



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

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

***MEDİCAGO LUPULİNA* VE *TRİFOLİUM ARVENSE*  
BİTKİLERİNİN ANTİOKSİDAN, ENZİM İNHİBİSYON VE  
ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Serap KÖKSAL BELLİKLİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**

**AKSARAY, 2025**

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 182362401 numaralı Doktora öğrencisi Serap KÖKSAL BELLİKLİ tarafından hazırlanan “*MEDİCAGO LUPULINA* ve *TRİFOLIUM ARVENSE* BİTKİLERİNİN ANTİOKSİDAN, ENZİM İNHİBİSYON VE ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Üye: Prof. Dr. Gökhan ZENGİN**

Selçuk Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Üye: Prof. Dr. Murat KAYA**

İstanbul Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Üye: Dr. Öğr. Üyesi Bülent ESKİN**

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

**Üye: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN YEŞİLDAL**

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 10/01/2025

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Fazliye KARABÖRK

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinallliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

**Serap KÖKSAL BELLİKLİ**



## TEŞEKKÜR

Tezsiz yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca tecrübeleri, donanımı ve engin bilgileri bana yol gösteren, pozitif kişiliği ile her zaman destek olan ve bu çalışmanın yürütülmesinde maddi ve manevi yardımını esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK ve ailesine, Selçuk Üniversitesi Fizyoloji-Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerekli çalışmaların yapılması ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Gökhan ZENGİN'e, bütün doktora eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen ve ilerlememe yardımcı olan Prof. Dr. Murat KAYA'ya, hücre kültürleri için laboratuvar ortamındaki çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Tuğçe KARADUMAN YEŞİLDAL'a, tezimin yazım aşamasında bıkıp usanmadan sorularımı cevaplayan Dr. Öğr. Üyesi Emel ÇAKMAK'a, bu çalışmada kullanılan bitki materyalinin teşhis edilmesinde bilgilerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Bülent ESKİN'e tez savunmama katılarak tavsiyelerde bulunan bütün hocalarıma sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarımda özellikle laboratuvarıda yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım İsmail ŞEN ve Ako Hamasaeed ABDULQADİR'e ve tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi olarak hiçbir desteğini benden esirgmeden her zaman arkamda duran, eğitim hayatımda beni her zaman motive eden anneme ve babama, eğitimimi tamamlayabilmek için onlarla vakit geçiremediğim zamanlarda bana moral veren eşim, oğlum ve kızıma teşekkürü bir borç bilirim.

Serap KÖKSAL BELLİKLİ

AKSARAY, 2025

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                         |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                                                                          | i    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                       | ii   |
| ÖZET.....                                                                                               | iv   |
| ABSTRACT .....                                                                                          | v    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                   | vi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                 | vii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                            | viii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                          | 1    |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ.....                                                                                 | 6    |
| 2.1 Fabaceae Familyası Genel Özellikleri.....                                                           | 6    |
| 2.1.1 <i>Medicago lupulina</i> 'nın sistematik şeması .....                                             | 6    |
| 2.1.2 <i>Trifolium arvense</i> 'nin sistematik şeması .....                                             | 7    |
| 2.3 Oksidatif Stres .....                                                                               | 11   |
| 2.4 Antioksidanlar .....                                                                                | 12   |
| 2.5 Fitokimyasallar .....                                                                               | 14   |
| 2.5.1 Fenolik bileşikler .....                                                                          | 16   |
| 2.5.2 Flavonoidler .....                                                                                | 16   |
| 2.5.3 Enzim inhibisyonu .....                                                                           | 18   |
| 2.5.3.1 Diyabetes mellitus ve enzim inhibisyonu .....                                                   | 19   |
| 2.5.3.2 Alzheimer hastalığı ve enzim inhibisyonu .....                                                  | 19   |
| 2.5.3.3 Hiperpigmentasyon ve enzim inhibisyonu.....                                                     | 20   |
| 2.5.3.4 Kanser ve antikanser özellikler .....                                                           | 20   |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                              | 22   |
| 3.1 Bitki Materyali .....                                                                               | 22   |
| 3.2 Bitki Ekstratlarının Elde Edilmesi.....                                                             | 22   |
| 3.3 Antioksidan Aktivite Metotları .....                                                                | 22   |
| 3.3.1 Toplam fenolik içerik.....                                                                        | 22   |
| 3.3.2 Toplam flavonoid içerik.....                                                                      | 23   |
| 3.3.3 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi .....                                                     | 23   |
| 3.3.4 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) .....                                                     | 24   |
| 3.3.5 Bakır iyonları indirgeme aktivitesi (CUPRAC) .....                                                | 24   |
| 3.3.6 ABTS radikal süpürme aktivitesi.....                                                              | 24   |
| 3.3.7 Toplam antioksidan kapasite.....                                                                  | 25   |
| 3.3.8 Metal şelatlama aktivitesi .....                                                                  | 25   |
| 3.4 Enzim İnhibisyon Testleri.....                                                                      | 25   |
| 3.4.1 Kolinesteraz inhibisyonu .....                                                                    | 25   |
| 3.4.2 Alfa-amilaz inhibisyonu.....                                                                      | 26   |
| 3.4.3 Alfa-glukozidaz inhibisyonu.....                                                                  | 26   |
| 3.4.4 Tirozinaz inhibisyonu .....                                                                       | 26   |
| 3.5 Hücreler ve kültür koşulları.....                                                                   | 27   |
| 3.5.1 MTT metodu ile bitki ekstratlarının antikanser ve sitotoksik<br>etkinliklerinin saptanması .....  | 27   |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....                                                                 | 28   |
| 4.1 Antioksidan Aktivite Bulguları.....                                                                 | 28   |
| 4.1.1 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> toplam fenolik içerik (TPC) ...              | 29   |
| 4.1.2 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin toplam flavonoid<br>içeriği..... | 31   |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.3 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin DPPH radikal<br>süpürme aktivitesi .....  | 33        |
| 4.1.4 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin ABTS radikali<br>süpürme aktivitesi ..... | 34        |
| 4.1.5 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin CUPRAC<br>indirgeme gücü .....            | 36        |
| 4.1.6 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin FRAP indirgeme<br>gücü .....              | 37        |
| 4.1.7 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin toplam<br>antioksidan kapasitesi.....     | 39        |
| 4.1.8 <i>Medicago lupulina</i> ve <i>Trifolium arvense</i> özütlerinin metal şelatlama<br>aktivitesi .....       | 40        |
| 4.2 Enzim İnhibisyon Testleri.....                                                                               | 41        |
| 4.2.1 Kolinesteraz inhibisyonu (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz) .....                                 | 43        |
| 4.2.2 $\alpha$ -amilaz and $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu.....                                                 | 45        |
| 4.2.3 Tirozinaz inhibisyonu .....                                                                                | 48        |
| 4.3 Hücre Kültürü Çalışmaları .....                                                                              | 49        |
| 4.3.1 Hücre hatları .....                                                                                        | 49        |
| 4.3.2 Uygulama örneklerinin hazırlanması.....                                                                    | 49        |
| 4.3.3 Antikanser ve hücre sitotoksosite deneyi.....                                                              | 49        |
| 4.3.4 Hücre kültürü ve MTT değerleri.....                                                                        | 50        |
| <b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>                                                                             | <b>56</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                            | <b>57</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                                                             | <b>69</b> |

## DOKTORA TEZİ

### ***MEDİCAGO LUPULİNA* VE *TRİFOLIUM ARVENSE* BİTKİLERİNİN ANTİOKSİDAN, ENZİM İNHİBİSYON VE ANTİKANSER ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Serap KÖKSAL BELLİKLİ**

**Aksaray Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**

#### ÖZET

Beklenen yaşam sürelerinin uzaması ve modern hayatın insanlara kazandırdıkları ile beslenme şeklinde gerçekleşen değişiklikler ile maruz kalınan dış etkenlere bağlı olarak tüm dünyada yaygınlığı giderek artan pek çok hastalık pandemiler oluşturmak üzere insanlığı tehdit etmektedir. Tüm bu hastalıklar için öncelikli olarak koruyucu yöntem arayışları hastalık oluşuktan sonra ise kolay uygulanabilen ve etkili olan tedavi yöntemi arayışları devam etmektedir. Tedavi sürecinde kullanılan sentetik kimyasal ilaçların yan etkileri ve ulaşılabilirliğinin daha zor olması sebebi ile bu ilaçların yerine kullanılabilecek fitokimyasal bileşenlerin içerik araştırmaları ve etkinliklerinin tespitini belirleyen çalışmaların değeri artmıştır. Ağır çevre şartlarında büyüyen bitkiler barındırdıkları çeşitli fitokimyasal bileşenler ile ön plana çıkmaktadırlar. Çalışmamızda Aksaray, Hasandağı civarında doğal yayılış alanlarından yetişen *Trifolium arvense* ve *Medicago lupulina* bitkilerinin sahip oldukları fitokimyasal bileşenler ile tedavide etkin olabilecekleri düşünülerek farklı özütlerinin (etil asetat ve metanol) biyolojik aktivitelerinin, enzim inhibisyon özelliklerinin ve hücre kültürü ile antikanser özelliklerinin araştırılması planlanmıştır. Tüm bu hedeflerle bitkilerimizin DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, PBD ve MCA yöntemleri ile toplam fenolik içerik oranları ve flavonoid içerik oranları ve antioksidan aktivite kapasiteleri tespit edilmiştir. Bütilkolin esteraz (BChE), asetilkolin esteraz (AChE), tirozinaz,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz testleri ile enzim inhibisyon aktivitelerini belirlemek için kullanılmıştır. Sonuçta tarafımızca yapılan çalışma ile *Trifolium arvense* ve *Medicago lupulina* bitkilerinin değerli bir fitokimyasal aktif kaynak olduğu, antioksidan aktivite kapasitesi ve enzim inhibisyon aktivitesi kapasitesi ile alzhemir, deri hastalıkları diyabet ve kanser hastalıkları gibi birçok hastalığın engellenmesi ve de tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antikanser Özellik, Biyolojik Aktivite, Enzim İnhibisyonu, Fitokimyasallar, *Medicago Lupulina*, *Trifolium Arvense*.

**Ocak, 2025; 69 sayfa**

## DOCTORATE THESIS

### ***MEDICAGO LUPULINA* AND *TRIFOLIUM ARVENSE* PLANTS ANTIOXIDANT, ENZYME INHIBITION AND ANTICANCER INVESTIGATION OF ITS FEATURES**

**Serap KÖKSAL BELLİKLİ**

**Aksaray University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biotechnology and Molecular Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Yavuz Selim ÇAKMAK**

#### **ABSTRACT**

Due to the prolongation of life expectancy and the changes in the way of nutrition and the changes in the way of nutrition and the prolongation of life expectancy, many diseases that are increasing in prevalence all over the world threaten humanity to create pandemics. For all these diseases, the search for preventive methods continues, and after the disease occurs, the search for easily applicable and effective treatment methods continues. Due to the fact that the side effects and accessibility of synthetic chemical drugs used in the treatment process are more difficult, the value of studies determining the content research and determination of the effectiveness of phytochemical components that can be used in these drugs has increased. Plants growing in severe environmental conditions come to the fore with various phytochemical components that they contain. In our study, it was planned to investigate the biological activities, enzyme inhibition properties and anticancer properties of different extracts (ethyl acetate and methanol) of *Trifolium arvense* and *Medicago lupulina* plants, which grow in their natural distribution areas around Aksaray, Hasandağı, considering that they may be effective in treatment with the phytochemical components they contain. With all these goals, the total phenolic content ratios and flavonoid content ratios and antioxidant activity capacities of our plants have been determined by DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, PBD and MCA methods. Inhibitory capacities of acetylcholine esterase (AChE), butyrylcholine esterase (BChE,  $\alpha$ -amylase), tyrosinase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes have been determined to determine enzyme inhibition activities. As a result, it is believed that *Trifolium arvense* and *Medicago lupulina* plants are a valuable phytochemical active source, with their antioxidant activity capacity and enzyme inhibition activity capacity, they can be used for the prevention and treatment of many diseases such as Alzheimer's, skin diseases diabetes, and cancer diseases.

**Keywords:** Anticancer Feature, Biological Activite, Enzym Inhibitions, Phytochemicals, *Medicago lupulina*, *Trifolium arvense*.

**January, 2025; 69 page**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 <i>Medicago lupulina</i> .....                                                                                                                                   | 7  |
| Şekil 2.2. <i>Trifolium arvense</i> .....                                                                                                                                  | 8  |
| Şekil 2.3. Antioksidanların sınıflandırılması. ....                                                                                                                        | 13 |
| Şekil 2.4. Fitokimyasalların sınıflandırılması.....                                                                                                                        | 15 |
| Şekil 4.1. <i>Medicago lupulina</i> antioksidan aktivite (IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonları grafiği. ....                                                               | 29 |
| Şekil 4.2. <i>Trifolium arvense</i> antioksidan aktivite (IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonları sonuçları. ....                                                             | 29 |
| Şekil 4.3. <i>Medicago lupulina</i> toplam fenolik içerik grafiği.....                                                                                                     | 30 |
| Şekil 4.4. <i>Trifolium arvense</i> TPC (mg GAEs/g özüt) sonuçlar.....                                                                                                     | 31 |
| Şekil 4.5. <i>Medicago lupulina</i> toplam flavonoid içerik grafiği.....                                                                                                   | 32 |
| Şekil 4.6. <i>Trifolium arvense</i> Toplam flavonoid içerik grafiği.....                                                                                                   | 33 |
| Şekil 4.7. <i>Medicago lupulina</i> DPPH içerik grafiği.....                                                                                                               | 33 |
| Şekil 4.8. <i>Trifolium arvense</i> DPPH içerik grafiği.....                                                                                                               | 34 |
| Şekil 4.9. <i>Medicago lupulina</i> ABTS içerik grafiği.....                                                                                                               | 35 |
| Şekil 4.10. <i>Trifolium arvense</i> ABTS içerik grafiği.....                                                                                                              | 35 |
| Şekil 4.11. <i>Medicago lupulina</i> CUPRAC içerik grafiği .....                                                                                                           | 36 |
| Şekil 4.12. <i>Trifolium arvense</i> CUPRAC içerik grafiği .....                                                                                                           | 37 |
| Şekil 4.13. <i>Medicago lupulina</i> FRAP içerik grafiği .....                                                                                                             | 38 |
| Şekil 4.14. <i>Trifolium arvense</i> FRAP içerik grafiği .....                                                                                                             | 38 |
| Şekil 4.15. <i>Medicago lupulina</i> PBD içerik grafiği .....                                                                                                              | 39 |
| Şekil 4.16. <i>Trifolium arvense</i> PBD içerik grafiği .....                                                                                                              | 40 |
| Şekil 4.17. <i>Medicago lupulina</i> metal şelatlama testi sonuçları grafiği.....                                                                                          | 40 |
| Şekil 4.18. <i>Trifolium arvense</i> metal şelatlama testi sonuçları grafiği.....                                                                                          | 41 |
| Şekil 4.19. <i>Medicago lupulina</i> enzim inhibisyonları.....                                                                                                             | 42 |
| Şekil 4.20. <i>Trifolium arvense</i> enzim inhibisyonları.....                                                                                                             | 43 |
| Şekil 4.21. <i>Trifolium arvense</i> etil asetat ve metanol ekstraktları ile 24 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları..... | 51 |
| Şekil 4.22. <i>Trifolium arvense</i> etil asetat ve metanol ekstraktları ile 48 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları..... | 51 |
| Şekil 4.23. <i>Trifolium arvense</i> etil asetat ve metanol ekstraktları ile 72 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları..... | 52 |
| Şekil 4.24. <i>Medicago lupulina</i> etil asetat ve metanol ekstraktları ile 24 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları..... | 52 |
| Şekil 4.25. <i>Medicago lupulina</i> etil asetat ve metanol ekstraktları ile 48 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları..... | 53 |
| Şekil 4.26. <i>Medicago lupulina</i> etil asetat ve metanol ekstraktları ile 72 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları..... | 53 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....                                                                                                                                                   | 10 |
| Çizelge 2.2. Reaktif nitrojen türleri (RNS).....                                                                                                                                                  | 11 |
| Çizelge 2.3. Oksidatif stresin sağlık üzerine etkileri. ....                                                                                                                                      | 12 |
| Çizelge 2.4. Karsinojenlerin sınıflandırılması ve bu sınıflara ait örnekler.....                                                                                                                  | 21 |
| Çizelge 4.1. <i>Medicago lupulina</i> antioksidan aktivite (IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonları<br>sonuçları.....                                                                                | 28 |
| Çizelge 4.2. <i>Trifolium arvense</i> antioksidan aktivite(IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonları<br>sonuçları.....                                                                                 | 29 |
| Çizelge 4.3. <i>Medicago lupulina</i> TPC (mg GAEs/g özüt) sonuçları.....                                                                                                                         | 30 |
| Çizelge 4.4. <i>Trifolium arvense</i> TPC (mg GAEs/g özüt) sonuçları.....                                                                                                                         | 31 |
| Çizelge 4.5. <i>Medicago lupulina</i> TFC (mg REs/g özüt) sonuçları.....                                                                                                                          | 32 |
| Çizelge 4.6. <i>Trifolium arvense</i> TFC (mg REs/g özüt) sonuçları.....                                                                                                                          | 32 |
| Çizelge 4.7. <i>Medicago lupulina</i> DPPH (mg TEs/g özüt) sonuçları.....                                                                                                                         | 33 |
| Çizelge 4.8. <i>Trifolium arvense</i> DPPH (mg TEs/g özüt) sonuçları.....                                                                                                                         | 34 |
| Çizelge 4.9. <i>Medicago lupulina</i> ABTS testi sonuçları.....                                                                                                                                   | 34 |
| Çizelge 4.10. <i>Trifolium arvense</i> ABTS sonuçları.....                                                                                                                                        | 35 |
| Çizelge 4.11. <i>Medicago lupulina</i> CUPRAC testi sonuçları.....                                                                                                                                | 36 |
| Çizelge 4.12. <i>Trifolium arvense</i> CUPRAC testi sonuçları.....                                                                                                                                | 36 |
| Çizelge 4.13. <i>Medicago lupulina</i> FRAP testi sonuçları grafiği.....                                                                                                                          | 37 |
| Çizelge 4.14. <i>Trifolium arvense</i> FRAP sonuçları.....                                                                                                                                        | 38 |
| Çizelge 4.15. Toplam antioksidan kapasite sonuçları.....                                                                                                                                          | 39 |
| Çizelge 4.16. <i>Trifolium arvense</i> toplam antioksidan kapasite sonuçları.....                                                                                                                 | 39 |
| Çizelge 4.17. <i>Medicago lupulina</i> toplam MCA sonuçları.....                                                                                                                                  | 40 |
| Çizelge 4.18. <i>Trifolium arvense</i> toplam MCA sonuçları.....                                                                                                                                  | 41 |
| Çizelge 4.19. <i>Medicago lupulina</i> enzim inhibisyonu (IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonları<br>sonucu.....                                                                                     | 42 |
| Çizelge 4.20. <i>Trifolium arvense</i> enzim inhibisyonu (IC <sub>50</sub> ) konsantrasyonları<br>sonucu.....                                                                                     | 42 |
| Çizelge 4.21. <i>Trifolium arvense</i> etil asetat ve metanol ekstraktları için hesaplanan<br>IC <sub>50</sub> değerleri HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde<br>canlılık sonuçları..... | 54 |
| Çizelge 4.22. <i>Medicago lupulina</i> etil asetat ve metanol ekstraktları için hesaplanan<br>IC <sub>50</sub> değerleri HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde<br>canlılık sonuçları..... | 55 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                   |                                                 |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>ABTS</b>                       | 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonat) |
| <b>ACAE</b>                       | Akarboz Eşdeğeri                                |
| <b>ACh</b>                        | Asetilkolin                                     |
| <b>AChE</b>                       | Asetilkolinesteraz                              |
| <b>AChEI</b>                      | Asetilkolinesteraz İnhibitörü                   |
| <b>AD</b>                         | Alzheimer Hastalığı                             |
| <b>AlCl<sub>3</sub></b>           | Alüminyum Klorür                                |
| <b>ATP</b>                        | Adenozin Trifosfat                              |
| <b>Aβ</b>                         | Bakır II Klorür                                 |
| <b>BChE</b>                       | Bütirilkolinesteraz                             |
| <b>BHA</b>                        | Butillenmiş Hidroksiyanozil                     |
| <b>BHT</b>                        | Butillenmiş Hidroksitoluen                      |
| <b>CAT</b>                        | Katalaz                                         |
| <b>ChAT</b>                       | Kolin Asetiltransferaz                          |
| <b>ChE</b>                        | Kolinesteraz                                    |
| <b>CuCl<sub>2</sub></b>           | Bakır II Klorür                                 |
| <b>CUPRAC</b>                     | Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite     |
| <b>DM</b>                         | Diabetes Mellitus                               |
| <b>DNA</b>                        | Deoksiribo Nükleik Asit                         |
| <b>DOPA</b>                       | 3,4-dihidroksifenilalanin                       |
| <b>DPPH</b>                       | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil                    |
| <b>DTNB</b>                       | 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)            |
| <b>FeCl<sub>2</sub></b>           | Demir (II) Klorür                               |
| <b>FeCl<sub>3</sub></b>           | Demir (III) Klorür                              |
| <b>FRAP</b>                       | Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç         |
| <b>g</b>                          | Gram                                            |
| <b>GAE</b>                        | Gallik Asit Eşdeğeri                            |
| <b>GALAE</b>                      | Galantamin Eşdeğeri                             |
| <b>GSH</b>                        | Glutatyon                                       |
| <b>GSH-RD</b>                     | Glutatyon Redüktaz                              |
| <b>GSH-PX</b>                     | Glutatyon Peroksidaz                            |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen Peroksit                               |
| <b>HNO<sub>3</sub></b>            | Peroksinitröz Asit                              |
| <b>HO<sub>2</sub></b>             | Hidroperoksil                                   |
| <b>HOCl</b>                       | Hipokloröz Asit                                 |
| <b>KAE</b>                        | Kojik Asit Eşdeğeri                             |
| <b>KOAH</b>                       | Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı             |
| <b>M</b>                          | Molar                                           |
| <b>MCA</b>                        | Metal Şelatlama                                 |
| <b>mg</b>                         | Miligram                                        |
| <b>ml</b>                         | Mililitre                                       |

## SİMGELER VE KISALTMALAR (DEVAM)

|                                     |                                 |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Mm</b>                           | Milimolar                       |
| <b>Mmol</b>                         | Milimol                         |
| <b>MVA</b>                          | Mevalonat                       |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> | Sodyum Karbonat                 |
| <b>NFT</b>                          | Nörofibriler Yumaklar           |
| <b>nm</b>                           | Nanometre                       |
| <b>NO<sup>-</sup></b>               | Nitrik Oksit                    |
| <b>NO<sub>2</sub></b>               | Nitrojen Dioksit                |
| <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>   | Peroksinitrit                   |
| <b>O<sub>3</sub></b>                | Ozon                            |
| <b>OH<sup>-</sup></b>               | Hidroksil                       |
| <b>PBD</b>                          | Fosfomolibdat                   |
| <b>RE</b>                           | Rutin Eşdeğeri                  |
| <b>RNS</b>                          | Reaktif Nitrojen Türleri        |
| <b>RO<sup>-</sup></b>               | Alkoksil                        |
| <b>ROO<sup>-</sup></b>              | Peroksil                        |
| <b>ROS</b>                          | Reaktif Oksijen Türleri         |
| <b>SOD</b>                          | Süperoksitdismutaz              |
| <b>TBHQ</b>                         | Üçüncül Bütilhidrokinon         |
| <b>TE</b>                           | Troloks Eşdeğeri                |
| <b>TFC</b>                          | Toplam Flavonoid İçerik         |
| <b>TPC</b>                          | Toplam Fenolik İçerik           |
| <b>TPTz</b>                         | 2,4,6-tripiryidyl-s-triazine    |
| <b>TRİS-HCl</b>                     | Tris (Hidroksimetil) Aminometan |
| <b>µg</b>                           | Mikrogram                       |
| <b>µg</b>                           | Mikrogram                       |
| <b>µl</b>                           | Mikrolitre                      |
| <b>µmol</b>                         | Mikromol                        |
| <b>%</b>                            | Yüzde                           |
| <b>°C</b>                           | Santigrat                       |

## 1. GİRİŞ

Canlılığın vazgeçilemez unsurları beslenme, barınma ve neslin devamıdır. Beslenme için en kolay şekilde elde edilebilen ve içeriği en kapsamlı olan kaynaklar her zaman tercih sebebidir. Canlılığın devamının sağlanması ve bu sürecin sağlıklı olarak geçirilmesi her zaman önceliklidir. Beslenmeyi sağlarken aynı zamanda besin kaynaklarının gerek hücresel yapıda gerekse organlar üzerinde iyileştirici etkisinin olması tercih sebebidir.

2000’li yılların başından itibaren daha yoğun adını duyduğumuz fonksiyonel tıp yönünden bakış temeli sistemik biyolojiye dayanan bir bakıştır. Hastalıkların akut döneminde semptomların hissedilmesinin azaltılmasının rahatlatıcı etkisini kabul etmekle birlikte, hastalıkların oluşumunda yer alan sebepleri araştırmaya ve sebeplerin önlenmesine çalışır. Fonksiyonel tıp kişinin yaşam tarzında yer alan ve hastalıklara zemin hazırlayan faktörleri belirleyip bunların değiştirilmesini sağlayarak, koruyucu hekimliği ön plana çıkarır (Özkaya, 2021).

Fonksiyonel tıp modeline göre kronik hastalıkların oluşum aşamasında fizyolojik sistemlerde oluşan işlevsel zayıflıklar ön plandadır. Fonksiyonel tıp, kronikleşen hastalıklara doğru ilerleyen süreci belirleyebilme ve fizyolojik sistemlerdeki zayıflıkları güçlendirerek hastalık sürecini tersine çevirebilme bilim ve sanattır (Türel, 2019).

Kronik sağlık sorunlarıyla başa çıkabilmek için fonksiyonel tıp; kişinin en iyi yaşamsal değerlere kavuşabilmesi için vücutta eksik olanı tamamlamayı ve en iyi yaşamsal değerlere kavuşabilmesi için bu duruma ulaşmaya önleyici olan faktörleri ortadan kaldırmayı amaçlar (Grisanti, 2013).

Besinlerin ve beslenme şeklinin sağlık üzerindeki etkileri, diyet ile alınan gıdaların sağlığı olumlu yönde ilerletmesi şuuru, kişilerin yiyecek seçimlerini ve yeme davranışlarını şekillendirmektedir (Boluda ve Capill, 2017). Söz konusu bilinç artışı, gıda ve sağlıklı yaşam arasındaki ilişki bağlantısını araştıran çalışmaların artmasına olanak sağlamış ve fonksiyonel gıda tanımı literatüre eklenmiştir. Fonksiyonel gıdalar; yaşam için gerekli olan asıl gıda ögesi ihtiyaçlarını karşılamamanın yanında, sağlığın geliştirilmesinde ve hastalıklardan korunmada görevli olan, biyoaktif faktörler ihtiva

eden gıda veya gıda tamamlayıcısı olarak ifade edilir. Fonksiyonel gıda, gıdanın tabii yapısında yer alan aktif bir bileşke halinde bulunmanın yanında, laboratuvar ortamındaki işlemler ile biyoaktif öğelerle içeriği artırılmış ve sağlık yönünden pozitif katkıları olan bir gıda da olabilir. Canlılığın sürekliliği için ihtiyaç duyulan gıda ve enerji unsurlarını ihtiva eden bütün gıdalar temelde fonksiyonel gıda olarak ifade edilebilir (Crowe ve Francis, 2013; Büyüktuncer, 2018).

