

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA ETRAFINDAN TOPLANAN BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN  
TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİ VE ANTİOKSİDAN  
ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Gülşah Merve GÜNEŞ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2014**

**Her hakkı saklıdır**

## ETİK

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

13.11.2014

Gülşah Merve GÜNEŞ

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ANKARA ETRAFINDAN TOPLANAN BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN TOTAL ANTIÖKSİDAN KAPASİTELERİ VE ANTIÖKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Gülşah Merve GÜNEŞ

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM  
Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. S. Belgin İŞGÖR

Son on yılda yapılan araştırmalar, tıbbi değeri olan bitkilerden elde edilen ekstrelerin içerdiği mineral ve metabolitlerinin yanı sıra özellikle antioksidan özelliği olan ikincil metabolitlerinin önemine de işaret etmektedir. Potansiyel terapötik etkileri, saflaştırılan bileşenleri ile yapılan çalışmalar ile gösterilen çok sayıda tıbbi bitki bulunmaktadır. Tez çalışması kapsamında, Ankara'nın çeşitli bölgelerinde yetişen ve potansiyel tıbbi değeri olan farklı bitki türlerinden *Diplotoxis tenuifolia* (L.) DC.'nin yaprak kısmı, *Reseda lutea* L. ve *Eryngium campestre* L.'nin çiçek ve yaprak kısımlarından metanolle elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri, toplam protein, polifenol ve flavonoid içerikleri belirlenmiş olup ayrıca antioksidan enzim sistemlerinde yer alan glutatyon-S-tranferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (KAT) aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Antimikrobiyal aktivite sonuçları değerlendirildiğinde her bir bitki özütü en az bir bakteri suşu üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Bitki özütlerinin maya suşuna karşı herhangi bir inhibitör etki oluşturmadığı bulunmuştur. Diğer taraftan en yüksek protein miktar içeriği 33.74 mg/mL ile *R.lutea* L. bitki çiçek özütünde saptanmışken en yüksek fenolik ve flavonoid madde miktarı içeriği ise sırasıyla 144.49 mg/mL ve 250.485 µg/mL ile *D.tenuifolia* (L.) DC. yaprak özütünde tespit edilmiştir. *R.lutea* bitki çiçeği özütünün 0.149 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile GST enzim aktivitesini en yüksek oranda inhibe ettiği (%64 inhibisyon) saptanmıştır. *D.tenuifolia* (L.) DC. yaprak özütünün 0.14 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile GPx enziminin aktivitesini %18 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Tez kapsamında incelenen bitki özütlerinde herhangi birinin KAT enzimi üzerine anlamlı bir inhibitör etki göstermediği bulunmuştur.

**Kasım 2014, 80 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan enzimler, fenolik bileşikler, flavonoidler, antioksidan savunma

## ABSTRACT

Master Thesis

### TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITIES AND EFFECT ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF SOME PLANT EXTRACTS COLLECTED FROM ANKARA REGION

Gülşah Merve GÜNEŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM  
CoSupervisor: Assist. Prof. Dr. S. Belgin ISGOR

Studies conducted over the past decade, the medical value of extracts from plants of the mineral and their metabolites as well as particular antioxidant properties indicate the importance of secondary metabolites. There are large number of medicinal plants which have shown beneficial therapeutic potential by their purified constituents. In this thesis, antimicrobial activity, total protein, phenolic and flavonoid contents of methanol extracts from *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. leaves, *Reseda lutea* L. and *Eryngium campestre* L. flowers and leaves were examined which were collected from Ankara region and have potential medicinal plants and also the effects of methanol extracts from this plants parts were investigated on antioxidant enzyme systems in glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT). Considering the results, each of plant extract showed an inhibitory effect on at least one bacterial strain while plant extracts did not show any inhibitory effect against yeast strain. The extract of *R. lutea* L. flowers showed the highest protein content with 33.74 mg/mL value. The extracts of *D. tenuifolia* (L.) DC. leaves showed the highest phenolic and flavonoid contents with 144.49 mg/mL and 250.485 µg/mL values, respectively. The extract of *R. Lutea* L. flowers has shown the highest GST inhibition activity (64 % inhibition) with 0.149 µg/mL of IC<sub>50</sub> value. The extract of *D. tenuifolia* leaves has shown the highest GPx inhibition activity (18 % inhibition) with 0.14 µg/mL of IC<sub>50</sub>. In this thesis examined the plant extracts did not show any significant effect on CAT enzyme inhibition.

**November 2014, 80 pages**

**Key Words:** Antioxidant enzymes, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant defence

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı)

Laboratuvar çalışmalarında bilgisinden ve engin tecrübelerini bizden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan saygı değer Yrd. Doç. Dr. S. Belgin İŞGÖR'e, (Atılım Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Uygulamalı Kimya Bölümü)

Hayatımda her zaman önemli yere sahip olan, bu tez çalışması süresince beni maddi ve manevi yönden destekleyen sevgili annem Güzin ARSLAN'a, babam Mehmet ARSLAN'a, ağabeyim Hakkı ARSLAN'a ve değerli eşim Mehmet Ali GÜNEŞ'e

Tez çalışmamın başından sonuna kadar hep yanımda olan ve bana destek veren sevgili Dr. Naznoosh SHOMALI MOGHADDAM'a

Laboratuvarda birlikte azimle çalıştığım canım arkadaşlarıma tek tek teşekkür ederim.

Gülşah Merve GÜNEŞ

Ankara, Kasım 2014

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkilerin Taksonomik ve Biyolojik Özellikleri...3	
2.1.1 <i>Diploaxis tenuifolia</i> (L.) DC.....	3
2.1.2 <i>Reseda lutea</i> L.....	4
2.1.3 <i>Eryngium campestre</i> L.....	5
2.2 Fenolik Bileşikler.....	6
2.2.1 Fenolik asitler.....	8
2.2.2 Flavonoidler.....	9
2.3 Serbest Radikaller.....	14
2.4 Canlı Sistemlerde Bulunan Antioksidan Sistemler.....	18
2.4.1 Enzimatik antioksidanlar.....	20
2.4.2 Non-Enzimatik antioksidanlar.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1 Materyal.....	23
3.2 Yöntem.....	25
3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması, saklanması ve tür teşhisi.....	25
3.2.2 Ekstraksiyon öncesi bitki örneklerinin hazırlanması.....	25
3.2.3 Bitki örneklerinin ekstraksiyona hazırlanması.....	26
3.2.4 Bitki özütlerinin antimikrobiyal analizi.....	27
3.2.4.1 Mikroorganizmaların üremesi için besi yerlerinin hazırlanması.....	27
3.2.4.2 Bitki özütlerin disklere emdirilmesi.....	27
3.2.4.3 Mikroorganizmaların standardize edilmesi.....	28
3.2.4.4 Besi yerlerin inokülasyonu ve disklerin yerleştirilmesi.....	29

3.2.4.5 İnhibisyonuz onların ölçümü.....	29
3.2.4.6 Antimikrobiyal analizde kullanılan negatif ve pozitif kontrol.....	29
3.2.5 Bitki özütlerin Lowry metodu ile protein tayini.....	30
3.2.6 Bitki özütlerin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	31
3.2.7 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi.....	32
3.2.8 Toplam polifenol miktarına bağı olarak bitki özütlerin doz plaka hazırlanması.....	33
3.2.9 Sığır karaciğerden homojenat hazırlanması.....	33
3.2.10 Bitki özütlerinin Glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesine etkilerinin analizi.....	34
3.2.11 Bitki özütlerinin glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi.....	34
3.2.12 Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi.....	35
4.BULGULAR.....	37
4.1 Bitki Özütlerinin Verimleri.....	37
4.2 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	37
4.2.1 Disk difüzyon yöntemi ile pozitif ve negatif kontrollerin sonuçları.....	37
4.2.2 Bitki özütlerinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları.....	38
4.3 Bitki Özütlerin Toplam Protein Tayini.....	39
4.3.1 Kalibrasyon eğrisi.....	39
4.3.2 Bitki özütlerinin protein miktarı.....	40
4.4 Bitki Özütlerinin Toplam Fenolik Madde Tayini.....	41
4.4.1 Kalibrasyon eğrisi.....	41
4.4.2 Bitkilerin toplam fenolik madde miktarı.....	42
4.5 Bitki Özütlerinin Toplam Flavonoid Madde Tayini.....	43
4.5.1 Kalibrasyon eğrisi.....	43
4.5.2 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı.....	44
4.6 Bitki Özütlerinin Glutasyon-S-Transferaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri.....	45
4.7 Bitki Özütlerinin Glutasyon Peroksidaz Enzimi Üzerine Olan Etkileri.....	50
4.8 Bitki Özütlerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri.....	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	80

## SİMGELER DİZİNİ

AlCl <sub>3</sub>	Alüminyum klorür
4-AP	4-Aminoantipirin
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
A-375	İnsan malign melanoma hücre hattı
BaCl <sub>2</sub>	Baryum klorür
BSA	Sığır serum albumin
Caco-2	İnsan kolon adenokarsinoma hücreleri
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Bakır sülfat
Cu	Bakır
Cys	Sistein
dH <sub>2</sub> O	Distile su
EtOH	Etanol
F <sup>-</sup>	Fluorid
HCl	Hidroklorik asit
HOCl	Hipoklorik asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik asit
HRO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hidroperoksil radikali
IC <sub>50</sub>	İnhibitör konsantrasyonu
KCl	Potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum difosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Potasyum monofosfat
MEA	Malt ekstraktagar
MeOH	Metanol
MRC-5	İnsan fibroblast kanser hücre hattı
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
NaCl	Sodyum klorür
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum karbonat
NaN <sub>3</sub>	Sodyum azit
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nano metre
N	Normalite
N <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Azit
NO <sup>-</sup>	Nitrikoksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrojen dioksit
OH	Hidroksil
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit



$O_2^-$	Süperoksit anyonu
$RO_2^-$	Peroksil radikali
RONOO	Alkil peroksinirat
t-BOOH	Tersiyer butilhidroperoksit
X <sup>•</sup>	Serbest radikal bileşiği

### Kısaltmalar

AA	Askorbik asit
ABTS	2,2 –azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit)
DHBS	Sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat
DHAA	Deoksihidroaskorbik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTT	Ditiyoteritol
EC	Enzim komisyon numarası
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
GA	Gallik asit
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresi
GP <sub>x</sub>	Glutasyonperoksidaz
GR	Glutasyonredüktaz
GSH	Redüklenmişglutasyon
GSHP <sub>x</sub>	Glutasyonperoksidaz
GSSG	Yükseltgenmiş glutasyon
GST	Glutasyon-S- transferaz
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HRP	HorseRaddishPeroksidaz
IOS	Oksidatif stres indeksi
KAT	Katalaz
kDa	Kilo Dalton
MIC	Minimal inhibisyonkonsantrasyonu
NA	Nurientagar
NADPH	Nikotinamidadenindinükleotit fosfat
NB	NutrientBroth
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
OD	Optik dansite
PBS	Salin-fosfat tamponu
RKT	Reaktif klorid türleri
RNT	Reaktif nitrojen türevleri
ROT	Reaktif Oksijen türevleri
RST	Reaktif sülfür türleri
SOD	Süperoksitdismutaz
TAR	Toplam antioksidan aktivite
TOS	Toplam oksidatif durum
Trp	Triptofan

Tyr  
UV  
WHO

Tirozin  
Ultraviole ışını  
Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Diplotaxistenuifolia</i> ( L).DC.....	3
Şekil 2.2 <i>Diplotaxistenuifolia</i> (L.) DC Türkiye’deki yayılış alanları.....	4
Şekil 2.3 <i>Reseda lutea</i> L.....	4
Şekil 2.4 <i>Reseda lutea</i> L. Türkiye’deki yayılış alanları.....	5
Şekil 2.5 <i>Eryngium campestre</i> L.....	6
Şekil 2.6 <i>Eryngium campestre</i> L. Türkiye’deki yayılış alanları.....	6
Şekil 2.7 Gallik asit, Kafeik asit.....	9
Şekil 2.8 Flavonoidlerin temel yapısı.....	10
Şekil 2.9 Eşleşmemiş elektronu olan atom modeli.....	14
Şekil 2.10 Modifikasyona uğramış guanin bazı.....	17
Şekil 2.11 Antioksidan sistemlerin şematik olarak sınıflandırılması.....	19
Şekil 2.12 Artan antioksidan aktivite gösterimi.....	20
Şekil 2.13 Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz arasındaki redoks döngüsü.....	22
Şekil 3.1 Bakteri süspansiyonu ile McFarland standardını karşılaştırmak için kullanılmış kağıt.....	29
Şekil 4.1 Toplam protein tayini için BSA standart eğrisi grafiği.....	40
Şekil 4.2 Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart eğrisi grafiği.....	42
Şekil 4.3 Toplam flavonoid madde tayini için kuersetin standart eğrisi grafiği.....	44
Şekil 4.4 <i>D.tenuifolia</i> (L.) DC. bitki yaprak özütünün glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	46
Şekil 4.5 <i>R. lutea</i> L. bitki çiçek özütünün glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	47
Şekil 4.6 <i>R. lutea</i> L. bitki yaprak özütünün glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	47
Şekil 4.7 <i>E.campestre</i> L. bitki çiçek özütünün glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	48
Şekil 4.8 <i>E.campestre</i> L. bitki yaprak özütünün glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	49
Şekil 4.9 Bitki özütlerinin GST enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon grafiki.....	50

Şekil 4.10 <i>D.tenuifolia</i> (L.) DC. bitki yaprak özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	51
Şekil 4.11 <i>R. lutea</i> L. bitki çiçek özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	52
Şekil 4.12 <i>R. lutea</i> L. bitki yaprak özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	52
Şekil 4.13 <i>E.campestre</i> L. bitki çiçek özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	53
Şekil 4.14 <i>E.campestre</i> L. bitki yaprak özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	53
Şekil 4.15 Bitki özütlerinin GPx enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon grafiği.....	54
Şekil 4.16 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.17 <i>R. lutea</i> L. bitki çiçek özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.....	57
Şekil 4.18 Bitki özütlerinin KAT enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon grafiği.....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Reaktif türler.....	15
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bitkilerin taksonomik olarak sınıflandırılması.....	23
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan bitkilerin toplandığı lokasyonlar.....	23
Çizelge 3.3 Bitki örneklerinin etiket numaraları.....	26
Çizelge 3.4 Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin listesi.....	30
Çizelge 3.5 Lowry metodunun çalışma şeması.....	31
Çizelge 3.6 Toplam polifenol miktar tayinin çalışma şeması.....	32
Çizelge 3.7 Toplam flavonoid miktar tayinin çalışma şeması.....	33
Çizelge 4.1 Bitki özütlerin (%) verimleri.....	37
Çizelge 4.2 Antibiyotiklerden elde edilen pozitif kontrol sonuçları.....	38
Çizelge 4.3 Bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	39
Çizelge 4.4 Protein tayini için elde edilen absorbans değerleri.....	40
Çizelge 4.5 Bitki özütlerinin protein miktarı.....	41
Çizelge 4.6 Fenolik madde tayini için elde edilen absorbans değerleri.....	41
Çizelge 4.7 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarı.....	42
Çizelge 4.8 Toplam flavonoid madde tayini için elde edilen absorbans değerleri.....	43
Çizelge 4.9 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı.....	44
Çizelge 4.10 Bitki özütlerinin GST enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri.....	49
Çizelge 4.11 Bitki özütlerinin GPx enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri.....	54
Çizelge 4.12 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> tayini için elde edilen absorbans değerleri.....	55
Çizelge 4.13 Bitki özütlerinin KAT enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri.....	57

## 1. GİRİŞ

Ülkemiz, coğrafi konumu, iklimi ve topoğrafik özellikleri nedeni ile zengin bir flora sahiptir. Türkiye florası ile yapılan araştırmalarda tespit edilen bitki türü sayısı, 3000'i endemik olmak üzere 12.000 civarında bitki taksonuna (tür, alttür, varyete düzeyinde) sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Erik ve Tarıkahya 2004). Türkiye'nin bu özelliği coğrafi faktörlerin yada diğer bir ifade ile bitkilerin yetişme ortamlarının çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. İklim özelliklerinde kısa mesafelerde ortaya çıkan bu değişiklikler, toprak tiplerinin farklılıkları gibi çok sayıda coğrafi faktör, bitki formasyonlarında farklılaşmasına ve türce çeşitlenmesine yol açmaktadır (Avcı 2005).

Bitkiler, uzun yıllardan beri sağlık alanında kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kayıtlarına göre günümüzde halen dünya popülasyonunun % 80'ni doğal olmasından ve yan etkilerinin olmayacağı düşünülmesi nedeni ile ilk tedavide geleneksel tıba yönelmektedir (Duraipandiyan vd. 2006, Blumberg 2006). Özellikle son on yılda yapılan araştırmalar, tıbbi değeri olan bitkilerden elde edilen özütlerin içerdiği mineral ve metabolitlerinin yanı sıra özellikle antioksidan özelliği olan ikincil metabolitlerinin de önemine işaret etmektedir. Potansiyel terapötik etkileri, saflaştırılan bileşenleri ile yapılan çalışmalar ile gösterilen çok sayıda tıbbi bitki bulunmaktadır (Praveen ve Bono 2007).

Doğal antioksidanlar olarak adlandırılan bu bitkilerin biyolojik özellikleri onların fenolik asit ve flavonoid gibi çeşitli fenolik bileşikleri yüksek seviyede içermesinden kaynaklanır (Garzon vd. 2010). Bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler, son yıllarda, birçok alanda insan sağlığı üzerine olan yararlı etkilerinden dolayı büyük bir ilgi görmektedir. Fenolik bileşikler sekonder metabolit olarak bilinirler ve meyve, sebze ve diğer yenilebilen bitkilerde yaygınca bulunmaktadır. (Barros vd. 2011, Pereira vd. 2012). Fenolik bileşikler, anti-karsinogenik (Ramos 2008, Korkina vd. 2009), anti-aterojenik (Liu vd. 2004), anti-trombotik (Errichi vd. 2011), anti-inflamatuar (Yoon ve Baek 2005, Beara vd. 2012), anti-alerjenik (Rakh ve Chaudhari 2010) ve anti-mikrobiyal (Xie vd. 2011) etkileri yapılan araştırmalar sonucu bulunmuştur.

Bu çalışmada, iklim ve toprak özellikleri bakımından zengin bitki florasına sahip Ankara'nın esitli bölgelerinde yetişen ve potansiyel tıbbi değeri olan farklı bitki türlerinden *Diplotoxis tenuifolia* (L.) DC.'nin yaprak, *Reseda lutea* L.ve *Eryngium campestre* L.'nin iek ve yaprak kısımlarından elde edilen metanollü özütlerin antimikrobiyal aktiviteleri, toplam protein, polifenol ve flavonoid miktarları belirlenmiş olup ayrıca antioksidan enzim sistemlerinde yer alan glutatyon-S-tranferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (KAT) aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkilerin Taksonomik ve Biyolojik Özellikleri

#### 2.1.1 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.

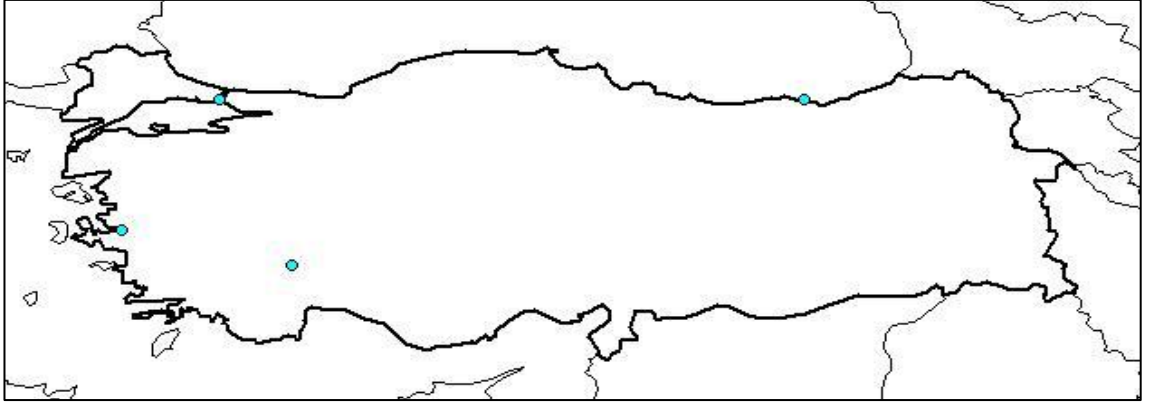
*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., Brassicaceae familyasına ve *Diplotaxis* cinsine ait çok yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.1). Halk arasında ‘Yabani Roka’olarak tanınan bu bitki türü genel olarak Güney ve Orta Avrupa, Kuzey Batı Afrika, Kırım, Kafkasya ve Batı Suriye’de yayılım göstermektedir. Şekil 2.2’de *D.tenuifolia* bitkisinin Türkiye’de Kuzey ve Batı Anadolu bölgelerinde dağılım gösterdiği bir harita sunulmuştur ([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr)).

*D. tenuifolia*, içerisinde yüksek miktarda C vitamini, flavonoid ve glukosiyonat gibi insan sağlığında önemli yer tutan birçok bileşik içermektedir (Bennett vd. 2004, Martinez-Sanchez vd. 2006). Yapılan araştırmalar Brassicaceae familyasına ait bitki türlerini diyetle alındığında ateroskleroz ve kanser gibi kronik hastalıkların azaldığını göstermiştir (Herr ve Büchler 2010).



Şekil.2.1 *Diplotaxis tenuifolia*(L)DC.([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr))





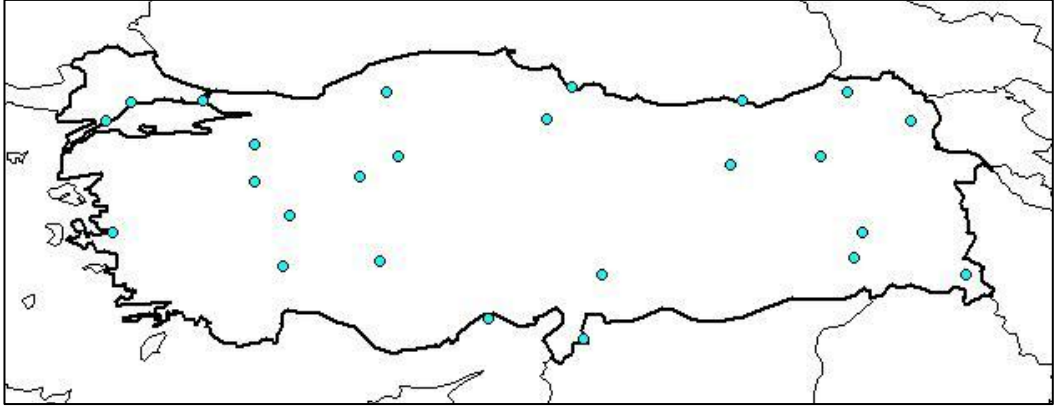
Şekil 2.2 *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanları ([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr))

### 2.1.2 *Reseda lutea* L.

*Reseda lutea* L., Resedaceae familyasına ve *Reseda* cinsine ait, halk arasında 'Muhabbet Çiçeği' olarak bilinen otsu bir bitkidir (Şekil 2.3). Dünya'da Güney, Batı ve Orta Avrupa, İsviçre, Afrika ve İranda yayılım gösterirken Türkiye'de Batı ve İç Anadolu Bölgelerinde bulunmaktadır (Şekil 2.4). *Reseda* cinsine ait olan 60 tür dünya çapında tanınmaktadır. Bunlardan sadece 15 tür Türkiye'de dağılım göstermektedir. *Reseda lutea* L. ve *Reseda luteola* Türkiye'de boya maddesi olarak el dokuması halılarda kullanılmaktadır (Davis 1979, Doğan 2001, Kızıl ve Kayabaşı 2005). Boya maddesi özelliği, içerisindeki luteolin flavonoidi içermesinden kaynaklanmaktadır. Luteolin, yüksek antioksidan kapasitesine sahip olanve bu nedenle antikanser çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir fenolik bileşiktir (Samy vd. 2006).