Son 40 yıldır gündemde olan fonksiyonel besin kavramı yeni bir kavram değildir. İnsanlığın varoluşundan beri kolay ulaşılabilirliği ile bitkisel kaynakların sağlıklı yaşamın devamını sağlamak amacıyla ve hastalıklarda tedavi edici olarak kullanıldığına dair kaynaklar mevcuttur. Bu konudaki en eski kaynaklar Sümerlere ait kil bir levhada günümüzden 5000 yıl önce yazılmış olarak tespit edilmiştir. Mısır, Yunan ve İslam medeniyetlerinden günümüze ulaşan birçok kaynaktada bitkisel kaynakların tedavi edici etkisinden faydalandığına dair bilgiler karşımıza çıkmaktadır (Süntar, 2020).

Sebze, meyve ve tahılların içeriğinde 8000 değişik fitokimyasal bileşen bulunduğu bilinmektedir (Yalçın, 2016). Günlük diyetle alınan meyvelerde ve sebzelerde bulunan fitokimyasallar vücudumuzu dejeneratif hastalıklardan korurlar (Çiçek, 2016). Fitokimyasal bileşenlerin alt sınıfları flavonoidler, izoflavonlar, indoller, karotenoidler, lignanlar, saponinler, monoterpenler, organosülfür bileşikleri ve polifenoller olarak tanımlanmaktadır. Antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antitoksik, antifungal, antialerjik, antikarsinojenik, immünomodülatör, nöroprotektif ve antihipertansif aktivite sahibi fitokimyasal bileşenler vardır. Flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, diyabet, kanser ve osteoporoz ilk sıralarda gelmek üzere günümüzde pek çok hastalığın tedavisi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Çiçek, 2016; Shandilya ve Sharma, 2017).

Günümüzde son zamanlarda oksidatif stresin birçok kronikleşmiş hastalığın açığa çıkmasında aktif rol üstlendiği tespit edilmiş ve oksidatif stresin engellenmesi amacıyla antioksidan etkiye sahip fitokimyasal bileşenlerin kullanılması tavsiye edilmektedir (Yalçın, 2016). Fitokimyasal bileşenler, oksidanların ve reaktif oksijen türlerinin inhibe edilmesine yönelik enzim yapımını uyararak antioksidan aktivite ortaya koymaktadır.

Canlılığın sürdürülmesi için moleküler oksijen gereklidir. Tüketilen oksijenin girmiş olduğu metabolik reaksiyonlar sonucunda %1-3 ü ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ne ve hücrel redoks reaksiyonları ile açığa çıkan RNS (Reaktif Nitrojen Türleri)ne dönüşür. ROS oluşumu konsantrasyonuna göre toksik olabilir (Seifried vd., 2007). Endojen karsinojenlerden çok bilinenleri oksijen ve nitrojen kaynaklı ROS ve RNS (Reaktif Nitrojen Türleri) olarak ifade edilen radikallerdir. İnsan vücudunda ROS ve RNS türleri düşük ve orta konsantrasyonlarda hücrel reaksiyonlar ve bağışıklık sisteminde koruyucu etkiler gösterebilir; yüksek konsantrasyonlarda hücre zarında oksidatif yönden tahrip geliştirir. Bu hasar sonrasında da kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalık gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıklar ortaya çıkar (Sies, 1997; Pham-Huy vd., 2008).

Antioksidan savunma mekanizmaları oksidatif stres aracılığı ile oluşan hücrel hasarı ve hastalıkları önleyici rol oynamaktadır. Antioksidanlar enzimatik olan veya nonenzimatik olan diye sınıflandırılabilir. Non-enzimatik antioksidanlar A, C ve E vitaminleri, alfa lipoik asit, koenzim Q10, karışık karotenoidler, glutatyon, farklı biyoflavanoidler, antioksidan mineraller (bakır, mangan, çinko ve selenyum) ve albümin, folik asit, ürik asit, B1, B2, B6 ve B12 vitaminleri gibi enzim tetikleyicileridir. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-PX), katalaz (CAT) ve glutatyonredüktaz (GSH-RD) dan oluşmakta olan grup ise enzimatik antioksidanlar grubudur. Normal yaşamsal koşullarda sinyal iletimini, bağışıklık cevabını ve proliferasyonun düzenlenmesini antioksidanlar gerçekleştirmektedir. ROS nin sebep olduğu diyabetik komplikasyonlar, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların engellenmesi ve tedavi edilmesinde antioksidanlar iyi bir alternatiftir (Maritim vd., 2003).

Antioksidanlar, canlıdaki metabolik aktivitelerle oksidatif stres sonrası ortaya çıkan serbest radikaller tarafından tetikleyen reaksiyonları önleyen veya tamamen durduran, böylece hücre boyutundaki hasarı geciktiren ya da önleyen moleküllerdir. Vücudumuzda hücre içi ve hücre dışı alanda hem enzim özellikli hem de non-enzim özellikli antioksidanlar bulunmaktadır (Finaud vd., 2006; Nimse ve Pal, 2015).

Enzimler ise metabolizmamızın ve canlılığımızın devamı için gerekli olan anahtar kilit mekanizmasına göre çalışan moleküller olup vücudumuzda birçok metabolik reaksiyonda ana rolü üstlenmektedirler. Enzimlerin gerek invitro gerekse invivo testler

ile aktivitelerini yavaşlatan veya tamamen durduran kimyasal bileşikler enzim inhibitörü olarak tanımlanırlar (Chauhan vd., 2012; Robin vd., 2018) Enzim inhibitörleri özellikle kronik hastalıkların oluşum mekanizmalarının netleşmesi ile ilaç sektöründe ilgi alanı haline gelmiştir. Biyokimya ve farmakoloji alanındaki ilerlemelerle keşfi artan enzim inhibitörleri hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadırlar (Balbaa ve El Ashry, 2012).

Canlı devamında hücrelerin çoğalması ve fonksiyonunu yitiren hücrelerin ortadan kaldırılması denge halinde görülmektedir. Dengenin çoğalma ya da ortadan kaldırılarak azaltılması yönünde değişmesi hastalıklar olarak karşımıza çıkmaktadır. Hücrelerin yanlış ve aşırı şekilde çoğalmaya başlaması DNA yapısındaki bozukluklara rağmen çoğalmaya devam etmesi etrafındaki ve uzak dokulara invazyonu olması doku ve organların fonksiyon kaybıyla ilerleyen morbiditesi yüksek ve tedaviyle engellenemez ise mortalite ile sonuçlanan hastalıkların genel adı kanserdir. Kanser hücrelerinin ortak özellikleri birçok çalışma ile tanımlanmış bu özellikler sırası ile hücre bölünmesinin sürekli olarak uyarılması, büyümesini baskılayan faktörlerin görev yapmaması, DNA yapısındaki bozukluk hücrenin ölümüne yani apoptozuna karşı direnç, büyümeye devam eden hücrelere yeni damar oluşumunun yani anjiyogenezin uyarılması ve yeni oluşan hücrelerin dokuya invazyon ve metastaz yapma yeteneğidir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser tedavisi için cerrahi müdahale radyo terapi kemoterapi ya da bunların kombinasyonu mevcut duruma göre tercih edilebilmektedir. Kemoterapötik ajanlar içerisinde yan etkisi az olan bununla birlikte hücre kanser hücresi üzerindeki etkisi en yüksek olan ajanlar tercih edilmektedir. Yan etkinin azaltılabilmesi amacıyla bitkisel kaynaklar öncelikle tercihtir ve çalışmalar bunun üzerine yoğunlaşmıştır. İn vitro ortamlarda gerçekleşen bitki ekstrelerinin hücre hatları üzerindeki etkileriyle ilaç geliştirme çalışmaları yönlendirilmektedir.

Çalışmamızda kullanılan *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* bitkileri ülkemizde ve ilimizde oldukça kolay bulunan bitkiler olup, halk arasında bilinen özellikleri ile tıbbi amaçla kullanımları göz önünde bulundurularak çalışmamız planlanmıştır. Fabacea ailesinden farklı türler ile çalışmalar yapılmış olsada literatür taramasında *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* bitkileri ile ilgili yapılan çalışmalar bulunamamıştır. Bunun üzerine tez çalışmamız planlanarak Aksaray, Hasandağı

civarında doğal yayılış alanlarından 2020 yılı vejetasyon dönemlerinde toplanmış, gölgede kurutularak karanlık uygun ortamda saklanmış olan bitki örneklerimizin farklı özütlerinin (etil asetat, metanol) toprak üstü bölümlerinin antioksidan kapasitelerinin, enzim inhibisyon özelliklerinin ve hücre hattındaki hareketlerinin tanımlanması ile antikanser özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Fabaceae Familyası Genel Özellikleri

Orchidaceae ve Asteraceae familyalarından sonra yaklaşık 751 cins ve 19000 i aşkın tür ile en büyük üçüncü familya Fabaceae familyasıdır (Christenhusz ve Byng, 2016). Ağaçlar, çalılar, otsu bitkiler ve sarmaşık gibi farklı bitkisel formları içermekte olan familya geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Bütün yeryüzünde geniş bir alana yayılış gösteren bitki türü otsu bitki türleri ve çalılar iken ağaçlar daha çok tropik bölgelerde yer almaktadır (Watson ve Dallwitz, 2008). Eski Çağlardan beri baklagiller bol yetişmesi ve çeşitliliği sebebi ile gıda ve tıbbi amaçlarla kullanılmışlardır. Çok yıllık otsu bitkilerle ekolojik dengeleyici özelliği ile baklagiller meraların bileşiminde yaygın olarak bulunmaktadır (Nyfeler vd., 2011; Gaba vd., 2015). Fabaceae ailesi öğelerinin çoğunluğu atmosferde yer alan azotu sabitleyebilme niteliğindeki bakterilerle birlikte mutualist yaşam şekli ile azot içeriği az seviyedeki topraklarda bile yetişebilmekte yüksek seviyede protein miktarına sahip olabilmektedir (Suter vd., 2015; Vertes vd., 2015). Bu sayede gıda sektöründe ve hayvancılıkta zengin bir gıda kaynağı olabilmelerinin yanı sıra kullanılan gübre miktarını da azaltmaktadırlar.

#### 2.1.1 *Medicago lupulina*'nın sistematik şeması

*Medicago lupulina* L. (Şerbetçiotu Yoncası) Fabaceae (Leguminosae) familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Diğer medicago türleri gibi öncelikli olarak yem sanayinde kullanılmakla beraber ilaç ve süs bitkisi olarak da tercih edilmektedir. Toprak istekleri az olduğundan soğuğa dayanıklı kurak ve taş arazilerde yetişebilmektedir (Aşk, 1987; Davis, 1985). Isparta yöresinde yapılan bir çalışmada bitkinin adaptasyonunun çok iyi olup hızlı bir şekilde yayılma özelliği gösterdiği gözlemlenmiştir bu özelliği sebebiyle çimlere alternatif bir tür olabileceği belirtilmiştir (Gül vd., 2012). *Medicago* türleri faydalı bileşenleri ve yüksek protein içeriği nedeniyle hayvanlarda yem olarak oldukça değerlidir (Yildiz; 2005). Bazı ülkelerde yaprakları yüksek protein içeriği sebebiyle çorba salata ve sandviçlerde tercih edilmektedir (Facciola S. 1990).

*Medicago lupulina*'nın sistematik şeması aşağıdaki gibidir;

Kingdom: Plantae  
Subkingdom: Tracheobionta  
Division: Magnoliophyta  
Class: Magnoliopsida  
Subclass: Rosidae  
Order: Fabales  
Family: Fabaceae  
Genus: Medicago  
Species: *Medicago lupulina*



Şekil 2.1 *Medicago lupulina*.

### 2.1.2 *Trifolium arvense*'nin sistematik şeması

*Trifolium arvense* bir yıllık yaşam sürecinde dik ve yükselici büyüme özelliğine sahiptir, yaklaşık 5–30 cm uzamakta olan bir yonca türüdür. Morumsu veya pembe renkli çiçeklere sahip, 30 cm'ye kadar uzayabilen otsu bir bitkidir. Diğer tüm yoncalar gibi yaprakları sapsız 3 yaprakçığa bölünmüştür (Zohary, 1970).

Azotu sabitleme özellikleri ile düşük verimli topraklara ekildiği zaman toprağı daha verimli bir yöne çevirir. Türkiye de “tavşanayağı” olarak bilinen *Triforium arvense*, Kutup bölgeleri hariç Avrupa’nın birçok bölgesinde ve Batı Asya’da doğal olarak yetişir. Hayvancılıkta meralarda otlatma esnasında keçi ve koyunlar tarafından tüketilir (Çağan vd., 2015). Azot fiksasyon bitkisidir ve düşük azotlu topraklarda örtü bitkisi olarak kullanılmıştır. Kumlu topraklarda güneşte en iyi şekilde büyür. Trifolium türleri, halk arasında küçük çocuklarda mide bağırsak hastalıkları, gut ve romatizma, yaraların tedavisi ve terleme durumlarında ayak bakımı için kullanılır (Baytop, 1999).

*Trifolium arvense*’ nin sistematik şeması aşağıdaki gibidir;

|             |                          |
|-------------|--------------------------|
| Kingdom:    | Plantae                  |
| Subkingdom: | Tracheobionta            |
| Division:   | Magnoliophyta            |
| Class:      | Magnoliopsida            |
| Subclass:   | Rosidae                  |
| Order:      | Fabales                  |
| Family:     | Fabaceae                 |
| Genus:      | Trifolium                |
| Species:    | <i>Trifolium arvense</i> |



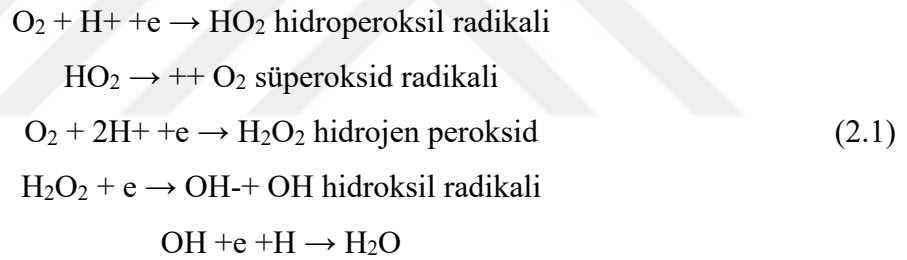
Şekil 2.2. *Trifolium arvense*.

## 2.2 Serbest Radikaller

Molekül diziliminde dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, enerjisi yüksek atomlar veya moleküller serbet radikallerdir (Halliwell ve Gutteridge, 1985). Taşıdıkları eşlenmemiş elektronlar sebebi ile serbest radikaller reaksiyona çok kolay katılırlar ve bu durumları biyolojik sistemlerde önem taşır. Bir orbitalinde eşlenmemiş bir elektron taşıyan ve elektronları zıt yönde hareket etmekte olan bileşikler bu hareketlerinden dolayı manyetik alan oluşturmaktadırlar. Serbest radikaller reaksiyona girdikleri moleküllerden ya elektron alırlar veya elektron verirler (Valko vd., 2007).

Serbest radikal kaynaklarının en önemlisi aerobik metabolizmaya sahip olan memelilerdeki oksijenin suya indirgenmesi esnasında yer alan tek elektron aktarılması ile oluşmakta olan reaktif partiküllerdir (Reilly vd, 1991).

Oksijenin indirgenmesi reaksiyonları (Denklem 2.1);



Hızlı bir şekilde hidrojen peroksit ve oksijen oluşturan süperoksit radikali kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Süperoksit radikali linin protonla almış şekli olan hidroperoksil radikali daha kuvvetli bir oksidan moleküldür. Reaksiyon ortamında demir ve bakır gibi taşıyıcı metaller olmadığında oldukça sabit olan hidrojen peroksit ise zayıf bir oksidoredüktandır ve katalaz, glutatyon peroksidaz (GSHPx) enzimleri ile parçalanır (Gaelani vd., 1989). Süperoksit radikalinden ya da demir yolları ile hidrojen peroksit radikalinden oluşan lipid peroksidasyonunu uyaran başlıca radikal olan hidroksil radikali (Halliwell vd., 1984).

Miyeloperoksidaz (MPO) HEM içeren bir enzim olup fagosit sitoplazmasında yer alır hipoklorik asit (HOCl) oluşumunu katalize eder. Demir tuzları veya süperoksit radikali ile reaksiyona giren hipoklorik asit, hidroksil radikali oluşumunu sağlar (Simpson vd., 1993; Klebanoff vd., 1980).

Endojen serbest radikaller ile birleşerek nitrik oksit peroksinitrit radikalini oluşturmaktadır. Peroksinitrit radikalinden de kolaylıkla hidroksil radikali oluşabilmektedir. Elektron transport zinciri sırasında oksijenin suya indirgenmesiyle süperoksit radikali oluşur (Halliwell vd., 1993). Doymamış yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunda rol oynayan sitokrom p 450 ve sitokrom b 5 reaksiyonları sırasında serbest radikaller oluşur (Jabs vd., 1995). D Aminoasit oksidaz, ürat oksidaz, acil-KoA oksidaz gibi enzimleri içermekte olan peroksizomlarda kuvvetli bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynağıdır. Plazma membranında yer alan lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerinin katalize ettiği reaksiyonlar sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır (Kellogg vd., 1977; Patel vd., 2018; Snezhkina vd., 2019). Tüm bu serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS) adı altında toplanmaktadır. Nitrojen atomları ihtiva eden reaktif nitrojen türleri (RNS); Nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub>), Nitrik oksit (NO<sup>-</sup>) ve radikal olmayan bileşikler, yani peroksinitrit (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), peroksinitröz asit (HNO<sub>3</sub>) ve nitröz oksit (N<sub>2</sub>O) gibi endojen serbest radikallerdendir (Shields vd., 2021).

Tüm bu ROS ve RNS ler endojen serbest radikallerdir. Hücre zar yapısında yer alan poliansatüre yağ asitlerinin okside edilmesini ihtiva eden lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılır. Lipit peroksidasyonu birçok klinik tablonun patogeneğinde rol oynamaktadır. İskemi hemoraji travma, kronik metabolik hastalıklar olan diyabet bazı karaciğer hastalıkları ve ateroskleroz bu hastalıklardan bazılarıdır (Jeroudi vd., 1994; Çetinkale vd., 1997; Konukoğlu vd., 1997; Taşçı vd., 1997).

**Çizelge 2.1.** Reaktif oksijen türleri (ROS).

| <b>Radikaller</b>             | <b>Nonradikaller</b>                            |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| Süperoksit O <sub>2</sub>     | Hidrojen peroksit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| Hidroksil OH                  | Hipokloröz asit HOCl                            |
| Peroksil ROO                  | Hipobromöz asit HOBr                            |
| Alkoksil RO                   | Singlet oksijen <sup>1</sup> O <sub>2</sub>     |
| Hidroperoksil HO <sub>2</sub> | Ozon O <sub>3</sub>                             |
| Lipid peroksil LOO            |                                                 |

**Çizelge 2.2.** Reaktif nitrojen türleri (RNS).

| <b>Radikaller</b>                | <b>Nonradikaller</b>                               |
|----------------------------------|----------------------------------------------------|
| Nitrik oksit NO                  | Nitrosil katyonu NO <sup>+</sup>                   |
| Nitrojen dioksit NO <sub>2</sub> | Nitroksil anyonu NO <sup>-</sup>                   |
|                                  | Dinitrojen tetroksid N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> |
|                                  | Dinitrojen trioksit N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  |
|                                  | Peroksinitrit ONOO <sup>-</sup>                    |
|                                  | Peroksinitrik asit ONOOH                           |
|                                  | Nitronyum katyonu NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>     |
|                                  | Nitril klorid NO <sub>2</sub> Cl                   |
|                                  | Alkil peroksinitrit ROONO                          |

### 2.3 Oksidatif Stres

İnsan vücudunda yer alan antioksidan müdafa sistemi ve oksidan öncüllerinin düzeyleri arasındaki dengenin, oksidan öncüllerine yönelik bozulması oksidatif stres diye tanımlanır. Başka bir ifade ile dokuların yapısında yüksek değerlerde açığa çıkan, üretilen ROS'ların atılamayarak birikmesi ile metabolik sistemin reaktif ürünleri ortadan kaldırma kabiliyeti arasında dengesizlik oluşması ifadesidir (Forman ve Zhang, 2021; Pizzino vd., 2017; Powers ve Jackson, 2008). Hücre düzeyinde oluşan oksidatif stres ile artan serbest radikaller biyomoleküllerden protein, nükleik asit, lipidlerin oksitlenmesi sonucu, protein yapısındaki DNA ve kodlanan bilgilerde bozukluk oluşmasına, arkasından hücre membran bütünlüğünün hasarı ile bozulmasına ve enzim aktivitesinin engellenmesine şeklinde çok fazla sonuç oluşmaktadır (Packer, 1997). Günümüzde sık görülen inflamasyon, romatoid artrit, damar sertliği, kanser, obezite, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların öngörülen asıl nedenleri içerisinde oksidatif stres yer almaktadır. Yarılanma ömürleri çok kısa olan serbest radikallerin rol aldığı oksidatif stres değerini doğrudan ölçmek mümkün değildir (Close vd., 2005). Bu sebepten bazı biyo-işaretleyici ajanlar kullanılarak protein, lipid ve DNA gibi önemli yapıların bozulmasının olup olmadığı veya ne kadar bir zarara maruz kaldıkları belirlenmektedir (Fisher-Wellman ve Bloomer, 2009). Nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer hastalığının (AD) ana nedeni lipoperoksidasyon sonucu membran fosfolipidlerinin azalmasıdır. Artan lipid oluşumu ile azalan antioksidan enzim aktiviteleri beyinde plak oluşumuna sebep olmaktadır. Alzheimer hastalarının beyin dokusunda ve beyin omurilik sıvısında akrolein, hidroksinonenal ve akrolein gibi oksidatif stres belirteci olan ajanlar gösterilmiştir. ROS üretimi ile birlikte nöronlarda glikoz taşıyıcısı GLUT3 ün, membran

proteinlerinin fonksiyonlarının, iyon transpotunun, glutamat taşıyıcılarının, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz pompasının, kinazların aktivitesinin bozulmasına sebep olarak nörodejeneratif hastalıkların oluşmasına yol açmaktadır (Pisoschi vd., 2015).

Oksidatif stres vücutta hiperglisemiye sebep olarak hiperglisemide hücrese düzeyde oksidatif stresi artırarak diyabet hastalığı oluşumundaki kompleks mekanizmayı tetiklemektedir (West, 2000). Diyabette glukozun kendi kendine oksidasyonu yoluyla glikozillenmiş antioksidan enzimler ve proteinler oksijen radikallerini toksik etkisini ortadan kaldıramadıklarından radikal oluşumu artmaktadır (Wolff, 1993; Giugliano vd., 1995). Tüm bunlarla birlikte diyabette oksijen radikallerinin oluşumuna sebep olan farklı iki reaksiyon vardır. Bunlardan ilki glukoz metabolizması ile üretimi yükselen NADPH düzeyi sayesinde artmış glukoz seviyelerinin sitokrom P450 benzeri reaksiyonu stimüle etmesidir (Jain, 1989). İkincisi ise Tip 1 DM un ayırıcı niteliği olan ketozisin diyabeti olan hastalarda oksijen radikal üretimini artırmasıdır (Jain vd., 1998).

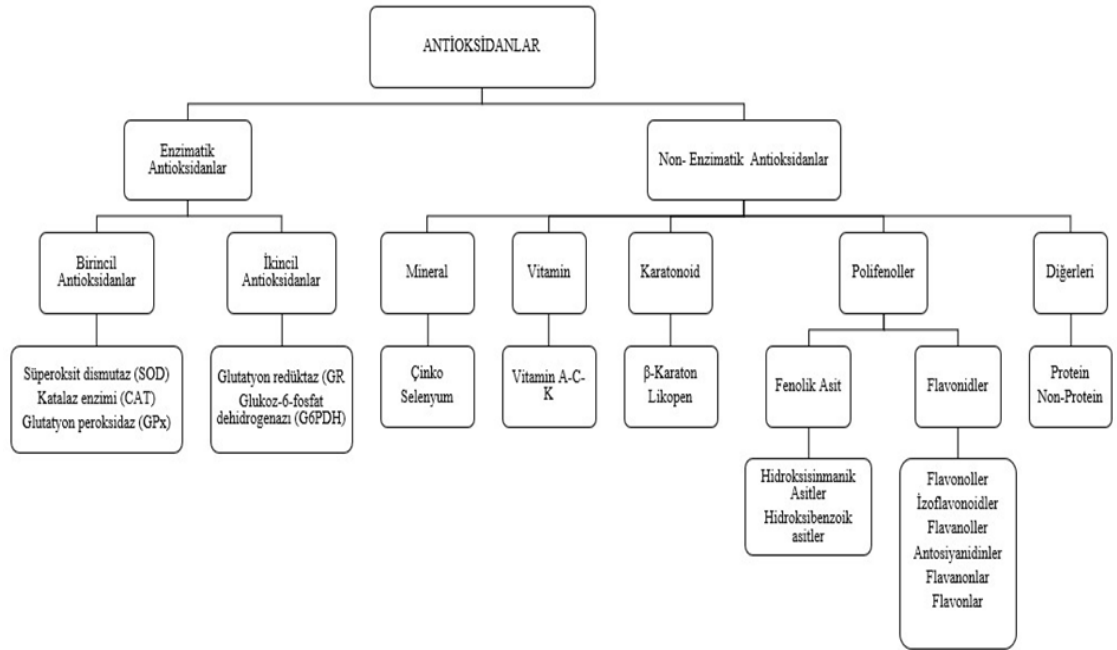
**Çizelge 2.3.** Oksidatif stresin sağlık üzerine etkileri (Barnes, 2020).

| <b>Solunum</b> | <b>Kardiyovasküler</b> | <b>Eklem/Deri</b> | <b>Nörolojik</b> | <b>Çoklu sistem</b> |
|----------------|------------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| Astım          | Hipertansiyon          | Gut               | Alzheimer        | Diyabet             |
| KOAH           | Ateroskleroz           | Dermatit          | Parkinson        | Kanser              |
| Bronşit        | Kardiyomiyopati        | Romatoid Artrit   | Hafıza Kaybı     | Fibromiyalji        |
|                | Anjino pektoris        |                   |                  | Otoimmünite         |

## 2.4 Antioksidanlar

Antioksidan savunma sistemleri hücrelerde DNA, lipit ve protein gibi oksidasyona uğratabilecek moleküllerin serbest radikaller aracılığı ile oksidasyonunu engelleyen ya da geciktirilen maddeler olan antioksidanlardan oluşur. Serbest radikallere elektron transferi yaparak kararlı hale gelmelerini sağlayan antioksidanlar hücrese düzeyde hasarın önüne geçerler. Serbest oksijen radikallerini uyararak tutulmalarını sağlayarak ya da güçsüz bir moleküle çevirdikleri oksidanlar ile temizleme etkilerini gösterirler. Oksidanlara kattıkları bir hidrojen ile reaksiyon hızını da azaltarak baskılama etkilerini gösterirler. Flavonoidler ve vitaminler baskılama etkisiyle antioksidan özellik sağlarlar lipit protein ve DNA yapılarında oluşan hasarın onarılması ile antioksidanlar onarma etkisini gerçekleştirir. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak ya da zincirlerini kırmak suretiyle işlevlerinin engellenmesini zincir koparma etkileriyle sağlarlar.

Antioksidanlar baskılama fonksiyonu, temizleme fonksiyonu, onarma fonksiyonu bir de zincir koparma fonksiyonu olarak 4 farklı mekanizma ile oksidasyonu engellerler (Valko vd., 2007). Antioksidanlar enzimatik olan ve olmayanlar olmak üzere 2 farklı sınıfa ayrılırlar ve bu 2 sınıf doğal antioksidanları oluştururlar. Hücresel düzeyde üretilmekte olan antioksidanlar enzimatik olarak isimlendirilirken, vücuda beslenme ve diyet ile alınan antioksidanlar ise enzimatik olmayanlar olarak isimlendirilir. Katalaz süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz serbest radikallere karşı birinci basamak olarak üretilen ve enzimatik olan antioksidanlardır (Ighodaro vd., 2018). Antioksidanların beslenme ile vücuda alınan ve enzimatik olmayan çeşitleri tahıllarda yaygın olarak bulunan fenolik maddeler, vitaminlerden A, E ve C, meyve ile sebze, baharat ve kateşin, resveratrol ile kuersetin gibi flavonoidlerdir (Aslankoc vd., 2018; Lotito ve Fraga, 1998; Postaci vd., 2018). Günümüze kadar yapılan fazlaca çalışmada, enzim içerikli antioksidanların (SOD, CAT, GSH-Px) ve enzim içerikli olmayan antioksidanların (C Vitamini, E Vitamini, karotenoidler, lipoik asit ve diğerleri) hücreyi ve dokuları oksidatif stresin zararlarından koruyucu olduklarını ve çeşitli görevleri olduğunu göstermektedir (Kojo ,2004; Topsakal vd., 2016; Saygin vd., 2018).



**Şekil 2.3.** Antioksidanların sınıflandırılması.

Hücreyi buna bağlı olarak bütün vücudu oksidatif hasara karşı koruyan antioksidanların, insan vücudu tarafından üretilenlerinin etki mekanizmaları açıklandıkça sentetik antioksidanlara karşı ilgi ve çalışmalar artmıştır. Yağların

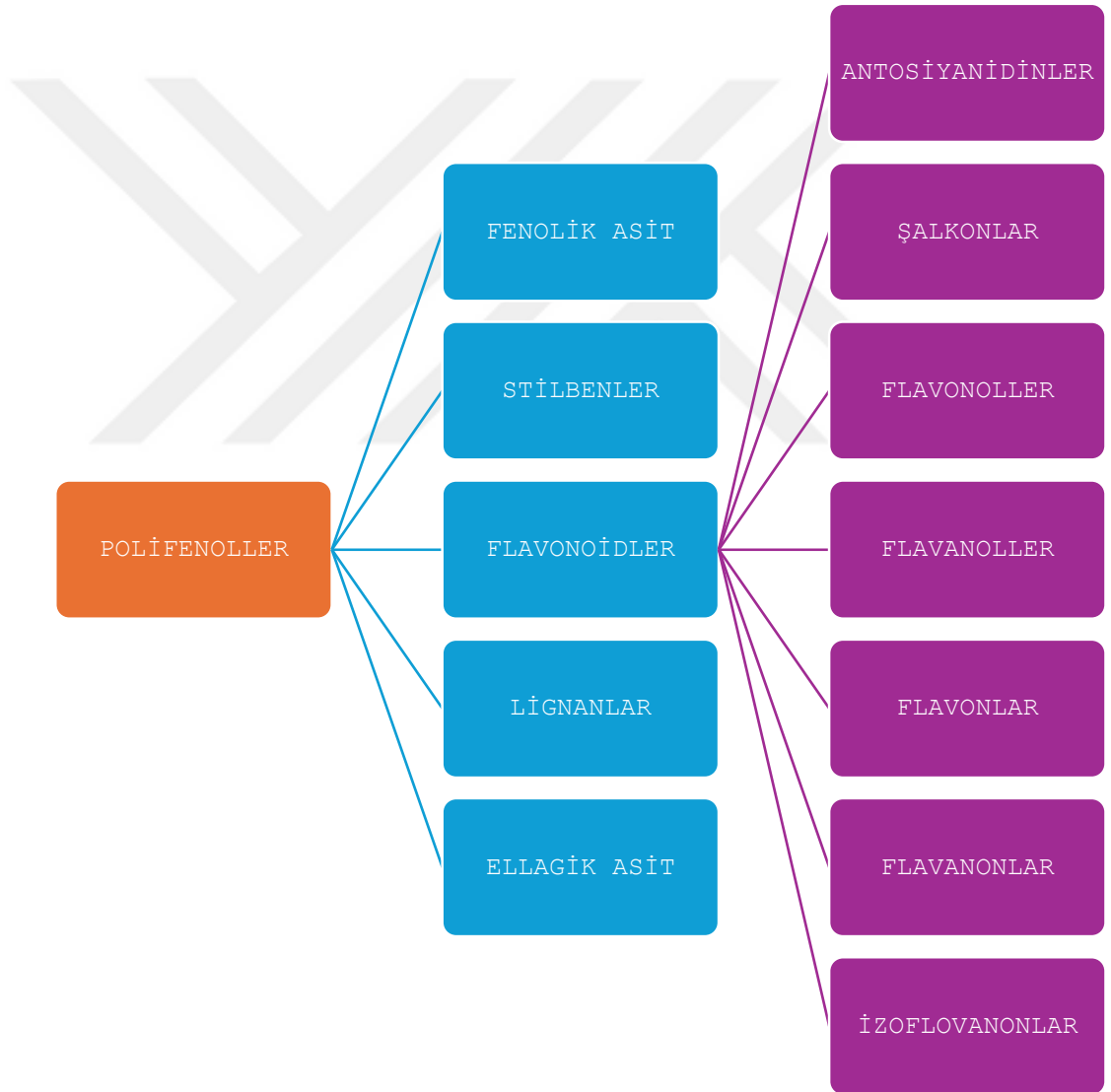
oksidasyon mekanizmalarının basamak basamak irdelenmesi ile oksidasyonunu önlemek için sentetik antioksidan üretimi için birçok çalışma başlatılmıştır. 1900 lü yılların ortalarından beri çok sayıda sentetik antioksidan madde üretilmesine rağmen günümüzde küçük bir bölümü kullanımdadır (Eken, 2007). Sentetik üretilen antioksidanlar doğal olanlarının en etkin olan sadece bir analogu taklit edecek şekilde geliştirmektedirler. Bu sayede de doğal antioksidanlarla sinerjistik etki göstererek daha fazla aktivite sağlarlar. Günümüzde sentetik antioksidanlar özellikle gıdaların raf ömrünü uzatmak ve tazeliğini korumak amacıyla kullanılabilir. Raf ömrünü uzatmak için bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer bütihidroksikinon (TBHQ) gibi doğal olmayan antioksidanlar gıdalara ilave edilmektedirler.

Sentetik antioksidanlarla ilgili yapılan son çalışmalar toksik olabileceklerini maliyetlerinin yüksek olduğunu ve etkilerinin doğal doğal antioksidanlarla göre daha az olduğunu ortaya koymuştur. Tüm bu sonuçlarla doğal antioksidanların aktivitelerinin daha yüksek olduğu besinlerle alınabilmelerinden dolayı ekonomik olduğu gösterilmiş ve tercih sebebi olmuşlardır. Aynı zamanda doğal olmayan antioksidanların karaciğer, akciğer ve bağırsak hasarlarına sebep olduğu (Wanasundara ve Shahidi, 1998) ve karsinojenik özelliğe sahip olduğunun tespit edilmesi ile doğal antioksidanlara yönelik ilgi artmıştır. Bu ilgiyle birlikte bitkilerin antioksidan özelliklerinin araştırılmasını içeren çalışmalar hız kazanmıştır.

## **2.5 Fitokimyasallar**

Bitkilerde yer alan bileşiklerin tıbbi amaçla kullanılan ve laboratuvar ortamında üretilen kimyasal bileşiklere yapısal olarak benzerlik göstermesinin keşfi sonrasında ilaç sektörü bitkileri araştırmaya yönelmiştir bu yönelimle birlikte bitkisel ürünlere talep ve ilgi yoğunlaşmıştır (Bayram vd., 2010; Jose vd., 2018; Mohammed vd., 2018). Besin olarak tüketilmeyen fakat insan sağlığı için yararlı etkilere sahip bitkisel aktif bileşiklere fitokimyasallar denir (Visioli vd., 2000; Sevindik, 2018). En çok bilinen ve aktif olarak kullanılan fitokimyasal bileşenler fenolik bileşikler (polifenoller), flavonoidler, karotenoidler, tanenler, terpenler, terpenoidler, saponinler, kumarinler, tokoferoller, izotiyosiyanatlar, fitosteroller, sülfidler, sülforafanlar, alkaloidler, fitoestrogenler ve indollerdir (Fidan ve Dündar, 2007) . Bu bileşikler beslenmemizde mikro besin üyesi olarak bulunmaktadır (Cemeroğlu, 2004).

Fitokimyasallar hastalıklara karşı koruyucu olan antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerdir (Vital vd., 2010). Fitokimyasallar antioksidan oldukları gibi metal iyonlarını şelatlaştırıcı, detoksifiye enzimleri stimüle ederek tümör oluşumunu başlatan ve sürdüren transkripsiyon faktörlerini baskılayıcı etki gösterirler (Verma vd., 2009). Bunun yanında dejenaratif hastalıkları engelleyici, antiallerjenik, antienflamatuar, antimikrobiyal, antitrombotik (kanın pıhtılaşmasını engelleyici), antikarsinojen, antiaterojen (damar sertliğini önleyici), antiülser ve vasodilatör (kan damarlarını dilate edici) bileşenler olarak reaksiyon yaparlar (Weisburger, 2000; Cemeroğlu, 2004; Halliwell, 2007).



**Şekil 2.4.** Fitokimyasalların sınıflandırılması.

### 2.5.1 Fenolik bileşikler

Aromatik aminoasit metabolizması sırasında bitkilerden fenolik bileşikler adı verilen ikincil metabolitler sentezlenir. Söz konusu bileşikler farklı seviyelerde olmak üzere bitkilerin bütün kısımlarında bulunur bitkinin koku tat renk gibi özelliklerini verirken aynı zamanda antimikrobiyal, antioksidan ve farklı enzim inhibisyonu etkisi gösterirler. Metabolizmanın ihtiyaç duyduğu antioksidanların doğal kaynakları fenolik bileşikler, yapılarında bulundurdıkları fenol halkasındaki OH grubu ile metallerle şelat oluşturma ve serbest radikallere bağlama etkisiyle antioksidan aktivitelerini gösterirler (Saldamlı, 1998; Verma vd., 2009). Fenolik bileşikler yapılarında bulunan fenol halkalarının sayılarına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapılara göre sınıflara ayrılırlar.

Genel bakış ile

- Flavonoidler (antosyanidinler, şalkonlar, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanoller (kateşinler) ve izoflavonlar),
- Fenolik asitler,
- Stilbenler,
- Lignanlar diye sıralanırlar (Khan ve Dangles, 2014)

### 2.5.2 Flavonoidler

Fenolik bileşikler içerisinde şelatlama özellikleri ile antioksidan aktivitelerini üst düzeyde gösteren grup flavonoidlerdir. flavonoidlerin en önemli özelliği insan vücudunda sentezlenememeleridir (Heim vd., 2002; Sivam vd., 2010) .

Molekül yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı, üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyi ve doymamışlık derecesi flavonoid molekülleri arasındaki farkı yaratmaktadır. Halka yapılarındaki bu farklılıklara göre antosyanidinler, flavonlar ve flavonoller, flavanonlar, flavanoller (kateşinler) ve izoflavonlar olarak isimlendirilmektedirler (Saldamlı, 1998). Günlük diyet ile düzenli olarak tüketilmelerinin meme ve prostat kanseri insidansında azalma sağladığının tespit edilmesi, flavonoidlerin antioksidan ve antikarsinojen yani sitotoksik özellikleri ile ilişkilendirilmiştir (Moein vd., 2007; Jaganathan vd., 2014; Yiannakopoulou, 2014;

Sharma vd., 2015; Ahmed vd., 2016; Zhong vd., 2017; Çağlar vd., 2017). Aynı zamanda flavonoidlerin antienflamatuar, antiviral, antialerjik ve antiaging aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Shebis vd., 2013; Parhiz vd., 2015; Seo vd., 2016; Liang vd., 2017). Vitamin P maddeleri diye de isimlendirilen flavonoidlerin periferik kılcal damarlarda kanama ve çatlamları engelleyici etkilerinin olduğu görülmüştür (Skowrya vd., 2014).

Flavonoidlerin bir grubunu flaviliumkasyonu yapısında bulunduran ve glikozit yapısındaki aglikon adı verilen antosiyaninler oluşturmaktadır. Aglikon kısmında hidroksil grubu ve metoksi grubu birlikte yer alır ve metoksi grubu arttıkça kırmızı renk, hidroksil grubu arttıkça açık mavi renk almaktadır. Suda çözünebilen doğal pigmentler olup meyve sebze ve bitkilerde bulunabilmektedir (Kong vd., 2010; Nizamoğlu ve Nas, 2010). Antosiyanidinler içinde delfinidinler, peonidinler, siyanidinler, malvidinler, peonidinler, petunidinler ile pelargonidinler yer alır ve vücuttaki etkileri antimikrobiyal, antiviral, antienflamatuar, antialerjik, antimutajenik, antikanserojenik ve antidiyabetik, antioksidan, olarak sıralanabilir (Ghosh ve Konishi, 2007).

Rutin, apigenin, krisin ve luteolinden oluşan ve flavonoidler grubunun temel bileşeni flavonolardır. Rutin kırmızı şarapta ve domatestte bulunur ve kuersetini glikozit formudur. Kırmızı acı biberde luteolin, meyve kabuklarında krisin ve maydanoz ve kerevizde apigenin bulunur (Fidan ve Dündar, 2007). Soğan, lahana ve elmeda bol miktarda bulunan flavonoller ise bitkilerin içeriğinde en bol yer alan flavonoid grubudur ve kuersetin, kaempferol, mirisetin ve fisetin bunlardandır (Saldamlı, 1998; Ghosh ve Konishi, 2007). Flavonun dihidroksi türevi flavanondur ve naringenin, hesperetin önemli flavanonlar arasında bulunur. Naringenin glikozidi olan naringinden greyfurtta hissedilen buruk acılık tadı alınır. Turunçgillerin kabuk kısmında ise hesperedin yoğun miktardadır (Saldamlı, 1998). Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan genistin ve daidzin ise öne çıkan izoflavonlar olup flavonların izomeridirler ve soya fıstığı ve soya fasulyesinde bulunur (Pascual vd., 2000; Cemeroğlu, 2004). Kateşinler flavonoidlerin besinlerdeki en yaygın grubudur. Ülkemizde üretimi çok yapılan ve tüketilen siyah çayda bulunan kateşinlerin %83 gibi yüksek bir oranda hidroksil radikalini yok etme kapasitelerinin olduğu belirtilmiştir (Li ve Xie, 2000). Kateşinler farklı bitkilerden izole edildikten sonra yapılan

çalışmalarda peridontal yani dişeti hastalıklarına sebep olan *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gibi ajanların üzerinde antimikrobiyal etkinliği olduğu gösterilmiştir (Ho vd., 2001; Demir vd., 2017). Farklı bir çalışmada epigallokateşin gallatın antikanser özellikleri incelendiğinde apoptozu indükleme etkisinin olduğu belirlenmiştir (Azam vd., 2004).

### 2.5.3 Enzim inhibisyonu

Vücudumuzda metabolizmamızın ve canlılığımızın devamı için birçoğ biyokimyasal mekanizma bu mekanizmaların içerisinde de enzimler yer almaktadır. Genler tarafından şifrelenen enzimler, uzun zincirli aminoasit polimerlerinden oluşurlar ve farklı dizilimlerdeki aminoasitlerin biraraya gelmesi ile üç boyutlu yapıları meydana gelir (Kılıç, 2002). Bu üç boyutlu yapıda aminoasitlerin bulundurdıkları yan gruplar belli bir bölgede toplanırlar ve enzimin aktif bölge adı verilen enzime spesifik substratın bağlanacağı bilgeyi oluşturular. Enzimin katalizleyeceği reaksiyona uygun substratın aktif bölgeye bağlanması ile reaksiyon başlamaktadır (Robinson, 2015; Pérez de la Lastra vd., 2021). Aktif bölgede oluşan bağlanma ile kararsız yapıdaki enzim substrat ikilisinin kararlı hale gelmesi sağlanır ve bu sayede daha az enerji ile reaksiyon gerçekleşir (Gözükara, 1997; Gonzalez vd., 2003).

Enzimlerin katalizlediği olaylar bazen hastalıklara sebep olabilmektedir. Enzim aktivitesinin az olması enzim eksikliğine bağlı hastalıklara sebep olabilirken, enzim aktivitesinin fazla olmasıda hastalıklara sebep olabilmektedir. Enzim aktivitesinin fazla olduğu durumlarda "enzim aktivitesini azaltan veya yok eden" mekanizmalar olan enzim inhibitörleri kullanılmaktadır. Enzim inhibitörleri küçük moleküllu kimyasal bileşenler olarak enzimi inhibe ederek katalitik aktivitesini düşürebilirler (Chauhan vd., 2012 ). Enzim inhibitörü özelliği olan kimyasal moleküller, enzim biyosentezini azaltarak; enzim ya da kofaktörlerini parçalayarak; enzim konformasyonunda allosterik değişimler yaparak veya enzimle ilgili doku fonksiyonunu bozarak fonksiyonlarını yerine getirirler. Enzim inhibitörleri fizyolojik şartlarda ilaç gibi kullanılabilir (Amtul vd., 2002).

### 2.5.3.1 Diyabetes mellitus ve enzim inhibisyonu

İnsan vücudundaki karbohidratların sindiriminde ve metabolizmasında amilaz ve glukozidaz önemli rol oynayan enzimlerdir. Diyabet hastalığındaki tedavi edici özelliklerini anlayabilmek için her iki enziminde vücudumuzdaki işlevini iyi bilmemiz gerekmektedir. Amilaz, ağızdaki tükürük bezleri tarafından ve pankreas tarafından ince bağırsağa üretilir ve salgılanır. Ağızda, tükürük  $\alpha$ -amilazı nişastaları daha küçük polisakkaritlere ve maltoza parçalayarak karbonhidrat sindirimi sürecini başlatır. Pankreas  $\alpha$ -amilazı bu süreci ince bağırsakta sürdürür. Amilaz yemeklerin sindirilmesi ile gerçekleşen hızlı kan şekeri yükselmesinde önemli rol oynamaktadır.

Glukozidaz grubu enzimler, disakkaritler ve oligosakkaritler gibi kompleks karbonhidratların glukoz gibi daha basit şekerlere hidrolizini yani parçalanmasını katalize eden enzimlerdir. Glukozidaz inhibitörleri en çok ince bağırsakta bulunan glukozidaz enzimlerinin aktivitesini yavaşlatarak kompleks karbohidratların sindirimini ve emilimini geciktirerek yemekten sonra kan şekeri seviyelerinin daha yavaş yükselmesini sağlamaktadır.  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu diyabet hastalığının yönetimi ve tedavisinde çok önemlidir (DeFronzo, 1999; Kimura ve Okuda, 2001; Han vd., 2003; Chiasson vd., 2004; Peña vd., 2004; Maki ve Pelkman, 2008; Tappy ve Le, 2010).

### 2.5.3.2 Alzheimer hastalığı ve enzim inhibisyonu

Alzheimer hastalığının tedavisi için ana yaklaşım asetilkolinesterazın inhibisyonu ve bu sayede merkezi sinapslardaki ACh seviyesini arttırmak olmuştur. Yapılan çalışmalar asetilkolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalarında sinaptik bölgedeki asetilkolin seviyesinin artması sağlayarak bilişsel yeteneğin artırılabilceğini ve nöropsikiyatrik semptomların hafifletilebileceğini göstermektedir (Zarotsky, vd., 2003). Butirilkolinesteraz (BChE) bir serin hidrolaz vücuttaki esterlerin hidrolizini katalize etmektedir. Düşük asetilkolin katalitik etkinliği olan Butirilkolinesterazın geniş bir substrat kapsamı vardır. Butirilkolinesteraz enzimin inhibisyonu ile beyin asetilkolin düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Alzheimer hastalığında BChE, dengede tutucu bir faktör şeklinde görev alan enzimdir. (Ha, vd., 2020). Anormal şekilde  $\beta$ -amiloid ( $A\beta$ ) birikimi ile ilişkilendirilen BChE

gösterilmiştir. İlerlemiş Alzheimer hastalığının tedavisi için çalışmalar, BChE inhibisyonunun potansiyel bir etken olduğunu öne sürmektedir.

### **2.5.3.3 Hiperpigmentasyon ve enzim inhibisyonu**

Tirozinaz enzimi melanositlerdeki melanini vücutta üç farklı reaksiyonla kataliz eder: Birinci yol; tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu. İkinci yol; L-DOPA'nın dopakinon'a oksidasyonu, üçüncü yol ise insanlarda dopakinonun, siklizasyon ve oksidatif polimerizasyonu da içeren bir seri kompleks reaksiyonla melanine dönüşmesidir (Sugumaran, 1991). Melanin pigmentinin anormal üretimi insanlarda ciddi bir estetik problemdir. Orta ve ileri yaşlarda genellikle sıkça rastlanır (Kalka vd., 2000) Eksojen sebepler özellikle ultraviyole ışığa maruz kalma melasma, solar lentigines ve çil gibi pigmental anormalliklerin yaygın sebebidir (Maeda ve Fukuda, 1991). Bazı ilaçlara ve kimyasallara maruz kalmanın yanı sıra belirli hastalıkların varlığı da hiperpigmentasyonla sonuçlanabilir. Tirozinaz enzim inhibitörlerini içeren depigmente edici ajanlar genellikle hiperpigmentasyon bozuklukların iyileştirilmesi için kullanılmaktadır (Kubo ve Yokokawa, 1992).

### **2.5.3.4 Kanser ve antikanser özellikler**

Vücudumuzda yer alan hücrelerin çoğalma yeteneğinin bozulması, aynı zamanda sağlıklı olma özelliğini yitiren hücrelerin apoptoz yeteğinin kaybolması ile aşırı çoğalan anormal hücrelerin dokulara karşı artmış invaze olabilme yeteneği ile ilerleyen ve tedavi edilmez ise morbidite ve mortalite oranı yüksek olan hastalıkların genel adı kanserdir.

Hanahan ve Weinberg yapılan çalışmalar ile işaret edilen ve incelenen kanser hücrelerinde ortak olarak bulunan özellikler 'Kanserin Karakteristikleri' başlığı altında sıralanır. Söz konusu özellikler hücre bölünmesinin sürekli indüklenmesi, büyüme baskılayıcı ajanlardan kaçınma, genomik yapıdaki kararsızlık, hücre ölümüne yani apoptoza karşı direnç, anjiyogenezin uyarılması sonucu invazyon ile metastaz yapma yeteneğidir (Hannan ve Weinberg, 2010; Hannan ve Weinberg, 2011).

Kanser oluşumunda kalıtsal faktörler, radyasyon, bazı virüsler, kimyasal maddeler ve besinler etkili olabilmektedir (Ruddon, 2007).

Kanser oluşumuna sebep olan ve ilgili mekanizmaları harekete geçiren herhangi bir medde ya da ajana karsinojen adı verilmektedir.

**Çizelge 2.4.** Karsinojenlerin sınıflandırılması ve bu sınıflara ait örnekler (Schulz, 2005).

| <b>KARSİNOJEN TİPLERİ</b>      | <b>ÖRNEKLER</b>                                                                                                          |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kimyasal karsinojenler</b>  | Nikel, kadmiyum, arsenik, nitrozaminler, trikloroetilen, arilaminler, benzopiren, aflatoksinler, reaktif oksijen türleri |
| <b>Fiziksel karsinojenler</b>  | UV radyasyon (özellikle UVB), İyonize radyasyon                                                                          |
| <b>Biyolojik karsinojenler</b> | İnsan papilloma virüs, Epstein-Barr-Virüs, Hepatit B virüs, <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Schistosoma mansoni</i>      |
| <b>Endojen yapılanmalar</b>    | DNA replikasyonu, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu metabolik reaksiyonlar, kronik inflamasyon                     |

Kanserin hastalığının tedavisi için hastalığın evresine ve ilerlemesine göre bulunduğu yerin durumuna göre pek çok farklı müdahalenin bir araya gelmesi ile tedavi protokolleri düzenlenmektedir. Cerrahi tedavi, radyoterapi, kemoterapi ya da bu yöntemlerin farklı kombinasyonları tercih edilmektedir. Lokal halde cerrahi ile kolayca vücuttan uzaklaştırılabilecek durumdaki lezyonların tedavisinde ilk tercih cerrahi müdahaledir. Çevre dokunun tamamen temizlenebilmesi için radyoterapi tedaviye eklenebilmektedir. Tüm bunların yanında lösemiler, lenfomalar, metastatik ya da lokal olarak ilerlemiş karsinomalar ve yumuşak doku kanserlerinin tedavisinde, cerrahinin ya da radyasyon tedavisinin de eşlik ettiği, kemoterapi tedavisi uygun olmaktadır. Kemoterapi ajanları kimyasal ya da bitkisel kökenli antikanserojen ve sitotoksik özelliğe sahip ajanlardır. Bitkisel kökenli ajanlar bitkilerden saflaştırılarak akciğer, over, meme, testis gibi organların kanserlerinde ticari ilaç olarak kullanılan moleküller haline getirilmektedirler. Söz konusu bitkilerden ilk karşımıza çıkanlar arasında *Taxus brevifolia* (*taxol/paclitaxel*) (Weaver, 2014), *Podophyllum peltatum* (*podophyllotoxin*), *Vinca minor*, *Catharanthus roseus* (*vincristine*, *vinblastine*, *vinorelbine*) (Thirumaran vd., 2007) ve bu ajanlara benzer özellik taşıyanlar sayılabilmektedir. Bu çalışmada *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* nin antikanser özelliklerini belirlenmesi amaçlanmıştır.

### **3. MATERİYAL VE METOT**

#### **3.1 Bitki Materyali**

Bitki örnekleri Aksaray, Hasandağı civarında doğal yayılış alanlarından 2020 yılı vejetasyon dönemlerinde toplanmış, gölgede kurutularak karanlık uygun ortamda saklanmıştır. Bitki örneklerinin teşhisi Dr. Bülent ESKİN ve Mustafa KESKİN tarafından yapılmıştır.

#### **3.2 Bitki Ekstratlarının Elde Edilmesi**

Bitki örneklerinden organik çözücüler kullanılarak özütler elde edilecek ve elde edilen özütlerin çözücü kısmı tamamen uçurularak özütler kurutulacak ve sonrasında antioksidan aktivitesi, enzim inhibisyon aktivitesi ve hücre kültürlerinde kullanılmak üzere stok çözeltiler (2 mg/ml konsantrasyonda) hazırlanacaktır. Hazırlan stok çözeltilerden ilgili analizler için ön denemeler yapılarak çalışılacak konsantrasyon aralıkları belirlenecektir. Kurutulmuş bitkiler blender yardımı ile öğütülerek toz hale getirilmiştir. Her bir bitki numunesi için toz hale getirilmiş 15'er gram örnek alındı 200 ml'lik iki farklı çözücü (metanol ve etil asetat) ile bir balon joje içerisine aktarıldı ve karıştırıldı. Ardından toplamda bir saat sürecektir şekilde 15'er dakikalık 4 tekrar ve her tekrar arasında 5'er dakikalık ara çalışma prensibiyle ekstraksiyon hazırlayabilmek için balonlar ultrasonikasyon cihazına yerleştirilmiştir. Ultrasonikasyon işlemi tamamlandıktan hemen sonra filtrasyon işlemine geçildi. Çözücüler uzaklaştırılarak saf bitki özütüne ulaşmak için buharlaştırma aleti kullanıldı. Liyofilizasyon yönteminden ise bir başka çözücü olan suyu ortamdan uzaklaştırmak için yararlanılmıştır. Bu yöntemlerin tamamlanması ile her iki bitkimizden iki ayrı çözücüde metanol ve etilasetat özütlerimiz elde edilmiştir.

#### **3.3 Antioksidan Aktivite Metotları**

##### **3.3.1 Toplam fenolik içerik**

Küçük modifikasyonlarla Folin-Ciocalteu metodu ile özütlerin toplam fenolik içerikleri değerlendirilmiştir (Juranović Cindrić vd., 2011; Agbor vd., 2014). Kısaca, örnek stok çözeltilerinden 0,2 ml alınarak, 1,5 ml distile su ve 0,5 ml %7'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenip karıştırıldı sonrasında 3 dakika bekletildi. Ardından 1 ml Folin-Ciocalteu

eklendi. Gallik asitin 12,5, 25, 50, 100 µg/ml konsantrasyonlarından standarta uygun şekilde alınıp işlemler aynı şekilde gerçekleştirildi. 0,2 ml methanol kör olarak örnek yerine konuldu. Arkasından 2 saat oda sıcaklığında karanlık bir ortamda inkübe edilen örnekler spektrofotometrede absorbensları 760 nm’de belirlendi. Değişik oranlarda yeşilden maviye giden renk değişimi örneklerin fenolik içeriklerine uygun şekilde gözlemlendi. Örneklerin ölçümleri 3’er tekrarlı olarak yapıldı. Örneklerin fenolik içerikleri Gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak standardın absorbens konsantrasyon grafiğinden bulunan denklemin kullanılması ile tespit edildi.