Şekil 2.3 *Reseda lutea*L. ([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr))



Şekil 2.4 *Reseda lutea* L. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanları ([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr)).

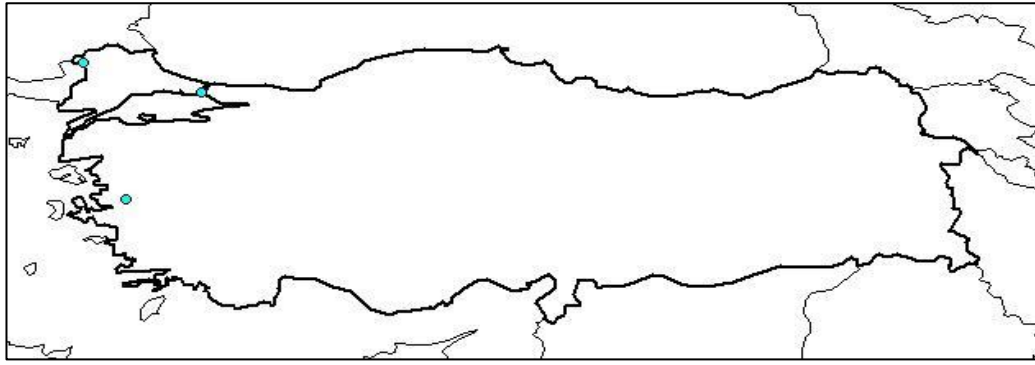
### 2.1.3 *Eryngium campestre* L.

*Eryngium campestre* L., Apiaceae ailesine ve *Eryngium* cinsine ait halk arasında 'Boğa Dikeni' olarak bilinen çok yıllık bir bitki türüdür (Şekil 2.5). Dünya'da genel olarak dağılımı Batı, Orta ve Güney Avrupa, Orta ve Güney Rusya, Kırım, Kuzey Afrika, Güney Batı Asya ve Afrikadır. Türkiye'de ise bu bitki türü Kuzey Batı ve Batı bölgelerde dağılım göstermektedir (Şekil 2.6) Ülkemizde 23 türü bulunmakla birlikte bunlardan 10 tanesi endemiktir (Davis 1972, Davis vd. 1988, Güner vd. 2000).

*Eryngium campestre*, anti-skorbütik, diaforetik, diüretik, balgam söktürücü, anti-inflamatuar ve afrodisyak gibi özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta yıllardır kullanılmaktadır. Ayrıca böbrek bozukluklarını ve böbrekte taş oluşumunu önlemek için Avrupa'da bitkisel ilaçlarda tavsiye edilmektedir (Weiss 2000).



Şekil 2.5 *Eryngium campestre* L. ([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr))



Şekil 2.6 *Eryngium campestre* L. bitkisinin Türkiye'deki yayılış alanları ([www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr)).

## 2.2 Fenolik Bileşikler

Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada görev aldığı düşünülen çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Saldamlı 2007). Bu fenolik bileşikler bitkilerde yaygın bulunan sekonder metabolitlerdir. Suda çözünebilir veya çözünememe özelliklerine göre sınıflandırılmakla birlikte günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Harborne ve Williams 2000). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir.

Fenolik bileşikler, bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip çok önemli sekonder metabolitlerdir. Çoğunlukla suda çözünür ve aromatik zincir halkasına bağlı bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren, basit fenolik bileşiklerden, yüksek oranda polimerize olmuş çok sayıda fenolik maddeleri içeren geniş bir gruptur.

Yapılarındaki farklılıklara rağmen fenolik bileşikler polifenoller olarak da adlandırılmaktadırlar (Balasundram vd. 2006).

Fenolik bileşikler, bitkinin büyümesi ve çoğalması gibi temel fonksiyonları sağlar, patojenlere, parazitlere ve predetörlere karşı savunmada rol oynarlar. Aynı zamanda bitkinin renklenmesinde de yardımcı olurlar (Baidez vd. 2007). Ayrıca bitki ve meyvelerde bulunan fenolik bileşikler, kimyasalların zararlarını önleyici (kemoprotentiv) bir faktör gibi rol aldığı rapor edilmiştir. Örneğin elmadaki fenolik bileşiklerin, kolon kanserini engellediği ile ilgili bir ilişki bildirilmiştir (Veeriah vd. 2006).

Birçok fenolik bileşiğin, büyük veya küçük oranda insan sağlığı için antioksidan potansiyele, antikanser, antimutajenik, antibakteriyal, antiviral ve anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Owen vd. 2000, Veeriah vd. 2006, Han vd. 2007). Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri, serbest radikalleri bağlamaları, metallerle şelat oluşturmaları, bazı enzimleri inaktive etmeleri ile açıklanmaktadır (Yang ve Tsao 2003).

Fenolik maddeler bitkide homojen olarak dağılmamaktadırlar. Suda çözünmeyen fenolikler, hücre duvarının bileşeni iken, suda çözünen fenolikler bitki hücresinin içerisinde yer alır (Naczki ve Shahidi 2004).

Fenolikler, bir veya daha fazla aromatik halkanın bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıması ile meydana gelen, 8000 yapısal türevi olan ve genellikle fenolik asit ve türevleri olarak kategorize edilen bileşiklerdir (Fresco vd. 2006).

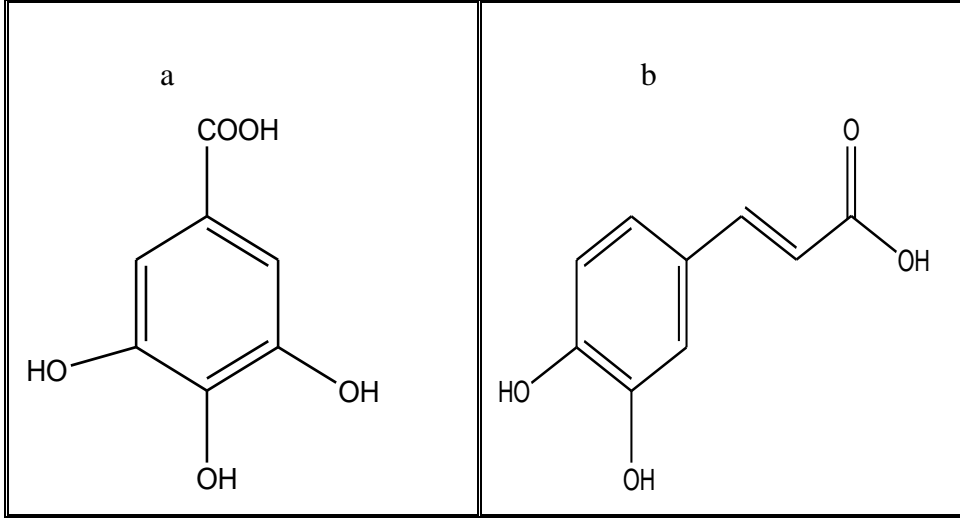
Fenolik bileşikler temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar.

### 2.2.1 Fenolik asitler

Fenolik asitler, fenolik bileşiklerin en temel sınıfı olup, bitki alemi içinde geniş bir yayılım gösterirler (Cai vd. 2004).

Fenolik asitler, genelde bir karboksilik fonksiyonuna sahip olan fenollerdir. Bununla birlikte ayrı ve belirgin organik asitleri fenolik asitler olarak adlandırılmakta, sinamik asit, benzoik asit ve aldehit analog olmak üzere üç ayırt edici karbon iskelet yapısını içermektedir. Temel yapı aynı kalsada aromatik halkadaki hidroksil gruplarının sayısı ve yeri değişerek farklılık oluşturmaktadır. Fenolik asitler, gıdaların renkleri, duyu kaliteleri, beslenme ve antioksidan özellikleri ile ilişkilidir. Dolayısıyla fenolik asitlerin antioksidan özellikleri ve potansiyel yaralarının ortaya çıkması ile bu bileşiklere ilgi giderek artmaktadır (Robbins 2003). Fenolik asitlerin antioksidan etkileri kimyasal yapıları ile ilgilidir (Tapiero vd. 2002). Bu etki, fenolik asitlerin aromatik halkada taşıdıkları hidroksil grup sayısına, bağlanma yerine ve pozisyonlarına bağlıdır (Marinova ve Yanishlieva 2003, Sroka ve Cisowski 2003, Peyrat-Maillard vd. 2000). Hidroksi grubunun sayısının artmasıyla bitkilerin antioksidan etkilerinin arttığı gözlemlenmiştir (Peyrat-Maillard 2000). Ayrıca metoksi grubu taşıyan fenolik asit türevlerinin taşımayana göre daha etkin olduğu araştırmalar sonucunda ortaya konmuştur (Marinova ve Yanishlieva 2003, Fukomoto ve Mazza 2000).

Predominant fenolik asitler hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asit türevleri içerirler. Bitkilerin sahip olduğu önemli fenolik asit türevlerinden gallik asit ve kafeik asit bileşiklerinin kimyasal yapıları şekil 2.7'de gösterilmektedir.



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

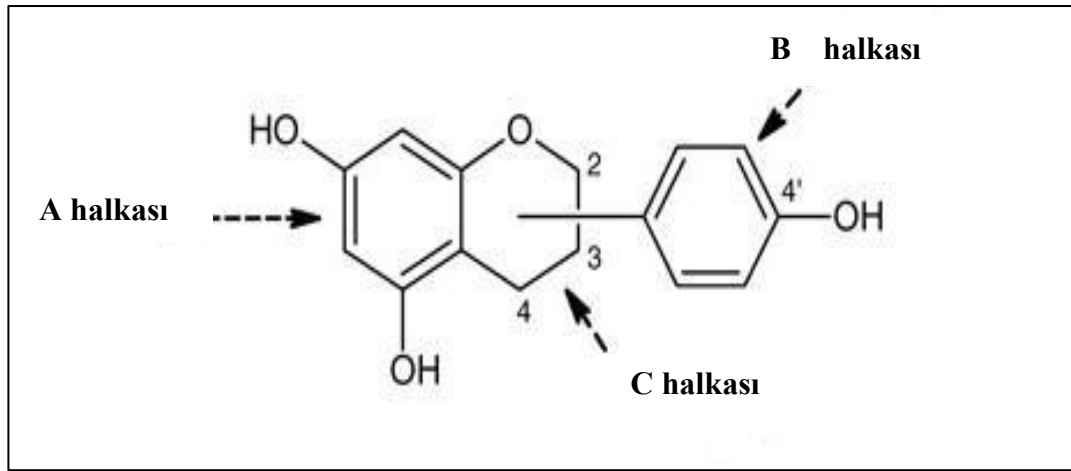
### 2.2.2 Flavonoidler

Flavonoidler, Shikimate metabolik yolu üzerinden, fenilalenin tarafından sentezlenen bitkide büyümeyi ve UV ışınlarından korumak gibi birçok görevi üstlenen sekonder bitki metabolitlerdir (Havsteen 2002). Flavonoidler, temel yapısındaki benzen halkasının, bir oksijen içeren piren halkası tarafından bağlanması ile oluşur. Flavonoidler 7 alt sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar flavonoller, flavonlar, flavanoller, flavononlar, antosiyanidinler ve izoflavonlardır (Erulund 2004). Yapılan araştırmalar flavonoidlerin doğal antioksidan (Spencer vd. 2005), anti-inflamatuar (Erulund 2004), anti-agregatör (Pignatelli vd. 2000) etkileri ve kanser hücrelerinin büyümesini durdurucu etkisinin bulunması gibi birçok çeşitli biyolojik aktivitesinin olduğunu göstermiştir (Sengupta vd. 2004).

Flavon ismi Latince flavus (sarı) kelimesinden gelmektedir. Bitkilerden elde edilen ve genellikle sarı renkli olan bu bileşikler 'flavonoid' olarak isimlendirilir (Nack ve Shahidi 2004). Flavonoidlerin yapı çeşitliliği, difenilpropan iskeletinin(C6-C3-C6), farklı yapılarda düzenlenme özelliğinin yanı sıra, her sınıf içinde molekülün aromatik halkalarına bağlanan sübsitüent sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonlarına göre ortaya çıkar. Hidroksil grupları, flavonoid yapısında bulunan en yaygın sübsitüentlerdendir.

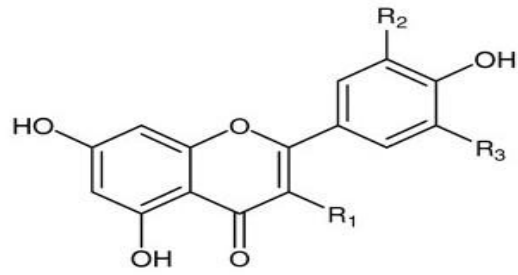
Hidroksil gruplarının reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla alkillenir veya glikozillenir (Çıkrıkçı 2005).

Flavonoidler, bitkilerde doğal olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler, şekil 2.8'de de gösterildiği gibi 2 aromatik halkanın (A ve B halkaları), C halkası olarak adlandırılan oksijenlenmiş merkezi 3 karbon halkaları ile bağlanmış, difenilpropan (C6-C3-C6) yapısına sahiptir (Cai vd. 2004).



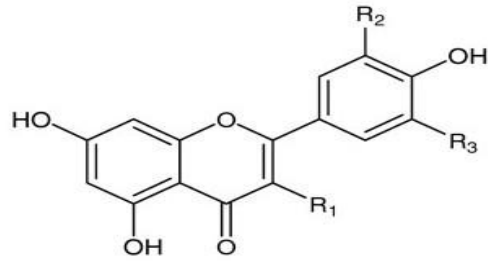
Şekil 2.8 Flavonoidlerin temel yapısı (Cai vd. 2004)

Flavonoidler, bitkiler tarafından üretilen ve genellikle primer metabolitlerin aksine bitkilerin hayatta kalması için esansiyel olmayan düşük molekül ağırlıklı ikincil metabolitlerdir. Flavonoidlerin 10.000 yapısal türevi rapor edilmiştir (Williams ve Grayer 2004, Ferrer vd. 2008). Flavonoidlerin detaylı sınıflandırılması (Saunders 2009):



### Flavonoller

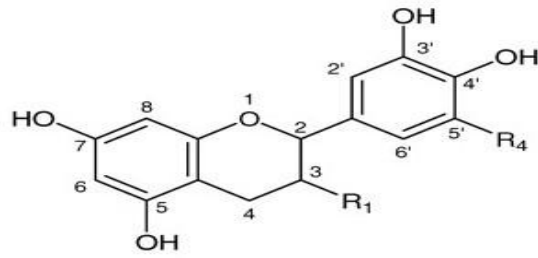
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
Kamferol	OH	H	H
Kuersetin	OH	OH	H
Mirisetin	OH	OH	OH
İzoramnetin	OH	OCH <sub>3</sub>	H



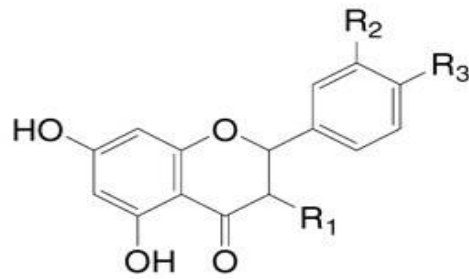
### Flavonlar

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
Luteolin	H	OH	H
Apigenin	H	H	H

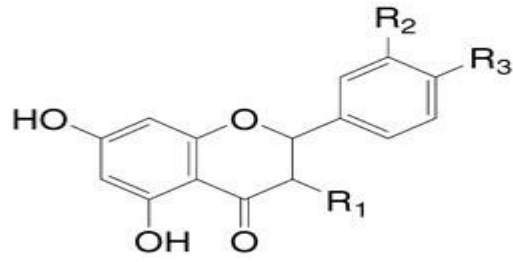




Flavanoller		
	R1	R4
Kateşin	OH	H
Epikateşin	OH	H
EGC	OH	OH
ECG	Gallat	H
EGCG	Gallat	OH

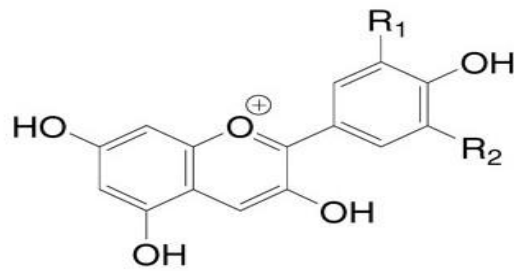


Flavanonlar			
	R1	R2	R3
Naringenin	H	H	OH
Hesperetin	H	OCH <sub>3</sub>	H



### Flavanonoller

	R1	R2	R3
Taksifolin	OH	OH	OH
Astilbin	O-rhamnosyl	OH	OH
Engeletin	o-rhamnosyl	H	OH

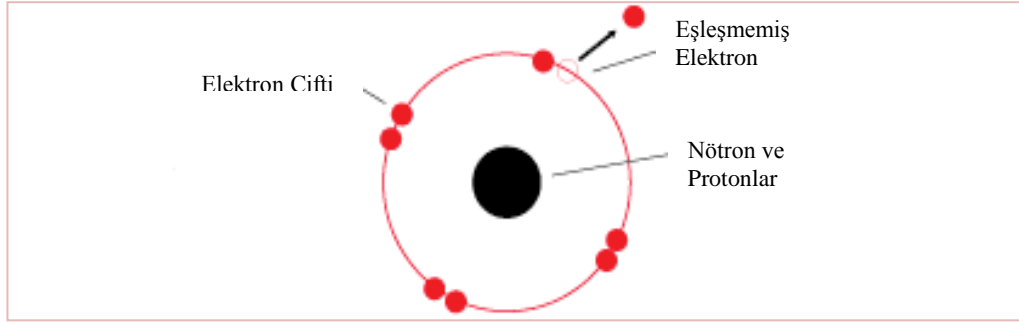


### Antosiyandinler

	R1	R2
Pelargonidin	H	H
Siyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Paeonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

### 2.3 Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Orbitali doldurup stabil hale gelmek için başka elektron/elektronlara ihtiyaç duyduğundan, ortaklanmamış elektronlar serbest radikalleri oldukça reaktif hale getirir (Willcox 2004).



Şekil 2.9 Eşleşmemiş elektronu olan bir atom modeli(<http://www.blessedherbs.com/internal-cleansing-kits-probiotics-antioxidants.aspx>)

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişinin doğal bir sonucudur. Oksidan moleküller, organizmada başlıca glikozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrası sürekli bir oluşum halindedir ve endojen/eksojen antioksidanlar tarafından etkisizleştirme süreci içerisindeyler. Bu oluşum ve etkisizleştirme süreci organizmada bir denge halindedir (Halliwell ve Gutteridge 1999).

Reaktif türler, merkezindeki atomuna göre 4 temel kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar çizelge 2.1’de gösterildiği gibi reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif nitrojen türleri (RNT), reaktif sülfür türleri (RST) ve reaktif klorid türleridir (RKT). (Halliwell ve Gutteridge 2007).

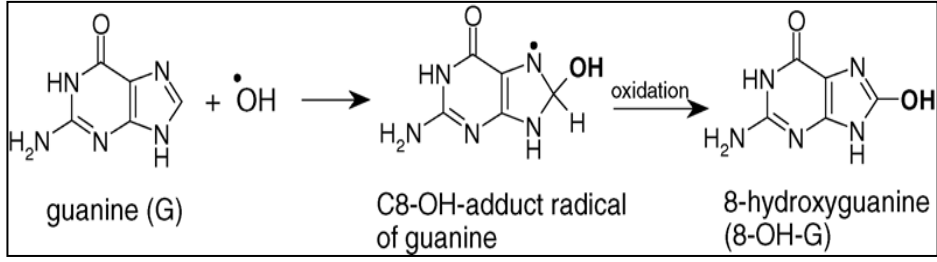
Çizelge 2.1 Reaktif türler

<p><b>Reaktif Oksijen Türleri(ROT)</b></p> <p>Süperoksit Radikali, <math>O_2^-</math></p> <p>Hidroksil Radikali, <math>OH\cdot</math></p> <p>Hidroperoksil, <math>HO_2\cdot</math></p> <p>Hidrojen peroksit, <math>H_2O_2</math></p> <p>Singlet Oksijen, <math>^1O_2</math></p> <p>Ozon, <math>O_3</math></p>	<p><b>Reaktif Nitrojen Türleri(RNT)</b></p> <p>Nitrik oksit, <math>NO\cdot</math></p> <p>Nitrojen dioksit, <math>NO_2\cdot</math></p> <p>Nitroksil iyonu(anyonu), <math>NO^-</math></p> <p>Nitronyum iyonu(katyonu), <math>NO^+</math></p> <p>Nitril iyonu(katyonu), <math>NO_2^+</math></p> <p>Nitröz asit, <math>HNO_2</math></p> <p>Peroksinitrit, <math>ONOO^-</math></p> <p>Peroksinitröz asit, <math>ONOOH</math></p>
<p><b>Reaktif Klorin Türleri(RKT)</b></p> <p>Klorin atomu, <math>Cl\cdot</math></p> <p>Hipoklorik asit, <math>HOCl</math></p> <p>Nitronyum klorid, <math>NO_2Cl</math></p>	<p><b>Reaktif Sülfür Türleri (RST)</b></p> <p>Sülfid, <math>SO_3^{2-}</math></p> <p>Disülfid-S-oksit, <math>DSSO</math></p> <p>Sülfenik asit, <math>RSOH</math></p> <p>Sülfenil radikali, <math>RS\cdot</math></p>

Bu radikallerin canlı sistemlerdeki en önemli sınıfını özellikle oksijen kaynaklı olan radikaller oluşturur (Valko vd. 2004). Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (Janos ve Krishnamurti 2005). Yaklaşık % 1-3 oksijen, vücut tarafından reaktif oksijen türlerine dönüştürülür. Üç önemli reaktif oksijentürü, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali hücrelerde mitokondri tarafından sürekli üretilen normal metabolik ürünlerdir (Seifried vd. 2007).