### 3.3.2 Toplam flavonoid içerik

Spektrofotometrik olarak total flavonoid içerik Arvouet-Grand vd. (1994)’e göre tespit edilmiştir. Metotta belirtildiği üzere, 1 ml özüt 1 ml %2’lik AlCl<sub>3</sub> ile karıştırıldı. Kör örneğinde ise her örnek için hazırlanan 1 ml metanol ve 1 ml özüt eklenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Quercetin’in çözeltileri standard olarak kullanıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerin ardından 415 nm’de köre karşı absorbensları okundu. Örneklerin flavonoid içerikleri Quercetin eşdeğeri (QE) olarak standardın absorbens konsantrasyon grafiğinde belirtilen denklem ile tespit edildi.

### 3.3.3 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi

Küçük modifikasyonlarla Sarikurkcu vd. (2008)’in yöntemi ekstrelerin DPPH radikalini giderme aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Metoda uygun hali ile ilk başta DPPH’nın 4 mM’lık çözeltisi elde edilmiştir. Kör tüpüne metanol, kontrol tüpüne ise 1 ml metanol ve 1 ml DPPH çözeltisi konulmuştur. Örnekler hazırlanırken farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 1 ml DPPH içerisine 1 ml özüt eklenmiş ve 30 dakika süre ile karanlık bir ortamda oda sıcaklığında inkübasyon için bekletilmiştir. Sürenin bitmesi ile 517 nm’de örneklerin, standart ve kontrollerin absorbens değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerleri kullanılarak örneklerin özütlerin DPPH radikali inhibe etme oranları (%I) Denklem 3.1’e göre hesaplanmıştır:

$$\%I = 100 \times (A_0 - A_1) / A_0 \quad (3.1)$$

(A<sub>0</sub>: Kontrolün absorbensı, A<sub>1</sub>: Özütün absorbensı)

Bununla beraber her bir özüt için radikalın %50'sinin inhibe edildiği konsantrasyon olan IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.

#### **3.3.4 Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP)**

Söz konusu teknik bitki ekstraktlarının demir iyonlarını indirgeme kapasitesinin belirlenmesi temeline dayandırılarak yapılmıştır (Aktumsek vd., 2013). İlk olarak 31,2 mg TPTz, 50 µl hidroklorik asit ve 10 ml distile su karışımı içinde çözündürülmüştür. Daha sonra 32 mg FeCl<sub>3</sub> 10 ml distile suda çözündürülmüştür. Son olarak 250 ml distile suya 4,1 ml asetik asit (%80) eklenmiş arkasından 0,66 gr sodyum asetat aynı çözelti içinde tamamı ile çözülünceye deyin karıştırılmıştır. Tampon, FeCl<sub>3</sub> ile TPTz 10/1/1 oranlarında karıştırıldıktan sonra 0,1 ml bitki özütü ile bu karışımın 2 ml'si karıştırılıp arkasından 30 dakika 30 °C'de inkübe olması beklenmiştir. Troloks çözeltisinin farklı konsantrasyonları (200, 150, 100, 75, 50 ve 25 µg/ml) standart olarak ekstre yerine kullanılmıştır. Hazırlanan örneğin absorbans değerleri inkübasyon sonunda 593 nm'de okunup sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) cinsinden tespit edilmiştir.

#### **3.3.5 Bakır iyonları indirgeme aktivitesi (CUPRAC)**

Söz konusu teknik Apak vd. (2006)'den küçük değişikliklerle yapılmıştır. Teknik için sırasıyla, CuCl<sub>2</sub>, neocuproine ve amonyum asetat çözeltilerinin tek tek 1'er ml alınmıştır. Alınan çözeltilerin üzerine ise değişik konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları ve standart BHT ile BHA'dan 0,5 ml ilave edilmiştir. Arkasından tüplerin hepsine 1'er ml distile su eklenmiştir. Son aşamada oda sıcaklığında ve karanlık bir yerde, 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri belirlenerek sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) türünden tespit edilmiştir.

#### **3.3.6 ABTS radikal süpürme aktivitesi**

Ufak bir değişiklikle ABTS katyon radikaline karşı temizleme aktivitesi, Re vd. (1999)'nın yöntemine göre ölçülmüştür. Kısaca ABTS radikal katyonu, 2,45 mM potasyum persülfat ile 7 mM ABTS çözeltisinin tepkimeye girmesi ve çözeltinin karanlık ortamda oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilmesiyle elde edilmiştir. Deneyde öncelikle, ABTS çözeltisi metanol ile 734 nm'de 0,700±0,02 absorbansa seyreltilmiştir. ABTS solüsyonu içine (2 ml) numune solüsyonu (1 ml) ilave edilip karıştırıldı. Örnek absorbansı, oda sıcaklığında 30 dakikalık bir inkübasyonun arkasından 734 nm'de

okunmuştur. ABTS radikal katyon süpürme aktivitesinin değeri, troloks eşdeğerleri (mgTEs/g) olarak belirlenmiştir.

### **3.3.7 Toplam antioksidan kapasite**

Cakmak vd. (2012)'ne göre fosfomolibdenum metodu uygulanmış ve total antioksidan kapasitenin belirlenmesi sağlanmıştır. Test için her biri değişik 3 çözelti hazırlanarak arkasından karıştırılarak reagent çözeltisi elde edilmiştir. 4 mM amonyum molibdat, 28 mM sodyum fosfat ve 6 M sülfürik asit çözeltilerinin birleştirilmesi karışım çözeltisi oluşturulmuştur. Akabinde 0,1 ml özüt üzerine bu karışımdan farklı konsantrasyonlardaki (0,0625-1 mg/ml) askorbik asit çözeltileri 3 ml alınarak ilave edilmiştir. Kör çözeitisini elde etmek içinse 0,3 ml metanol eklenmiştir. Arkasından elde edilen çözelti tüpleri 90 dakika ve 95 °C'de inkübe edildikten sonra 695 nm'de absorbands değerleri okunup sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) cinsinden tespit edilmiştir.

### **3.3.8 Metal şelatlama aktivitesi**

Çalışmamızda kullandığımız her iki bitki için metal şelatlama yetenekleri ferrozin metodu ile elde edilmiştir. Elimizdeki özütler ferrozin kullanılarak FeCl<sub>2</sub> ile reaksiyona tabii tutularak ortamdaki demir (II) varlığı tespit edildi. Deneyin devamında absorbandslar 562 nm'de ölçülmüştür. Aynı işlemler EDTA içinde yapılarak elde edilen sonuçlar EDTA eş değeri (mg EDTA/g) olarak belirlendi (Uysal vd., 2017).

## **3.4 Enzim İnhibisyon Testleri**

### **3.4.1 Kolinesteraz inhibisyonu**

Ellman metodu kullanılarak Kolinesteraz (ChE) inhibitör aktivitesi ölçülmüştür (Aktumsek vd., 2013). Örnek çözeltisi (50 µL) DTNB (125 µL) ve asetilkolinesteraz (veya bütirilkolinesteraz) çözeltisi (25 µL) Tris-HCl tamponu (pH 8,0) içerisinde birleştirildi. Arkasından 96 kuyucuklu mikrolpaka içerisinde 25 °C'de inkübasyonu 15 dakikada yapıldı. Reaksiyon asetilkolin iyodinin veya bütirilkolin klorid ilavesiyle başlatılmıştır. Aynı şekilde her bir özüt için, kör enzim içermeyen bir tüp olarak hazırlanmıştır. Örnek ve kör absorbandsları 405 nm'de 25 °C'de 10 dakika inkübasyonun arkasından okunmuştur. Kolinesteraz inhibitör aktivitesi galantamine eşdeğeri (GALAE) olarak belirlenmiştir.

### 3.4.2 Alfa-amilaz inhibisyonu

Caraway-Somogyi iyodin/potasyum iyodid (IKI) metodu ile  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktivitesi elde edilmiştir (Yang vd., 2012). Örnek çözeltileri (25  $\mu$ L)  $\alpha$ -amilaz çözeltisi ile (50  $\mu$ L) fosfat tamponunda (pH 6,9; 6 mM sodyum klorid) 96 kuyucuklu mikropate içinde birleştirilmiştir. Karışım 37 °C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyondan sonra reaksiyonun başlaması nişasta çözeltisi (50  $\mu$ L, %0,05) eklenmesi ile gerçekleşti. Aynı zamanda enzim içermeyen kör çözeltisi hazırlandı. Reaksiyon karışım çözeltisi 10 dakika 37 °C’de inkübe edilip HCl (25  $\mu$ L, 1 M) eklendiğinde reaksiyon durduruldu. Bunun devamında iyodin-potasyum iyodid çözeltisi (100  $\mu$ L) eklendi. Örnek ve kör absorbanları 630 nm’de okunarak  $\alpha$ -amilaz inhibitör aktivitesi değerleri akarboz eşdeğeri (ACAE) olarak belirlendi.

### 3.4.3 Alfa-glukozidaz inhibisyonu

Palanisamy vd. (2011)’nin tekniğine uygun olarak  $\alpha$ -glukozidaz inhibitör aktivitesi belirlenmiştir. 96 kuyucuklu mikropate içinde örnek çözeltisi (50  $\mu$ L), glutatyon (50  $\mu$ L),  $\alpha$ -glukozidaz çözeltisi (50  $\mu$ L) fosfat tamponu (pH 6,8) ve PNPG (50  $\mu$ L) çözeltisi karıştırılmış ve 37 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Enzim içermeyen bir kör aynı işlemlerle hazırlandı. Hazırlanan çözeltilere sodyum karbonat (50  $\mu$ L, 0,2 M) eklendiğinde reaksiyonun durması sağlandı. Örnek ve kör absorbanları 400 nm’de okunarak  $\alpha$ -glukozidaz inhibitör aktivitesinin seviyesi akarboz eşdeğeri (ACAE) olarak verilmiştir.

### 3.4.4 Tirozinaz inhibisyonu

Tirozinaz inhibitör aktivitesinin belirlenmesi substrat olarak L-DOPA kullanılarak dopachrome metodu ile gerçekleştirilmiştir (Orhan vd, 2012). 15 dakika 25 °C’de inkübasyona bırakılan örnek çözeltisi (25  $\mu$ L), tirozinaz çözeltisi (40  $\mu$ L) ve fosfat tamponu (100  $\mu$ L, pH 6,8) ile 96 kuyucuklu mikropate içerisinde karıştırılmıştır. Çözeltinin reaksiyonu L-DOPA (40  $\mu$ L) eklenmesiyle başlatılmıştır. Aynı işlemler ile enzim içermeyen kör çözeltisi hazırlanmıştır. Örnek ve kör çözeltileri 10 dakika 25 °C’de inkübe edildikten sonra absorbanları 492 nm’de okunmuştur. Sonuçları kojik asit eşdeğeri (KAE) olarak tirozinaz inhibitör aktivitesi değeri olarak verilmiştir.

### 3.5 Hücreler ve kültür koşulları

Çalışmada Şap Enstitüsü'nden temin edilerek stoklanan Hela kanser hücresi ile normal fare fibroblast hücresi %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM besiyerinde çoğaltılacaktır. Hücreler %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde 37 °C'de inkübe edilecek ve %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı ile kaldırılarak 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak üretimleri gerçekleştirilecektir. Durumları inverted mikroskop ile günlük olarak kontrol edilecektir. Bu şekilde hücreler ilgili antikanser aktivite analizlerine hazır hale getirilecektir.

#### 3.5.1 MTT metodu ile bitki ekstrelerinin antikanser ve sitotoksik etkinliklerinin saptanması

MTT metodu kullanılarak bitki ekstrelerinin sitotoksik etkileri incelenecektir. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT'yi parçalayarak, çözülebilir formazan kristalleri oluşturmaya prensibine dayanarak yapılmaktadır. Hücreler stoktan açılarak 25 cm<sup>2</sup> flasklara ekilip, %80-90 oranında konfluent olduğunda tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril platelere ekilmiştir. 24 saatlik süre ardından besiyerleri uzaklaştırılıp ve her bir ekstre için literatürle uyumlu aralıkta olacak şekilde uygulama yapılacak ve sitotoksik doz bulunmaya çalışılmıştır. Ardından plâtelere belirlenen inkübasyon inkübasyon süresince %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besiyerleri çekilip 20 µl serumsuz besiyeri üzerine 90 µl MTT solüsyonu eklenecek ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılıp, formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri 4nm dalga boyunda miktoplate reader ile ölçülerek kaydedilmiştir. Hücreli kuyucukların ortalama değeri ile hücresiz kuyucukların ortalama değerlerinin farkı alınacak ve formüle uygulanarak yüzde canlılık hesaplanmıştır. Okunan değerlere göre elde edilen grafiğin eğrisinden kültürün %50'sini öldüren eden doz (IC<sub>50</sub>) belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak belirlenmiştir. Kanser hücre hattında yapılan çalışmaların tümü için sağlıklı kontrol grubu olarak L929 fare fibroblast hattı kullanılmıştır.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

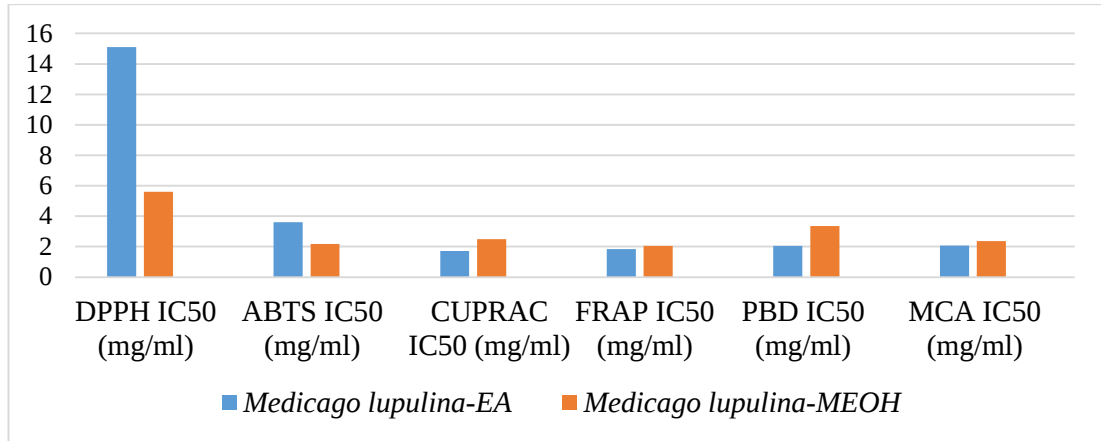
##### 4.1 Antioksidan Aktivite Bulguları

Çalışmamızda kullandığımız *Medicago Lupulina* ve *Trifolium arvense* bitkilerinin etil asetat ve metanol kullanılarak hazırlanmış özütlerinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri de belirlenmiştir. DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP ve PBD testleri yapılarak antioksidan aktivitelerini belirlemek için örneklerle toplam antioksidan kapasite testi, yapılmıştır. Bitkilerin yapısında yer alan polifenollerin açığa çıkmasını en iyi sağlayan çözücüler polar çözücülerdir ve metanol polar çözücüler arasında ikinci sırada yer almaktadır. Etil asetat ise polaritesi düşük olmasına rağmen örneklerin yapısında yer alan sekonder metabolitleri oldukça kolay şekilde açığa çıkarmasından dolayı tercih edilmektedir (Abubakar ve Haque, 2020). Bitki özütleri hazırlanmasında polaritesi yüksek çözücüler çözücünün sahip olduğu polar yapı ile antioksidan özellikteki moleküllerin polar bölgeleri içerisinde gerçekleşen etkileşim sebepli öncelikli tercihtir (Boeing vd., 2014). Kimyasal analizlerde bir maddenin spesifik bir biyolojik ya da biyokimyasal fonksiyonu inhibe etme gücünün bir göstergesi olan IC<sub>50</sub> konsantrasyonları da test edilmiş olup sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden belirlenmiştir. IC<sub>50</sub> konsantrasyonları düşük seviyelerde ise daha yüksek antioksidan kapasiteyle bağlantılı olmaktadır. IC<sub>50</sub> konsantrasyonları bakımından test edilen metotların sonuçları Çizelge 4.1 ve 4.2 ile Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** *Medicago lupulina* antioksidan aktivite (IC<sub>50</sub>) konsantrasyonları sonuçları.

| Özütler                        | DPPH IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | ABTS<br>IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | CUPRAC<br>IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | FRAP<br>IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | PBD IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | MCA IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | 15,11±0,75*                      | 3,60±0,02*                          | 1,71±0,01*                            | 1,84±0,03*                          | 2,048±0,08*                     | 2,07±0,03*                      |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | 5,61±0,02                        | 2,18±0,02                           | 2,50±0,01                             | 2,06±0,02                           | 3,345±0,05                      | 2,36±0,03                       |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma

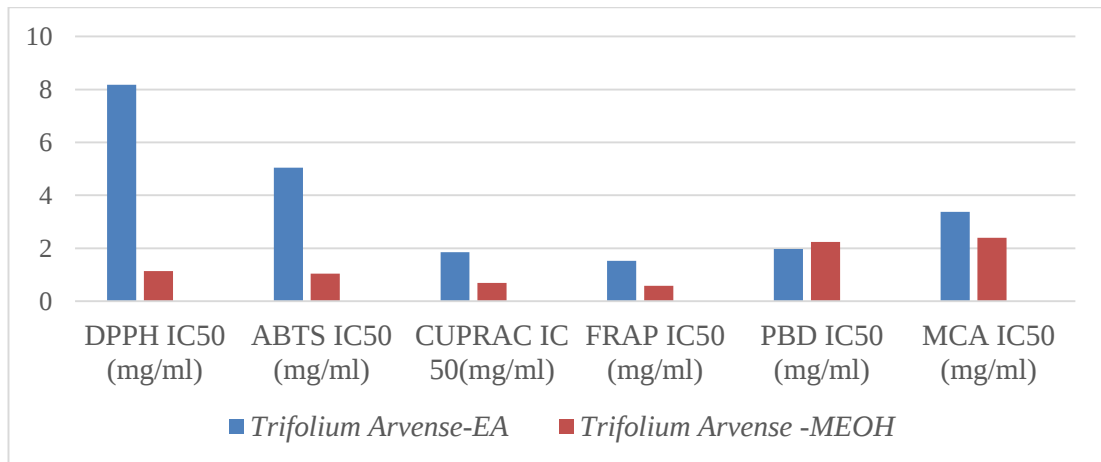


Şekil 4.1. *Medicago lupulina* antioksidan aktivite (IC<sub>50</sub>) konsantrasyonları grafiği.

Çizelge 4.2. *Trifolium arvense* antioksidan aktivite(IC<sub>50</sub>) konsantrasyonları sonuçları.

| Özütler                         | DPPH IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | ABTS IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | CUPRAC<br>IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | FRAP IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | PBD IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) | MCA IC <sub>50</sub><br>(mg/ml) |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA    | 8,18±0,37*                       | 5,05±0,15*                       | 1,85±0,05*                            | 1,52±0,02*                       | 1,972±0,07*                     | 3,37±0,11 *                     |
| <i>Trifolium arvense</i> - MEOH | 1,14±0,00                        | 1,04±0,00                        | 0,69±0,00                             | 0,58±0,00                        | 2,242±0,13                      | 2,40±0,30                       |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



Şekil 4.2. *Trifolium arvense* antioksidan aktivite (IC<sub>50</sub>) konsantrasyonları sonuçları.

#### 4.1.1 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* toplam fenolik içerik (TPC)

Çalışmada *Medicago lupulina*dan elde edilen etil asetat ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri belirlenmiştir.

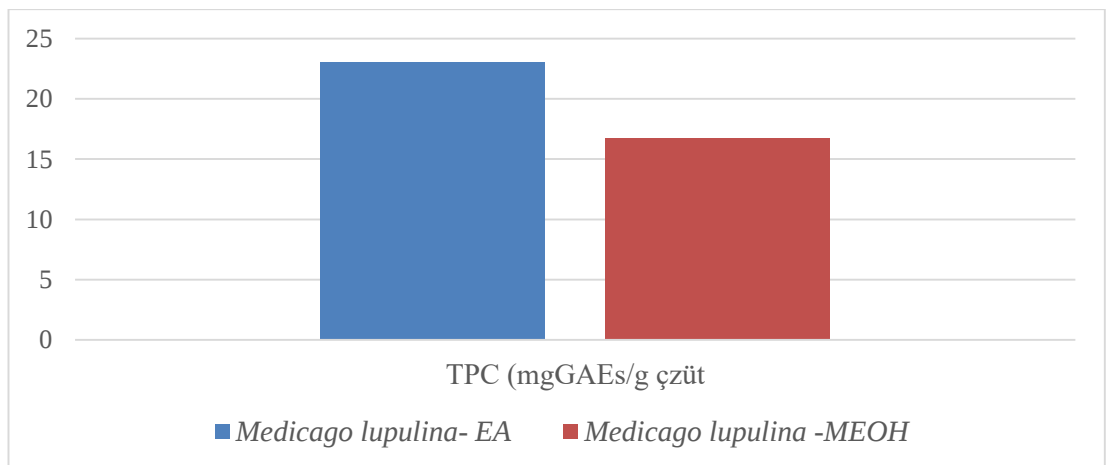
*Medicago lupulina* nın toplam fenolik içerikleri etilasetat ve metanol ekstrelerinde sırasıyla 23,02 mg GAE/g özüt ve 16,72 mg GAE/g özüt olarak belirlenmiştir (izelge 4.3, şekil 4.3).

*Medicago lupulina* ile Kicel ve Olszewska-15 tarafından yapılan çalışmada farklı fraksiyonlardaki fenolik içerikleri 6,6-162,4 mgGAE oranları arasında değiştiği gösterilmiştir ve değerler birbirine uymaktadır. Pamukçu vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *Medicago murex var. murex*’ den hazırlana özütlerin toplam fenolik içerikleri 83,70 – 163,93 mg GAE/g özüt değerleri içinde seyrettiği belirlenmiş ve bütün çalışmalarda birbiri ile uyumlu değerler olduğu görülmüştür. *Medicago polymorpha* ile ilgili yapılan çalışmada toplam fenolik madde içeriği 85,75±4,30 mg GAE/g yaş bitki değeri ile en yüksek fenolik madde içeren bitkilerdendir (Khan vd., 2016). Türkiye de doğal yayılışa sahip olan *Medicago rigidula* için akmak vd., (2017) tarafından yapılan çalışmada toplam fenolik içerik 79,61 mg GAE/g özüt düzeyinde tespit edilmiştir. *Medicago* cinsi ile yapılan diğer çalışmalara göre *Medicago lupulina* nın fenolik içeriğinin daha dzk olduğu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.3.** *Medicago lupulina* TPC (mg GAEs/g özüt) sonuçları.

| zt                           | TPC (mg GAEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | 23,02±0,65*          |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | 16,72±0,41           |

\* paralel analizinin ortalaması±standart sapma



**şekil 4.3.** *Medicago lupulina* toplam fenolik içerik grafiği. GAE: gallik asit eşdeğeri.

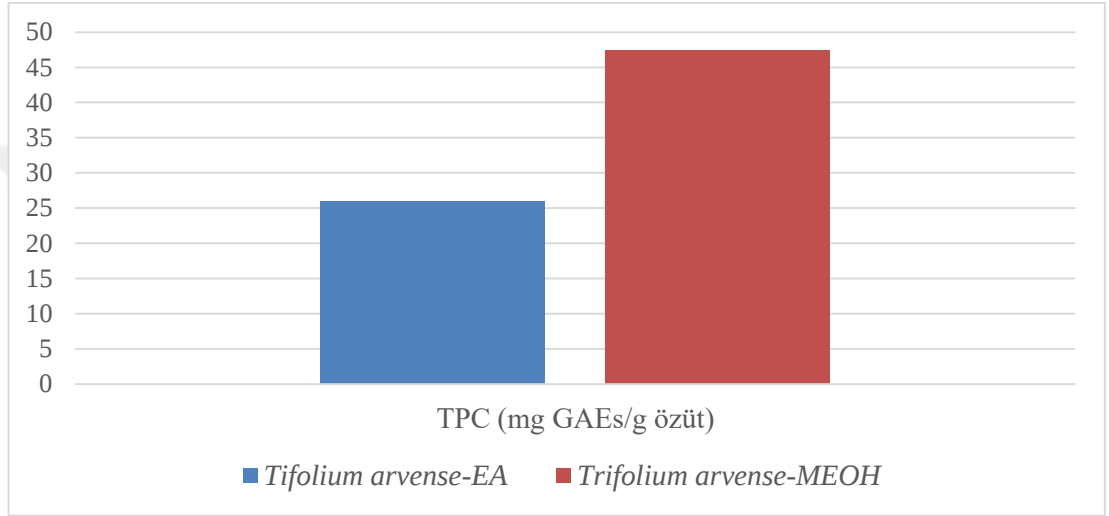
Çalışmamızda *Trifolium arvense*’nin etil asetat ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik içerikleri belirlenmiştir.

*Trifolium arvense* nin toplam fenolik içerikleri etilasetat ve metanol ekstrelerinde sırasıyla 25,98 mg GAEs/g özüt ve 47,46 mg GAEs/g özüt olarak tespit edilmiştir. (Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

**Çizelge 4.4.** *Trifolium arvense* TPC (mg GAEs/g özüt) sonuçları.

| Özüt                           | TPC (mg GAEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | 25,98±0,36*          |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | 47,46±3,39           |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



**Şekil 4.4.** *Trifolium arvense* TPC (mg GAEs/g özüt) sonuçlar. GAE: gallik asit eşdeğeri.

#### 4.1.2 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin toplam flavonoid içeriği

*Medicago lupulina* 'nın etilasetat ve metanol özütlerinde yapılan çalışmada toplam flavonoid içerikleri etilasetat ve metanol ekstrelerinde sırasıyla 7,69 mg GAE/g özüt ve 11,44 mg GAE/g özüt olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

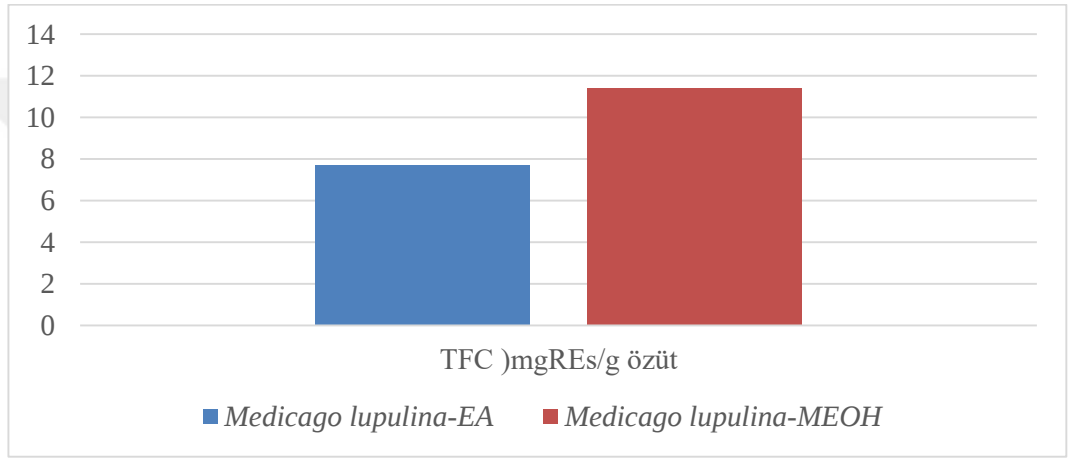
*Medicago murex* ile yapılan çalışmada etil asetat özütünde flavonoid içerik tespit edilememiş olsada flavonoid içeriklerinin araştırılması sonucunda metanol özütünde 26,05 µg QE/g özüt oranında su özütünde ise 24,48 µg QE/g özüt oranında toplam flavonoid içeriği olduğu tespit edilmiştir. *M. sativa*, *M. segitalis*, *M. scutelata*, *M. rigidula*, *M. tornata*, *M. truncatula*, ve *M. minima* türlerinde toplam flavonoid içerik 5-12 mg CEQ/ g kuru bitki olarak (Rodrigues vd., 2013) bulunduğu görülmüştür.

*Medicago rigidula* için Çakmak vd., (2017) tarafından yapılan çalışmada toplam flavonoid içeriği 27,38 µg QE/g özüt olarak tespit edilmiştir. *Medicago murex* ve *Medicago rigidula* ya göre çalışmamızdaki *Medicago lupulina*'nın değerleri daha düşük bulunmuştur.

**Çizelge 4.5.** *Medicago lupulina* TFC (mg REs/g özüt) sonuçları.

| Özüt                           | TFC (mg REs/g özüt) |
|--------------------------------|---------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | 7,69±0,13*          |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | 11,44±0,23          |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



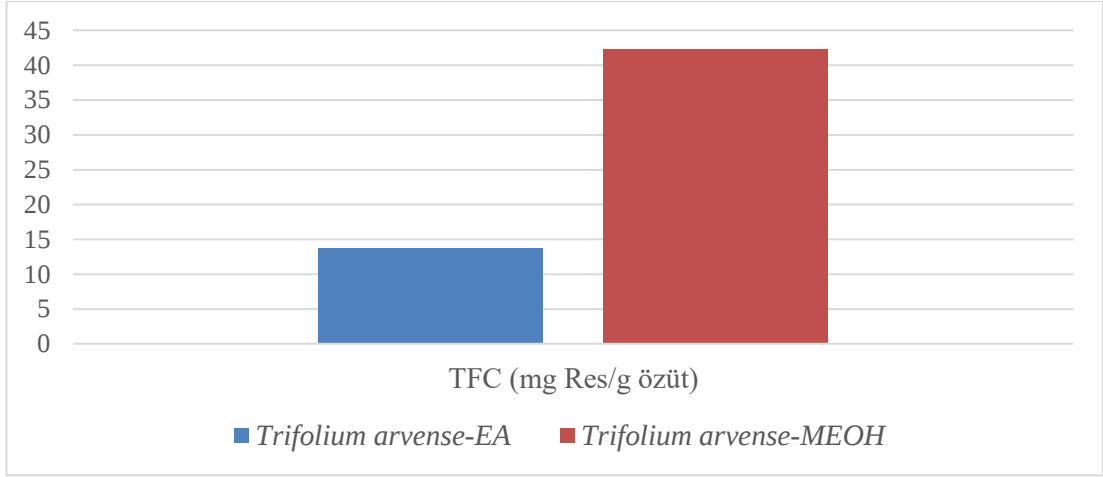
**Şekil 4.5.** *Medicago lupulina* toplam flavonoid içerik grafiği RE: rutin eşdeğeri.

Çalışmamızda *Trifolium arvense*'nin etil asetat ve metanol özütlerinin flavonoid içerikleri sırası ile 13,73±0,23 mg REs/g özüt ve 42,28±0,40 mg REs/g özüt olarak bulunmuş metanol özütünde etilasetata göre daha yüksek tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

**Çizelge 4.6.** *Trifolium arvense* TFC (mg REs/g özüt) sonuçları.

| Özüt                           | TFC (mg REs/g özüt) |
|--------------------------------|---------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | 13,73±0,23*         |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | 42,28±0,40          |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



**Şekil 4.6.** *Trifolium arvense* Toplam flavonoid içerik grafiği RE: rutin eşdeğeri.

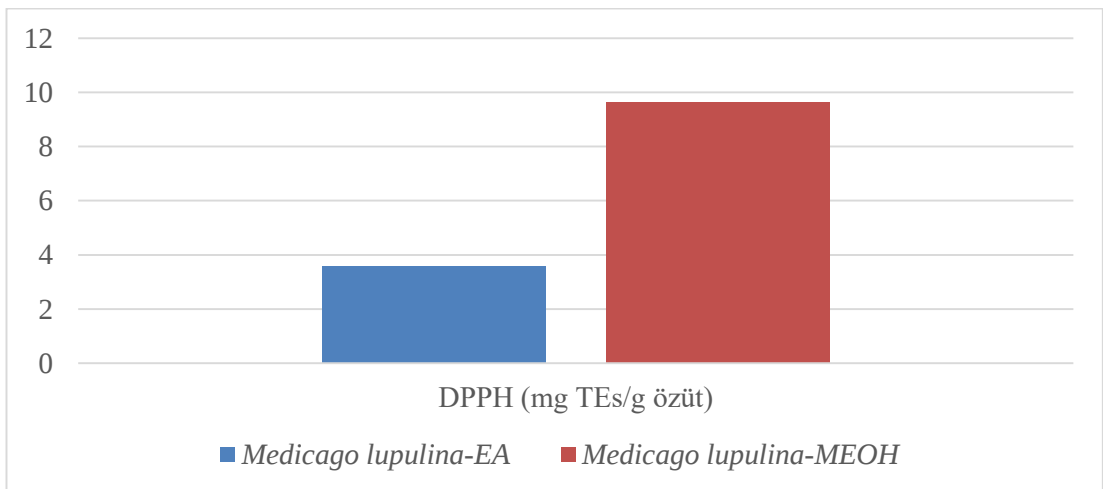
#### 4.1.3 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin DPPH radikal süpürme aktivitesi

*Medicago lupulina* bitkisinin DPPH yöntemi ile serbest radikal giderme aktivitesi araştırıldığında etilasetat ve metanol ekstraktlarında sırası ile  $3,58 \pm 0,18$  mgTEs/g özüt ve  $9,64 \pm 0,03$  mgTEs/g özüt inhibisyon göstermiştir. Metanol özütü daha yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

**Çizelge 4.7.** *Medicago lupulina* DPPH (mg TEs/g özüt) sonuçları.

| Özüt                           | DPPH (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | $3,58 \pm 0,18^*$    |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | $9,64 \pm 0,03$      |

\*Üç paralel analizin ortalaması  $\pm$  standart sapma



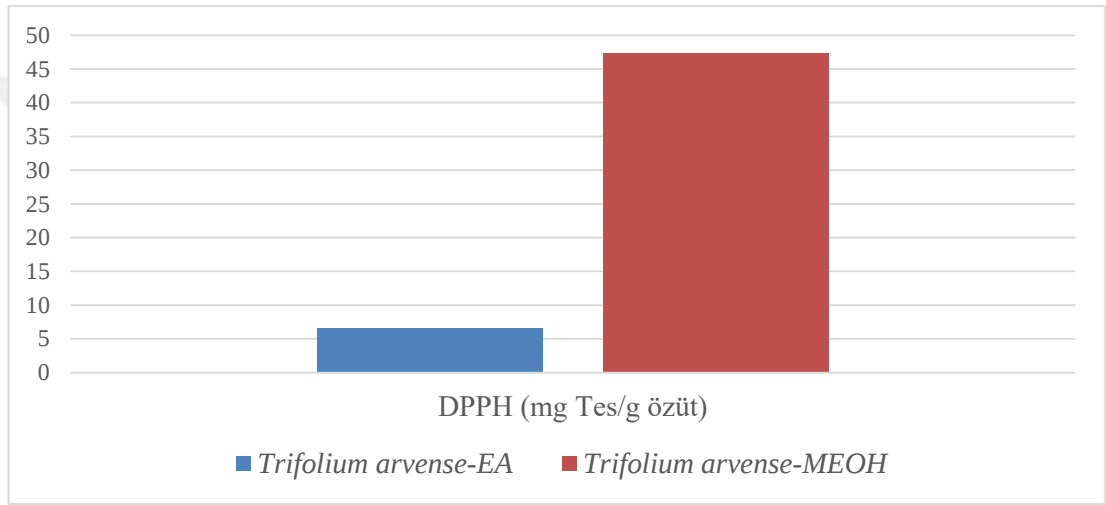
**Şekil 4.7.** *Medicago lupulina* DPPH içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

*Trifolium arvense*'nin etilasetat ve metanol özütlerinde yapılan DPPH yöntemi ile serbest radikal süpürme etkisine bakıldığında sırası ile  $6,62 \pm 0,30$  mg TEs/g özüt ve  $47,37 \pm 0,20$  mg TEs/g özüt değerleri bulunmuş ve metanol özütü daha yüksek değer vermiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.8).

**Çizelge 4.8.** *Trifolium arvense* DPPH (mg TEs/g özüt) sonuçları.

| Özüt                           | DPPH (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | $6,62 \pm 0,30^*$    |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | $47,37 \pm 0,20$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması  $\pm$  standart sapma



**Şekil 4.8.** *Trifolium arvense* DPPH içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

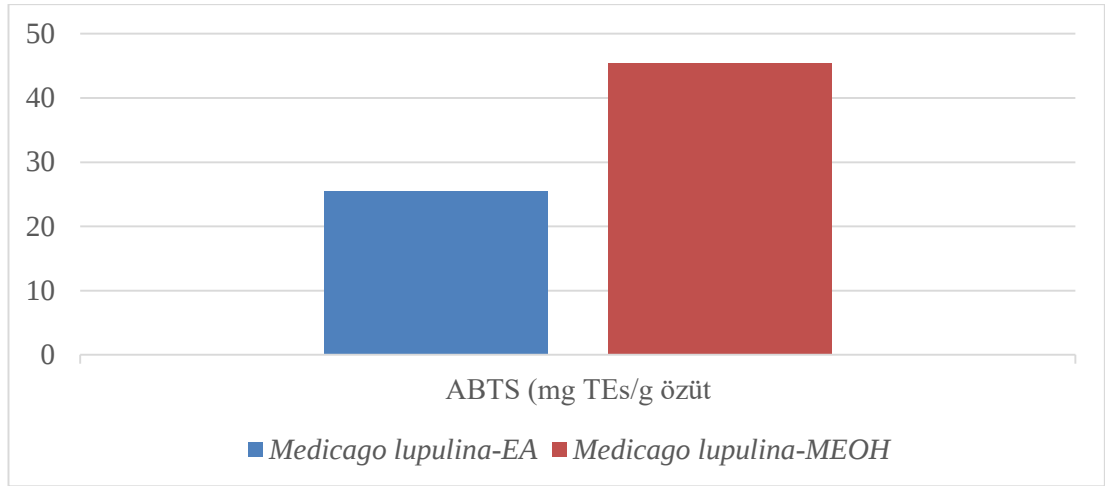
#### 4.1.4 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin ABTS radikali süpürme aktivitesi

*Medicago lupulina* bitkisinin etil asetat ve metanol özütleri için ABTS radikal süpürme aktivitesine değerlendirme yapılmış ve sırasıyla  $27,54$  mg TEs/g özüt ve  $45,39$  mg TEs/g özüt aktiviteleriyle metanol ekstresinin aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.9).

**Çizelge 4.9.** *Medicago lupulina* ABTS testi sonuçları.

| Özüt                           | ABTS (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | $25,54 \pm 0,13^*$   |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | $45,39 \pm 0,37$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması  $\pm$  standart sapma



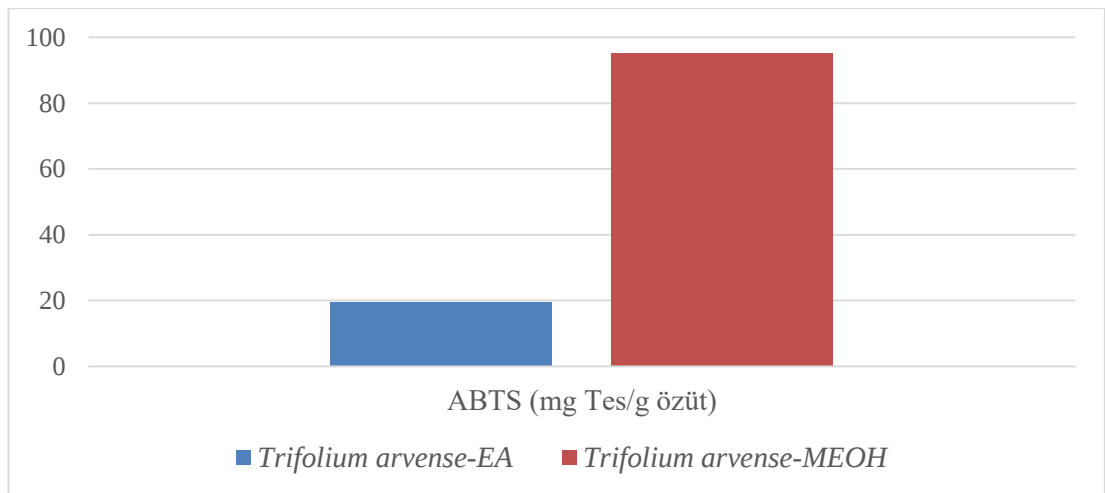
**Şekil 4.9.** *Medicago lupulina* ABTS içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

*Trifolium arvense*'nin her iki özütünde de ABTS radikal süpürme aktivitesine değerlendirilmiş ve etil asetat ile metanol için sırası ile 19,61±0,57 mg TEs/g özüt ve 95,18±0,26 mg TEs/g özüt tespit edilmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10). *Medicago lupulina*'nin metanol özütünün 2 katından daha yüksek değer *TALK arvense*'nin metanol özütünde elde edilmiştir.

**Çizelge 4.10.** *Trifolium arvense* ABTS sonuçları.

| Özüt                           | ABTS (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | 19,61±0,57*          |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | 95,18±0,26           |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



**Şekil 4.10.** *Trifolium arvense* ABTS içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

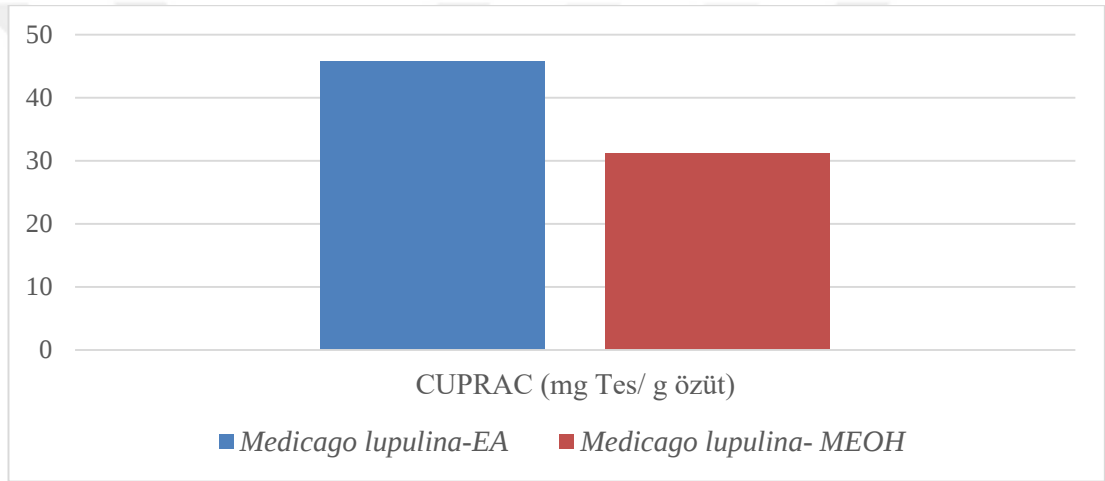
#### 4.1.5 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin CUPRAC indirgeme gücü

*Medicago lupulina* bitkisinin etil asetat ve metanol özütleri için CUPRAC indirgeme gücü testi yapılmış ve etil asetat için  $45,68 \pm 0,33$  mg TEs/g özüt ve metanol için  $31,23 \pm 0,94$  mg TEs/g özüt olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.11).

Çizelge 4.11. *Medicago lupulina* CUPRAC testi sonuçları.

| Özüt                           | CUPRAC (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|------------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | $45,68 \pm 0,33^*$     |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | $31,23 \pm 0,94$       |

\*Üç paralel analizin ortalaması $\pm$ standart sapma



Şekil 4.11. *Medicago lupulina* CUPRAC içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

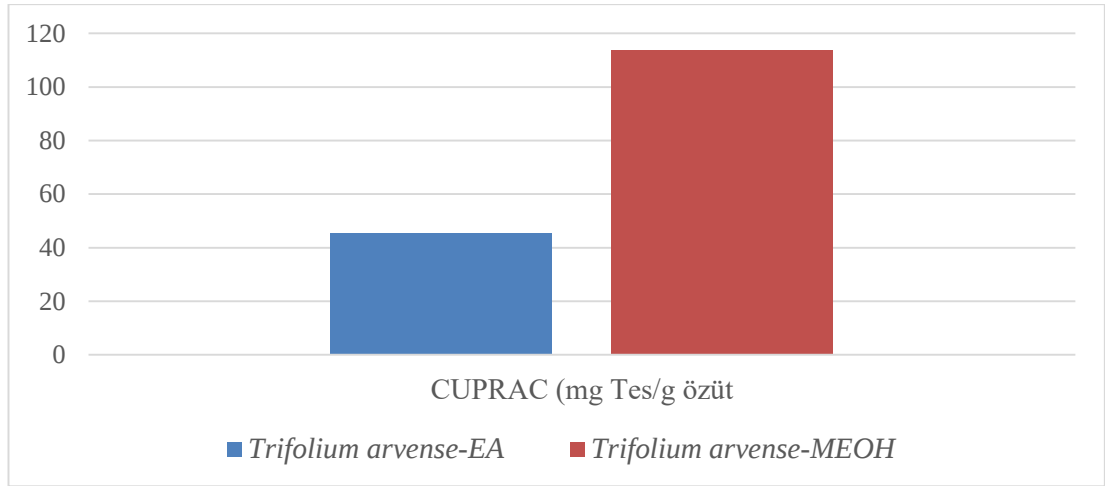
*Trifolium arvense* bitkisinin etil asetat ve metanol özütleri için CUPRAC indirgeme gücü testi yapılmış ve etil asetat için  $45,25 \pm 1,04$  mg TEs/g özüt ve metanol için  $113,79 \pm 0,83$  mg TEs/g özüt olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.12).

Her iki bitkini etil asetat özütlerinde birbirine çok yakın değerler bulunsada metanol için *Trifolium arvense*'nin sonucu *Medicago lupulina*'nın 3 katından fazla bulunmuştur.

Çizelge 4.12. *Trifolium arvense* CUPRAC testi sonuçları.

| Özüt                           | CUPRAC (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|------------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | $45,25 \pm 1,04^*$     |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | $113,79 \pm 0,83$      |

\*Üç paralel analizin ortalaması $\pm$ standart sapma



**Şekil 4.12.** *Trifolium arvense* CUPRAC içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

#### 4.1.6 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin FRAP indirgeme gücü

*Medicago lupulina* 'nın FRAP testinde etilasetat ve metanol ekstraktlarında sırası ile  $19,76 \pm 0,34 \text{ mg TE/g özüt}$  ve  $17,63 \pm 0,21 \text{ mg TE/g özüt}$  değeri bulunmuştur (Çizelge 4.13, Şekil 4.13).

*Medicago rigidula* 'nın metanol ekstresinde Çakmak vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada frap testinde  $67,01 \text{ mg}$  troloks eşdeğeri antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

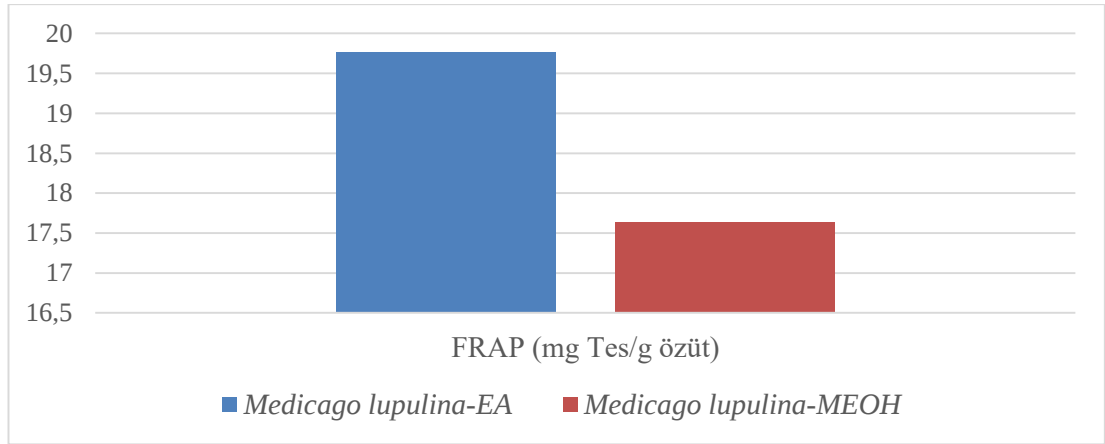
*Medicago* 'nın farklı türleri ile yapılan çalışmada *Medicago minima* 'nın  $58,05 \text{ mmol/g}$  değeri ile en düşük *Medicago segitalis* 'in  $120,84 \text{ mmol/g}$  değeri ile en yüksek değere sahip olduğu gösterilmiştir (Rodrigeus vd., 2013).

*Medicago murex* 'ten elde edilen farklı özütler değerlendirildiğinde metanol özütü  $81,94 \text{ mg TE/g özüt}$ , etil asetat özütü  $85,81 \text{ mg TE/g özüt}$  ve su özütü  $91,41 \text{ mg TE/g özüt}$  oranlarında demir indirgeme antioksidan gücünde oldukları belirtilmiştir. Genel olarak *Medicago* türleri ile yapılan FRAP testindeki değerlerden daha düşük bir değer elde edilmiştir. Genel olarak çalışmamızda;

**Çizelge 4.13.** *Medicago lupulina* FRAP testi sonuçları grafiği.

| Özüt                          | FRAP (mg TEs/g özüt) |
|-------------------------------|----------------------|
| <i>Medicago Lupulina-EA</i>   | $19,76 \pm 0,34^*$   |
| <i>Medicago Lupulina-MEOH</i> | $17,63 \pm 0,21$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması  $\pm$  standart sapma



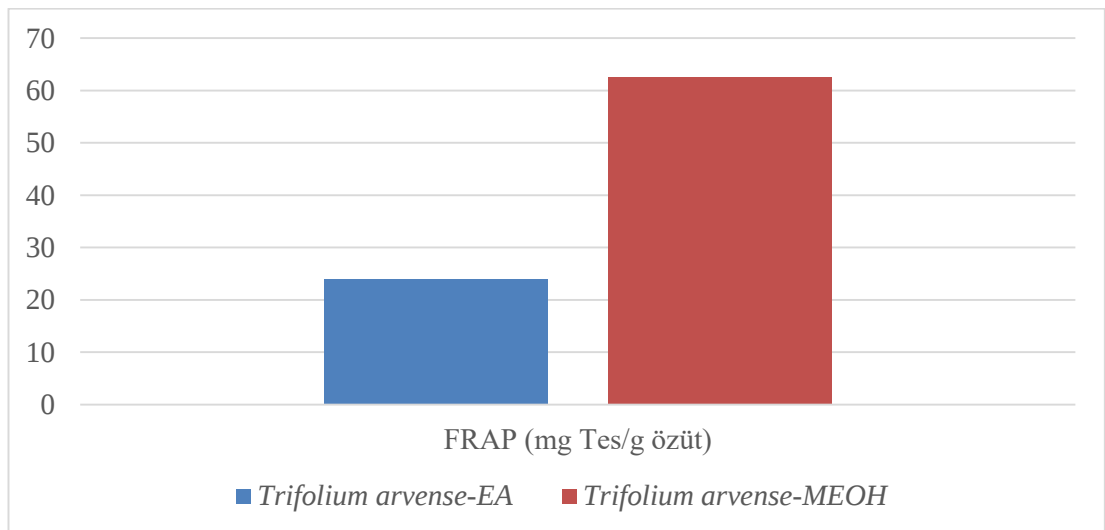
**Şekil 4.13.** *Medicago lupulina* FRAP içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

*Trifolium arvense* için her iki özütünde FRAP testi yapıldığında etil asetat ve metanol özütünde sırası ile  $23,91 \pm 0,25$  mg TEs/g özüt ve  $62,53 \pm 0,41$  mg TEs/g özüt bulunmuştur (Çizelge 4.14, Şekil 4.14). Her iki özütte *Medicago*'nun aynı özütlerine göre daha yüksek değerler vermiştir.

**Çizelge 4.14.** *Trifolium arvense* FRAP sonuçları.

| Özüt                           | FRAP (mg TEs/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | $23,91 \pm 0,25^*$   |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | $62,53 \pm 0,41$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



**Şekil 4.14.** *Trifolium arvense* FRAP içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri.

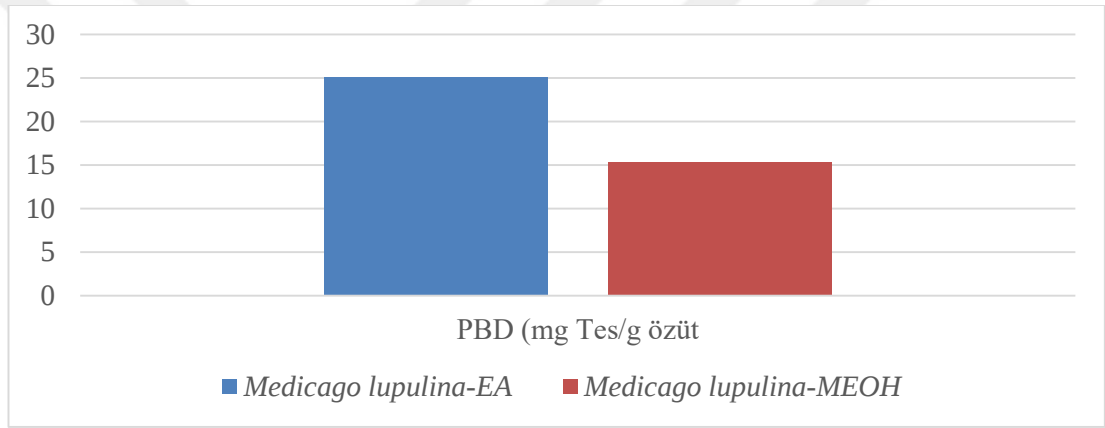
#### 4.1.7 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin toplam antioksidan kapasitesi

*Medicago lupulina* 'nın etil asetat ve metanol ekstraktlarında total antioksidan kapasiteye bakıldığında sırasıyla,  $25,06 \pm 1,00$  mgTEs/g özüt ve  $15,33 \pm 0,22$  mgTEs/g özüt değerleriyle etil asetat özütü daha güçlü bulunmuştur (Çizelge 4.15, Şekil 4.15).

Çizelge 4.15. Toplam antioksidan kapasite sonuçları.

| Özüt                           | PBD (mg TEs/ g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | $25,06 \pm 1,00^*$   |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | $15,33 \pm 0,22$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması $\pm$ standart sapma



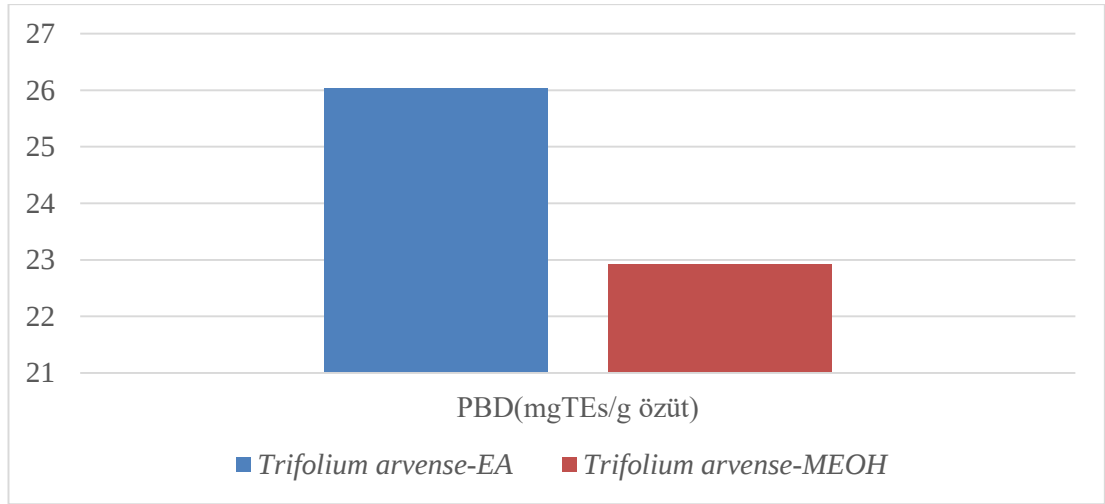
Şekil 4.15. *Medicago lupulina* PBD içerik grafiği TE: troloks eşdeğeri

*Trifolium arvense* PBD değerleri etil asetat özütü için  $26,03$  mg EDTA/g özüt ve  $22,91$  mg EDTA/g özüt sonucu elde edilmiştir (Çizelge 4.16, Şekil 4.16).