ROT'lar endojen ve eksojen olmak üzere 2 yolla üretilmektedir (Inoue vd. 2003). Eksojen kaynaklar, çevresel etmenler, metal iyonları (demir, bakır, kadmiyum, nikel krom,civa), pestisidler, radyasyon ve ksenobiyotiklerdir (Valko vd. 2006). ROT'ların endojen kaynakları ise peroksizomlar, mikrozomlar, P450 metabolizması, nötrofiller ve eisonofillerdir (Inoue vd. 2003).

ROT'ların konsantrasyonları onların etkileri üzerinde anahtar bir faktördür. Eğer yüksek konsantrasyonlarda olmaları durumunda makromoleküller için oldukça zararlı olabilmektedirler (Veskoukis vd. 2012). Düşük konsantrasyonlardaki ROT'ların enfeksiyon ajanlarına, karşı etkide bulunduğu ve hücre içi sinyal iletiminde rol aldığı bilinmektedir. Yine düşük konsantrasyonlardaki ROT'ların bir diğer yararı ise mitojenik cevap indüksiyonunda yer almasıdır. Fakat bunlara rağmen yüksek konsantrasyonlardaki ROT'ların lipitler, membranlar, proteinler ve nükleik asitleride kapsayan hücre yapılarına zarar verdiği rapor edilmiştir (Poli vd. 2004). Özellikle, hidroksil radikalının (OH•), DNA molekülündeki pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek DNA'nın iskeletine zarar verdiği bilinmektedir (Dizdaroglu vd. 2002, Valko vd. 2006).



Şekil 2.10 Modifikasyona uğramış guanin bazı (Valko vd. 2006)

DNA'nın sürekli bu modifikasyona maruz kalması oksidatif hasar olarak adlandırılır ve mutajenezis, karsinogenezis ve yaşlanmanın ilk adımına sebep olur. Hatta çok çeşitli kanser dokularında serbest radikallerden kaynaklanan DNA hasarı tespit edilmiştir. (Marnett 2000, Cooke vd. 2003).

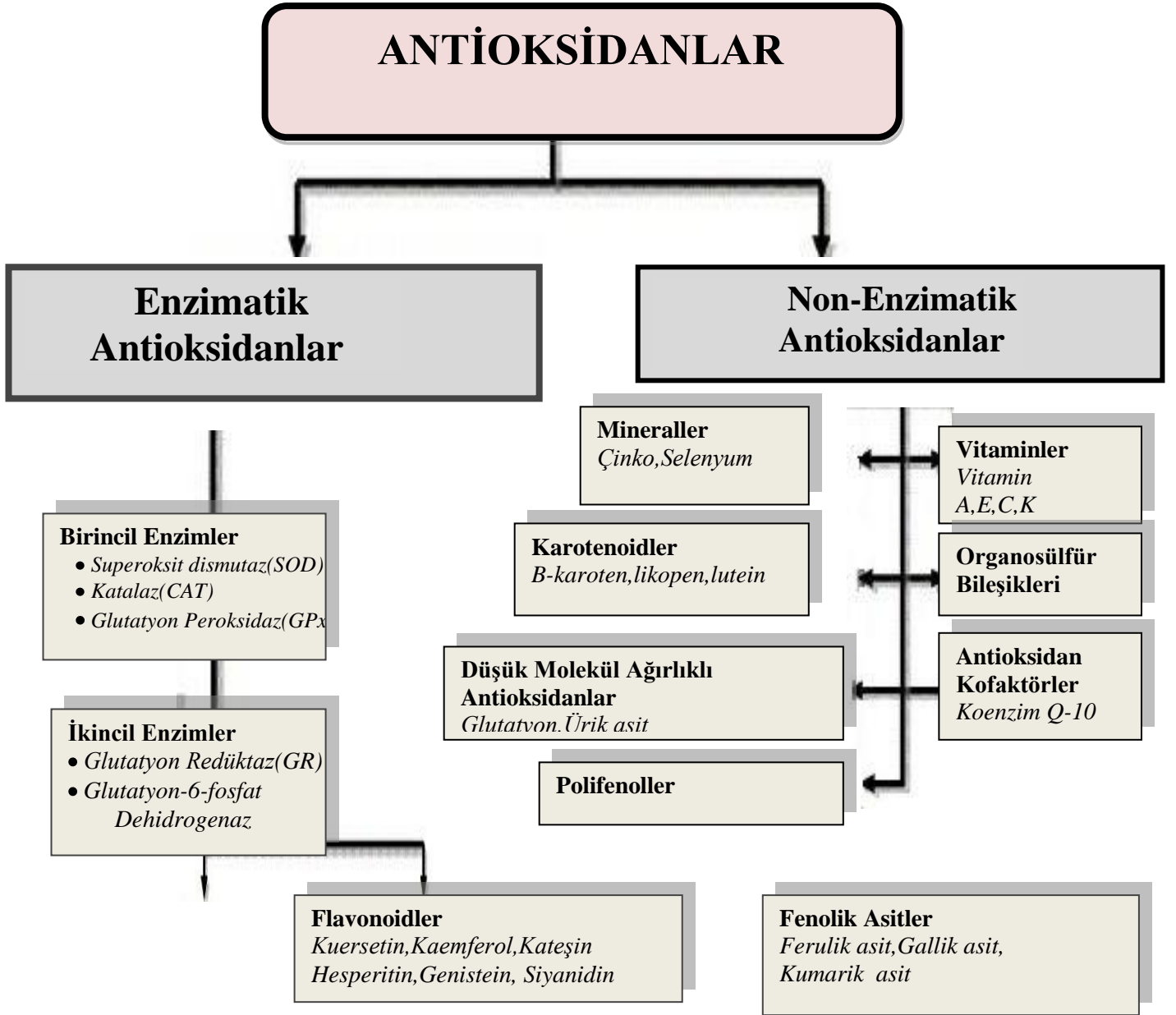
Vücutta doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta, ancak radikal parçalayan antioksidan sistemlerle oluşan serbest radikaller ortadan kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır (Yen ve Wu 1999). Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma sistemlerinin aktiviteleri arasındaki dengesizliktir. Şiddetli oksidatif stres hücre hasarı, hücre ölümü ve kanser gibi birçok insan hastalığına sebep olur (Tas vd. 2005). Lipid peroksidasyon aracılığı (bağlı) ile oluşan serbest radikaller, en temel hücre membran yıkımı ve hücre hasarı mekanizmasında önemle dikkate alınmaktadırlar (Yeh vd. 2005).

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, insan vücudunda hücre metabolizması sırasında, yan ürünler gibi sürekli olarak üretilirler. Bu zararlı yan ürünler eğer hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılmamışlar ise DNA, proteinler ve lipitler gibi fonksiyonel makromoleküllerde oksidatif hasara neden olurlar (Apel ve Hirt 2004). Serbest radikallerin artması, yaşa bağlı hastalıkları, kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar ve inflamasyon oluşma sıklığını artırır (Cai vd. 2004).

## 2.4 Canlı Sistemlerde Bulunan Antioksidan Savunma Sistemleri

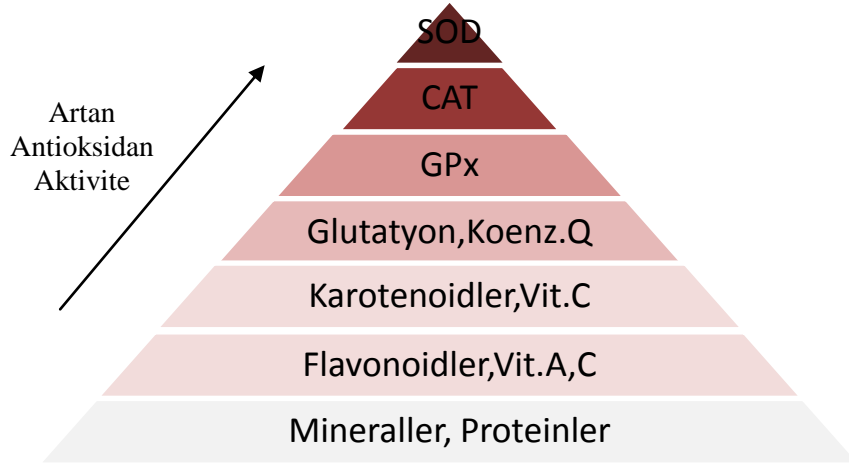
Reaktif oksijen türleri, antioksidan enzimler ve enzimatik antioksidanlar tarafından dengede tutulurlar. Bazı antioksidan savunmaları, serbest radikalleri direk ortadan kaldırırlar böylece biyolojik merkezler için maksimum koruma sağlarlar. İyi bir antioksidan, (i) özellikle serbest radikalleri yok etmeli, (ii) redoks metalleri ile şelat oluşturmalı, (iii) diğer antioksidanlar ile birlikte uyum içinde çalışmalı, (iv) gen ekspresyonuna olumlu etki etmeli, (v) hızlıca emilmeli (vi) dokularda belli bir konsantrasyona sahip olmalı, (vii) hem su fazında hem de membranda çalışabilmelidirler (Valko vd. 2006).

ROT'ların zararlı etkilerine karşı kendilerini korumak için, tüm hücre kompartmanlarında ve ayrıca ekstraselüler kısımda fazla olan ROT'lara karşı, aeorobik organizmalar çeşitli savunma ve korunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Hasara uğramış DNA'yı var olan DNA tamir enzimleri onarabilir fakat antioksidanlar hücreyi serbest radikallerden korumak için daha spesifik ve daha etkili bir yoldur. Antioksidan sistemler non-enzimatik antioksidanlar ve antioksidan enzimler gibi eksojen ve endojen olarak ikiye ayrılırlar (Şekil 2.11). Bunlara ek olarak içerisinde nötrofiller, makrofajlar ve spesifik antibadileri de içerene anti-karsinojenik savunma sistemleri de vardır (Jakobisiak vd. 2003).



Şekil 2.11 Antikoksidan sistemlerin şematik olarak sınıflandırılması (Ratnam vd. 2006)



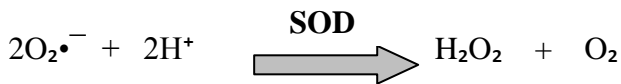


Şekil 2.12 Artan antioksidan aktivite gösterimi

#### 2.4.1 Enzimatik antioksidanlar

##### -Süperoksit Dismutaz(SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) (EC.1.15.1.1) her ne kadar 1939'ların başlarında izole edilse de Mccord ve Fridovich 1968 yılında yaptıkları çalışmalar ile en etkili intraselüler enzimatik antioksidan olarak SOD'u keşfetmişlerdir. SOD, süperoksit anyonunu ( $O_2^{\bullet-}$ ), molekuler oksijene ve hidrojen peroksitine ( $H_2O_2$ ) dönüştürür (Nordberg ve Arner 2001).

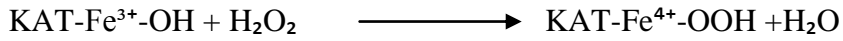


Diğer enzimlerin hiçbiri bu reaksiyon aktivitesine sahip değildir, dahası SOD'un bilinen tek aktiviteside bu reaksiyondur (Karihtala ve Soini 2007). SOD'lar yapılarında buldukları metaller, aminoasit dizilişleri, sahip oldukları alt üniteler, kofaktörler ve diğer özelliklere göre çeşitli izoformları bulunmaktadır. İnsanda SOD'un 3 izoformu vardır: Mangan içeren dismutaz (Mn-SOD) (*Mitokondriyal SOD*), bakır ve çinko içeren dismutaz (Cu,Zn-SOD) (*Sitozolik SOD*), ekstraselüler SOD (EC-SOD) (Landis ve Tower 2005).

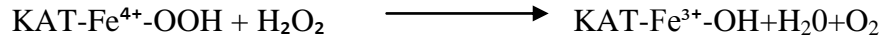
### **-Katalaz (KAT)**

Katalaz (KAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroksidaz, EC.1.11.1.6), herbiri 60kD olan, dört altbirimden oluşan homotetramerik özellikte kompleks bir enzimdir (Kaddour 2008). Herbir alt ünite aktif bölgesinde bir hem grubu ve ferriprotoporfirin IX taşımaktadır. Bu oldukça etkili protein, milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), son derece yüksek bir hızla (107M/Sec), moleküler oksijene ve suya çevirir (Goyal ve Basak 2010).

Reaksiyonun ilk aşamasında katalazın hem demiri ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkileşerek oksijence zengin demir peroksit oluşur. Oluşan demir peroksit, bileşik1 olarak adlandırılır.



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yüksek konsantrasyonlarında bileşik1 ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek su ve moleküler oksijeni oluşturur.



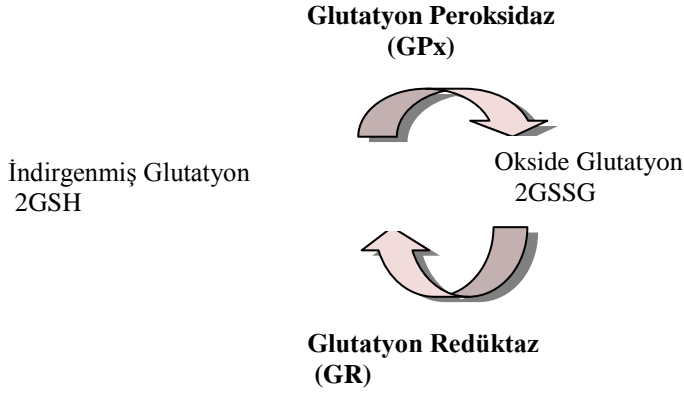
Burada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak görev yapmaktadır (Switala ve Loewen 2002).

Katalaz birçok doku tarafından sentezlenmesine rağmen özellikle karaciğer, böbrek ve eritrositlerden sentezlenir (Goyal ve Basak 2010). Hepatositlerden sentezlenen KAT ağırlıklı olarak peroksizomlarda bulunurken, eritrositlerden sentezlenen KAT sitozolde serbest olarak bulunur (Forsberg vd. 2001).

### **-Glutatyon Peroksidaz**

Glutatyon peroksidazın temel olarak iki formu bulunmaktadır. Bunlardan biri selenyum bağımlı (GPx, EC.1.11.1.19) iken diğeri selenyum bağımsızdır (Glutatyon-S tranferaz, GST, EC.2.5.1.18) .Bu iki enzim sahip oldukları alt üniteler, aktif bölgelerine selenyum olup olmadığı ve katalitik aktivitelere göre farklılık gösterirler (Mates vd. 1999).

Glutatyon peroksidaz(GPx), substrat olarak GSH (glutatyon) kullanarak  $H_2O_2$ 'i ortadan kaldıran bir diğer enzim grubudur. Bu reaksiyon sonucu oluşan okside glutatyon disülfid (GSSG), tekrar glutatyon redüktaz (GR) tarafından indirgenmiş GSH'a dönüştürülür (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz arasındaki redoks döngüsü

#### 2.4.2 Non-Enzimatik Antioksidanlar

Non-enzimatik antioksidanlar; mineral (Se, Zn), vitamin (A, C, K ve E), karotenoitler ( $\beta$ -karoten, likopen, lutein, zeaksantin), organosülfür bileşikleri (allium, allil sülfid, indoller), düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GSH-Px, ürik asit), antioksida ko-faktörler (ko-enzim Q10) ve polifenoller şeklinde incelenmektedir (Pellegrini vd. 2009, Cemeli vd. 2009).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Çalışmamızda incelenmek üzere Ankara'nın çeşitli bölgelerinden 2009 yılı Temmuz ve Ağustos aylarında toplanmış 3 farklı bitki türü ve bunların çeşitli kısımları kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de çalışmada kullanılan bitkilerin taksonomik sınıflandırması ve çizelge 3.2'de bitkilerin toplandığı tarihler ve lokasyonlar gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan bitkilerin taksonomik sınıflandırılması

<b>Familya</b>	<b>Cins</b>	<b>Bitki Türü</b>
Brassicaceae	<i>Diplotaxis</i>	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.
Resedaceae	<i>Reseda</i>	<i>Reseda lutea</i> L.
Apiaceae	<i>Eryngium</i>	<i>Eryngium campestre</i> L.

Çizelge 3.2 Çalışmada incelenen bitkilerin toplandığı lokasyonlar

<b>Familya</b>	<b>Bitki Türü</b>	<b>Lokasyon</b>
Brassicaceae	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	Yenikent-Zir Vadisi (17.07.2009)
Resedaceae	<i>Reseda lutea</i> L.	Yenikent-Zir Vadisi (17.07.2009)
Apiaceae	<i>Eryngium campestre</i> L.	Yenikent-Zir Vadisi (17.07.2009)

Bitki örneklerinden elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivitelerini incelemek amacıyla 5 farklı mikroorganizma seçilmiştir. Bu amaçla, Gram (+) bakterilerden *Bacillus subtilis* ATCC-6633 ve *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 Gram (-) bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 ve *Escherichia coli* ATCC-25922 ile ökaryotik bir maya olan *Candida albicans* ATCC-10231 seçilmiştir. Bitkilerden elde edilen özütlerin, antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimler üzerindeki

aktivitelerini incelemek amacıyla sığır karaciğerinden homojenat hazırlanmıştır. Sığır karaciğeri Kazan mezbahasından temin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan; 4-Aminoantipirin (4-AP), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve sodyum azit ( $NaN_3$ ) Acros firmasından, sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat) Carlo Erba firmasından, sodyum karbonat ( $Na_2CO_3$ ) ve tersiyer-butyl hidroperoksit (t-BOOH) Fisher Scientific firmasından, ditiyoteritol (DTT), 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), nitro blue tetrazolium (NBT) ve sodyum hidrosit (NaOH) Fluka firmasından, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) Gebru firmasından, malt ekstrakt agar (MEA) ve nutrient agar (NA) İgs firmasından, alüminyum klorür ( $AlCl_3$ ), bakır sülfat ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), baryum klorür ( $BaCl_2$ ), etil alkol (EtOH), gallik asit (GA), nutrient broth, potasyum klorür (KCl), sodyum asetat, sodyum klorür (NaCl) ve sülfürik asit Merck firmasından, dimetil sülfoksit (DMSO), % 99'lük metanol, potasyum monofosfat ( $K_2HPO_4$ ) ve potasyum difosfat ( $KH_2PO_4$ ) Riedel-de Haen firmasından, bovin serum albumin (BSA), etilenediaminetetraasetik asit (EDTA), Folin-Ciocalteu reaktifi, glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz enzimi (GR), horse raddish peroksidaz (HRP), katalaz enzimi (KAT), ksantin, kuersetin dihidrat ve sodyum 3,5 dikloro-2-hidroksi benzen sülfonat (DHBS) Sigma firmasından sağlanmıştır.

Tüm deneylerde kullanılan mikropipet uçları ve ependorflar Biohit firmasından, enzim çalışmalarında kullanılan mikropalakalar Brand firmasından temin edilmiştir. Ayrıca, antimikrobiyal deneylerinde, bitkilerden izole edilen özütleri emdirmek amacıyla, Oxoid marka steril diskler kullanılmıştır.

Tez çalışmaları boyunca; bitki özütlerin hazırlanması için Rotari Evaporator (Büchi B-490), ekstraktların toplam protein, polifenol ve flavonoid bileşiklerin tayininde spektrofotometrik ölçümler almak amacıyla UV-Vis spektrofotometre (HP 8453 A) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan kimyasalların miktarını tartmak amacıyla hassas terazi (Denver Inst), ısıtma veya karıştırma amacıyla kullanılan ısıtıcı manyetik karıştırıcı (Heidolph Mr Hei), deneylerin sağlıklı bir ortamda yapılması için kullanılan çeker ocak, deneylerde kullanılan saf su için saf su cihazı (Millipore) ve ultra saf su sistemi (Millipore) kullanılmıştır. Deneyler sırasında, kullanılan kimyasalları doğru bir

şekilde muhafaza etmek amacıyla kullanılan buz dolabı (Bosch), enzim çalışmalarında kullanılan buz makinesi (Scotsman AF80), enzim aktivite tayininde kullanılan Multimode mikropilaka okuyucu (Spectra Max M2e) kullanılmıştır. Deneylede malzeme ve kimyasal sterilizasyonu için kullanılan yatay otoklav, hücre, ısıya hassas kimyasalların saklanmasıda kullanılan derin dondurucu (-20°C, Bosch), hazırlanan doku homojenatların saklanmasıda kullanılan derin dondurucu -80°C (Hettich) kullanılmıştır. Deneyleler sırasında kullanılan tamponlar ve solüsyonların pH'sını sağlamak amacıyla kullanılan pH metre (Mettler Toledo), sığır karaciğer homojenat hazırlanmasıda kullanılan tezgah üstü soğutucu santrifüj (Hettich) ve ultra yüksek devir soğutucu ve vakumlu santrifüj (Hanil Science), kimyasalların karışımını hazırlamak için vorteks (Heidolph) ve araştırmalar sürecinde otomatik pipetlerden (Gilson ve Biohit) faydalanılmıştır.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Bitki örneklerinin toplanması, saklanması ve tür teşhisi**

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

### **3.2.2 Ekstraksiyon öncesi bitki örneklerinin hazırlanması**

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

Kurutma işleminden sonra bitki örnekleri etiketlenmiş ve uygun saklama kutularına alınmıştır. Çizelge 3.3'de bitki örneklerinin etiket numaraları verilmiştir.

Çizelge 3.3 Bitki örneklerinin etiket numaraları

<b>Familya</b>	<b>Bitki Türü</b>	<b>Etiket Numarası</b>
Brassicaceae	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.)DC.	FG-2010-10
Resedaceae	<i>Reseda lutea</i> L.	FG-2010-13
Apiaceae	<i>Eryngium campestre</i> L.	FG-2010-18

Çalışmada kullanılacak olan *Diplotaxis tenuifolia* (yabani roka)'nın yaprak kısmı, *Reseda lutea* (yaban muhabbetçiçeği) ve *Eryngium campestre* (boğa dikenini)'nin yaprak ve çiçek kısımları incelenmek için kullanılmıştır.

### 3.2.3 Bitki örneklerinin ekstraksiyona hazırlanması

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

Ekstraksiyon aşamasında toz halinde olan bitki örneklerinden polar ve apolar bileşiklerce zengin özüt elde edilmesi amacıyla % 99'luk metanol çözgeni kullanılmıştır (Cowan 1999). Bitki ekstraksiyon işlemi 2 gr toz bitki örneğine 20 mL çözgen (toz ağırlık-çözgen hacim oranı 1:10 olacak şekilde) eklenmesiyle başlamıştır. Hazırlanan karışımlar 30 dakika iyice karıştırıldıktan sonra 24 saat süreyle 4°C'de bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışımlar 6000 devir, 4°C'de ve 20 dakika süre içinde santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra, tüplerde oluşan çökeltiler atılarak sıvı fazdaki çözgen alınmış ve 40°C'de uygun basınçta (337 mbar) rotari evaportor yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen konsantre özüt çözünebildiği miktarda DMSO'da çözülmüştür. Çözünen bitki özütleri alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır (Ertürk 2003).