Çizelge 4.16. *Trifolium arvense* toplam antioksidan kapasite sonuçları.

| Özüt                           | PBD (mg TEs/ g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | $26,03 \pm 0,9^*$    |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | $22,91 \pm 1,32$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması $\pm$ standart sapma



Şekil 4.16. *Trifolium arvense* PBD içerik grafiği TE: troluks eşdeğeri

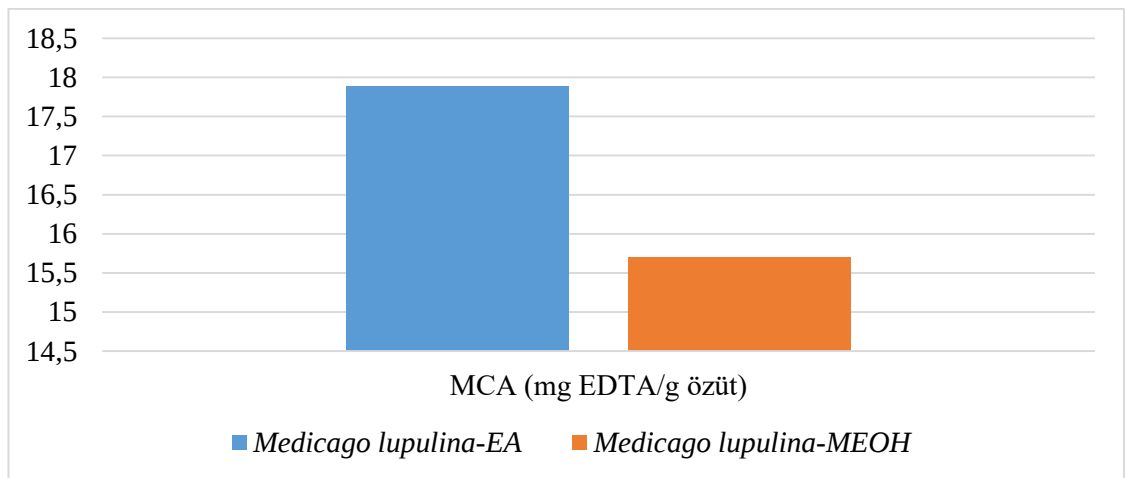
#### 4.1.8 *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* özütlerinin metal şelatlama aktivitesi

Metal elatlama aktivitesi (MCA) değerlendirilen *Medicago lupulina*’nın etil asetat ve metanol ekstratlarında sırasıyla 17,89 mg EDTA/g özüt ve 15,69 mg EDTA/g özüt olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4.17). Değerler birbirine yakın olmakla birlikte etil asetat ekstresinde daha yüksektir.

Çizelge 4.17. *Medicago lupulina* toplam MCA sonuçları.

| Özüt                           | MCA (mg EDTA/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | 17,89±0,25*          |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | 15,69±0,22           |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



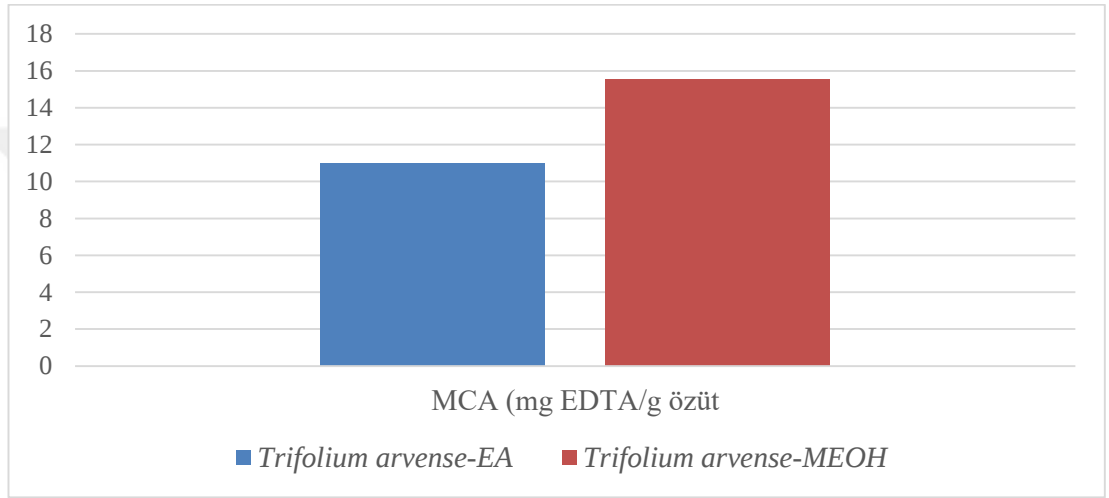
Şekil 4.17. *Medicago lupulina* metal şelatlama testi sonuçları grafiği.

*Trifolium arvense* için yapılan metal şelatlama testinde etil asetat özütü için  $11,0 \pm 1,92$  mg EDTA/g özüt ve metanol özütü için  $15,54 \pm 0,25$  mg EDTA/g özüt sonuçları elde edildi (Çizelge 4.18, Şekil 4.18).

**Çizelge 4.18.** *Trifolium arvense* toplam MCA sonuçları.

| Özüt                           | MCA (mg EDTA/g özüt) |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | $11,0 \pm 1,92^*$    |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | $15,54 \pm 0,25$     |

\*Üç paralel analizin ortalaması  $\pm$  standart sapma



**Şekil 4.18.** *Trifolium arvense* metal şelatlama testi sonuçları grafiği.

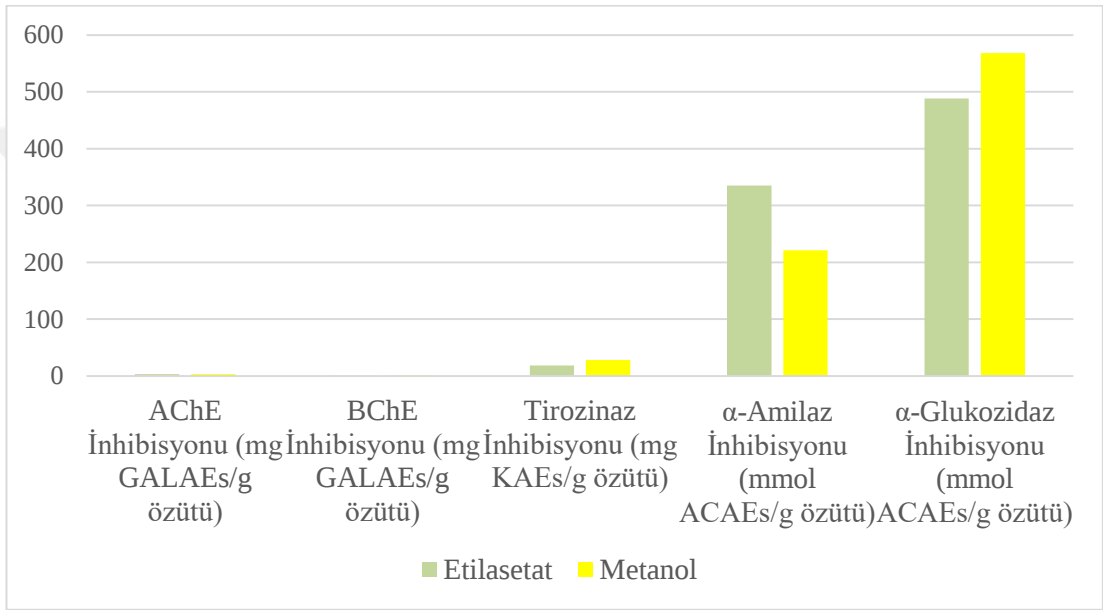
#### 4.2 Enzim İnhibisyon Testleri

Küresel sağlık problemlerinden olan Alzheimer, diabetes mellitus ve hiperpigmentasyon hastalıkları yeni enzim inhibitörlerinin keşfi sayesinde enzim inhibisyonu yaklaşımı ile tedavi edilebilme imkanına sahiptir. Alzheimer hastalığını asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitörleri ile deride oluşan hiperpigmentasyonu tirozinaz inhibitörleri ile diyabet hastalığı ise alfa amilaz ve alfa glikozidaz inhibitörleri ile tedavi etmek mümkündür (Zengin vd., 2015). Çalışmamızda *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense*'nin etilasetat ve metanol ekstraktlarında enzim inhibisyon aktiviteleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19, Çizelge 4.20, Şekil 4.20).

**Çizelge 4.19.** *Medicago lupulina* enzim inhibisyonu (IC<sub>50</sub>) konsantrasyonları sonucu.

| Özüt                           | AChE İnhibisyonu (mg GALAEs/g özütü) | BChE İnhibisyonu (mg GALAEs/g özütü) | Tirozinaz İnhibisyonu (mg KAEs/g özütü) | $\alpha$ -Amilaz İnhibisyonu (mmol ACAEs/g özütü) | $\alpha$ -Glukozidaz İnhibisyonu (mmol ACAEs/g özütü) |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>Medicago lupulina</i> -EA   | 3,48±0,01*                           | 5,76±0,09*                           | 18,66±1,23*                             | 334,99±2,40*                                      | 488±3,54*                                             |
| <i>Medicago lupulina</i> -MEOH | 3,31±0,11                            | 1,30±0,01                            | 27,84±0,07                              | 221,21±0,97                                       | 568±0,01                                              |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma

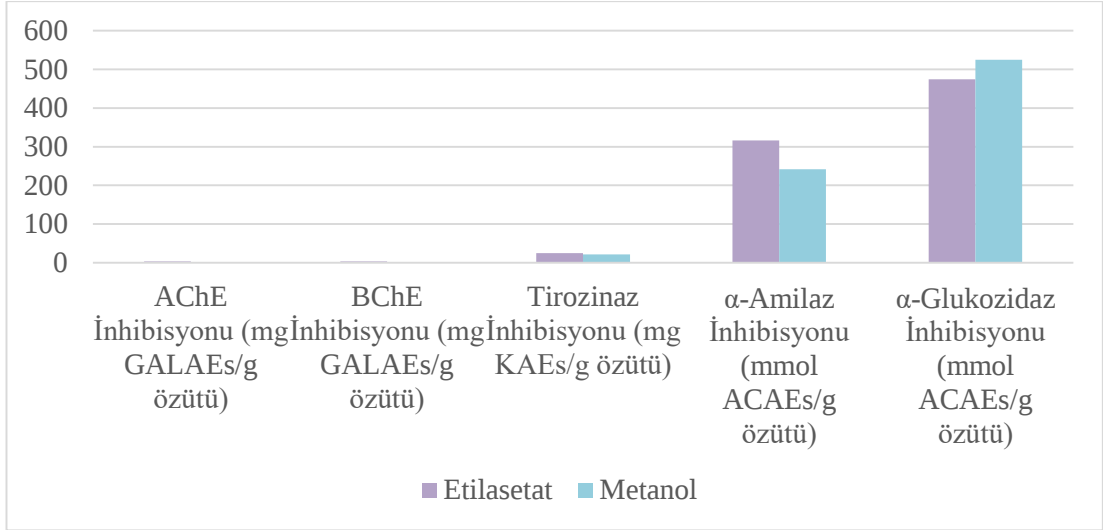


**Şekil 4.19.** *Medicago lupulina* enzim inhibisyonları.

**Çizelge 4.20.** *Trifolium arvense* enzim inhibisyonu (IC<sub>50</sub>) konsantrasyonları sonucu.

| Özüt                           | AChE İnhibisyonu (mg GALAEs/g özütü) | BChE İnhibisyonu (mg GALAEs/g özütü) | Tirozinaz İnhibisyonu (mg KAEs/g özütü) | $\alpha$ -Amilaz İnhibisyonu (mmol ACAEs/g özütü) | $\alpha$ -Glukozidaz İnhibisyonu (mmol ACAEs/g özütü) |
|--------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>Trifolium arvense</i> -EA   | 3,48±0,06*                           | 3,21±0,08*                           | 24,95±0,46*                             | 316,02±4,87*                                      | 474±7,07*                                             |
| <i>Trifolium arvense</i> -MEOH | Na                                   | 0,62±0,02                            | 20,97±0,40                              | 241,35±0,28                                       | 525±4,24                                              |

\*Üç paralel analizin ortalaması±standart sapma



**Şekil 4.20.** *Trifolium arvense* enzim inhibisyonları.

#### 4.2.1 Kolinesteraz inhibisyonu (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz)

Alzheimer hastalığı için mevcut tedavilerin çoğunluğu, kolinerjik nöronların parçalanmasını ve çeşitli AD semptomlarının başlıca nedenleri olan kolinesterazlar tarafından nörotransmitter asetilkolinin (ACh) hızlı hidrolizini içeren kolinerjik hipoteze dayanmaktadır. İnsan beyni iki tip kolinesteraz içermektedir. Bunlar asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE)'dir. Bu enzimleri inhibe etmek, ACh hidrolizini bloke ederek bilişsel eksiklikleri iyileştirmede önemli bir rol oynar. Dolayısıyla bu enzimleri inhibe edebilecek doğal kaynakların araştırılması bir hayli önemlidir (Jaipeda vd., 2023).

Çalışmamızda *Trifolium arvense* türünden hazırladığımız etilasetat ve metanol ekstraktları kolinesteraz enzim inhibisyonları açısından araştırıldığında asetilkolinesteraz için *Trifolium arvense*'nin etilasetat ekstresinde  $3,48 \pm 0,06$  mg GALAEs/g ekstrakt aktivite ve metanol ekstresinde herhangi bir aktivite tespit edilmemiştir. Bütirilkolinesteraz aktivitelerine bakıldığında ise *Trifolium arvense*'nin etilasetat ekstresinde  $3,21 \pm 0,08$  mg GALAEs/g ekstrakt aktivite tespit edilirken metanol ekstresinde  $0,62 \pm 0,02$  mg GALAEs/g ekstrakt aktivite tespit edilmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19, Çizelge 4.20, Şekil 4.20).

*Medicago lupulina* kolinesterazlara karşı inhibisyonları araştırıldığında ise asetilkolinesteraz enzimine karşı inhibisyonu etilasetat ekstresinde  $3,48 \pm 0,01$  mg GALAEs/g ekstrakt ve metanol ekstresinde  $3,31 \pm 0,11$  mg GALAEs/g ekstrakt aktivite

tespit edilmiştir. Bütirilkolinesteraz aktivitelerine bakıldığında ise etilasetat ekstresinde  $5,76 \pm 0,09$  mg GALAEs/g ekstrakt ve metanol ekstresinde  $1,30 \pm 0,01$  mg GALAEs/g ekstrakt aktivite tespit edilmiştir. Her iki örneğimizin etilasetat ekstreleri asetilkolinesteraz için aynı aktiviteyi göstermiştir. En yüksek aktivite *Medicago lupulina*'nın etilasetat ekstresinde tespit edilmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19, Çizelge 4.20, Şekil 4.20).

Çakmak vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *Medicago rigidula*'nın metanol özütü için asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz için sırası ile enzim inhibisyon aktivitesi  $2,05 \pm 0,08$  ve  $0,94 \pm 0,11$  mg GALAEs/g ekstrakt olarak bulunmuştur. Bir diğer çalışmada Pamukçu vd. (2017) *Medicago murex* türünden hazırlamış oldukları metanol, etilasetat ve su özütlerinin asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerini sırasıyla  $1,84 \pm 0,06$  mg GALAEs/g ekstrakt,  $1,17 \pm 0,14$  mg GALAEs/g ekstrakt ve  $2,02 \pm 0,16$  mg GALAEs/g ekstrakt olarak tespit etmişlerdir. Suyundikov (2020) *Thermopsis turcica* türü ile yaptığı çalışmada hazırlamış olduğu metanol özütünün asetilkolinesteraz aktivitesini  $3,97 \pm 0,050$  mg GALAE/g ekstrakt aktivite olarak tespit etmiştir. Fatıma vd. (2023) tarafından *Sophora mollis* yaprak kısımlarından hazırlanan özütün anti-asetilkolinesteraz aktivitesi en yüksek  $1000 \mu\text{g} / \text{mL}$  konsantrasyonda en yüksek inhibisyon yüzdesini ( $114,60 \pm 19,95$ ) göstermiştir. Ayrıca *Sophora mollis*, *Mucuna pruriens* ve *Indigofera atropurpurea* türlerinin etkinliği sırasıyla *Sophora mollis* (IC<sub>50</sub> değeri  $75.96 \mu\text{g/mL}$ ) > *Mucuna pruriens* (IC<sub>50</sub> değeri  $508,20 \mu\text{g/mL}$ ) > *Indigofera atropurpurea* (IC<sub>50</sub> değeri  $560 \mu\text{g/mL}$ ) olarak kaydedilmiştir. Ahmad vd. (2019) tarafından *Trifolium repens* bitkisinin n-hekzan (Tr.Hex), kloroform (Tr.Chf), etanol (Tr.Et), metanol (Tr.Cme), ve su (Tr.Aq) ekstratları için asetilkolinesteraz inhibisyon etkinliği çalışmış; yapılan çalışmada Tr. Chf, sırasıyla 1000, 500, 250, 125 ve  $62,5 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda sırasıyla  $82,4 \pm 0,57$ ,  $77,9 \pm 2,24$ ,  $72,1 \pm 0,47$ ,  $67,9 \pm 0,96$  ve  $62,3 \pm 0,57$  enzim inhibisyon değerleri tespit edilmiştir. IC<sub>50</sub> değeri,  $21 \mu\text{g/mL}$  olarak alınmış ve bu durumda Tr.Chf'nin tüm numuneler arasında en güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiş. Aynı çalışmada bütirilkolinesteraz inhibitör çalışılmış ve bitkinin Tr.Chf ve Tr.Et ekstratları test edilen en yüksek  $1 \text{ mg} / \text{mL}$  konsantrasyonda  $86,9 \pm 1,30$  ve  $77,5 \pm 0,49$  değerlerinde inhibisyon sergilemişler. IC<sub>50</sub> değerleri Tr.Chf ve Tr.Et için sırasıyla 15 ve  $125 \mu\text{g/mL}$  olarak hesaplanmıştır. Eruygur vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada *Medicago sativa*'nın farklı büyüme aşamalarında toplanan bitkinin çiçeklenme öncesi

yapraklarda asetilkolinesteraz aktivitesi en yüksek değerde 561,29 IC50 (µg/mL) bulunmuştur. Çiçek kısmından hazırlanan özütlerin butirilkolinesteraz aktivitesi ise 1794,77 IC50 (µg/mL) değeri ile en yüksek bulunmuştur. Edrizi vd. (2018) tarafından *Marrubium alysson* ve *Peganum harmala* metanol özütü ile yapılan çalışmada butirilkolinesteraz aktivitesi 1 mg/ml konsantrasyonda ve 37 °C'de *Marrubium alysson*'un metanol ekstraktında %72,5±2,07'lik bir inhibitör aktivite ile en aktif olarak bulunmuştur. *Peganum harmala*'dan metanol ekstraktları % 50,53±1.98 inhibisyon göstermiştir. 10 µg/ml konsantrasyonda ve 37 °C' de *Marrubium alysson* ve *Peganum harmala*'nın metanol ekstraktı butirilkolinesterazı %38,23±2,45 ve %27,35±1,54 ile inhibe ettiği tespit edilmiştir. Alhawari vd., (2023) yaptıkları çalışmada *Cassia timoriensis* ve *Cassia grandis* bitkilerini kullanmışlardır. *C. timoriensis*'in çiçek kısımlarından su, etilasetat, metanol ve n-hekzan ekstratlarını hazırlamışlardır. *C. grandis*'in ise kabuk kısımlarından su, etilasetat, metanol ve n-hekzan ekstratlarını hazırlamışlardır. Ekstraktların asetilkolinesteraz inhibisyon yetenekleri araştırılmış ve sonuçlar sırasıyla n-hekzan özütü için %47,70±0,35, su özütü için %51,23±0,07, metanol özütü için %83,90±0,75 ve etilasetat özütü için %86,19±1,75 olarak tespit etmişlerdir. Al-Hmadi vd. (2024) yapmış oldukları çalışmada *Glycyrrhiza foetida* türünün toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlamış oldukları kloroform, etilasetat ve metanol özütlerinin AChE ve BChE inhibisyon aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda toprak üstü kısımlarından hazırlanan özütlerde AChE için en yüksek aktiviteyi 2,23±0,11 mg GALAE/g ile kloroform özütünde, BChE için ise en yüksek aktiviteyi 3,39±0,79 mg GALAE/g ile etilasetat özütünde tespit etmişlerdir. Kök kısımlarının sonuçlarına bakıldığında ise AChE için en yüksek sonucu 2,29±0,20 mg GALAE/g ile etilasetat özütünde, BChE inhibisyonu için ise en yüksek sonucu 3,75±0,30 mg GALAE/g ile kloroformda tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

#### 4.2.2 $\alpha$ -amilaz ve $\alpha$ -glukozidaz İnhibisyon Değerleri

Diabetes mellitus hastalığının etkili yönetimi için güncel bir yaklaşım olan enzim inhibisyonunun temel prensibi, karbonhidrat hidrolizini sağlayan enzimlerin inhibisyonu yoluyla tüketilen karbonhidratların sindirimini azaltarak diyetle ilişkili hiperglisemiye azaltmaktır. Sindirim sistemindeki temel bir terapötik hedef olan pankreatik  $\alpha$ -amilaz nişastanın maltoza hidrolizinin ilk adımını katalize eder ve bu maltozlar  $\alpha$ -glukozidazlar tarafından glikoza daha fazla parçalanır. Bu nedenle,  $\alpha$ -

amilazın etkisini azaltarak elde edilen nişasta hidrolizinin gecikmesi, yemek sonrası hiperglisemide glikoz artışını düzenlemede önemli bir rol oynar (Dandekar, 2021).

Bu açıdan değerlendirildiğinde  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilecek inhibitörlerin keşfi önem arz etmektedir. Bu kapsamda çalışmamızda *Trifolium arvense* ve *Medicago lupulina* türlerinden hazırlanmış olan farklı özütlerin glukoz metabolizmasında rol alan enzimler olan  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilme yetenekleri tespit edilmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre; *Trifolium arvense* türünden hazırlanan özütlerin  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyonları sırasıyla etilasetat özütü için  $316,02 \pm 4,87$  mmol ACAE/g ekstrakt ve metanol özütü için  $241,35 \pm 0,28$  mmol ACAE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *T. arvense* etilasetat ekstraktlarında  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu  $474 \pm 7,07$  mmol ACAEs/g ekstrakt ve metanol ekstraktları için  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu  $525 \pm 4,24$  mmol ACAEs/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Bir diğer tür olan *Medicago lupulina* için ise  $\alpha$ -amilaz inhibisyonu etilasetat ekstraktlarında  $334,99 \pm 2,40$  mmol ACAEs/g ekstrakt aktivite ve metanol ekstraktları için  $221,21 \pm 0,97$  mmol ACAEs/g ekstrakt aktivite tespit edilmiştir. *M. lupulina* türü için  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon sonuçlarına bakıldığında ise etilasetat ekstraktlarında enzim inhibisyonu  $488 \pm 3,54$  mmol ACAEs/g ekstrakt aktivite ve metanol ekstraktları için ise  $568 \pm 0,01$  mmol ACAEs/g ekstrakt aktivite tespit edilmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19, Çizelge 4.20, Şekil 4.20).

Çakmak vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada *Medicago rigidula* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol özütü için  $\alpha$ -amilaz enzim inhibisyon aktivitesi  $0,73 \pm 0,04$  mmol ACAEs/g ekstrakt ve  $\alpha$ -glukozidaz enzim inhibisyonu aktivitesi  $1,30 \pm 0,09$  mmol ACAEs/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Pamukçu vd (2017) çalışmalarında *Medicago murex* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları metanol, etilasetat ve su özütlerinin  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonlarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda hem  $\alpha$ -amilaz hem de  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu açısından en yüksek aktivite tespit edilen özütün etilasetat ( $\alpha$ -amilaz:  $1,01 \pm 0,02$  mmol ACAE/g ekstrakt,  $\alpha$ -glukozidaz:  $6,34 \pm 0,17$ ) özütü olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada Ceylan vd., (2021) *Lathyrus czechottianus* türünden hazırlamış oldukları etilasetat ve su ekstraktlarının  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyon yeteneklerini araştırmışlar ve çalışmanın sonucunda  $\alpha$ -amilaz için etilasetat ekstraktını  $0,34 \pm 0,01$  mmol ACAEs/g ekstrakt, su ekstraktını  $0,14 \pm 0,01$  mmol ACAEs/g

ekstrakt olarak tespit etmişlerdir.  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu için ise sonuçları etilasetat özütü için  $1,56 \pm 0,13$  mmol ACAEs/g ekstrakt ve su özütü için  $6,49 \pm 0,09$  mmol ACAEs/g ekstrakt olarak bildirmişlerdir. Llorent-Martinez vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada *Lathyrus nissolia* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları metanol özütlerinin  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonlarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $3,66 \pm 0,06$   $\mu\text{g/ml}$  ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonunu  $1,01 \pm 0,01$   $\mu\text{g/ml}$  olarak tespit etmişlerdir. Ashafa vd. (2019) yaptıkları çalışmada *Lessertia montana* türünün kabuk ve tohum kısımlarından hazırladıkları farklı ekstratların  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonlarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda kabuk kısmında  $\alpha$ -amilaz inhibisyonu için en yüksek aktiviteyi  $1815 \pm 247,80$   $\mu\text{g/ml}$  ile etanol ekstraktında, tohum kısmında ise  $1191 \pm 10,46$   $\mu\text{g/ml}$  sulu ekstraktta tespit etmişlerdir. Özütlerin  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonlarına bakıldığında ise kabuk kısmı için en yüksek aktivite  $2609 \pm 47,54$   $\mu\text{g/ml}$  ile sulu özütte, tohum kısmı için ise en yüksek aktivite  $2947 \pm 223,20$   $\mu\text{g/ml}$  ile yine sulu özütte tespit etmişlerdir. Tundis vd. (2015), çalışmalarında *Trifolium pratense* ile *Trifolium repens* türlerinin etanol özütlerini çiçek bölümlerinden hazırlayarak  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonlarını çalışmışlardır. Elde edilen bulgulara göre tüm ekstraktların konsantrasyona bağlı bir şekilde hipoglisemik aktivite sergilediğini bildirmişlerdir. *T. repens* özütlerinin  $\alpha$ -amilaz inhibisyonunu  $25,0 \pm 2,9$   $\mu\text{g/mL}$  ve  $\alpha$ -glukosidaz inhibisyonunu  $69,5 \pm 3,1$   $\mu\text{g/mL}$  olarak tespit etmişlerdir. *T. pratense* özütleri için ise sonuçlar  $\alpha$ -amilaz inhibisyonu için  $78,7 \pm 2,1$   $\mu\text{g/mL}$  ve  $\alpha$ -glukosidaz inhibisyonu için  $70,8 \pm 3,9$   $\mu\text{g/mL}$  olarak bildirilmiştir. Thilak vd. (2023), yaptıkları çalışmada *Senna alata* türünün yaprak kısımlarından farklı konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80  $\mu\text{g/ml}$ ) hazırladıkları aseton, metanol ve su özütlerinin,  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz enzimlerini inhibe edebilme potansiyellerini değerlendirilmişlerdir. Çalışmanın sonucunda  $\alpha$ -amilaz inhibisyonu için en yüksek sonuçlar 80  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda sırasıyla aseton için  $\%59,88 \pm 1,40$ , metanol için  $\%27,74 \pm 0,30$  ve su için  $\%13,53 \pm 1,23$  olarak tespit edilmiştir.  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu için en yüksek sonuçlar 80  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda sırasıyla aseton özütü için  $\%21,23 \pm 0,60$  metanol özütü için  $\%82,940 \pm 0,157$  ve su özütü için  $\%81,326 \pm 0,738$  olarak tespit edilmiştir.