### **3.2.4 Bitki özütlerinin antimikrobiyal analizi**

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

#### **3.2.4.1 Mikroorganizmaların üremesi için besi yerlerinin hazırlanması**

Antimikrobiyal etki analizinde bakterilerin üretilmesi için gerekli olan katı besi yeri için nutrient agar ve maya suşunun üretilmesi için malt ekstrakt agar kullanılmıştır. Nutrient agar besi yeri için 28 gr besi yeri 1L dH<sub>2</sub>O içinde çözülmüştür. Malt ekstrakt agar'ın hazırlanmasında ise 39 gr besi yeri 1L dH<sub>2</sub>O içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Mikroorganizmaların standardizasyonunda sıvı besi yeri olarak Nutrient Broth kullanılmıştır. Besi yerinin hazırlanması için 8gr besi yeri 1L dH<sub>2</sub>O içinde çözülmüştür. Hazırlanan ve sterilize edilen besi yerleri, petri kaplarına ortalama 4.0 mm ( $\pm 0.5$ mm) derinlikte olacak şekilde dökülmüştür. 120 mm'lik çapında olan bir petri kapı yaklaşık 40mL besi yeri içermiştir. Sıvı besi yerinde ise, hazırlanan ve sterilizasyon işleminden geçen besi yeri 16×16 mm'lik steril cam tüplere alınmıştır. Her steril cam tüp yaklaşık 10mL besi yeri içermiştir. Tüm besi yerleri hazırlandıktan sonra 4°C'de saklanmıştır (Silici ve Koç 2006). Besi yerlerin döküm ve sterilizasyon işlemleri Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ndeki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.2 Bitki özütlerin disklere emdirilmesi**

Bitki örneklerinden elde edilen özütler, 6mm'lik boş ve steril antibiyotik disklerine 5 µL ve 20 µL oranında emdirilmiştir. Özütlerin emdirildiği diskler bir gün oda ısısında kurumaya bırakılmıştır (Moghaddam 2014)



### 3.2.4.3 Mikroorganizmaların standardize edilmesi

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

Mc Farland No 0.5 standardının hazırlanması için; 0.0999 gr BaCl<sub>2</sub> tartılarak 10 mL dH<sub>2</sub>O içinde çözülmüştür. Sonra, 100 mL 0.36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( %1 v/v) çözeltisi hazırlanarak, BaCl<sub>2</sub> çözeltisinden 0.5 mL alınmış ve 0.36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den 99.5 mL ile karıştırılmıştır .

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

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



Şekil 3.1 Bakteri süspansiyonu ile McFarland standardını karşılaştırmak için kullanılmış kağıt

#### **3.2.4.4 Besi yerlerin inokülasyonu ve disklerin yerleştirilmesi**

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

#### **3.2.4.5 İnhibisyon zonların ölçümü**

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

#### **3.2.4.6 Antimikrobiyal analizde kullanılan negatif ve pozitif kontrol**

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

Çizelge 3.4 Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin listesi

Antibiyotik Diski	Madde Miktarı
Ampicillin	10mg
Gentamicin	10mg
Streptomycin	10mg
Tetracyclin	30mg

### 3.2.5 Bitki özütlerin Lowry metodu ile protein tayini

Bitki örneklerinden elde edilen özütlerin protein miktarı Lowry protein tayin metodu ile belirlenmiştir (Lowry vd. 1951). Alkalin ortamda bakır iyonu ( $\text{Cu}^{2+}$ ) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve  $\text{Cu}^{1+}$ 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys amino asitleri Folin reaktifinde bulunan fenol yapısını indirgeyerek mavi renk oluşumuna neden olurlar. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır ve 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Lowry metodunda, protein standardı olarak 1mg/mL Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisinden faydalanılmış ve 0.1-0.5 mg/mL aralığında 4 farklı konsantrasyonda BSA standart çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca, bu metotta kullanılmış olan Lowry reaktifi; A (% 2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1 N NaOH), B (% 1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) ve C (% 2 Na-K tartarat) tamponlarının sırayla 100:1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi ise 1:1 oranında distile su içerisinde hazırlanmıştır. Bitkilerden elde edilen özütlerin protein tayini için 0.5 mL Kör (sadece saf su), standart protein çözeltileri (BSA) ve bitki örnekleri içeren tüplere 2.5mL Lowry reaktifi eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüm deney tüplerine 0.25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüm solüsyonların 600 nm'de Kör'e karşı absorbans ölçümleri alınmıştır. Bitki özütlerinin protein miktarı, BSA konsantrasyonuna karşılık gelen  $\text{OD}_{600}$  değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon

grafiğinden yararlanarak hesaplanmıştır. Deneyin çalışma şeması çizelge 3.5’de sunulmuştur.

Çizelge 3.5 Lowry metodunun çalışma şeması

Reaktifler	Kör Küveti (mL)	Numune Küveti (mL)
Bitki Ekstraktı	-	0.1
Su	0.5	0.4
Lowry Reaktifi	2.5	2.5
10 dakika inkübasyon süresi		
Folin Reaktifi	0.25	0.25

### 3.2.6 Bitki özütlerin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik madde tayini spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotta Folin-Ciocalteu reaktifine ek olarak % 2’lik sodyum karbonat çözeltisi ve fenolik madde standardı olarak da gallik asit (GA) kullanılmıştır. Oluşan reaksiyona bağlı renk değişimleri ise 750 nm’de absorbans ölçümü ile belirlenmiştir. Gallik asit (1mg/mL) çözeltisinden 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 mg/mL olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda standart hazırlanmıştır. DMSO ile hazırlanan çözeltiler fenolik madde standartları olarak kullanılmıştır. Fenolik madde miktarı tayini için 100 µl kör (sadece DMSO), standart bileşik (GA) ve bitki özütü içeren tüplere 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve iyice karıştırılan solüsyonlar oda ısısında karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda özütler, standart ve kör tüplerine 1 ml %2’lik sodyum karbonat eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra bu kez 1 saat oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, tüm solüsyonların 750 nm’de kör’e karşı absorbans ölçümleri ( $OD_{750}$ ) alınmıştır. Gallik asidin farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen  $OD_{750}$  değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam fenolik madde miktarları hesaplanmıştır (Slinkard ve Singleton 1977). Deneyin çalışma şeması çizelge 3.6’da sunulmuştur.

Çizelge 3.6 Toplam polifenol miktar tayinin çalışma şeması

Reaktifler	Kör Küveti (mL)	Numune Küveti (mL)
Numune	–	0.1
DMSO	0.1	–
Folin-Ciocalteu	1	1
5 dakika, oda ısısında ve karanlık ortamda inkübasyon süresi		
%2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1	1
1 saat, oda ısısında ve karanlık ortamda inkübasyon süresi		

### 3.2.7 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi

Bitki özütlerin toplam flavanoid madde miktarı 1988 yılında Woisky ve Salatino tarafından modifiye edilen alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir. Bu metotta % 95'lik etil alkol, % 10'luk alüminyum klorür ve 1M sodyum asetat çözeltileri kullanılmıştır ayrıca metotta, kuersetin flavonoidi kalibrasyon eğrisi yapmak için kullanılmıştır. 10 mg kuersetin 10 mL % 80'lik etil alkol içerisinde çözülerek, 25, 50 ve 100 µg/mL'ye seyreltilmiştir. Flavonoid madde tayini için tüpler içine 0.5 mL kör (% 95'lik etil alkol), standart kuersetin solüsyonları ve bitki özütleri koyulmuş, üzerine 1.5 mL % 95'lik etil alkol, 0.1 mL % 10'luk alüminyum klorür, 0.1 mL sodyum asetat (1M) ve 2.8 mL DMSO ilave edilerek , 30 dakika karanlık ortamda ve oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, tüm solüsyonların 415 nm'de köre karşı absorbans ölçümleri (OD<sub>415</sub>) alınmıştır. Kuersetin farklı konsantrasyonlarına karşı ölçülen OD<sub>415</sub> değerleriyle oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak özütlerdeki toplam flavonoid madde miktarları hesaplanmıştır. Bu deneyin çalışma şeması çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 Toplam flavonoid miktar tayinin çalışma şeması

Reaktifler	Kör Küveti (mL)	Numune Küveti (mL)
Numune	–	0.5
%95'lik Etil Alkol	2	1.5
%10'luk AlCl <sub>3</sub>	0.1	0.1
1M'lık Na asetat	0.1	0.1
DMSO	2.8	2.8
30 dakika oda ısısında inkübasyon		

### 3.2.8 Toplam polifenol miktarına bağlı olarak bitki özütlerin doz plaka hazırlanması

Enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla, bitki özütlerinden elde edilen toplam polifenol madde miktarına bağlı olarak her bir bitki örneği için sekiz dozda özüt plakası hazırlanmıştır. Hazırlanan bu plakada, en yüksek doz 23.81 µg/mL olmak üzere en düşük doz 0.186 µg/mL olmaktadır.

### 3.2.9 Sığır karaciğerden homojenat hazırlanması

Glutasyon-S-transferaz ve glutasyon peroksidaz enzimlerinin aktivite tayini için sığır karaciğeri kullanılmıştır. Enzim izolasyon işlemi 2 kez, 31 Ocak 2012 ve 16 Ekim 2012 tarihlerinde yapılmıştır. İzolasyon işlemi için -80°C'de saklanmış olan sığır karaciğeri tartılarak, ağırlığının iki katı kadar 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH=7.0) (0.15M potasyum klorür, 1mM EDTA ve 1mM ditiyotritol içermektedir) eklendikten sonra, homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 4°C, 10,000 × g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan süpernatant alınıp başka tüplere konulmuş ve ikinci kez +4°C, 30,000 × g'de 60 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant enzim aktivite tayinlerinde kullanılmak amacıyla ependorflar içerisinde -80°C'de saklanmıştır (Çoruh vd. 2007).

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

Özütlerin glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Habig ve arkadaşları tarafından 1974 yılında geliştirilen metottan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, 5 µL bitki özütü, 33µL 200mM'lık fosfat tamponu (pH=6.5), 5µL karaciğerden izole edilmiş GST enzimi (0.7826 mg/mL) ve 200 µL 50 mM'lık CDNB ve 200 mM'lık GSH içeren 100 mM fosfat tamponu ile 250 µL'lik toplam hacimde, 96 kuyulu mikrolakalarda 240 sn'de ve 340nm dalga boyunda yürütülmüştür. Bitki özütlerinin en yüksek dozu 23.81 µg/mL ve en düşük doz 0.374 µg/mL olmak üzere stok solüsyonları 1:2 oranında DMSO ile seri seyreltmeyle hazırlanmıştır. Bu özütlerinin enzim aktivitesine olan etkisi ise özüt yerine çözgen kullanılan köre karşılık farklı konsantrasyonlardaki özütlerin GST aktivitesine olan etkilerinin kıyaslanmasıyla belirlenmiştir. Deney tüm bitki örnekleri için duplike olarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

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

$\epsilon$ = Sönümlenme Katsayısı CDNB için 9,60 nM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> dır.

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş ve özütlerin % inhibisyon oranları ve IC<sub>50</sub>değerleri hesaplanmıştır.

### 3.2.11 Bitki özütlerinin glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesine etkilerinin analizi

Bitki özütlerin glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirtmek amacıyla GPx enzim aktivite tayini, glutasyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutasyon ve hidrojen peroksidin su ve yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) dönüşü sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'ın NADPH molekülünün NADP'ye oksidasyonu 340 nm'de takibe alınmıştır (Plaben vd. 1982).

Tüm deney işlemleri 96 kuyulu mikropalakada ve her bitki örneği için duplike olarak gerçekleştirilmiştir. Bitki özütlerin en yüksek dozu 23.81 µg/mL ve en düşük doz 1.48 µg/mL olmak üzere stok solüsyonları 1:2 oranında DMSO ile seri seyreltmeyle hazırlanmıştır. Özütlerin GPx enzim aktivitesine olan etkilerinin tespiti için her bitki örneğine karşılık Kör ve enzim kontrolü hazırlanmıştır. 5 µL Kör, enzim kontrolü (sadece DMSO) ve bitki örneği içeren kuyulara sırayla 36 µL 0.5 mM'lık EDTA içeren Tris.HCl (pH=8.0) tamponu, 2µL sığır karaciğer dokusundan elde edilen sitozol (0.9282 mg/mL) (enzim kontrolü hariç), 5 µL glutatyon redüktaz (20U/mL) enzimi, 20 µL 20mM'lık GSH, 5 µL 10mM'lık NADPH çözeltisi ve en son 120 µL 10mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren Tris.HCl tamponu eklenerek karışımın toplam hacmi 200 µL'ye tamamlanmıştır. Karışım karıştırıldıktan hemen sonra 340 nm'de optik dansitedeki (OD<sub>340</sub>) düşüş, 5 dakika süresince takibe alınmıştır. Enzim aktivitesi ise deneysel verilerin aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır.

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

NADPH için 340 nm'deki sönümleme katsayısı ( $e_{340}$ ) 0,00622  $\text{nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  olarak alınmıştır.

Elde edilen sonuçlar ise Graphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş ve özütlerin % inhibisyon oranları ve IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

### **3.2.12 Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesine etkilerinin analizi**

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

Deney işlemleri iki aşamadan oluşmuştur. İlk aşamada her bitki özütünden 2µL oranında alınmış ve mikropalaka kuyucuklarına konulmuştur. Bitki özütlerinin en yüksek



dozu *D.tenuifolia* ve *R.lutea* yaprak özütleri için 11.90 µg/mL iken *R.lutea* çiçek özütü için en yüksek doz 5.95 µg/mL'dir. En düşük doz hepsinde aynı olmak üzere 0.186 µg/mL stok solüsyonları 1:2 oranında DMSO ile seri seyreltmeyle hazırlanmıştır. Sonra, Kör ve özüt içeren kuyulara sırasıyla 100.1 U/mL katalaz enziminden 20µL, 50mM'lık fosfat tamponundan 28 µL ve 10 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 50 µL eklenerek 2 dakika inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrası karışıma 50 µL 15 mM'lık NaN<sub>3</sub> ilave edilmiş ve 5 dakika karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İkinci inkübasyondan sonra ve deneyin ikinci aşamasında her karışımdan 5'er µL örnek alınmış ve yan kolondaki kuyulara konulmuştur. Konulan karışımın üzerine 255 µL kromojen karışımı eklenmiş, böylece toplam hacim 260 µL'ye tamamlanmıştır. Kromojen karışımı aynı günde kullanmak amacıyla 4-AP, DHBS ve HRP enziminden (1 mL:1mL: 1µL) oluşturularak hazırlanmıştır.

Karışım iyice karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, ortamda kalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kromojen arasında oluşan reaksiyonda ortaya çıkan pembe renk 520 nm dalga boyunda mikropalakada okunmuştur.

Bu işlemler her bitki özütü için ayrı ayrı ve dublike olarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi aşağıda sunulan formüle yerleştirilerek hesaplanmıştır.

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

Elde edilen sonuçlar ise Gaphpad Prism 6.0 programı yardımıyla analiz edilmiş ve özütlerin % inhibisyon oranları ve IC<sub>50</sub>değerleri hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Bitki Özütlerinin Verimleri

*Diplotaxis tenuifolia*, *Reseda lutea* ve *Eryngium campestre* türlerinden elde edilen metanollü özütlerin % verimleri çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Bitki özütlerinin (%) verimleri

Bitki Familyası	Bitki Adı	Bitki Kısımları	Verim ( %)
Brassicaceae	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Yaprak	13.02
Resedaceae	<i>Reseda lutea</i>	Çiçek	10.15
		Yaprak	6.02
Apiceae	<i>Eryngium campestre</i>	Çiçek	5.275
		Yaprak	6.72

Özütlenme çalışmasında elde edilen bulgulara göre en yüksek verim *Diplotaxis tenuifolia*’nın yaprağından elde edilmiştir. En düşük verim ise *Reseda lutea*’nın yaprağından elde edilmiştir.

### 4.2 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

#### 4.2.1 Disk difüzyon yöntemi ile pozitif ve negatif kontrollerin sonuçları

Antibiyotiklerden; Ampisilin, Gentamisin, Stroptomisin ve Tetrasiklin pozitif kontrol olarak, DMSO ve metanol ise negatif kontrol olarak disk difüzyon yönteminde standart bakteri suşlarına karşı test edilmiştir. Pozitif kontrollerden elde edilen sonuçlar çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Çizelge 4.2 Antibiyotiklerden elde edilen pozitif kontrol sonuçları

Mikroorganizmalar	Standart Antibiyotikler			
	Ampisilin	Gentamisin	Streptomisin	Tetrasiklin
	İnhibisyon Zon Çapı (mm)			
<i>Bacillus subtilis</i> , ATCC-6633	30	18	25	13
<i>Candida albicans</i> , ATCC-10231	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> , ATCC-25922	20	-	23	35
<i>Pseudomona aeruginosa</i> , ATCC-27853	-	15	15	20
<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC-25923	20	30	20	13

Ayrıca, negatif kontrolde kullanılan DMSO ve metanolün hiçbir mikroorganizma suşu üzerinde inhibisyon etkisi görülmemiştir.

#### 4.2.2 Bitki özütlerinin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite tayini sonuçları

Bitki örneklerinden elde edilen metanollü özütlerin disk difüzyon yöntemi ile mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği inhibisyon etkileri çizelge 4.3’de verilmiştir. *Diplotaxis tenuifolia*’nın çiçeğinden, *Reseda lutea* ve *Eryngium campestre*’nin çiçek ve yaprağındanelde edilen metanollü özütlerin antimikrobiyal aktivitesi, 2 adet Gram (+) (*B.subtilis* ve *S.aureus*), 2 adet Gram (-) (*E.coli* ve *P.aeruginosa*) bakterileri ile bir adet maya (*C.albicans*) suşu olmak üzere toplam 5 adet mikroorganizma üzerinde

incelenmiştir. Sonuçlara göre her bir bitki özütü en az bir mikroorganizma suşu üzerinde inhibisyon etki göstermiştir.

Çizelge 4.3 Bitki özütlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları

Bitki Örnekleri		Mikroorganizmalar				
Bitki Adı	Bitki Kısmı	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
		İnhibisyon Zon Çapı (mm)				
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	yaprak	10	-	13	-	12
<i>Reseda lutea</i>	Çiçek	-	-		-	10
	Yaprak	Çok hafif	-	10	13	13
<i>Eryngium campestre</i>	Çiçek	7	-	-	-	10
	Yaprak	-	-	-	8	8

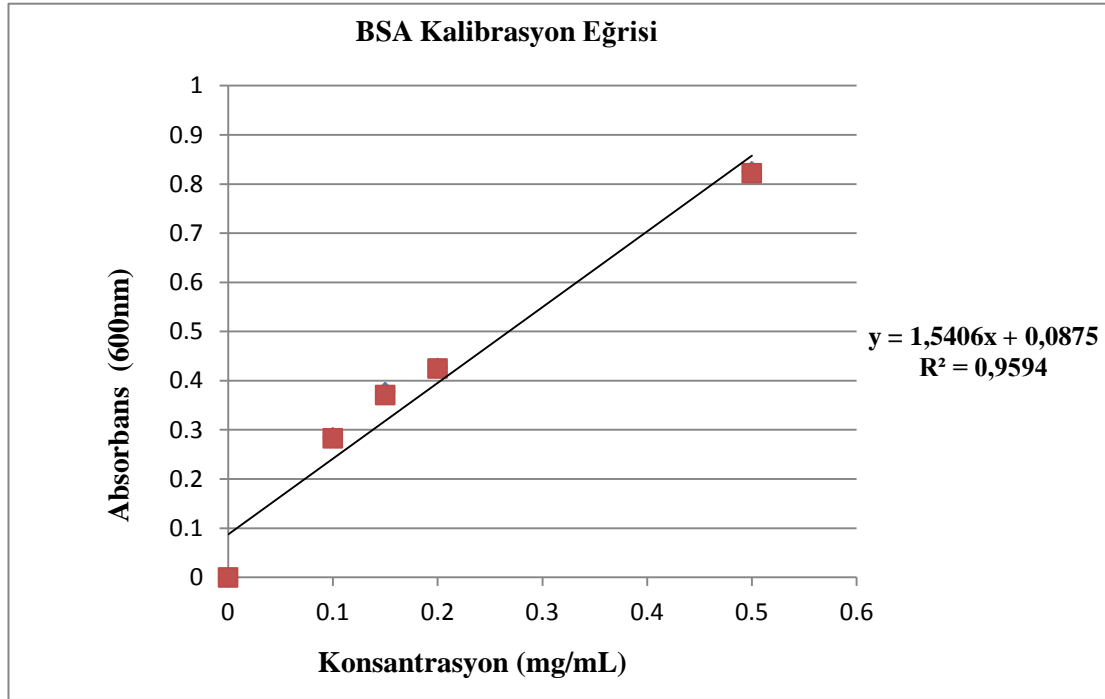
### 4.3 Bitki Özütlerin Toplam Protein Tayini

#### 4.3.1 Kalibrasyon eğrisi

Bitki özütlerinin toplam protein miktarı Lowry yöntemine göre belirlenmiş olup şekil 4.1'deki kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için sığır albumin serum (BSA)'dan hazırlanmış, farklı konsantrasyonlarda solüsyonlardan elde edilen absorbans değerlerine göre çizilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Protein tayini için elde edilen absorbans değerleri

BSA Konsantrasyon (mg/mL)	Absorbans Değerleri (600 nm)	
0	0	0
0.1	0.285	0.283
0.15	0.377	0.371
0.2	0.426	0.425
0.5	0.826	0.822



Şekil 4.1 Toplam protein tayini için BSA standart eğrisi grafiği

#### 4.3.2 Bitki özütlerinin protein miktarı

Tez çalışmasında kullanılan bitkilerden elde edilen metanollü özütlerin protein miktarları Lowry yöntemine göre belirlenmiştir. Elde edilen veriler çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5 Bitki özütlerinin protein miktarı

Bitki Adı	Bitki Kısımları	Protein Miktarı (mg/mL)
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Yaprak	21.29
<i>Reseda lutea</i>	Çiçek	33.74
	Yaprak	17.74
<i>Eryngium campestre</i>	Çiçek	15.95
	Yaprak	13.93

Gözlemlenen sonuçlara göre, *Reseda lutea*'nın çiçeğinden elde edilen özüt 33.74 mg/mL oranında içerdiği protein miktarı ile incelenen bitkiler arasında en yüksek protein miktarını içerirken, *Eryngium campestre*'nin yaprağından elde edilen özüt 13.93 mg/mL oranında içerdiği protein miktarı ile en düşük protein içerikli özüt olarak belirlenmiştir.

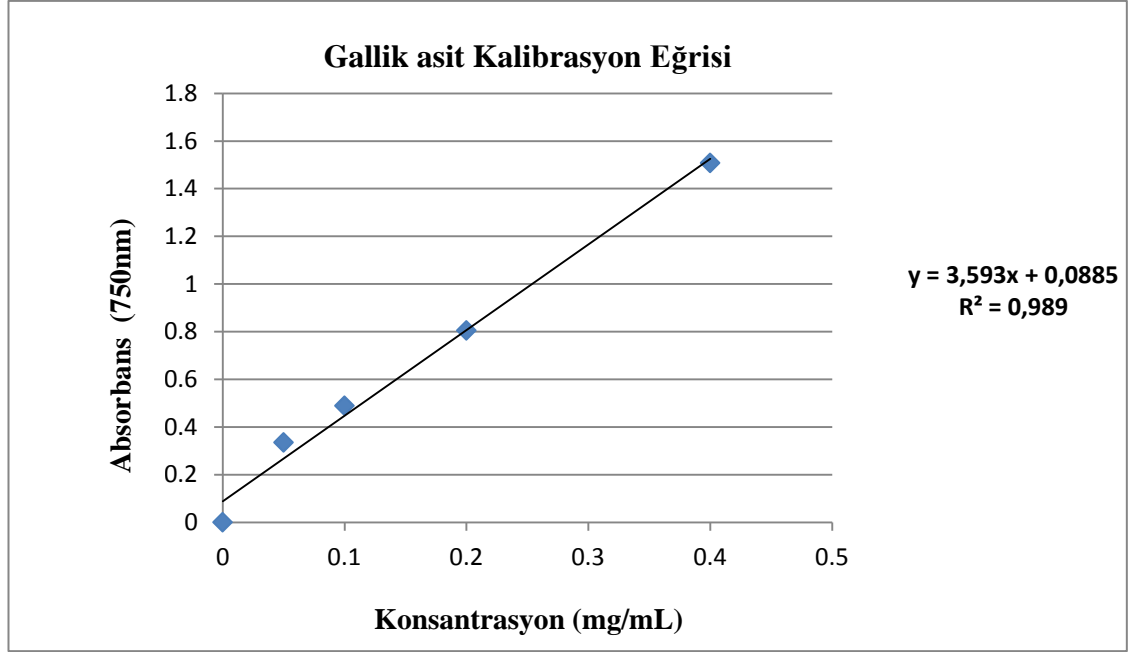
#### 4.4 Bitki Özütlerinin Toplam Fenolik Madde Tayini

##### 4.4.1 Kalibrasyon eğrisi

Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi Folin-Ciocalteu (FCR) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile bitki özütlerinin toplam fenolik madde içeriklerinin tayini için çizilen kalibrasyon eğrisinde, standart olarak çeşitli gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisine ait olan absorbans değerleri çizelge 4.6'da, çizilen standart grafiği şekil 4.2'de sunulmuştur.

Çizelge 4.6 Fenolik madde tayini için elde edilen absorbans değerleri

Ana Konsantrasyon (mg/mL)	Final Konsantrasyonu (mg/mL)	Absorbans (750 nm)
0	0	0
0.05	2,381	0.335
0.1	4,762	0.489
0.2	9,524	0.805
0.4	19,048	1.508



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

#### 4.4.2 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarı

Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarları şekil 4.2'deki kalibrasyon eğrisi yardımı ile hesaplanmış ve elde edilen deneysel veriler çizelge 4.7'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre *Diplotaxis tenuifolia*'nın yaprağının en yüksek, *Reseda lutea*'nın çiçeği ise en düşük fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.7 Bitki özütlerinin toplam fenolik madde miktarı

Bitki Adı	Bitki Kısımları	Fenolik madde Miktarı (mg/mL)
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Yaprak	144.49
<i>Reseda lutea</i>	Çiçek	109.01
	Yaprak	133.52
<i>Eryngium campestre</i>	Çiçek	109.62
	Yaprak	116.69

## 4.5 Bitki Özütlerinin Toplam Flavonoid Madde Tayini

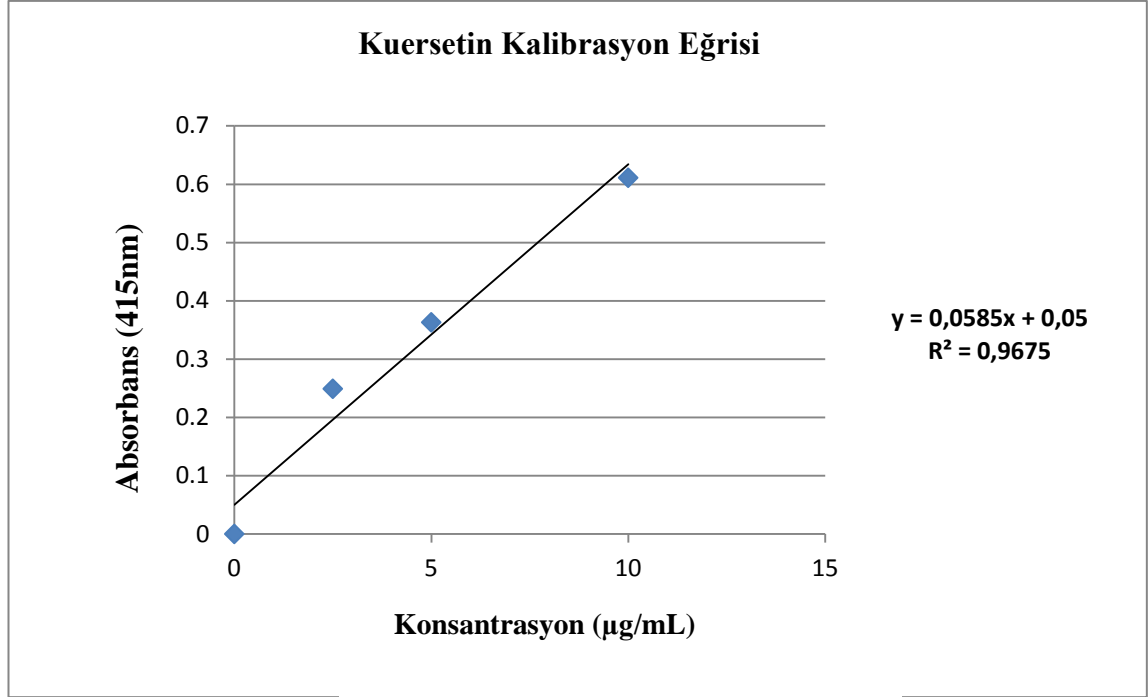
### 4.5.1 Kalibrasyon eğrisi

Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde tayini alüminyum klorür klorometrik yöntemi ile belirlenmiştir. Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde tayini için çizilen kalibrasyon eğrisinde, belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış standart kuersetin çözeltilerinden elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisine ait absorbans verileri çizelge 4.8’de, kalibrasyon eğrisi grafiği şekil 4.3’de sunulmuştur.

Çizelge 4.8 Toplam flavonoid madde tayini için elde edilen absorbans değerleri

<b>Ana Konsantrasyon (µg/mL)</b>	<b>Final Konsantrasyon (µg/mL)</b>	<b>Absorbans (415nm)</b>
0	0	0
25	2.5	0.249
50	5	0.363
100	10	0.611





Şekil 4.3 Toplam flavonoid madde tayini için kuersetin standart eğrisi grafiği

#### 4.5.2 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı

Çalışmada kullanılan bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları şekil 4.3'deki kalibrasyon eğrisi grafiği yardımıyla hesaplanmış ve elde edilen deneysel veriler çizelge 4.9'da verilmiştir. Elde edilen verilere göre *Diplotaxis tenuifolia*'nın yaprağının en yüksek, *Reseda lutea*'nın çiçeğinin ise en düşük flavonoid madde miktarına sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9 Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarı

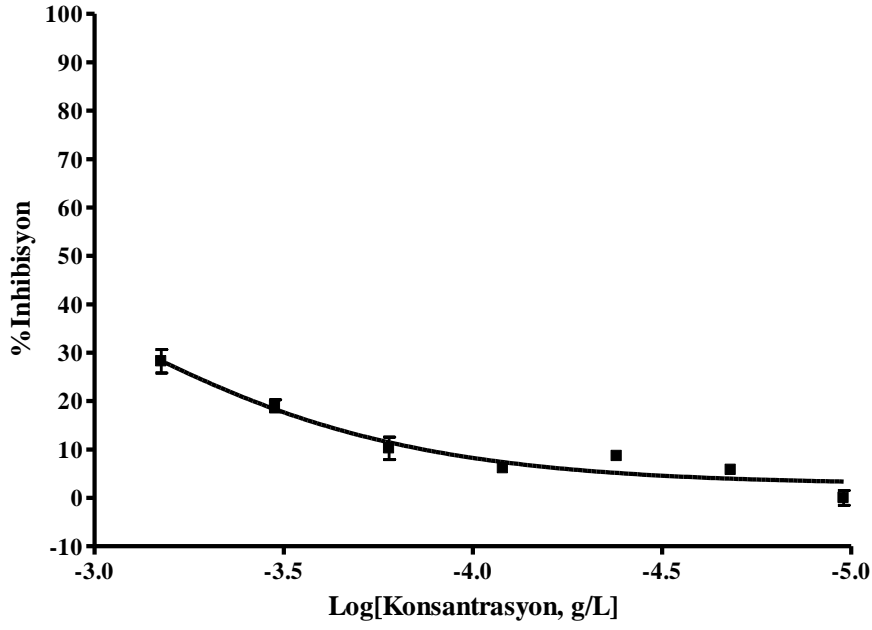
Bitki Adı	Bitki Kısımları	Flavonoid madde miktarı (µg/mL)
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Yaprak	250.485
<i>Reseda lutea</i>	Çiçek	78.724
	Yaprak	196.809
<i>Eryngium campestre</i>	Çiçek	110.589
	Yaprak	108.372

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

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

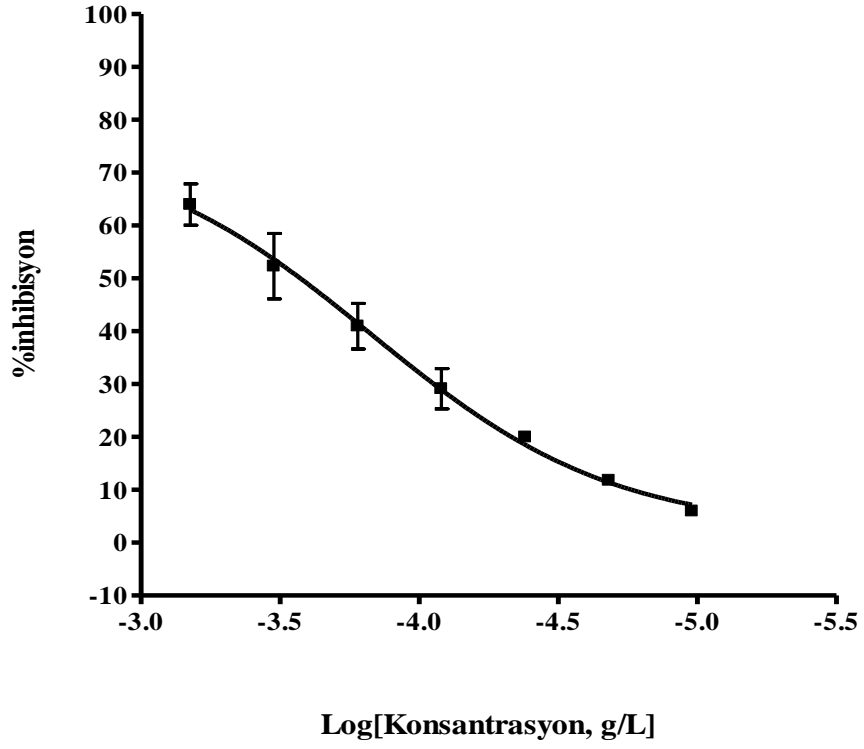
GST enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra, *Diplotaxis tenuifolia*'nın yaprağı, *Reseda lutea*'nın ve *Eryngium campestre*'nin çiçek ve yaprak özütlerinin GST enzim aktivitesine olan etkileri çalışılmıştır. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevap eğrilerinin çizildiği grafikler şekil 4.4-4.8'de gösterilmiştir. Ayrıca bitki özütlerinin GST enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleri karşılaştırılmalı olarak çizelge 4.10 ve şekil 4.9'da sunulmuştur.

Şekil 4.4'de *Diplotaxis tenuifolia* bitki yaprağından elde edilen özütün en yüksek dozu kullanıldığında en fazla % 28 inhibisyon yaptığı görülmektedir.  $\text{IC}_{50}$  değeri, 1.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olarak bulunmuştur.

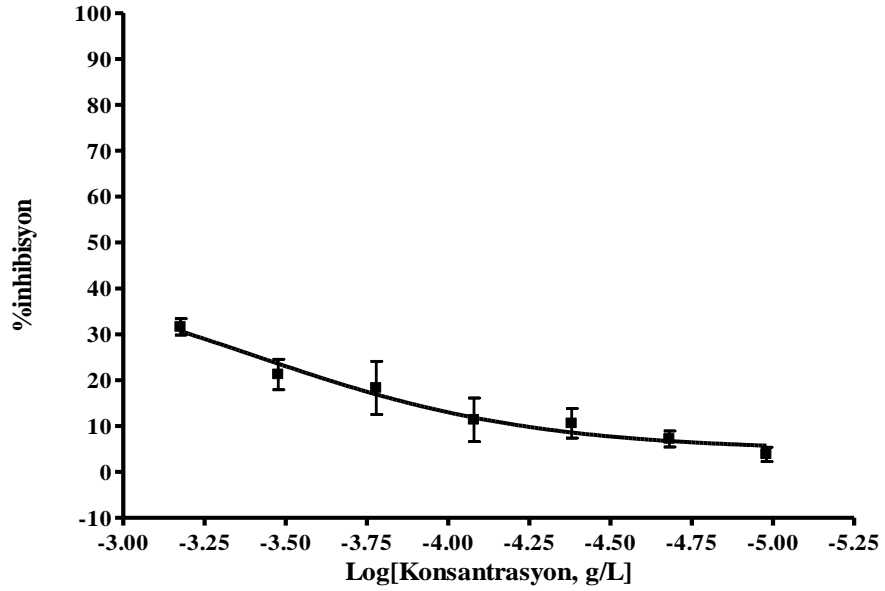


Şekil 4.4 *D.tenuifolia* (L.) DC. yaprak özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Şekil 4.5 - 4.6'da *Reseda lutea* bitki çiçeği ve yaprak özütlerinin en yüksek dozları kullanılmış ve sırasıyla en fazla %64 ve %30 inhibisyon gösterdikleri bulunmuştur. Yine  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $0.149 \mu\text{g/mL}$  ve  $0.403 \mu\text{g/mL}$ 'dir. Bulunan veriler doğrultusunda *Reseda lutea* çiçek özütünün iyi bir GST inhibitörü olduğunu göstermektedir.

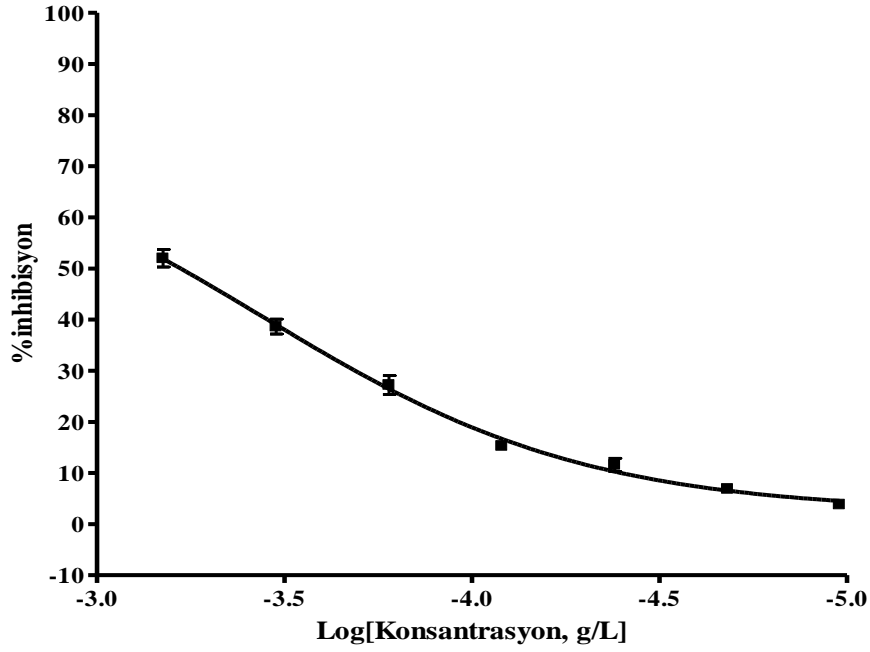


Şekil 4.5 *R.lutea* L. bitki çiçeği özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

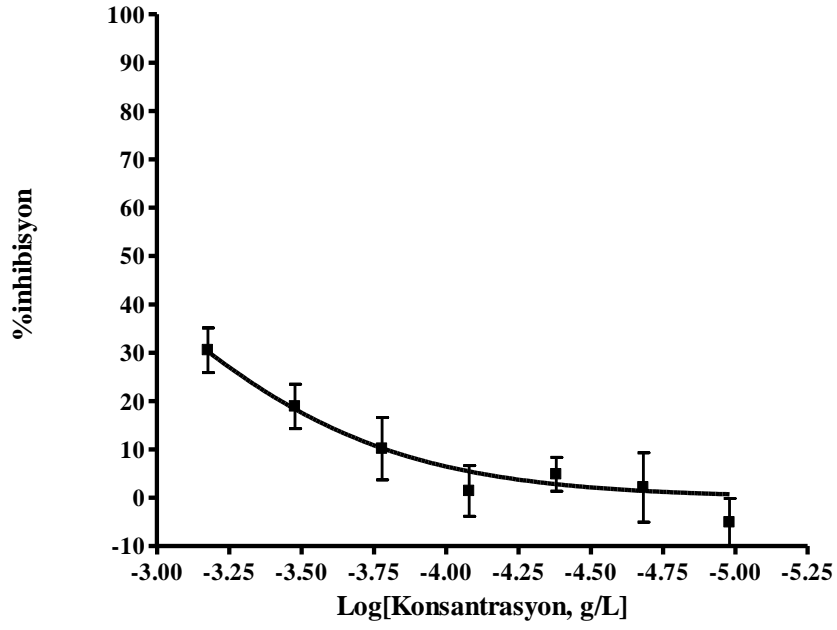


Şekil 4.6 *R.lutea* L. bitki yaprağının özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

*Eryngium campsetre* bitki çiçeği ve yaprak özütlerinin doz-cevap eğrisi şekil 4.7- 4.8’de gözlemlenmiş ve sırasıyla en yüksek dozda en fazla %50 ve %30 oranında GST enzimi inhibisyonu yaptıkları gösterilmiştir. IC<sub>50</sub>değerleri ise sırasıyla 0.36 µg/mL ve 1.22 µg/mL olarak bulunmuştur. Bulunan sonuçlar *Eryngium campestre* bitkisinin çiçek özütünün iyi bir GST inhibitörü olduğunu göstermiştir.



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

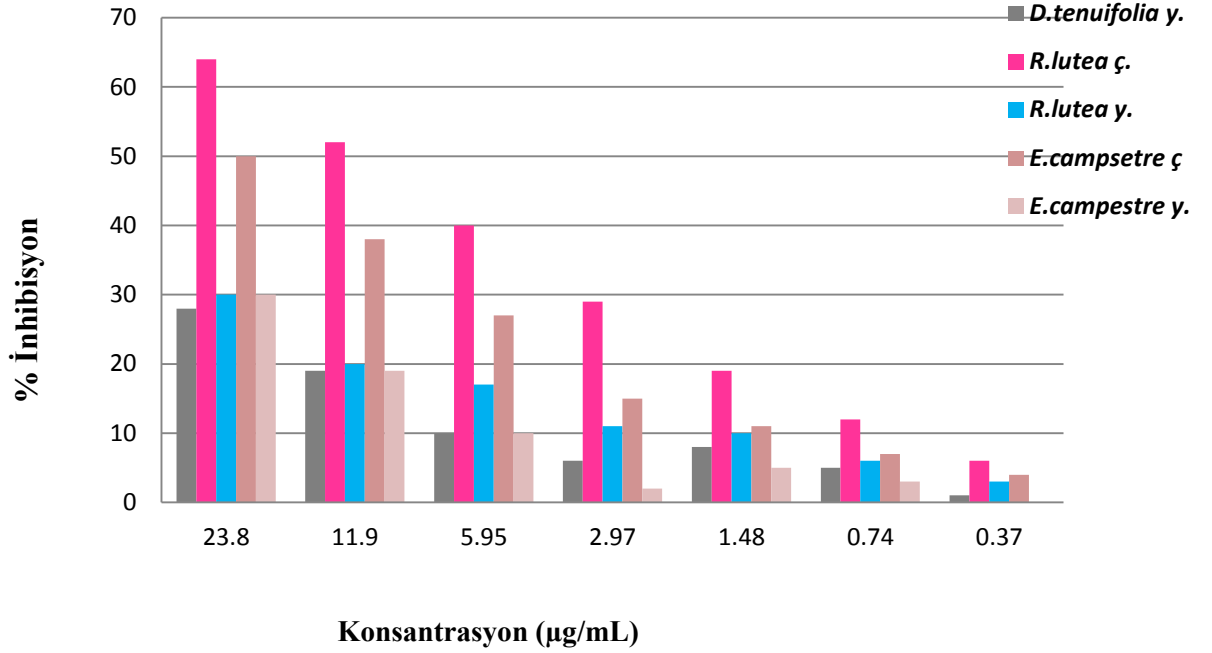


Şekil 4.8 *E. campestre* L. bitki yaprak özütünün glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Çizelge 4.10 Bitkiözütlerinin GST enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri

<b>Bitki Özütlerinin GST Enzimi Üzerinde Doza Bağlı % İnhibisyon Değerleri</b>					
<b>DOZ(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><i>D.tenuifolia</i> yaprak</b>	<b><i>R.lutea</i> çiçek</b>	<b><i>R.lutea</i> yaprak</b>	<b><i>E.campestre</i> çiçek</b>	<b><i>E.campestre</i> yaprak</b>
23.81	28	64	30	50	30
11.90	19	52	20	38	19
5.95	10	40	17	27	10
2.97	6	29	11	15	2
1.48	8	19	10	11	5
0.74	5	12	6	7	3
0.37	1	6	3	4	-

### GST Enzimi Üzerinde Doza Bağlı % İnhibisyon Grafiği



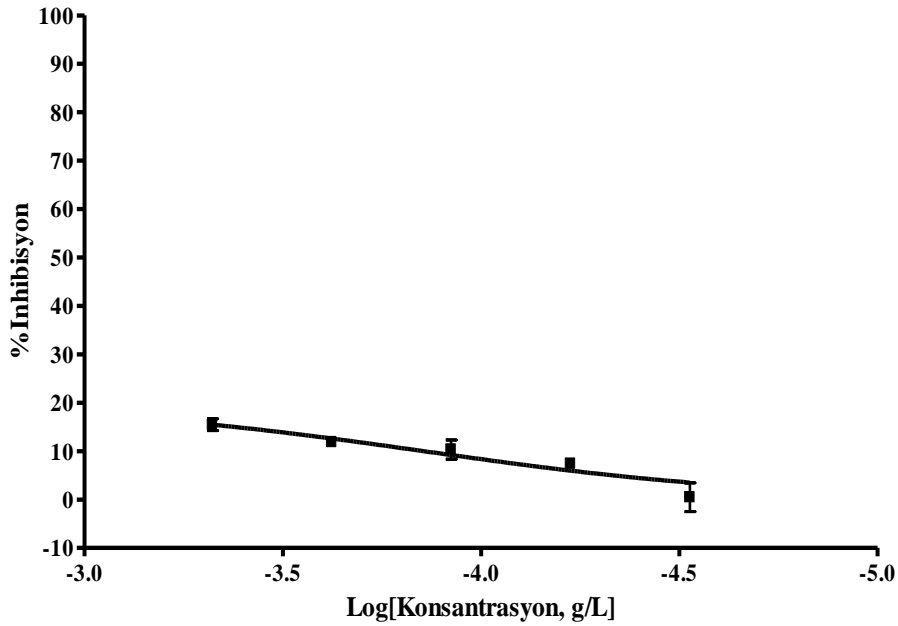
Şekil 4.9 Bitki özütlerinin GST enzimi üzerindeki doza bağlı % inhibisyon grafiği

#### 4.7 Bitki Özütlerinin Glutasyon Peroksidaz Enzimi Üzerine Olan Etkileri

Sığır karaciğer dokusundan saflaştırılan GPx enzim aktivitesini belirtmek amacıyla GPx enzim aktivite tayini, glutasyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotta GPx etkisiyle glutasyon ve hidrojen peroksitin, suya ve yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüşü sonrasında açığa çıkan GSSG ürün miktarına bağlı olarak GR'nin NADPH molekülünün NADP'ye oksidasyonu 340 nm'de okunmuştur. Bitki özütleri olmadan, yani sadece GPx enziminin oluşturduğu aktivite değeri 0.9282 mg/mL enzim için ölçülen 0.045mmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak belirlenmiştir.

GPx enzim aktivitesi hesaplandıktan sonra *Diplotaxis tenuifolia*'nın yaprağı, *Reseda lutea*'nın ve *Eryngium campestre*'nin çiçek ve yaprak özütlerinin GPx enzim aktivitesine olan etkileri çalışılmıştır. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevap grafikleri şekil 4.10 - 4.14'de gösterilmiştir. Ayrıca bitki kısımlarından elde edilen özütlerin GPx enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri karşılaştırmalı olarak çizelge 4.11 ve şekil 4.15'de sunulmuştur.

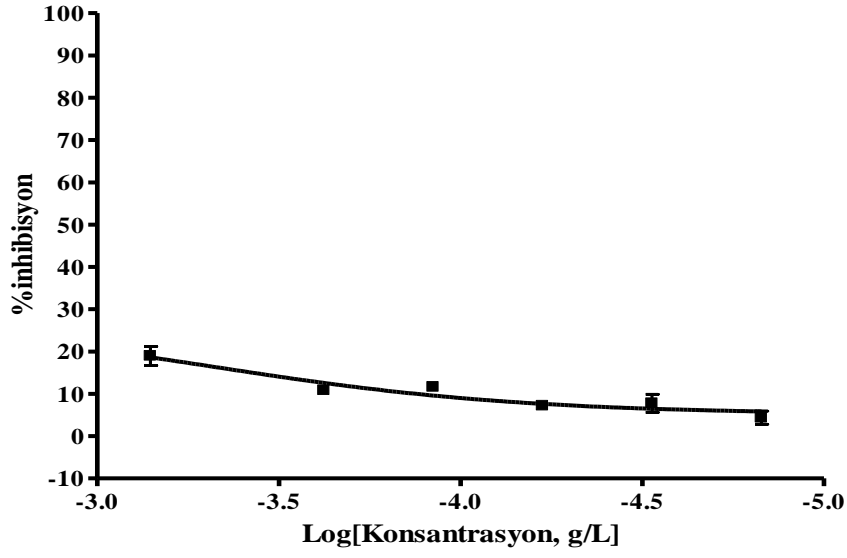
*Diplotaxis tenuifolia* bitki yaprak özütünün doz-cevap eğrisi şekil 4.12 gösterilmiş olup, en yüksek dozda maksimum %18 GPx enzimi inhibisyonu yaptığını, IC<sub>50</sub>değer ise 0.14 µg/mLolarak bulunmuştur.



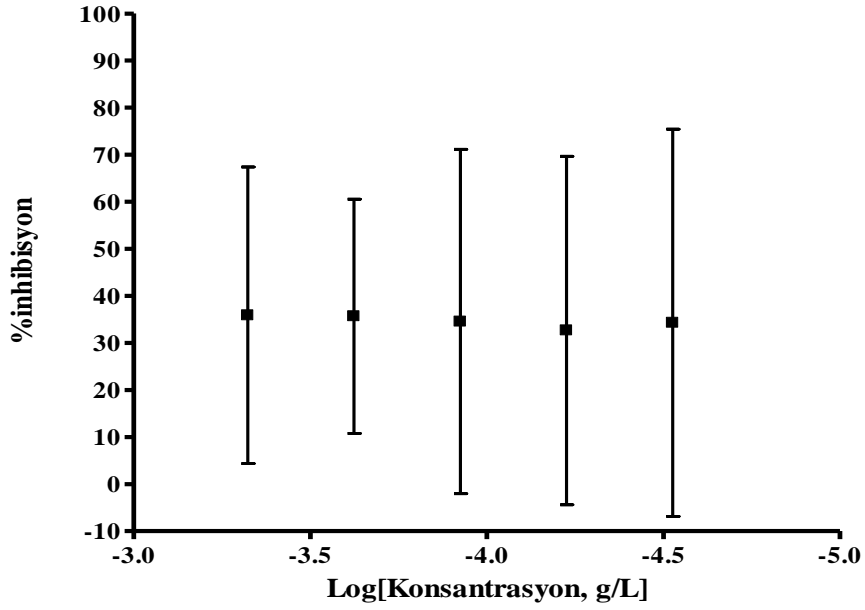
Şekil 4.10 *D. tenuifolia* (L.) DC. bitki çiçeği özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine olan etkisi.

Şekil 4.11-4.12'de *Reseda lutea* bitki çiçeği ve yaprak özütlerinin en yüksek dozları kullanılmış ve çiçek kısmının %16 inhibisyon yaptığı gözlemlenirken, bitkinin yaprak özütü için herhangi bir değer hesaplanamamıştır. *Reseda lutea* bitkisinin çiçek özütünün IC<sub>50</sub> değeri ise 0.49 µg/mL olarak bulunmuştur.





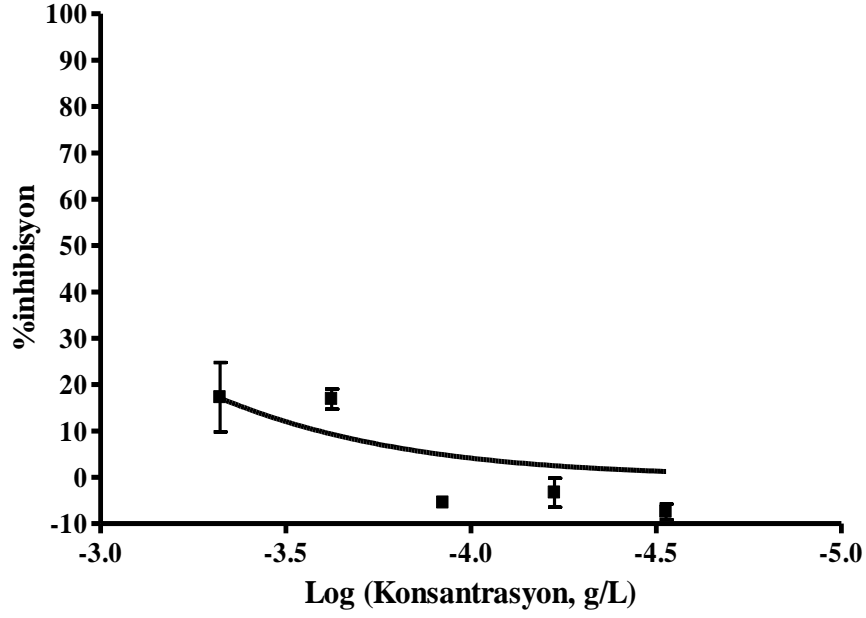
Şekil 4.11 *R. lutea* L. bitki çiçek özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi



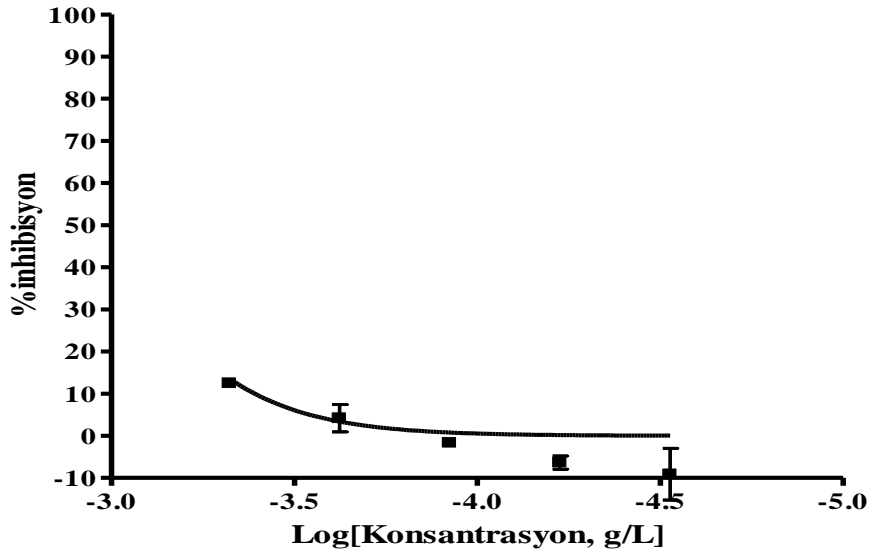
Şekil 4.12 *R. lutea* L. bitki yaprak özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Şekil 4.13 ve 4.14'de *Eryngium campestre* bitki çiçeği ve yaprağından elde edilen özütlerin en yüksek dozu kullanıldığında sırasıyla maksimum % 15 ve % 13 inhibisyon

olduğu gözlemlenmiştir. Sırasıyla IC<sub>50</sub>değerleri 2.31µg/mL ve 0.11 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



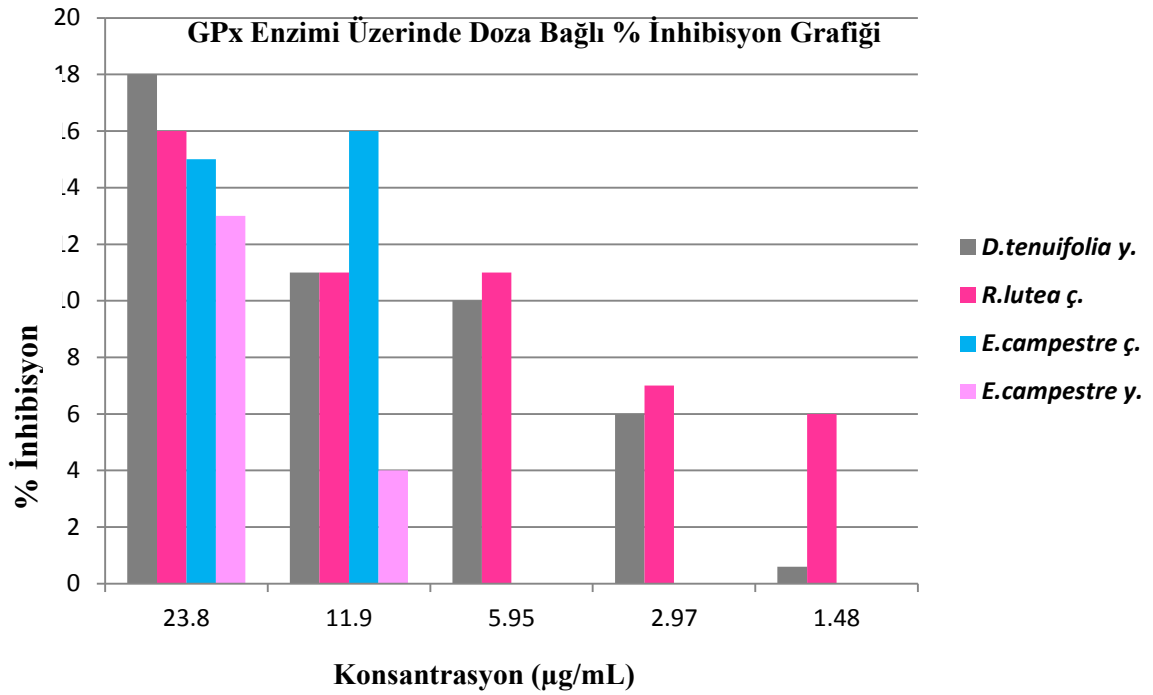
Şekil 4.13 *E.campestre* L. bitki çiçek özütünün GPx enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.14 *E. campestre* L. bitki yaprak özütünün glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.11 Bitki özütlerinin GPx enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri

<b>Bitki Özütlerinin GPx Enzimi Üzerinde Doza Bağlı % İnhibisyon Değerleri</b>					
<b>DOZ(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><i>D. tenuifolia</i> yaprak</b>	<b><i>R.lutea</i> çiçek</b>	<b><i>R.lutea</i> yaprak</b>	<b><i>E.campestre</i> çiçek</b>	<b><i>E.campestre</i> yaprak</b>
23.81	18	16	-	15	13
11.90	11	11	-	16	4
5.95	10	11	-	-	-
2.97	6	7	-	-	-
1.48	0.6	6	-	-	-



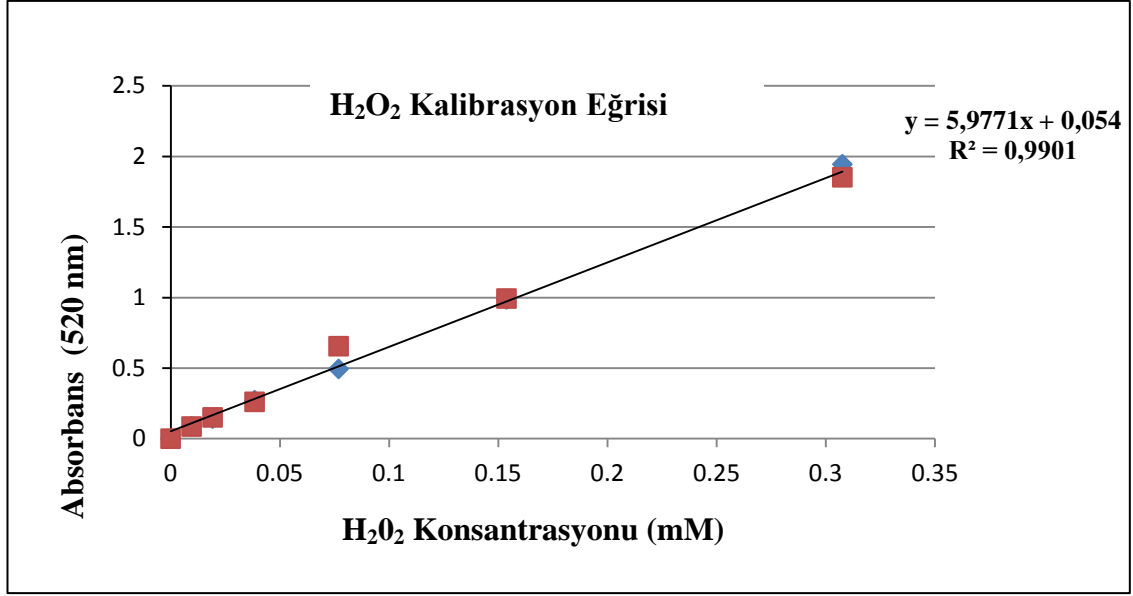
Şekil 4.15 Bitki özütlerinin GPx enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon grafiği

#### 4.8 Bitki Özütlerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Olan Etkileri

Bitki özütlerinin katalaz (KAT) enzim aktivitesi üzerinde olan etkilerini belirlemek için diğer enzim aktivite tayinlerinde olduğu gibi, katalaz aktivite tayini yapılmıştır. Bu enzimin hidrojen peroksiti suya katalizlediği reaksiyon spektrofotometrik olarak 520 nm'de peroksit miktarındaki düşüğe bağlı olarak absorpsiyondaki görülen azalmanın takibiyle gerçekleştirilmiştir. Bitki özütleri olmadan sadece KAT enziminin oluşturduğu aktivite değeri 4.53 mg/mL saf enzim için ölçülen 100.1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin KAT enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değerle kıyaslanarak belirlenmiştir. KAT enziminin aktivitesi şekil 4.16'da gösterildiği gibi  $\text{H}_2\text{O}_2$  kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için  $\text{H}_2\text{O}_2$ ·den hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardan oluşan solüsyonlardan elde edilen absorbans değerlerine göre çizilmiştir (Çizelge 4.12).

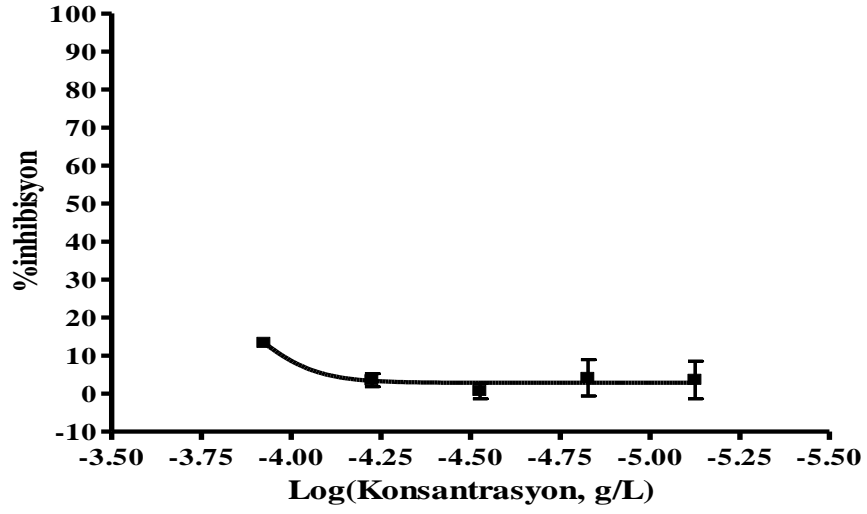
Çizelge 4.12  $\text{H}_2\text{O}_2$  tayini için elde edilen absorbans değerleri

<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> Konsantrasyon (mM)</b>	<b><math>\text{H}_2\text{O}_2</math> Final Konsantrasyon (mM)</b>	<b>Absorbans Değerleri (520nm)</b>	
0	0	0	0
0.1	0.0096	0.0869	0.0861
0.2	0.0192	0.1422	0.1506
0.4	0.0384	0.2723	0.2609
0.8	0.0769	0.4942	0.6551
1.6	0.1538	0.9870	0.9929
3.2	0.3076	1.9444	1.8522



Şekil 4.16 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kalibrasyon eğrisi

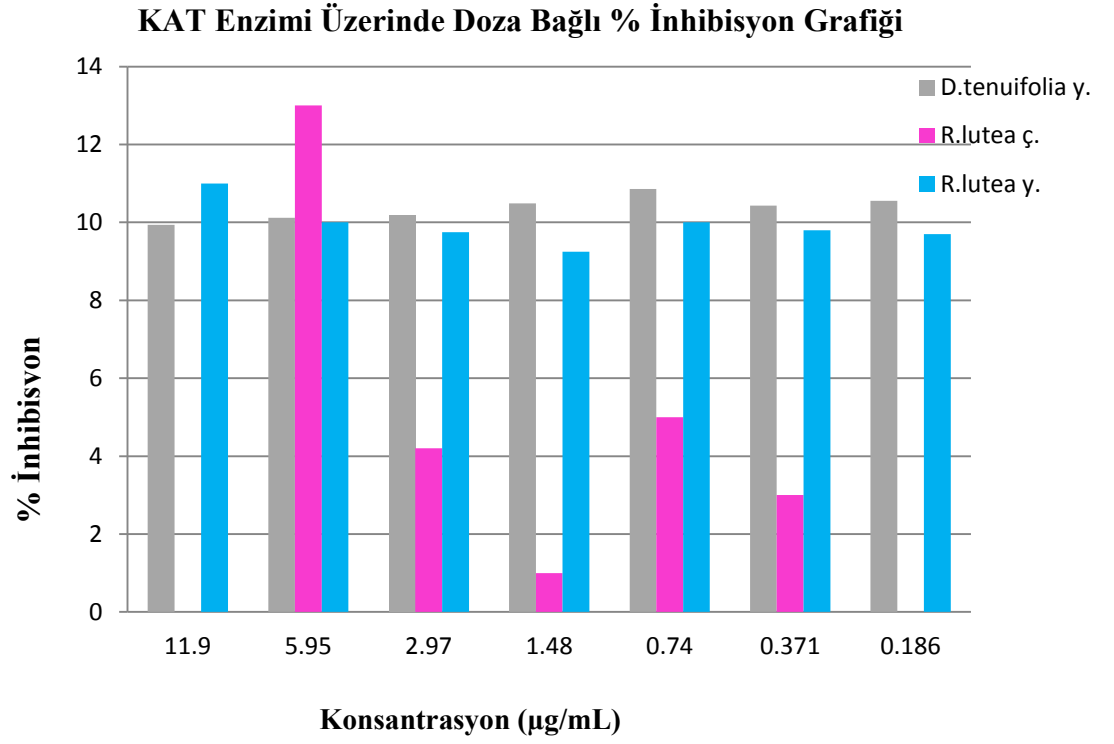
KAT enzim aktivitesi hesabı yapıldıktan sonra; *Diplotaxis tenuifolia* yaprak özütü, *Reseda lutea* ve *Eryngium campestre* çiçek ve yaprak özütlerinin ön tarama çalışması yapılmıştır. Yapılan bu ön tarama sonucunda sadece *Diplotaxis tenuifolia* bitkisinin yaprak özütü ve *Reseda lutea* bitkisinin çiçek ve yaprak özütlerinin KAT enzim aktivitesine olan etkilerine bakılmak üzere karar verilmiştir. %100 enzim aktivitesine dayanılarak enzimin inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır. Çizilen eğim grafikleri, özüt konsantrasyonlarının % inhibisyon değerlerine karşılık gelen doz-cevab grafiğinde sadece *R. lutea* bitkisinin çiçek özütünün KAT enzimine karşı inhibisyon etkisi gösterilmiş şekil 4.17’de gösterilmiş olup ayrıca bitki özütlerinin KAT enzimi üzerindeki etkilerinin doza bağlı % inhibisyon değerleri karşılaştırmalı olarak çizelge 4.13 ve şekil 4.18’de sunulmuştur.