#### 4.2.3 Tirozinaz inhibisyonu

Tirozinaz, bakterilerde, memelilerde, bitkilerde ve mantarlarda melanin biyosentezinde önemli bir enzimdir. Melanin enziminin cildi UV hasarından koruduğu iyi bilinmektedir ancak aşırı ekspresyonu durumunda çillenmeye, melezmaya, cilt kanserine ve yaşlılık lekelerine neden olabilmektedir. Tirozinaz inhibitörlerinin kullanımı ise cilt yaşlanması ve pigmentasyon bozukluklarını önleyici etkileri ile ilaç ve kozmetik endüstrisinde büyük bir öneme sahiptir. Bitkisel ikincil metabolit gruplarından olan flavonoidler, tirozinazın aktif bölgesindeki bakır iyonlarıyla etkileşime girebilen polihidroksifenolik yapıları nedeniyle metal şelatlama yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, tirozinaz inhibisyonunun keşfi için umut vadeden model bileşiklerdir (Almaraz-Abarca vd., 2023). Buradan hareketle çalışmamızda tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi araştırılmıştır.

Çalışmamızda *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* türlerinden hazırlanan farklı özütlerin tirozinaz inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgulara göre *Medicago lupulina* türü için tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi sırasıyla etilasetat ekstresinde  $18,66 \pm 1,23$  mg KAEs/g ekstrakt ve metanol özütünde  $27,84 \pm 0,07$  mg KAEs/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. *Trifolium arvense* tirozinaz enzim inhibisyonu ise sırasıyla etilasetat özütü için  $24,95 \pm 0,46$  mg KAEs/g ekstrakt ve metanol özütü için  $20,97 \pm 0,40$  mg KAEs/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.19, Çizelge 4.20, Şekil 4.20).

Çakmak vd. (2017), tarafından yapılan çalışmada *Medicago rigidula* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları metanol özütü için tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesi  $16,36 \pm 0,85$  mg KAEs/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Pamukçu vd. (2017) çalışmalarında *Medicago murex* türünün toprak üstü kısımlarından hazırladıkları etilasetat, metanol ve su özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon yeteneklerini araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre tirozinaz inhibisyon yeteneği  $4,23 \pm 0,56$  mg KAE/g ekstrakt ile  $28,29 \pm 1,02$  mg KAE/g ekstrakt aralığında bildirilmiştir. Al-Hmadi vd. (2024), yapmış oldukları çalışmada *Glycyrrhiza foetida* türünün toprak üstü ve kök kısımlarından hazırlamış oldukları kloroform, etilasetat ve metanol özütlerinin tirozinaz inhibisyon yeteneklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda tüm özütlerin tirozinaz enzimini inhibe edebilme potansiyelinin  $52,84 \pm 3,10$ -  $80,34 \pm 1,98$  mg KAE/g aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Maneeachi ve Rinthong (2018),

çalışmalarında *Cajanus cajan* bitkisinin kök, gövde ve tohum kısımlarının metanol, dichloromethane and su ekstraktlarının tirozinaz inhibitör aktivitelerini araştırmıştır. Sonuçlar, ekstraktların 3,55 – 12,43 mg / ml arasında değişen IC50 değerleri ile tirozinaz inhibitör aktivitesi gösterdiğini ortaya koymuştur. Thummajitsakul vd. (2022), yaptıkları çalışmada *Vigna mungo* (L.) türünden hazırlamış oldukları özütlerin tirozinaz inhibitör aktivitelerine bakmışlardır. Çalışmanın sonucunda etanol ekstraktı için 22,02±6,74 mg/ml ve ardından su ekstraktı için tirozinaz inhibisyonu 398,86 ±243,29 mg/ml olarak bildirilmiştir.

### 4.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 4.3.1 Hücre hatları

Çalışma kapsamında *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* etil asetat ve metanol ekstraktlarının antikanser ve sitotoksik aktivitelerinin değerlendirilmesi için Hela ve L929 hatları kullanılmıştır. İnsan rahim ağzı kanseri hücre hattı Hela (HUKUK, Şap Enstitüsü, Ankara, Turkey) ve sağlıklı fare fibroblast hattı olan L929 (HUKUK, Şap Enstitüsü, Ankara, Turkey), %10 FBS (Fetal Sığır Serum), %1 penisilin / streptomisin içeren yüksek glukoz DMEM besiyerinde (Sigma, Katalog No. D6429) kültür edilmiştir.

#### 4.3.2 Uygulama örneklerinin hazırlanması

Örnekler 2 mg/ml stok konsantrasyonda hazırlanmış ve partiküllerin dağılımı için sonikatör kullanılmıştır. Ardından hazırlanan stok çözeltiler 0,2 µm'luk polikarbonat filtre ile sterilize edilmiş ve kullanım için 1 mg/ml-125 µg/ml aralığındaki konsantrasyonda DMEM besiyeri ile seyreltilmiştir.

#### 4.3.3 Antikanser ve hücre sitotoksite deneyi

Hücre canlılığının belirlenmesi, hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenazın aktivitesini ölçen (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için, her iki hücre hattı da 96 kuyucuklu platelere 1x 10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde ekilmiş ve plateler %5 CO<sub>2</sub> 37 °C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücre kültür ortamı 2 mg/ml-125 µg/ml aralığında aralığında *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* etil asetat ve metanol ekstraktlarını içeren taze besiyeri ortamıyla

değiştirilmiştir. Kontrol kuyucuklarının besiyerleri de değiştirilerek tazelenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda MTT solüsyonu final konsantrasyonu 0,5 mg/ml olacak şekilde her bir kuyucuğa eklenmiştir. İnkübasyondan üç saat sonra, oluşan formazan kristalleri oluşumu kontrol edilerek, kristaller DMSO ile çözündürülmüş ve elde edilen renk, 492 nm dalga boyunda ChroMate®ELISA reader cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Her deney, üç tekrarlı olarak iki hücre hattı için paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların uygulanmadığı, yalnızca besiyeri içeren kuyucuklar kontrol görevi görmüş, hücre canlılık yüzdesi, kontrol grubuna göre kıyaslanarak aşağıdaki denklem 4.1 ile belirlenmiştir.

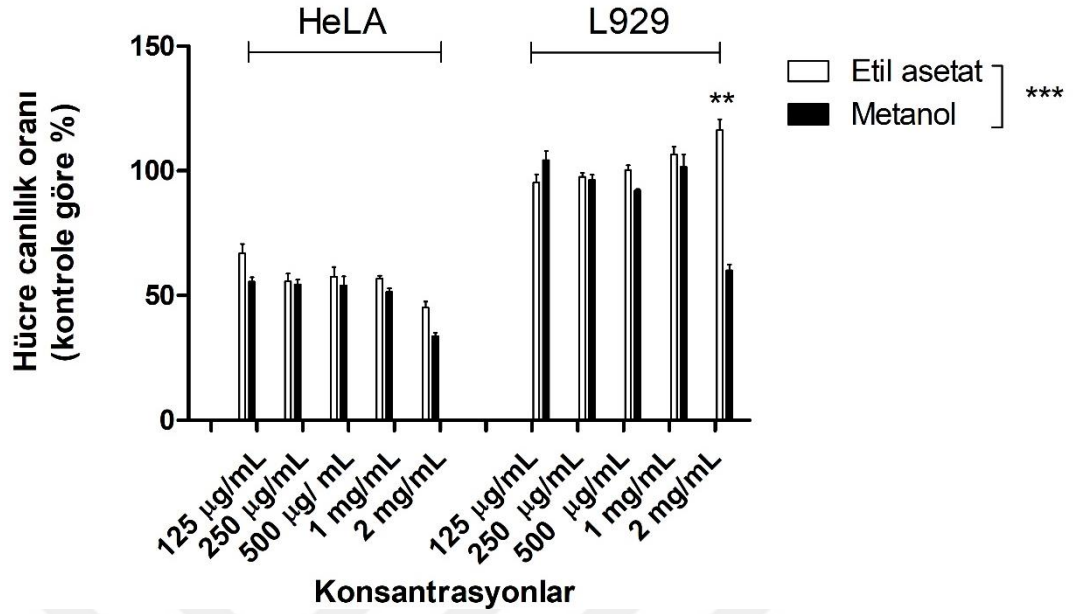
$$\% \text{ Canlılık} = [(A_{\text{örnek}})/(A_{\text{kontrol}})] \times 100 \quad (4.1)$$

$A_{\text{kontrol}}$  kontrol kuyusunun absorbansını,  $A_{\text{örnek}}$  ekstrakt uygulama kuyu absorbansını göstermektedir.

#### 4.3.4 Hücre kültürü ve MTT değerleri

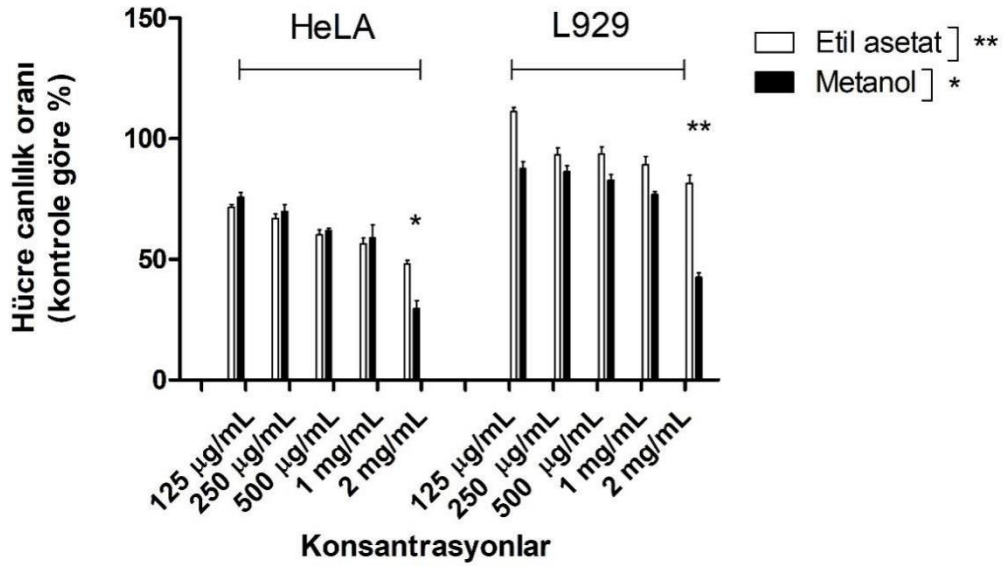
Çalışma kapsamında *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense* bitkilerinin etil asetat ve metanol ekstraktlarının rahim ağzı kanseri hücre hattı (HeLa) üzerinde antikanser etkilerinin belirlenmesi amaçlanmış olup, antikanser aktivite için sağlıklı hücrelere etki etmeyen selektif dozun belirlenmesi için uygulama konsantrasyonları (125, 250, 500 µg/ml ve 1 mg/ml, 2 mg/ml sağlıklı fare fibroblast hücrelerine (L929) uygulanmıştır. Gümüşhan Aktaş, 2018 yaptığı çalışmada keçiboynuzu yapraklarından metanol ve etanol ekstraktları hazırlamış ve söz konusu ekstrenin HeLa hücrelerinde DNA sentezini baskılayarak mitotik aktiviteyi ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini belirlemiştir. Yine aynı şekilde Custodio vd., 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında *C. siliqua* ağaçlarının dişi, erkek ve hermafrodit olarak sınıflandırılan cinslerinin yapraklarından ayrı ayrı metanol ekstraktları hazırlayarak HeLa hücrelerine 24 saat süreyle uygulayarak bulgularını raporlamışlar ve sonuçta erkek ve hermafrodit ağaçların yapraklarından hazırlanan metanol ekstraktlarının, HeLa hücre şoğalmasını daha yüksek oranda inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvenses*den elde edilen sonuçlar Şekil 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ile çizelge 4.21 ve çizelge 4.22’de verilmiştir.

*Trifolium arvense* & MTT 24 Saat



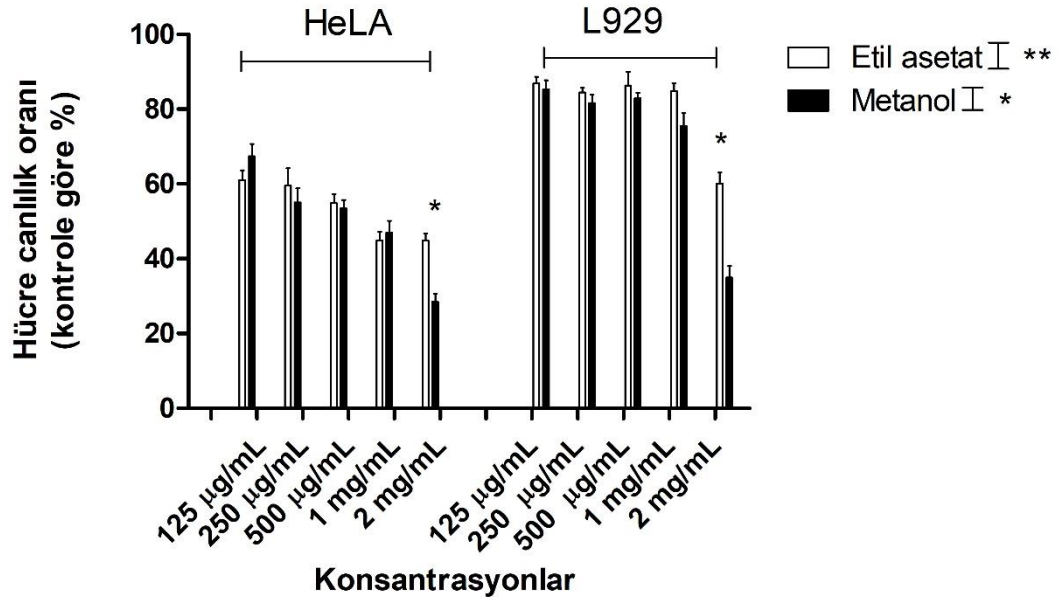
Şekil 4.21. *Trifolium arvense* etil asetat ve metanol ekstreleri ile 24 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

*Trifolium arvense* & MTT 48 Saat



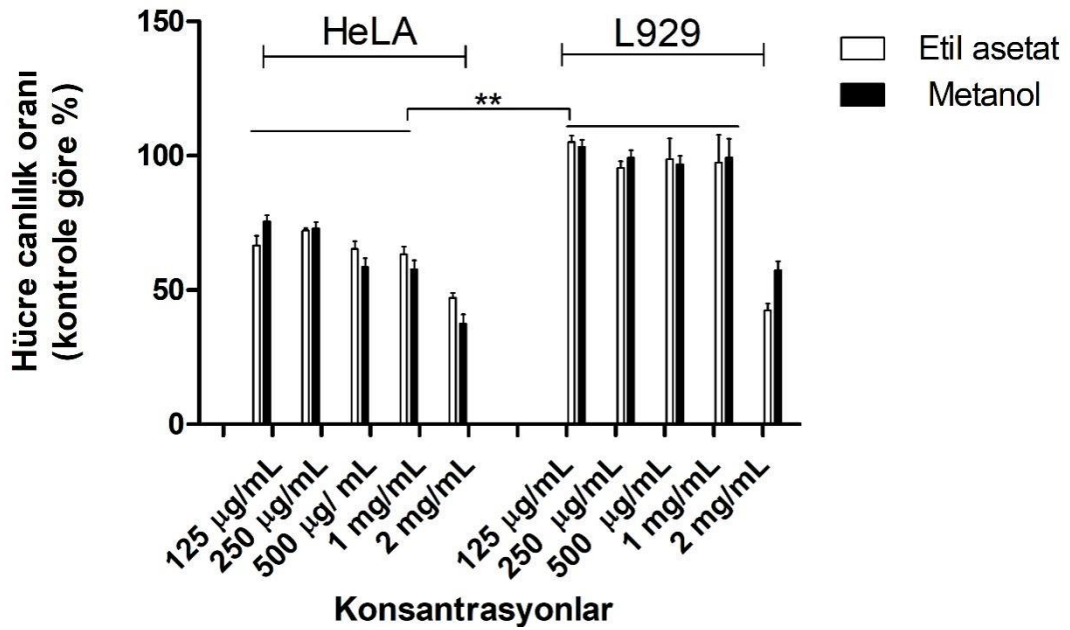
Şekil 4.22. *Trifolium arvense* etil asetat ve metanol ekstreleri ile 48 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

### *Trifolium arvense* & MTT 72 Saat



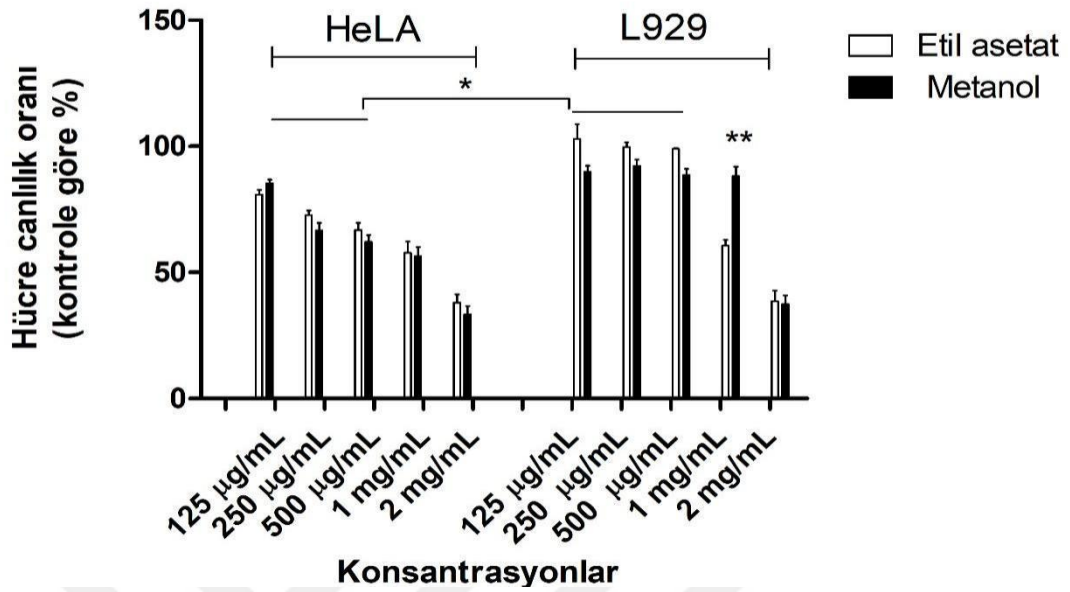
Şekil 4.23. *Trifolium arvense* etil asetat ve metanol ekstraktları ile 72 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

### *Medicago lupulina* & MTT 24 Saat



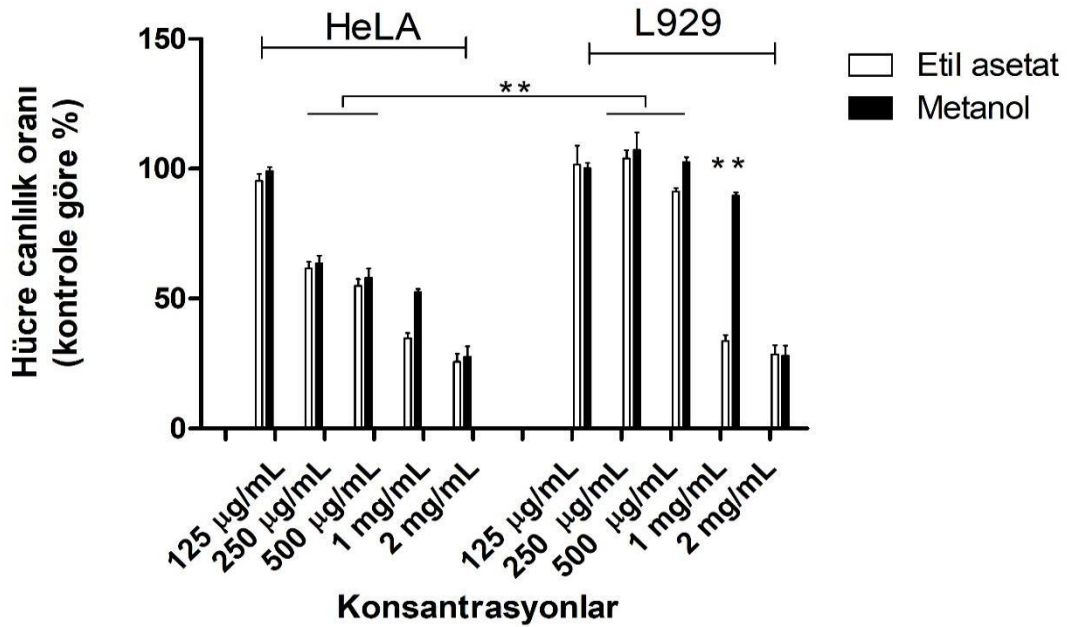
Şekil 4.24. *Medicago lupulina* etil asetat ve metanol ekstraktları ile 24 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

### Medicago lupulina & MTT 48 Saat



Şekil 4.25. *Medicago lupulina* etil asetat ve metanol ekstreleri ile 48 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

### Medicago lupulina & MTT 72 Saat



Şekil 4.26. *Medicago lupulina* etil asetat ve metanol ekstreleri ile 72 saatte inkübe edilen HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

24 saat için tüm uygulama dozlarında, kanser ve sağlıklı hücreler için alınan % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (\*\*;  $p < 0,0001$ ). Bununla birlikte maddenin ekstraksiyon metodunun (etil asetat, metanol) antikanser aktivite değerlendirmeleri için kullanılan HeLa hücre hattındaki canlılık düzeyinde anlamlı bir farklılık oluşturmadiğı ( $p > 0,05$ ), 2 mg/ml uygulama konsantrasyonu için metanol ekstraktının L929 hücrelerinde etil asetata göre anlamlı düzeyde sitotoksitite oluşturduğu belirlenmiştir (\*\*;  $p < 0,01$ ).

48 saat için tüm uygulama dozlarında, kanser ve sağlıklı hücreler için alınan % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (etil asetat ekstraktları için \*\*;  $p < 0,01$ , metanol ekstraktları için \*;  $p < 0,05$ ). Bu bağlamda 2 mg/ml uygulama konsantrasyonu için metanol ekstraktının HeLa (\*;  $p < 0,05$ ) ve L929 (\*\*;  $p < 0,01$ ) hücre hatlarının her ikisinde de etil asetata göre anlamlı düzeyde sitotoksitite oluşturduğu belirlenmiştir.

72 saat için gerçekleştirilen deneylerde, tüm uygulama dozlarında, kanser ve sağlıklı hücreler için alınan % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (etil asetat ekstraktları için \*\*;  $p < 0,01$ , metanol ekstraktları için \*;  $p < 0,05$ ). Bu bağlamda 2 mg/ml uygulama konsantrasyonu için metanol ekstraktının HeLa (\*;  $p < 0,05$ ) ve L929 (\*;  $p < 0,05$ ) hücre hatlarının her ikisinde de etil asetata göre anlamlı düzeyde sitotoksitite oluşturduğu belirlenmiştir. İlgili ekstraktlar için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri çizelge 4.21’de verilmiştir.

**Çizelge 4.21.** *Trifolium arvense* etil asetat ve metanol ekstreleri için hesaplanan  $IC_{50}$  değerleri HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

| Zaman (saat) | <i>T. arvense</i><br>(Etil asetat)<br>$IC_{50}$ (mg/ml) | <i>T. arvense</i><br>(Metanol)<br>$IC_{50}$ (mg/ml) |
|--------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 24 saat      | 1,433±0,069                                             | 0,492±0,078                                         |
| 48 saat      | 1,781±0,032                                             | 0,954±0,12                                          |
| 72 saat      | 0,786±0,053                                             | 0,515±0,079                                         |

24 saat için 2 mg/ml dışındaki tüm uygulama dozlarında, kanser ve sağlıklı hücreler için alınan % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (\*\*;  $p < 0,01$ ).

Bununla birlikte maddenin ekstraksiyon metoduna bağı farklı ekstre uygulamalarının HeLa ve L929 hücre hattındaki canlılık düzeyinde anlamlı bir farklılık oluşturmadığı ( $p > 0,05$ ) belirlenmiştir.

48 saatlik inkübasyonda, 125, 250 ve 500  $\mu\text{g/ml}$  uygulama dozları için, kanser ve sağlıklı hücreler için alınan % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (\*;  $p < 0,05$ ). Bu bağlamda metanol ekstresinin 1 mg/ml uygulama konsantrasyonu için ise farklılığın anlamlılık düzeyi daha yüksektir (\*\*;  $p < 0,01$ ). Etil asetat ekstresinin 1 mg/ml uygulaması ve 2 mg/ml uygulama dozu her iki ekstre içinde iki hücre hattında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

72 saat için gerçekleştirilen deneylerde, 250 ve 500  $\mu\text{g/ml}$  uygulama dozlarında, kanser ve sağlıklı hücreler için alınan % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştur (\*\*;  $p < 0,05$ ). Bu bağlamda metanol ekstresinin 1 mg/ml uygulama konsantrasyonu için ise farklılığın anlamlılık düzeyi daha yüksektir (\*\*;  $p < 0,01$ ). Etil asetat ekstresinin 1 mg/ml uygulaması ve 125  $\mu\text{g/ml}$ , 2 mg/ml uygulama dozu her iki ekstre için de iki hücre hattında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ). İlgili ekstraktlar için hesaplanan  $\text{IC}_{50}$  değerleri çizelge 4.22’de verilmiştir.

**Çizelge 4.22.** *Medicago lupulina* etil asetat ve metanol ekstreleri için hesaplanan  $\text{IC}_{50}$  değerleri HeLa ve L929 hücrelerinin kontrole göre yüzde canlılık sonuçları.

| Zaman (saat) | <i>M. lupulina</i><br>(Etil asetat)<br>$\text{IC}_{50}$ (mg/ml) | <i>M. lupulina</i><br>(Metanol)<br>$\text{IC}_{50}$ (mg/ml) |
|--------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 24 saat      | 2,849±0,088                                                     | 1,106±0,084                                                 |
| 48 saat      | 1,233±0,079                                                     | 0,987±0,109                                                 |
| 72 saat      | 0,590±0,163                                                     | 0,813±0,195                                                 |

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmamızda kullandığımız her iki bitkimizde Türkiye’de yaygın olarak yetişmekte olup hayvancılığın yaygın olduğu bölgelerde yem olarak tercih edilmektedirler. Çalışmamızda tercih edilen bitkilerin yaygın yetiştirme alanına sahip olması ve bazı ülkelerde protein kaynağı olarak insan beslenmesinde de tercih edilmesi sağlığa etkileri yönünden sahip oldukları içeriğin önemli olduğu görüşünü oluşturmuştur. Sağlığı önemli şekilde etkileyen hastalıklar için koruyucu hekimlik önemli olduğundan ve temelde beslenme şekli ile hastalıkların oluşum mekanizmaları arasında bağlantı olduğu tespit edildikçe bitkiler önem kazanmaktadır. *Medicago lupulina* ve *Trifolium arvense*’nin farklı antioksidan özellikleri incelendiğinde fabaceae ailesinde yapılan çalışmalara yakın değerler içerdiği gözlenmiştir. Çalışmamızda diyabet hastalığı, alzheimer hastalığı ve hiperpigmentasyon bozukluklarına etkileri her iki bitkinin etilasetat ve metanol özütlerinin enzim inhibisyon testleri ile değerlendirilmiştir. Diabetes mellitus ile ilişkilendirilen her iki enzim olan  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -glukozidaz inhibisyonu için tespit edilen sonuçların yüksekliği dikkat çekmektedir. Bu bitki özütlerinin içerdikleri sekonder metabolitler vasıtasıyla diabetes mellitus hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere farmakolojik alanda tercih edilebilecek bitkiler olduğu düşünülmektedir.