Şekil 4.17 *R.lutea* L. bitki çiçek özütünün katalaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

Çizelge 4.13 Bitki özütlerinin KAT enzimi üzerinde doza bağlı % inhibisyon değerleri

Bitki Özütlerinin Katalaz Enzimi Üzerinde Doza Bağlı % İnhibisyon Değerleri			
DOZ (µg/mL)	<i>D. tenuifolia</i> yaprak	<i>R.lutea</i> çiçek	<i>R.lutea</i> yaprak
11.90	9.94	-	11
5.95	10.12	13	10
2.97	10.18	4.2	9.75
1.48	10.49	1	9.25
0.74	10.86	5	10
0.37	10.43	3	9.80
0.186	10.55	-	9.70



Şekil 4.18 Bitki özütlerinin KAT enzimi üzerinde doza bağlı %inhibisyon grafiği

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin insan sağlığında kritik bir rol üstlenebilecekleri ve önemli besin kaynağı olarak kullanılabilirler yapılan araştırmalarda kanıtlanmıştır. (Asami vd. 2003). Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu düşünölen çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Saldamlı 2007). Hücrelerde doğal metabolik yollarla serbest radikaller oluşmakta ancak oluşan bu radikaller ortamdan antioksidan sistemler aracılığı ile kaldırıldığından, herhangi bir sitotoksite ortaya çıkmamaktadır. Ancak bu işleyişin radikaller lehine bozulduğu durumlarda bir dizi patolojik olay ortaya çıkmaktadır (Yen ve Wu 1999). Vücutta oluşan bu serbest radikallere karşı bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler, son yıllarda, birçok alanda insan sağlığı üzerine olan yararlı etkilerinden dolayı büyük bir ilgi görmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, Ankara'nın çeşitli bölgelerinden toplanan ve potansiyel tıbbi bitki oldukları oldukları bilinen *Diplotaxis tenuifolia*'nın yaprak kısmı, *Reseda lutea* ve *Eryngium campestre*'nin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen özütlerin antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve çeşitli biyokimyasal özellikleri bazı antioksidan enzimlerin (GST, GPx ve KAT) aktivitelerine olan etkileri aracılığı ile incelenmiştir. Çalışmanın antimikrobiyal kısmında, metanol ile özütlenen bitkilerin 5 farklı bakteri ve maya suğu üzerine olan etkileri incelenmiş olup, yine bu özütlerin biyokimyasal çalışmalarında toplam protein, polifenol ve flavonoid miktarları *invitro* metodlar kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, metanolla elde edilmiş bu bitki özütlerinin antioksidan savunma sistemlerinde görev alan enzimler (GST, GPx ve KAT) üzerine etkileri doz- cevap analizleri ile incelenmiştir.

Tez çalışmasında, *D.tenuifolia*'nın yaprağı, *R.lutea* ve *E.campestre* çiçek ve yaprağından elde edilen metanollü özütlerin *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* bakterileri ve bir maya suğu olan *Candida albicans* üzerine olan etkileri incelenmek üzere disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bitki kısımlarından elde edilen metanollü özütler 5 µL ve 20 µL olmak üzere 6mm'lik



disklere emdirilmiştir. Yalnız, 5 µL özüt emdirilen hiç bir bitki örneğinin diskleri çevresinde önemli ölçüde zon gözlemlenememiştir. Sonuçlar incelendiğinde her bir bitki özütü en az bir mikroorganizma suşu üzerinde inhibitör etki göstermiştir (Çizelge 4.3).

*D. tenuifolia* bitki yaprağından elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivite sonuçları çizelge 4.3'te görüldüğü gibi, *B. subtilis* üzerinde 10 mm, *E. coli* üzerinde 13mm, *S.aureus* üzerinde 12 mm zon çapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bir maya suşu olan *C.albicans* üzerinde ise herhangi bir zon çapı oluşturmamıştır. *D. tenuifolia* ile ilgili az antimikrobiyal çalışma olmakla birlikte, Rodriquez vd. 2005 yılında yaptıkları çalışmada *D. tenuifolia* bitkisinin yaprak, gövde ve çiçek kısımlarından GC-MS metodu kullanarak bazı nitril türevlerini izole etmişlerdir. Bitkiden elde edilen nitril türevlerinin çeşitli funguslar üzerinde MIC metodu kullanarak test etmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında, *D. tenuifolia*'nın potansiyel anti-fungal kaynak olarak kullanılacağı tespit edilmiştir.

Aynı zamanda Atta vd. 2011 yılında yapmış oldukları bir çalışmada *Diplotaxis* cinsine ait *Diplotaxis harra* bitkisinin metanollü özütlerinin gram pozitif (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) ve gram negatif bakterilere (*Pseudomonas auregenosa*, *Echerichia coli*, *Enterobacter sp*, *Salmonella typhi*) karşı ılımlı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

*R.lutea* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.3), *R.lutea* çiçek özütü sadece *S.aereus* üzerinde 10 mm zon çapı oluşurken, yaprak özütü *E.coli* üzerinde 10 mm, *P.aeruginosa* ve *S.aereus* üzerinde 13mm zon çapı oluşmuştur. Bitki *C.albicans* üzerinde ise herhangi bir zon çapı oluşturmamıştır. *R. lutea* ile yapılan diğer literatür araştırmalarına bakıldığında, Kumarasamy vd. 2002 yılında yaptıkları çalışmalarında, içlerinde *R. lutea* bitkisinde bulunduğu toplam 21 tane, İskoçya'nın çeşitli yerlerinden topladıkları potansiyel tıbbi bitkilerin, 3 farklı çözücü (n-hekzan, diklorometan ve metanol) ile tohumlarının özütlerini elde ederek, 11 adet patojenik bakteri suşuna karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışmalarında metot olarak MIC testi

kullanmışlardır. Sonuçlar değerlendirildiğinde *R.lutea* bitkisinden elde edilen n-hekzan ve diklorometan özütlerinin herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermezken, metanollü özütlerin özellikle *S.aureus* suşuna karşı yüksek oranda direnç gösterdiği tespit etmişlerdir. (MIC=0.0001 mg/ml).

*E.campestre* bitkisinin çiçek ve yaprak özütlerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde, bitkinin çiçek özütü sadece *B.subtilis* ve *S.aureus* üzerinde zon çapı göstermiştir.. Değerler sırasıyla 7 mm ve 10 mm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Bitkinin yaprak özütü ise *P. aeruginosa* üzerinde ve *S aureus* üzerinde 8 mm 'lik zon çapı oluşmuştur. *E. campestre*'nin çiçek ve yaprak özütleri, *C.albicans* üzerinde herhangi bir zon çapı oluşturmamıştır. *E. campestre* ile ilgili diğer çalışmalarla sonuçlar karşılaştırıldığında Thiem vd. 2010 yılında, içerisinde *E.campestre*'nin de bulunduğu üç adet *Eryngium* türünün antimikrobiyal (antibakteriyal ve antifungal) aktivitelerini içeren çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında bitkilerin etanol ile elde edilmiş yaprak ve kök özütlerinin, 2 tane bakteri suşu (*S.aerus*, *B.subtilis*) ve 3 tane fungus (*C.albicans*,*A.niger*, *T.mentagrophytes*) suşu olmak üzere bu mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini MIC testini kullanarak araştırmışlardır. Sonuçlar incelendiğinde her üç türde bakteri suşlarına sadece *S.aerus* için çok hafif bir antimikrobiyal bir etki gösterirken buna karşın, bu üç türün etanollü yaprak ve kök kısımları funguslara karşı (özellikle *T. mentagrophytes*) yüksek miktarda anti-mikotik etki göstermiştir.

*E.campestre* hakkında literatürde çok az antimikrobiyal aktivite ile ilgili bilgi bulunduğu için yine aynı aileye (Apiceae) ait farklı türdeki *Eryngium* cinsi bitkilerinin antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

Meot-Duros vd. (2008) Apiceae familyasına ait başka bir *Eryngium* türünün (*E.maritimum*) metanollü yaprak özütlerinin, 12 farklı bakteri suşu ve 1 maya suşu üzerinde, antimikrobiyal etkilerini MIC testi kullanarak incelemişler. Sonuçlarında ise *E.maritimum* apolar fraksiyonundan elde edilmiş özütlerin toplam 9 mikroorganizmayı inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

Marcetic vd. (2014) yaptıkları çalışmada 2007 Nisan ayında Doğu Sırbistan bölgesinden topladıkları yine Apiceae familyasına ait olan *Eryngium palmatum* türünün metanol ve kloroform kullanarak elde ettikleri çiçek ve yaprak özütlerini MIC testi kullanarak 8 farklı bakteri suşu ve 1 tane maya suşu üzerinde etkilerine bakmışlardır. Sonuç olarak özellikle metanollü özütlerin yüksek seviyede antimikrobiyal aktivite (3.5-15.6 µg/mL aralığında) gösterdiği tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında antimikrobiyal çalışmaların sonucunda, en düşük aktivite *E. campsetre*'nin çiçeğinden hazırlanan özütte gözlemlenmiştir. *E. campsetre*'nin çiçeğinden elde edilen özüt sadece *B. subtilis* üzerinde 7 mm'lik zon oluşturarak en düşük antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca antimikrobiyal deneylerde kullanılan ve tek maya suşu olan *C. albicans* üzerinde hiç bir bitki özütü herhangi bir etki göstermemiştir. Yani *C. albicans* tüm bitki özütlerine karşı direnç göstermiştir.

Fenolik bileşikler, bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip çok önemli sekonder metabolitlerdir. Çoğunlukla suda çözünür ve aromatik zincir halkasına bağlı bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren, basit fenolik bileşiklerden, yüksek oranda polimerize olmuş çok sayıda fenolik maddeleri içeren geniş bir gruptur (Balasundram vd. 2006).

Tez çalışmasında bitki özütlerinin toplam protein madde miktarı tayini için Lowry yöntemi, toplam fenolik madde miktarını tespit etmek amacıyla Folin-Ciocalteu (FCR) yöntemi, toplam flavonoid madde tayini için ise alüminyum klorür klorometrik yöntemi kullanılmıştır.

*D. tenuifolia* bitkisinin yaprak özütünün toplam protein madde miktarı 21.29 mg/mL, fenolik madde miktarı 144.49 mg/mL, toplam flavonoid madde miktarı ise 250 µg/mL olarak bulunmuştur. *D. tenuifolia* yaprak özütü toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı bakımından diğer bitkilere göre en yüksek içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. *D. tenuifolia* bitkisi ile yapılan diğer çalışmalara bakıldığında Martinez-Sanchez vd. (2008) yaptıkları bir araştırmada, Brassicaceae familyasına ait üç türün (*Nasturtium officinale*, *Diplotaxis tenuifolia* ve *Eruca vesicaria*), yapraklarının toplam

flavonoid, C vitamini içeriklerini ve antioksidan özelliklerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada flavonoid ve C vitamini içerikleri HPLC ile incelenirken, antioksidan aktiviteleri ABTS, DPPH ve FRAP metotları karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, *D.tenuifolia* bitkisinde, kuersetin, kaemferol ve isohamnetin flavonolleri bulunmuş fakat ana flavonol olarak kuersetin tespit edilmiştir. C vitaminleri özellikleri incelenirken askorbik asit (AA) ve dehidroaskorbik asit (DHAA) standart alınarak ölçülmüş ve *D. tenuifolia* diğer 2 bitkinin arasında bir C vitamini içeriği göstermiştir. Çalışmanın sonununda araştırmacılar bitkilerdeki antioksidan özelliğin yapraklardaki flavonoid ve C vitamini içerikleri ile doğru orantılı olduğunu söyleyerek, *D. tenuifolia*'nın iyi bir antioksidan özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada Conforti vd. 2010 yılında İtalya'nın güneyinden topladıkları ve içlerinde *D. tenuifolia* bitkisinde bulunduğu toplam 18 bitkinin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan aktiviteleri ve NO inhibisyon özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmada fenolik madde içerikleri tespit edilirken Folin-Ciocalteu kimyasalı, klorojenik asit ise standart olarak kullanılmıştır. Antioksidan aktivite tayininde DPPH yöntemi kullanılmıştır. Araştırmanın sonuçları değerlendirildiğinde *D.tenuifolia*'nın hidroalkolik yaprak özütlerinin fenolik madde içeriği 29.0 mg/g olarak tespit edilmiş ve diğer bitkiler arasında çok düşük bir değer olarak bulunmuştur. DPPH analiz sonuçlarına bakıldığında *D.tenuifolia*'nın herhangi bir sonuç göstermediği tespit edilmiştir. Çalışmada bitkilerin en iyi antioksidan kapasite özelliklerinin en yüksek polifenol içerikleri ile doğru orantılı bir ilişkide oldukları tespit edilmiş. Bu sonuca göre de *D. tenuifolia*'nın NO inhibisyonunun diğer bitkilere göre çok az olduğu tespit edilmiştir.

Durazzo vd. 2013 yılında yaptıkları çalışmada, *D.tenuifolia* bitkisini iki farklı koşulda yetiştirerek, C vitamini, karetenoid, antioksidan özelliklerini ve insan kolon adenokarsinoma hücrelerine (Caco-2) karşı anti-proliferatif etkisine bakmışlardır. Çalışmada karetenoid içerikleri Shapless ve arkadaşlarının kullandığı metod ile tespit edilirken, C vitamini içeriği HPLC ile tayin edilmiştir. Antioksidan kapasitesini belirlemede ise FRAP yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde *D.tenuifolia* bitkisinin fitokimyasal içerikleri çevresel faktörlere karşı bağımlı olduğu, iyi bir

antioksidan özelliğe sahip olduğu, polifenol özütlerinin apoptotik ve anti-proliferatif etki gösterdiği bulunmuştur.

Bennett vd. (2006) yaptıkları çalışmada, içinde *D.tenuifolia*'nında bulunduğu 4 bitkinin ontogenetik açıdan, glukosinat, flavonoid ve diğer sekonder metabolitlerinin ayrıntılı olarak profillerini araştırmışlar. Çalışmanın sonucunda bu dört bitkinin içerdiği bu bileşiklerin, bitkininin yaşına ve incelendiği kısma göre oldukça farklı sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir.

*R. lutea* bitkisinin çiçek ve yaprak özütlerinin toplam protein madde miktarı sırasıyla 33.74 mg/mL ve 17.74 mg/mL, fenolik madde miktarı sırasıyla 109.01 mg/mL ve 133.52 mg/mL, toplam flavonoid madde miktarı ise sırasıyla 78.72 µg/mL ve 196.81 µg/mL olarak bulunmuştur.*R. lutea* çiçek özütünde tespit edilen toplam protein miktarı, tez çalışmasında incelenen diğer bitki ve kısımlarına göre en yüksek orana sahip olduğu tespit edilmiştir.Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında, Tawaha vd. (2007) yaptıkları bir çalışmada içerisinde *R.lutea* bitkisinde olduğu çeşitli bitkilerin kısımlarını toz haline getirerek sulu ve metanollü özütler elde etmişlerdir. Çalışmalarında bitkilerin toplam antioksidan aktivitelerini, ABTS metodu ile belirlerken, toplam fenolik madde içeriklerini Folin-Ciocalteu kolorimetrik metodu (standart olarak gallik asit kullanılmıştır) ile tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarında *R.lutea* bitkisinin toplam antioksidan aktivitesi sulu ve metanöllü özütleri sırasıyla 70.8 ve 116.0 µmol TEµ/g bulunurken, toplam fenolik madde içeriği sulu ve metanöllü özütlerin sırasıyla 17.7 ve 15.1 mg GAE/g olarak bulunmuştur.

Literatür taramalarında, *R. lutea* bitkisi ile ilgili toplam protein, fenolik ve flavonoid madde içeriği ile ilgili kısıtlı bilgi olduğundan dolayı, *R. lutea* bitkisi ile yapılan diğer biyokimyasal ve moleküler çalışmaları araştırılmıştır.

Bedoya vd. 2000 yılında yaptıkları çalışmada içerisinde *R.lutea* bitkisinde bulunduğu 15 tıbbi bitkinin etanol ve sulu çözeltileri ile hazırladıkları özütlerin anti-HIV aktivitelerine bakmışlardır. Özellikler *R.lutea* bitkisinin sulu çözeltisinin güçlü anti-HIV özellikte olduğu tespit edilmiştir.

Radulovic vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada *R. lutea* bitkisinin kök, çiçek ve meyve kısımlarının insan A375 melanoma ve MRC5 fibroblast kanser hücrelerinin üzerindeki sitotoksik etkilerine bakmışlardır. Özellikle *R. lutea* kök ve çiçek kısımlarının güçlü sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

*E. campestre* bitkisinin çiçek ve yaprak özütlerinin toplam protein madde miktarı sırasıyla 15.95 mg/mL ve 13.93 mg/mL, fenolik madde miktarı sırasıyla 109.62 mg/mL ve 116.69 mg/mL, toplam flavonoid madde miktarı ise sırasıyla 110.59 µg/mL ve 108.37 µg/mL olarak bulunmuştur. *E. campestre* ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında Suciü ve Parvu (2012) çalışmalarında 3 farklı *eryngium* türünden (*E. planum*, *E. campestre*, *E. maritimum*) elde ettikleri %70'lik etanollü özütlerin farelerde akut inflamasyon da nasıl rol aldıklarını karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Fareler öncelikle 3 gruba ayrılmış ve bu üç gruba üç farklı *eryngium* türü intraperitonel yolla verilmiştir. Bunun öncesinde farelere inflamasyonu artırıcı 'turpentine oil' bileşiği yine aynı yolla enjekte edilmiş. Sonuçlar değerlendirildiğinde farelerin kan değerlerinde, serum nitrit-nitrat, toplam oksidatif durum (TOS), toplam antioksidan aktivite (TAR), oksidatif stres indeksi (OSI) ve toplam lökosit sayı değerlerine bakılmıştır. Tüm bitki özütleri önemli derecede oksidatif stresi azalttığı ve etkili bir anti-inflamatuar ajan oldukları yapılan çalışmada gösterilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan bitkilerin, toplam protein, fenolik ve flavonoid madde içeriklerinin sonuçları karşılaştırıldığında en yüksek protein miktar içeriği 33.74 mg/mL ile *R. lutea* bitki çiçeğinde tespit edilmişken en düşük protein miktarı ise 13.93 mg/mL ile *E. campestre* yaprak özütünde tespit edilmiştir. En yüksek fenolik madde içeriği ise 144.49 mg/mL ile *D. tenuifolia* yaprak özütünde tespit edilirken en düşük fenolik madde içeriği *R. lutea* çiçek özütünde ve 109.01 mg/mL olarak bulunmuştur. En yüksek toplam flavonoid madde miktarı 250.485 µg/mL ile *D. tenuifolia* yaprağında gözlemlenirken, en düşük toplam flavonoid miktarı ise 78.724 µg/mL ile *R. lutea* yaprak özütünde bulunmuştur.

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, insan vücudunda hücre metabolizması sırasında, yan ürünler gibi sürekli olarak üretilirler. Bu zararlı yan ürünler eğer hızlı bir

şeklide ortamdan uzaklaştırılması ise DNA, proteinler ve lipitler gibi fonksiyonel makromoleküllerde oksidatif hasara neden olurlar (Apel ve Hirt 2004). ROT'ların zararlı etkilerine karşı kendilerini korumak için, tüm hücre kompartanlarında ve ayrıca ekstraselüler kısımda fazla olan ROT'lara karşı, aerobik organizmalar çeşitli savunma ve korunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Jakobisiak vd. 2003). Normal fizyolojik şartlarda oluşan hücre içi ROT'ların detoksifikasyonu antioksidan savunma sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu sistem bilindiği gibi GST, GPx ve KAT gibi antioksidan enzimleri kapsamaktadır. Hücresel ROT düzeyindeki artışın hücre döngüsünü yavaşlatması sebebiyle kanser kemoterapötiklerinin etkinliklerini düşürdüğü, kaspaz aktivitesinin inhibisyonunu yaparak ve ölüm reseptörlerini inaktifleştirerek terapötik aracılıklı apoptozu engellediği ve bunun sonucunda bazı kemoterapötiklerin etkinliğini düşürdüğü gösterilmektedir (Conklin 2004). Yine yapılan diğer araştırmalarda antioksidan savunma sistemlerinde yer alan enzimlerin aşırı ekspresyonu, tümör hücrelerinde çoklu ilaç direncine neden olduğu belirtilmiştir (Salinas ve Wong 1999, Zanden vd. 2003). Bundan dolayı kemoterapötik etki mekanizması göz önüne alınarak, ROT detoksifikasyon mekanizmasının kontrolünün ve bu enzimlerin aktivitesini inhibitörler aracılığı ile modüle etmek ilaç ve dolayısıyla tedavi etkinliğini arttıracakları düşünülmektedir.

*D. tenuifolia*, *R. lutea* ve *E.campestre* bitkilerinden elde edilen özütlerin daha önce antioksidan sistemlerde yer alan antioksidan enzimler üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bitki özütlerinin GST, GPx ve KAT enzim aktiviteleri üzerine etkileri ilk defa bu tez çalışmasında yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen metanollü özütlerin glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GP<sub>x</sub>), katalaz (KAT), gibi antioksidan savunma sistemlerinde yer alan enzimlerin aktivitelerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla bitki özütlerinin konsantrasyonları bitkilerin toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş olup % inhibisyon grafikleri oluşturularak değerlendirilmiştir. İnhibisyon gösteren bitki örnekleri özütlerinin % inhibisyon yapan konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>), bu standardize değerler üzerinden µg/mL olarak hesaplanmıştır. Toplam fenolik bileşik miktarına göre konsantrasyonları en

yüksek (23.81 µg/mL) ve en düşük (0.186 µg/mL) olarak standardize edilmiş, bitki özütleri 1/2 oranında 8 doza seyreltilmişti.

GST enzim deneyi çalışmasında, bitkilerin farklı kısımlarından elde edilmiş özütlerin, GST enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Habig vd. (1974) tarafından geliştirilmiş metot, modifiye edilmiş ve mikropilaka uygulamaları için minyatürize edilmiştir. Başlangıçta, toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş konsantrasyonlar 7 dozda (0.372-23.81 µg/mL) hazırlanmıştır. Mikropilaka düzeyinde uygulamak amacıyla ilk olarak, bitki özütleri olmadan sığır karaciğerinden kısmen izole edilen GST enzimi, içerdiği protein miktarına göre 4.069, 5.94, 1.252 ve 0.782 mg/mL olmak üzere enzim kalibrasyonu yapılmıştır. Her protein konsantrasyon için ayrı ayrı grafik eğrileri çizilmiştir. Çizilen grafik sonuçlarına göre en iyi enzim aktivitesi grafik eğrisi 0.782 mg/mL konsantrasyonuna ait olduğu için tüm GST deneyi boyunca kullanılan sitozol miktarı 0.782 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, bu değer için ölçülen enzim aktivitesi 1.721 µmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Budeğer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GST enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değer ile kıyaslanarak belirlenmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan bitkilerin GST enzim deneyi sonuçları değerlendirildiğinde *D. tenuifolia* bitkisinin yaprak özütü en yüksek dozda en fazla %28 inhibisyon yaptığı görülmektedir, IC<sub>50</sub> değeri ise 1.210µg/mL bulunmuştur. *R.lutea* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen özütten yüksek dozda sırasıyla %64 ve %30 GST enzimi üzerine inhibitör etki gösterdikleri bulunmuştur. Ayrıca IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.149µg/mL ve 0.403µg/mL olarak bulunmuştur. *E.campestre*'nin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen özütte sırasıyla % 50 ve % 30 oranında GST enzim inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur, IC<sub>50</sub> değerleri ise sırasıyla 0.36 µg/mL ve 1.22 µg/mL'dir.

GST enzim deneyi sonuçları, tez çalışmasında kullanılan bitkilerin kendi aralarında karşılaştırıldığında *R. lutea* ve *E. campestre* bitkilerinin çiçek özütleri sırasıyla % 64 ve % 50 inhibisyon oranı ile iyi birer GST enzim inhibitörü olduğunu göstermektedir. Tez



çalışmasında en az inhibisyon, 1.210 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile *D.tenuifolia*'nın yaprağından elde edilen özütte gözükmiştir.

Çalışmada bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen özütlerin glutatyon peroksidaz (GP<sub>x</sub>) enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla Plaben vd. (1982) geliştirmiş olduğu metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, ilk olarak enzim kalibrasyonu yapmak için sığır karaciğer dokusundan kısmen saflaştırılan GP<sub>x</sub> enzimi, içerdiği protein miktarına göre 5 dozda (0.464, 0.928, 1.856, 3.713 ve 7.426 mg/mL) kullanılmıştır. Her protein konsantrasyonu için ayrı ayrı grafikler çizilmiştir. Bu değer için ölçülen enzim aktivitesi 0.045 mmol/min/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve bitki özütlerinin GP<sub>x</sub> enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değer ile kıyaslanarak belirlenmiştir.

Bitki özütlerinin GP<sub>x</sub> enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla deneyde toplam fenolik madde miktarına göre standardize edilmiş konsantrasyonlardan 5 doz (23.81- 1.48 µg/mL) kullanılmıştır. GP<sub>x</sub> enzim aktivite tayini, glutatyon redüktaz (GR) içeren indirek ölçüm metoduyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada GP<sub>x</sub> enziminin substratları olarak tanınan hidrojen peroksit, kumil hidroperoksit ve tert-butil hidroperoksit maddelerinin GP<sub>x</sub> enzim aktivitesi üzerinde olan etkileri araştırılmıştır. Kullanılan her substrat için ayrı ayrı GP<sub>x</sub> enzim aktivite hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, GP<sub>x</sub> deneyinde kullanılmak üzere en iyi substratın kumil hidroperoksit olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen doz-cevap eğrilerinin sonuçları değerlendirildiğinde, *D.tenuifolia* bitki yaprağından elde edilen özüt 0.14 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile % 18 oranında GPx enzim inhibisyonu yaptığı gözükmektedir. *R. lutea* bitkisinin çiçek özütünde en yüksek dozda en fazla % 16 inhibisyon yaptığı gözlemlenmiştir, IC<sub>50</sub> değeri ise 0.49 µg/mL 'dir. *R.lutea* bitkisinin yaprak özütünde herhangi bir GPx enzim inhibisyonu gözükmemiştir. *E. campestre* bitkisinin çiçek ve yaprak özütlerinin sonuçlarına bakıldığında en yüksek dozda en fazla sırasıyla % 15 ve % 13 GPx enzim inhibisyonu yaptığı bulunmuştur. IC<sub>50</sub> değerleri ise sırasıyla 2.31 µg/mL ve 0.11 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan bitkilerin GPx enzim deneyi sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında en yüksek GPx inhibisyonu *D. tenuifolia* yaprak özütünün 0.14 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri % 18 inhibisyon yaptığı, en düşük GPx inhibisyonu ise *E.campestre* yaprak özütünün 0.11 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile % 13 inhibisyon yaptığı gözlenmektedir. *R.lutea* bitki yaprak özütünde ise GPx enzimi üzerine herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir.

Bitki özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla Aebi (1997) tarafından geliştirilmiş metot modifiye edilmiş ve mikropilaya uygulamaları için minyatürize edilmiştir. Çalışmada sığır karaciğerinden elde edilen sitozolün katalaz enzimi içermediği araştırma sonucunda bulunduktan sonra tüm deneylerde ticari olarak temin edilen saf katalaz kullanılmıştır. Çalışmanın devamında bitki özütlerinin katalaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için, toplam fenolik madde miktarına göre bitki özütlerinin en yüksek dozu *D.tenuifolia* ve *R.lutea* yaprak özütleri için 11.90 µg/mL iken *R.lutea* çiçek özütü için en yüksek doz 5.95 µg/mL'dir. En düşük doz hepsinde aynı olmak üzere 0.186 µg/mL stok solüsyonları 1:2 oranında DMSO ile seri seyreltmeyle hazırlanmıştır Daha sonra substrat olarak kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molekülünün kalibrasyonu yapılmıştır. Ticari olarak temin edilen saf katalaz enzimi kromojen olarak kullanılan 4.AP ve DHBS konsantrasyonları ile kalibre edilmiştir

Katalaz enzimi çalışmasında, öncelikle bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen özütlerin ön taraması yapılarak hangi özütleri kullanacağımız tespit edilmiştir. Bu tarama sonucunda, *D.tenuifolia* bitki yaprak özütü, *R.lutea* bitki çiçek ve yaprak kısmı katalaz enzim çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir. Doz-cevap eğrilerine göre sonuçlar değerlendirildiğinde *D.tenuifolia* bitkisi yaprak özütü KAT enzimi üzerinde yaklaşık % 10 inhibisyon etki yaptığı saptanmıştır. *R.lutea* bitkisinin çiçek ve yaprak özütü ise sırasıyla % 13 ve % 11 inhibisyon gösterdiği kaydedilmiştir.

Sonuç olarak bitki florası bakımından zengin olan ülkemizde, ayrıca birçoğu endemik olan bu bitkilerin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması ileride birçok alanda büyük önem taşımaktadır. Kanseri gibi proliferatif hastalıklarda kullanılan kemoterapötiklerin etkinliklerini arttırmak ve tümör hücrelerinde yukarıda bahsedilen

nedenlerden dolayı oluşan çoklu direnci engellemek için bitkiler gibi doğal kaynaklara dayalı bileşiklerin tespit edilmesi gerekmektedir. Sonraki çalışmalarda bitki özütlerinin hedef fraksiyon çalışmaları yapıp hangi molekülün daha etkin olabileceği araştırılabilir.

## KAYNAKLAR

- Aebi, H. 1984. "Catalase *in vitro*." Methods Enzymology 105; 121-6.
- Anonim. 2014. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. Web Sitesi: [www.turkherb.ibu.edu.tr](http://www.turkherb.ibu.edu.tr). Erişim Tarihi: 24.05.2014.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol, 55; 373–399.
- Asami, D., Hong, Y., Barrett, D. and Mitchell, A. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(5); 1237–1241.
- Avcı, M. 2005. ‘Türkiye bitki örtüsünün çeşitlilik ve endemizm açısından bir değerlendirilmesi’. Ulusal Coğrafya Kongresi. Bildiri Kitabı (Ed. S. Avcı ve H. Turoğlu), 73-85.
- Atta, E.M., Hashem, A.I., Ahmed, A.M., Elqosy, S.M., Jaspars, M. and El-Sharkaw, E.R. 2011. Phytochemical studies on *Diploaxis harra* growing in Sinai. European Journal of Chemistry, 4; 535-538.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. Food Chemistry, 99; 191-203.
- Baidez, A.G., Gomez, P., Del Rio, J.A. and Ortuno, A. 2007. Dysfunctionality of the xylem in *Olea europaea* L. plants associated with the infection process by *Verticillium dahliae* Kleb. Role of phenolic compounds in plant defense mechanism. J Agric Food Chem, 55; 3373–3377.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C. F. R., Carvalho, A. M. and Santos-Buelga, C. 2011. Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. Food Chemistry, 127; 169–173.
- Beara, I.N., Lesjak, M.M. and Orcic, D.Z. 2012. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L. LWT—Food Science and Technology, 47; 64–70.
- Bedoya, L.M., Sanchez-Palomino, S., Abad, M.J., Permejo, P. and Alcami, J. 2001. Anti-HIV activity of medicinal plants extracts. Journal of ethnopharmacology, 77; 113-116.

- Bennett, R.N., Mellon, F.A. and Kroon, P. 2004. Screening crucifer seeds as sources of specific intact glucosinolates using ion-pair high-performance liquid chromatography negative ion electrospray mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, 52; 428–438.
- Bennett, R.N., Rosa, E.A.S., Mellon, F.A. and Kroon, P.A. 2008. Ontogenic Profiling of Glucosinolates, Flavonoids, and Other Secondary Metabolites in *Eruca sativa* (Salad Rocket), *Diplotaxis erucoides* (Wall Rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (Wild Rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish Rocket). *J. Agric. Food Chem*, 54; 4005-4015.
- Blumberg, D.L.M. 2006. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Peppermint Tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res*, 20;619-633.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74; 2157–2184.
- Cemeli, E., Baumgartner, A. and Anderson, D. 2009. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res*, 681; 51–67.
- Conforti, F., Marrelli, M., Carmela, C., Menichini, F., Valentina, P., Uzunov, D., Statti, G.A., Duez, P. and Menichini, F. 2011. Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), in vitro inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food Chemistry*, 129; 1413–1419.
- Conklin, K.A. 2004. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*, 3(4); 294-300.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17;1195–214.
- Coruh, N., Sagdicoglu Celep, A.G., Ozgokce, F. and Iscan, M. 2007. Antioxidant capacities of *Gundelia tournefortii* L. extracts and inhibition on glutathione-S-transferase activity. *Food chemistry*, 100; 1249-1253
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 10; 564-582.
- Çıkrıkçı, S. 2005. 4'-dioktilamino-3-hidroksiflavon temelli floresans problemlerinin sentezleri ve özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Davis, P.H. 1972. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. 4. University Press, Edinburgh, pp. 292–304.
- Davis, P.H. 1979. *Flora of Turkey and the Aegean Islands*. Vol. 1, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, UK.

- Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K. 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement), 10. University Press, Edinburgh, pp. 145.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. and Rodriguez, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Rad. Biol. Med.* 32; 1102–1115.
- Doğan, Y. 2001. A Study on the Autecology of *Reseda lutea* L. (Resedaceae) Distributed in Western Anatolia. *Turk J Bot*, 25; 137-148.
- Duraipandiyan, V., Ayyanar, M., Ignacimuthu, S. 2006. Antimicrobial Activity of Some Etnomedicinal Plants Used by Paliyar Tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(35);68-82.
- Durazzo, A., Azzini, E., Lazze, M.A., Raguzzini, A., Pizzala, R. and Maiani, G. 2013. Italian Wild Rocket [*Diplotaxis Tenuifolia* (L.) DC.]: Influence of Agricultural Practices on Antioxidant Molecules and on Cytotoxicity and Antiproliferative Effects. *Agriculture* , 3; 285-298.
- Erik, S. and Tarıkahya, B. 2004. ‘ Türkiye Florası Üzerine’, *Kebikeç*, 17; 139-163.
- Errichi, B.M., Belcaro, G., Hosoi, G., Cesarone, M.R. Dugall, M. and Feragalli, B. 2011. Prevention of post thrombotic syndrome with Pycnogenol in a twelve month study, *Panvinerma Med*, 53; 21-27.
- Erulund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res*, 24; 851–874.
- Ertürk, Ö. ve Demirbağ, Z. 2003. *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. *Çevre Koruma*, 12 (47); 27-31.
- Ertürk, Ö., Katı, H., Yaylı, N. and Demirbağ, Z. 2006. Antimicrobial properties of *Silene multifida* (Adams) Rohrb plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 30; 17-21.
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C. and Noe, J. P. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant. Physiol. Biochem*, 46;356–370.
- Forsberg, L., de Faire, U. and Morgernstern, R. 2001. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys*, 389; 84–93.
- Fresco, P., Borges, F., Diniz, C. and Marques, M.P.M. 2006. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev*, 26;747–766.
- Fukumoto, L.R. and Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48; 3597-3604.

- Garzon, G. A., Narváez, C. E., Riedl, K. M. and Schwartz, S. J. 2010. Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Food Chemistry*, 122, 980–986.
- Goyal, M.M. and Basak, A. 2010. Human catalase: looking for complete identity. *Protein cell*, 1(10); 888-897.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Baser, K.H.C. 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 11. Edinburgh University Press, Edinburgh, 136–138.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. 1974. Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22–25); 7130-7139.
- Halliwell, B. And Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. (4th ed.). New York: Oxford University Press.
- Han, X.Z., Shen, T. and Lou, H.X. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci*, 8;950–988.
- Harborne, J.B. and Williams, C.A. 2000. “Advances in Flavonoid Research”, *Phytochemistry*, 55; 481-504.
- Havsteen, B.H. 2002. The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, 96; 167–202.
- Herr, I. and Büchler, M. W. 2010. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Review*, **36**; 377-383.
- Inoue, M., Sato, E.F. and Nishikawa, M. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*, 10; 2495-505.
- Jakobisiak, M. and Lasek, W.G. 2003. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett*, 90; 103–22.
- Janos, Z. and Krishnamurti, D. 2005. *Oxidative Stress and Disease 10: Nutrients and cell signaling*. Taylor & Francis; Önsöz.
- Karihtala, P. and Soin, Y. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Journal Compilation*, 115; 81-103.

- Kızıllı, S. and Kayabaşı, N. 2005. muhabbet çiçeğinin (*reseda lutea* L.) boyama özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir çalışma. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18(2); 195-200.
- Kirby, J.C., Bauer, A.W., Sherris, W.M.M. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Journal of Clinical Pathology. 36; 493-496.
- Korkina, L.G., De Luca, C., Kostyuk, V.A. and Pastore, S. 2009. Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. Curr. Med. Chem, 16; 3943–3965.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L. and Sarker, S.D. 2002. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. Journal of ethnopharmacology, 83; 73-77.
- Landis, G.N. and Tower, J. 2005. Superoxide dismutase evolution and life span regulation, Mech. Ageing Dev, 126; 365–379.
- Liu, R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action, J. Nutr. 134; 3479S–3485.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193; 265-275.
- Marcetic, M.D., Petrovic, S.D., Milenkovic, M.T and Niketic, M.S. 2014. Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of *Eryngium palmatum* Pancic and Vis. (Asteraceae). Cent. Eur. J. Biol, 9(2); 149-155.
- Marinova, E.M. and Yanishlieva, N.V. 2003. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. Food Chemistry, 81; 1019-26.
- Marnett, L.J. 2000. Oxyradicals and DNA damage, Carcinogenesis 21; 361-370.
- Martinez-Sanchez, A., Marin, A., Llorach, R., Ferreres, F. and Gil, M.I. 2006. Controlled atmosphere preserve quality and antioxidant constituents in wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia* L.). Postharvest Biol. Technol, 40; 26–33.
- Martinez-Sanchez, A., Gil-izquierdo, A., Gil, M.I. and Ferreres, F. 2008. A Comparative Study of Flavonoid Compounds, Vitamin C, and Antioxidant Properties of Baby Leaf *Brassicaceae* Species. J. Agric. Food Chem. 56; 2330–2340.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. Clinical Biochemistry, 8; 595–603.



- Meot-Duros, L., Le Floch, G. and Magne, C. 2007. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology* 116 ; 258–262.
- Moghaddam, S.N. 2014. Ankara'nın etrafından toplanan bitkilerin antioksidan ve antikanser değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Naczki, M. and Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolic compounds in food. *Journal of Chromatography A*, 1054; 95–111.
- Nebija, F., Stefkov, G., Karapandzova, M, Stafilov, T., Panavska, T.K. and Kulevanova, S. 2009. Chemical characterization and antioxidant activity of *Eryngium campestre* L., Apiaceae from Kosovo. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 55; 22-32.
- Nordberg, J. and Arner, E.S. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, 31; 1287– 1312.
- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R. and Spiegelhalder B. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer*, 36;1235–1247.
- Pellegrini, N., Miglio, C. and Del Rio, D. 2009. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *Int J Food Sci*, 60; 12–22
- Pereira, O. R., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M. and Cardoso, S. M. 2012 Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*. *Food Chemistry*, 131; 652–659.
- Peyrat-Maillard, M. N., Bonnely, S. and Berset, C. 2000. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51; 709-716.
- Pignatelli, P., Pulcinelli, F.M. and Celestini, A. 2000. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr*, 72; 1150–1155.
- Pleban, P.A., Munyan, A. and Beachum, J. 1982. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem*, 28; 311-316.
- Praveen, K.R. and Awang, B. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*, 2 (1); 70-80.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. and Chiarpotto, E. 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem*, 11; 1163–1182.

- Rakh, M.S. and Chaudhari, S.R. 2010. Evaluation of antiallergic activity of various extracts of *Momordica dioica* Roxb. Willd fruit pulp. *J of Pharm Res*, 3 (9); 2161-2162.
- Ramos, S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res*, 52; 507–526.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K. and Ravi Kumar, R.N.M. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113; 189–207.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10); 2866–2887.
- Rodriguez, S.A., Vela Gurovic, M.S., Mulet, M.C. and Murray, A.P. 2006. *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., a source of a potentially antifungal essential oil containing nitrile. *Biochemical Systematics and Ecology* 34; 353-355.
- Rodulovic, N.S., Zlatkovic, D.B., Ilc-Tomic, T., Senerovic, L. and Nikodinovic-Runic, J. 2013. Cytotoxic effect of *Reseda lutea* L.: A case of forgotten remedy. *Journal of ethnopharmacology*.
- Saldamlı, İ. 2007. *Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları*. Ankara, 463-492.
- Salinas, A.E. and Wong, M.G. 1999. Glutathione S-transferases review. *Curr. Med. Chem*, 6; 279- 309.
- Samy, R.P., Gopalakrishnakone, P. and Ignacimuthu, S. 2006. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7, 12-dimethylbenz(a) anthracene-induced mammary tumors in rats. *Chem Biol Interact*, 164; 1-14.
- Saunders, C. 2009. The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells. *Bioscience horizons*, Volume 2, Number 2.
- Seifried, H.E., Anderson, D.E., Fischer, E.I. and Milner, J.A. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18; 567–579.
- Sengupta, A., Ghosh, S. and Das, S. 2004. Modulatory influence of garlic and tomato on cyclooxygenase-2 activity, cell proliferation and apoptosis during azoxymethane induced colon carcinogenesis in rat. *Cancer Lett*, 208; 127–136.
- Silici, S. and Koc, A.N. 2006. Comparative study of *in vitro* methods to analyse the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *Letters in Applied Microbiology*, 43; 318-324.

- Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28; 49-55.
- Spencer, J.P., Kuhnle, G.G. and Hajirezaei, M. 2005. The genotypic variation of the antioxidant potential of different tomato varieties. *Free Radic Res*, 39; 1005–1016.
- Sroka, Z. and Cisowski, W. 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41; 753–758.
- Suciu, S. and Parvu, A.E. 2012. Comparative study on the effects of *eryngium sp.* extracts in an acute inflammation model in rat. *Annals of RSCB*, Vol. XVII, Issue 2.
- Switala, J. and Loewen, P.C. 2002. Diversity of Properties Among Catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2); 145-154.
- Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, B.A. G. and Mathe, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56; 200-207.
- Tas, F., Hansel, H., Belce, A., Ilvan, S., Argon, A. and Camlica, H. 2005. Oxidative stress in breast cancer. *Med Oncol*, 22;11–5.
- Tawaha, K., Alali, F.Q, Gharaibeh, M., Mohammad, M. and El-Elimat, T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104; 1372-1378.
- Thiem, B., Goslinska, O., Kikowska, M. and Budzianowski, J. 2010. Antimicrobial activity of three *Eryngium* L. species (Apiaceae). *Kerva polinica*, Volume 56, No 4.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. and Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem*, 266; 37–56.
- Valko, M., Rhode, C.J., Moncol, J., Izokovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160; 1–40.
- Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J. and Dietrich, H. 2006. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. *MolCarcinogen*, 4; 164–174.

- Veskoukis, A.S., Tsatsakis, A.M. and Kouretas, D. 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell stress chaperon*, 17; 11-21.
- Weiss, R.F. and Fintelmann, V. 2000. *Herbal Medicine, Spasmodic Cough and Whooping Cough*. Ind Ed. Edited by Stuttgart-New York Thieme, pp. 365.
- Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nut*, 44; 275–295.
- Williams, C.A. and Grayer, R. J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep*, 21:539–573.
- Woisky, R. and Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res*, 37; 99-105.
- Xie, J., Zhang, Y., Kong, D. and Rexit, M. 2011. Rapid identification and determination 11 polyphenols in *Herba lycopi* by HPLC–MS/MS with multiple reactions monitoring mode (MRM). *Journal of Food Composition and Analysis*, 24; 1069–1072.
- Yang, R. and Tsao, R. 2003. Optimization of a new mobile to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a tool phenolic index using high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1018; 29-40.
- Yeh, C.C., Hou, M.F., Tsai, S.M., Lin, S.K., Hsiao, J.K. and Huang, J.C. 2005. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with ovarian cancer. *Clin Chim Acta*, 381(1-2); 104-111.
- Yen, G. C. and J. Y. Wu. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem*, 65; 375-379.
- Yoon, J. H. and Baek, S. J. 2005 Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J*, 46 (5); 585.
- Zanden, J.J., Hamman, O.B., Iersel, M.L.P.S., Boeresn, S., Cnubben, N.H.P., Bello, M., Vervoort, J., Bladeren, P.J. and Rietjens, I.M.C.M . 2003. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chemico-Biological Interactions*, 145; 139- 148.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Gülşah Merve GÜNEŞ

Doğum Tarihi : 23.10.1986

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Fatoş Abla Lisesi (2004).

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2010).

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı  
(Şubat 2011-Kasım 2014).

### Hakemli Dergiler

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