Hücre kültürü ve MTT sonuçlarımız daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmakla birlikte her iki bitkimizinde metanol ekstraktları etanol ekstraktlarına göre HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etki düzeylerinin daha yüksek anlamlı değerler olduğu tespit edilmiştir. Bu hali ile günümüzde kullanılan kemoterapik fitokimyasal ajanların amacının hastanın normal dokularına zarar vermeden en az yan etki ile hedef kanser hücrelerini yok etmesi amacına uygun olup olmadığının ekstraktların potansiyel antikanser ajan olarak değerlendirilebilmeleri için normal hücrelere zarar vermeyen etken maddenin tespit edilmesi gerekmektedir.

*Medicago lupulina* ve *trifolium arvense* nin yapılacak farklı çalışmalarla ilaç endüstrisinde kullanılabilecek potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abubakar, A. R. ve Haque, M., 2020. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes, *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12, 1, 1.
- Agbor, G. A., Vinson, J. A. ve Donnelly P. E., 2014. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay, *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 3, 8, 147-156.
- Ahmad, S., Zeb, A., Ayaz, M. ve Murkovic, M., 2019. Characterization of phenolic compounds using UPLC–HRMS and HPLC–DAD and anti-cholinesterase and anti-oxidant activities of *Trifolium repens* L. Leaves, *European Food Research and Technology*, Volume 246, 485-496.
- Ahmed, SI., Hayat, MQ., Tahir, M., Mansoor, Q., Ismail, M., Keck, K. ve Bates, RB., 2016. Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl, *BMC complementary and alternative medicine*, 16, 1, 460.
- Alhawari, M. B., Dianita, R., Rawa, M.S.A., Nogawa, T. ve Wahab, H.A., 2023. Potential Anti-Cholinesterase Activity of Bioactive Compounds Extracted from *Cassia grandis* L.f. and *Cassia timoriensis* DC, *Plants*, 12, 2, 344.
- Al-Hmadi, H. B., Majdoub, S., El Mokni, R., Angeloni, S., Mustafa, A. M., Caprioli, G. ve Hammami, S., 2024. Metabolite profiling, enzyme inhibitory activity and antioxidant potential of different extracts from *Glycyrrhiza foetida* Desf. (Fabaceae, Galegeae, Glycyrrhizinae), *Fitoterapia*, 173, 105792.
- Almaraz-Abarca, N., Chaidez-Ayala, A.I., Wallander-Compeán, L., Ávila-Reyes, J. A., Delgado-Alvarado, E.A., Naranjo-Jiménez, N., Rosas-Medina ve Colmenero-Robles, A., 2023. Variation of the phenolic composition and  $\alpha$ -glucosidase inhibition potential of seeds, soaked seeds, and sprouts of four wild forms and four varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris*), *Plant Science Today*, Vol 10, 2, 399-414.
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S. ve Duran, A., 2013. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea L. taxa* from Turkey, *Food Chemistry*, 141, 1, 91-97.
- Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G. O., Cakmak, Y. S. ve Duran, A., 2013. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L. species*, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290296.
- Amtul, Z., Siddiqui, R. A., Choudhury, M. I., 2002. Chemistry and mechanism of urease inhibition, *Curr Med Chem*, 9, 1323-48.

- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. ve Ercag, E., 2006. The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 5, 6, 292–304.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A. ve Legret, P., 1994. Standardization of a propolis extract and identification of the main constituents, *Journal de pharmacie de Belgique*, 49, 6, 462-468.
- Ashafa, A. O. T., Balogun, O. ve Adegbeji, A. J., 2019. Inhibitory potentials and kinetics of the inhibition of carbohydratehydrolysing enzymes by the pod and seed extracts of *Lessertia montana* (Fabaceae) E. Phillips & R.A. Dyer, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9, 1, 42-50.
- Aslankoc, R., Gumral, N., Saygın, M., Senol, M., Ascı, H., Cankara, F. N. ve Comlekci S., 2018. The impact of electric fields on testis physiopathology, sperm parameters and DNA integrity—The role of resveratrol *Andrologia*, 50, 12971.
- Aşk, M. K., 1987. Yaylak ve Mera Islahı. Kurtuluş Ofset Basımevi, Ankara.
- Azam, S., Hadi, N., Khan N. U. ve Hadi, S. M., 2004. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3- gallate: Implications for anticancer properties, *Toxicology in vitro*, 18, 5, 555-561.
- Balbaa, M. ve El Ashry, E. S. H., 2012. Enzyme inhibitors as therapeutic tools, *Biochem Physiol*, 1, 2, 1000103.
- Barnes P. J., 2020. Oxidative stress-based therapeutics in COPD, *Redox Biology*, 33, 101544.
- Baytop T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci, İ., 2010. Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara, 437-454.
- Benjamin, S., Pradeep, S., Josh, M. S., Kumar, S. ve Masai, E., 2015. A monograph on the remediation of hazardous phthalates, *Journal of Hazardous Materials*, 298, 58-72.
- Boluda, I. K. ve Capill, I. K., 2017. Consumer attitudes in the election of functional foods, *Spanish Journal of Marketing-ESIC*, 21, 65-79.
- Büyüktuncer, Z., 2018. beslenme, fonksiyonel besinler ve mikrobiyota, Türkiye Klinikleri Beslenme ve Diyetetik-Özel Konular, 4, 2, 9-15.
- Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P. ve Gupta, N., 2012. Mannanases microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 93, 5, 1817-1830.

- Cemeroğlu, B., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara.
- Ceylan, R., Zengin, G., Guler, G. O. ve Aktumsek, A., 2021. Bioactive constituents of *Lathyrus czeczottianus* and ethyl acetate and water extracts and their biological activities: An endemic plant to Turkey, *South African Journal of Botany*, 143, 306-311.
- Chiasson, J. L. ve Rabasa-Lhoret, R., 2004. Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function. *Diabetes, obesity and metabolism*, 6, 2, 1-12.
- Close, G. L., Ashton, T., McArdle, A. ve McLaren, D. P., 2005. The emerging role of freeradicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury.
- Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 142, 257-266.
- Custódio, L, Fernandes, E, Escapa, A. L, vd. 2009. Antioxidant activity and in vitro inhibition of tumor cell growth by leaf extracts from the carob tree (*Ceratonia siliqua*), *Pharm Biol.* 47, 8, 721-728.
- Crowe, K. M. ve Francis, C., 2013. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113, 8, 1096-1103.
- Çaçan, E., Aydın, A. ve Başbağ, M., 2015. Bingöl Üniversitesi yerleşkesinde yer alan bazı baklagil yem bitkilerine ait kalite özelliklerinin belirlenmesi, *Turkish Journal of Agricultural And Natural Sciences*, 2, 1, 105–111.
- Çağlar, H. O., Süslüer, S. Y., Kavaklı, Ş., Gündüz, C., Ertürk, B., Özkınay, F. ve Haydaroğlu, A., 2017. Meme kanseri kök hücrelerinde elajik asit ile indüklenmiş mRNA'ların ifadesi ve elajik asidin apoptoz üzerine etkisi, *Ege Tıp Dergisi*, 56, 183-192.
- Çakmak, Y. S., Aktumsek, A. ve Duran, A., 2012. Studies on antioxidant activity, volatile compound and fatty acid composition of different parts *Glycyrrhiza echinata* L, *EXCLI Journal*, 11, 178-187.
- Çakmak, Y. S., Zengin, G., Eskin B., Yıldırım K., Topal M., Aydın G. H., Ünlü E., Baydemir M. ve Erten, K., 2017. Investigation of antioxidant and enzyme inhibition activities and phenolic compound of *Medicago Rigidula*(L) All. *Marmara Pharmaticeutical Journal*, 21, 3, 522-529.
- Çetinkale, O., Belce, A., Konukoğlu, D., Senyuva, C., Gumustas, M. K. ve Tas, T., 1997. Evaluation of lipid peroxi dation and total antioxidant status in plasma of rats following thermal in jury, *Burns*; 23, 2, 114-7.
- Çiçek, B., 2016. Fitokimyasallar ve immün sistem, *Türkiye Klinikleri Beslenme ve Diyetetik-Özel Konular*, 2, 2, 36-41.

- Dandekar, P. D., Kotmale, A. S., Chavan, S. R., Kadlag, P. P., Sawant, S. V., Dhavale, D. D. ve RaviKumar, A., 2021. Insights into the inhibition mechanism of human pancreatic  $\alpha$ -amylase, a type 2 diabetes target, by dehydrodieugenol b isolated from ocimum tenuiflorum. ACS oega, 6, 3, 1780-1786.
- Davis P. H., 1965-1985. Flora of Turkey and the East Aegean Islands Edinburgh of the University Pres, 1-9. ISBN: 0 85224 516 5.
- DeFronzo, R. A., 1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus, Annals of Internal Medicine, 131, 4, 281-303.
- Demir, T., Demir, H., Görler, O., Özden, S., Doğan, D. Ö., Tuğut, F., Saygın, A. G., Ülgey, M. ve Muslu, Z., 2017. The effects of some drinks on saliva pH. Journal of Interdisciplinary Medicine and Dental Science, 5, 2-4.
- Edziri, H., Marzouk, B., Mabrouk, H., Garreb, M., Douki, W., Mahjoub, A., Verschaeve, L., Najjar, F., Mastouri, M., 2018. Phytochemical screening, butyrylcholinesterase inhibitory activity and anti-inflammatory effect of some Tunisian medicinal plants, South African Journal of Botany, 114, 84-88.
- Eken, S., 2007. Bazı materyallerde antioksidan tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Eruygur, N., Dinçel, B. ve Kütük, Dinçel, N.G., 2018. Comparative study of in vitro antioxidant, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity of alfalfa (Medicago sativa L.) collected during different growth stages , Open Chem., 16, 963–967.
- Fatıma, I., Safdar, N., Akhtar W., Munir, A., Saqib, S., Ayaz, A., Bahadur, S., Alrefaei, A. F., Ullah, F. ve Zaman, W., 2023. Evaluation of potential inhibitory effects on acetylcholinesterase, pancreatic lipase, and cancer cell lines using raw leaves extracts of three fabaceae species, Heliyon, 9, 5.
- Fidan, A. F. ve Dündar, Y., 2007. Yucca schidigera ve içerdği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri, Lalahan H. A. Enstitü Dergisi, 47, 31-39.
- Finaud, J., Lac, G. ve Filaire, E., 2006. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training.reveiw article, 36, 4, 327-358.
- Fisher-Wellman, K. ve Bloomer, R. J., 2009. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history, Dynamic medicine, 8, 1.
- Forman, H. J. ve Zhang, H., 2021. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy, Nature Reviews Drug Discovery, 20, 9, 689709.
- Gaelani, G. F., Galiano, S., Canepo, L., Ferraris, A. M. ve Kirkman, H. N. 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxidein erthrocytes, Blood, 73, 334-9.

- Ghosh, D. ve Konishi, T., 2007. Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function, *Asia Pacific Journal Clinic Nutrition*, 16, 200-208.
- Grisanti, R., 2013, May. - e American Chiropractor. What is Functional Medicine? Erişim Adresi: <http://archive.theamericanchiropractor.com/issue/20130501#!&pid=52----Türel> B., Fonksiyonel Tıp Nedir?, *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 2019;3(Özel Sayı):150-154 DOI: bshr.621155), Erişim Tarihi: 04.12.2024
- Giugliano, D., Ceriello, A. ve Paolisso, G., 1995. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular diseases: which role for oxidative stress? *Metabolism*, 44: 363–368.
- Gonzalez, G. V., Torres, E. F., Aguilar, C. N., Gomez, S. J. R., Godinez, G. D. ve Augur, C., 2003, Advantages of Fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 157-167
- Gözükara, E. M., 1997, *Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri*, İstanbul.
- Gül, A., Özçelik, H. ve Uzun, Ö., 2012. Isparta yöresindeki bazı doğal yerörtücü bitkilerin adaptasyonu ve özellikleri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 16, 2, 133-145.
- Gümüşhan Aktaş, H., 2018. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (Journal of Harran University Medical Faculty)* 15, 3, 199-206. Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye
- Ha, Z. Y., Mathew, S. ve Yeong, K. Y., 2020. Butyrylcholinesterase: a multifaceted pharmacological target and tool, *Current Protein and Peptide Science*, 21, 1, 99-109.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem*, 219, 744-52.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C., 1985. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases, *Mol. Aspects Med.*, 8, 2, 89-193.
- Halliwell, B. ve Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *Am J Clin Nutr*, 57, 7155-65.
- Halliwell, B., 2007. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health, *Cardiovascular Research*, 73, 341-347.
- Han, L. K., Kimura, Y. ve Okuda, H., 2003. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet, *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 27, 4, 441-449.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer, *Cell.*, 100, 57-70.

- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144, 646-674.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. ve Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, Metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- Ho K. Y., Tsai, C. C., Huang, J. S., Chen, C. P., Lin, T. C. ve Lin, C. C., 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 187-191.
- Ighodaro, O. M. ve Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, 287–293.
- Jabs, C. M., Heglen, P. ve Eklof, B., 1995. Breakdown of adenine nucleotides formation of oxygen Free radicals, and early markers of cellular injury in endo toxic shock, *Eur J Surg* 161, 147-55.
- Jain, S. K., 1989. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells, *J Biol Chem.*, 264, 35, 21340–21345.
- Jain, S.K., Kannan, K. ve Lim, G., 1998. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells, *Free Radic Biol Med.*, 25, 9, 1083–1088.
- Jaipaea, S., Saehlim, N., Sutcharitruk, W., Athipornchai, A., Ingkaninan, K. ve Saeeng, R., 2023. Synthesis of piperine analogues as AChE and BChE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Phytochemistry Letters*, 53, 216-221.
- Jaganathan, S. K., Ilayappan, M. V, Narasimhan, G. ve Supriyanto, E., 2014. Role of pomegranate and citrus fruit juices in colon cancer prevention, *World Journal of Gastroenterology*, 20, 4618-4625.
- Jeroudi, M.O., Hartley, C. J. ve Bolli, R., 1994. Myocardial reperfusion injury: Role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants, *Am J Cardiol* 73, 10, 2B-7B.
- Jose, J., Raju, D. ve Nayak, P., 2018. Microspheres-novel drug delivery carrier for plant extracts for antibacterial activity, *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11, 1681-1684.
- Juranović, Cindrić, I., Kunšić, M., Zeiner, M., Stinger, G. ve Rusak, G., 2011. Sample preparation methods for the determination of the antioxidative capacity of apple juices, *Croatica Chemica Acta*, 84, 3, 435-438.
- Kalka, K., Mukhtar, H., Turowski-Wanke, A. ve Merk, H., 2000. Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13, 143-149.

- Khan, M.K. ve Dangles, O., 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols, *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 85-104.
- Kellogg, E. W. ve Fridovich, I., 1977. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically Generated superoxide and hydrogen peroxide, *J Biol Chem*, 6721-6725.
- Kılıç, D., 2002. Mısır nişastasının hidrolizinde  $\alpha$ -amilaz enziminin aktivitesinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kicel, A. ve Olszewska, M. A., 2015. Evaluation of antioxidant activity, and quantitative estimation of flavonoids, Saponins and Phenols in Crude Extract and Dry Fractions of *Medicago Lupulina* Aerial Parts. *Nat Prod Comm*, 10, 483-486.
- Kimura, Y. ve Okuda, H., 2001. Resistant dietary starches as functional ingredients, *Journal of AOAC International*, 84, 2, 607-614.
- Klebanoff, S. J., 1980. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytosis. *Ann Intern Med*, 100, 480-489.
- Kubo, I. ve Yokokawa, Y., 1992. Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*, *Phytochemistry*, 31, 1075-1077.
- Kojo, S., 2004. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 11, 10
- Konukoğlu, D., Hatemi, H., Özer, E. M., Gönen, S. ve Akçay, T., 1997. The erythrocyte glutathione levels during oral glucose tolerance test, *J Endocrinol Invest*, 20, 471-5.
- Liang, Q., Chen, H., Zhou, X., Deng, Q., Hu, E., Zhao, C. ve Gong, X., 2017. Optimized microwave-assistant extraction combined ultrasonic pretreatment of flavonoids from *Periploca forrestii* Schltr. and evaluation of its anti-allergic activity, *Electrophoresis*, 38, 1113-1121.
- Li, C. ve Xie, B., 2000. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6362-6366.
- Llorent-Martinez, E. J., Zengin, G., Fernández-de Córdova, M. L., Bender, O., Atalay, A., Ceylan, R. ve Aktumsek, A., 2017. Traditionally used *Lathyrus* species: phytochemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory properties, cytotoxic effects, and in silico studies of *L. czeczottianus* and *L. nissolia*, *Frontiers in pharmacology*, 8, 83.
- Lotito, S. B. ve Fraga, C. G., 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radic Biol Med.*, 24, 435-44.

- Maki, K. C. ve Pelkman, C. L., 2008. Resistant starch in the diet: potential health benefits, *Journal of the American College of Nutrition*, 27,6, 704-713.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A. ve Watkins, J. B., 2003. 3rd. Diabetes, oxidativestress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 17,1, 24-38,
- Maneechai, S. ve Rinthong, P., 2018. Total phenolic content and tyrosinase inhibitory potential of extracts from *cajanus cajan* (L.), *Pharmacogn Journal*, 10, 6, 109-112.
- Moein, S., Farzami, B., Khaghani, S., Moein, M. R. ve Larijani, B., 2007. Antioxidant properties and prevention of cell cytotoxicity of *Phlomis persica* Boiss, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 83-88.
- Mohammed, F. S., Akgul, H., Sevindik, M. ve Khaled, B. M. T., 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *Zebaria*, *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 5694- 5702.
- Nimse, S. B. ve Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms, *RSC advances*, 5, 35, 27986-28006.
- Orhan, I. E., Senol, F. S., Gulpinar, A. R., Sekeroglu, N., Kartal, M. ve Sener, B., 2012. Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses, *Food Chem*, 130, 882-882.
- Özkaya, Ö. Ş., 2021. Yaşam kalitesi ve fonksiyonel besinler, *Fenerbahçe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, 1, 62-68.
- Palanisamy, U. D., Ling, L. T., Manaharan, T. ve Appleton, D., 2011. Rapid isolation of geranin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity, *Food Chemistry*, 127, 1, 21-27.
- Pamukcu D., 2017. *Medicago Murex* var. *murex*'in (fabaceae) in vitro antioksidan ve bazı enzimlerin aktiviteleri üzerine inhibisyon özelliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aksaray.
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani F., Rezaee, R. ve Iranshahi, M., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models, *Phytotherapy Research*, 29, 323-331.
- Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C. ve Rivas-Gonzalo, J. C., 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5331-5337.
- Patel, R., Rinker L., Peng, J. ve Chilian, W. M., 2018. Reactive oxygen species: The good and the bad, *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*, 7, 8.

- Peña, P., Risopatrón, J., Villegas, J., Miska, W., Schill, W. B. ve Sánchez, R., 2004. Alpha-glucosidase in the human epididymis: topographic distribution and clinical application. *Andrologia*, 36, 5, 315-320.
- Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health, *International Journal of Biomedical Science*, IJBS, 4, 2, 89.
- Pisoschi, A. M. ve Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-57.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V. ve Bitto, A., 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health, *Oxidative medicine and cellular longevity*
- Postaci, I., Coskun, O., Senol, N., Aslankoc, R. ve Comlekci, S., 2018. The physiopathological effects of quercetin on oxidative stress in radiation of 4.5 g mobile phone exposed liver tissue of rat, *Bratisl Lek Listy*, 119, 8, 481-489.
- Powers, S. K. ve Jackson, M. J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production, *Physiological reviews*, 88, 1243-1276.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free radical biology and medicine*, 26, 9-10, 1231-1237.
- Reilly, P. M., Schiller, H. J. ve Bulkley, G. B., 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated By free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surgery*, 161, 488-501.
- Robin, T., Reuveni, S. ve Urbakh, M., 2018. Single-molecule theory of enzymatic inhibition, *Nature communications*, 9, 1, 1-9.
- Rodrigues, F., Palmeira-de-Oliveira, A., das Neves, J., Sarmento, B., Amaral, M. H., Oliveira, M. B., 2013. Medicago spp. extracts as promising ingredients for skin care products, *Ind Crop Prod*, 49, 634-44.
- Ruddon, R. W., 2007. *Cancer Biology*. 40. Baskı Michigan, Oxford University Press.
- Saldamlı, İ., 1998. Gıda kimyası, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, 489-495, Ankara.
- Schulz, W. A., 2005. *Molecular Biology of Human Cancers*, 1. Baskı USA, Springer Science + Business Media, Inc.,
- Sharma, K., Ko, E. Y., Assefa, A. D., Ha, S., Nile, S. H., Lee, E. T. ve Park, S. W., 2015. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties, *Journal of food and drug analysis*, 23, 243- 252.

- Sevindik, M., 2018. Pharmacological Properties of Mentha Species, *J Tradit Med Clin Natur*, 7, 259-263.
- Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z. ve Yehoshua, Y., 2013. Natural antioxidants: Function and sources, *Food and Nutrition Sciences*, 4, 643-649.
- Shields, H. J., Traa, A. ve Van, Raamsdonk, J. M., 2021. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: A comprehensive review of comparative and experimental studies, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 181.
- Sies, H. ve Cadenas, E., 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs, *Philos. Trans. R. Soc. B311*, 617-31
- Simpson, R., Alon, R., Kobzik, L., Valeri, R., Shepro, D. ve Hechtman, H. B., 1993. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia re perfusion. *Annals of Surgery* 218, 4, 444-454.
- Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S. ve Perera, C. O., 2010. Properties of bread dough With added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: a review. *Journal of Food Science*, 75, 163-174.
- Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., Melnikova, N. V., Krasnov, G. S. ve Dmitriev, A. A., 2019. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 6175804.
- Saldamlı, İ., 1998. Gıda kimyası, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği, 489-495, Ankara.
- Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J. A. ve Manzano-Agugliaro, F., 2020. Worldwide research trends on medicinal plants, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17,10, 3376.
- Sarikurkcü, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M. ve Harmandar, M., 2008. Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays, *Bioresource Technology*, 99, 10, 4239-4246.
- Saygin, M., Ozmen, O., Erol, O., Ellidağ, H. Y., Ilhan, I. ve Aslankoc, R., 2018. The impact of electromagnetic radiation (2.45 GHz, Wi-Fi) on the female reproductive system: The role of vitamin C. *Toxicol Ind Health*, 34, 9, 620-630.
- Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I. ve Milner, J. A., 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species, *J Nutr Biochem*. 18, 9, 567-579.
- Shandilya, U. K. ve Sharma, A., 2017. Functional foods and their benefits: an overview, *J. Nutr. Health Food Eng*, 7, 247. doi: 10.15406/jnhfe.2017.07.00247.

- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp Physiol.*, 82, 2, 291–295.
- Skowrya, M., Falguera, V., Gallego, G., Peiro, S. ve Almajano, M. P., 2014. Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods in vitro and in model food emulsions, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 911-918.
- Sugumaran, M., 1991. Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization, *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 293, 4–10.
- Suyundikov M., 2020. Eber sarisi bitkisinin  $\alpha$ -amilaz,  $\alpha$ -glukozidaz, tirozinaz, asetilkolin estera z enzimlerini inhibe edici özellikleri ile esansiyel yağ asidi içeriğinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Kimya Anabilimdalı, Afyonkarahisar.
- Süntar, I., 2020. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants, *Phytochemistry Reviews*, 19, 5, 1199-1209.
- Tappy, L. ve Lê, K. A., 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological reviews*, 90, 1, 23-46.
- Taşçı, I., Apaydın, B. B., Konukoğlu, D., Ayan, F., ve Dikmen, Y., 1996. Karaciğer iskemi ve reperfüzyon hasarında ibuprofen, siklosporin ve streptokinazın etkileri, *Çağdaş Cerrahi Dergisi*, 10, 76-81.
- Thummajitsakul, S., Kriangchaikijkul, P., Hrungham, S., Onchai, K. ve Silprasit, K., 2022. Antioxidant activity, anti-tyrosinase activity and fourier transform infrared spectra of extract and lotion from germinated seeds of vigna mungo (L.) Hepper, *Science & Technology Asia*, 27, 386-399.
- Thi Quynh Doan, N., Brogger-Christensen, S., 2015. Thapsigargin, origin, chemistry, structure-activity relationships and prodrug development, *Current Pharmaceutical Design*, 21, 5501- 5517.
- Thirumaran, R., Prendergast, G. C., Gilman, P. B., 2007. Cytotoxic chemot herapy in clinical treatment of cancer, In: Prendergast G. C., Jaffee E. M. eds. *Cancer Immunotherapy*, Academic Press, 101-116.
- Topsakal, S., Ozmen, O., Aslankoc, R. ve Aydemir, D., H., 2016. Pancreatic damage induced by cigarette smoke: the specific pathological effects of cigarette smoke in the rat model, *Toxicol Res (Camb)*, 5, 3, 938-945.
- Tundis, R., Marrelli, M., Conforti, F., Tenuta, M.C., Bonesi, M., Menichini, F., Loizzo, M. R., 2015. *Trifolium pratense* and *T. repens* (Leguminosae): Edible Flower Extracts as Functional Ingredients, *Foods*, 4, 338-348.
- Türel, B., 2019. Fonksiyonel Tıp Nedir?, *J Biotechnol and Strategic Health Res.*;3(Özel Sayı):150-154 DOI: bshr.621155).

- Thilak, B., Thodi, C. R. ve Sukumaran, S. T., 2023. Identification of bioactive compounds from the ethnomedicinal plant *Senna alata* (L.) Roxb. (fabaceae) through in vitro and molecular docking analysis against  $\alpha$ -glucosidase enzyme: A diabetic drug target, *Plant Science Today*, 10, 235-249.
- Uysal, S., Zengin, G., Locatelli, M., Bahadori, M. B., Mocan, A., Bellagamba, G., De Luca, E., Mollica, A. ve Aktumsek, A., 2017. Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition, *Frontiers in Pharmacology*, 8, 290.
- Wanasundara, U. N. ve Shahidi, F., 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils, *Food Chemistry*, 63, 335-342.
- Weaver, B. A., 2014. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells, *Mol Biol Cell*; 25, 18, 2677-2681.
- Weisburger, J. H., 2000. Eat to live, not live to eat, *Nutrition*, 16, 767-773.
- West, I. C., 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes, *Diabet Med.*, 17, 3, 17171–17180.
- Wolff, S. P., 1993. Diabetes mellitus and free radicals, Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications, *Br Med Bull.* 49, 3, 642-652.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M. T. D. ve Mazur M. J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol.*, 39, 44-84.
- Verma, B., Hucl, P. ve Chibbar, R. N., 2009. Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions, *Food Chemistry*, 116, 947-954.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Serap KÖKSAL BELLİKLİ

### EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

**Lisans** : İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıp Bölümü,  
1999-2005

**Yüksek Lisans** : Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji  
ve Moleküler Biyoloji A.B.D., (Tezsiz), 2014-2016

### MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. 2005-2007 Muş / Bulanık / Güllüova Sağlık Ocağı/Pratisyen Hekim
2. 2007-2008 Kocaeli Kızılay Kan Merkezi
3. 2008-2010 Aksaray Ana Çocuk Sağlığı Merkezi
4. 2010-2016 Aksaray İl Sağlık Müdürlüğü
5. 2016- Halen Şehit Ali Çakır ASM/ Aile Hekimliği

### TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler