

T.C.

KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ASTRAGALUS TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN VE
ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ, SAĞLIKLI VE
KANSERLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE ANTİKANSER VE
ANTİPROLİFERATİF KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEREN TANRIÖVER

Danışman: Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

EYLÜL, 2019

KİLİS

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU danışmanlığında, Ceren TANRIÖVER tarafından hazırlanan “**Bazı *Astragalus* Türlerinin Fitokimyasal İçeriklerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, Sağlıklı ve Kanserli Hücre Hatları Üzerinde Antikanser ve Antiproliferatif Kapasitelerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması 12 / 09 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

| Jüri Üyeleri | Unvanı, Adı Soyadı (Kurumu) | İmza |
|---------------------|--|-------------|
| Başkan | Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU (Kilis 7 Aralık Üniversitesi) | |
| Üye | Doç. Dr. Muhittin DOĞAN (Gaziantep Üniversitesi) | |
| Üye | Dr. Öğr. Üyesi Sevgi GEZİCİ (Kilis 7 Aralık Üniversitesi) | |

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2019 tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No:

Dr. Öğr. Üyesi Hülya DEDE

Enstitü Müdür V.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI ASTRAGALUS TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN VE ANTIOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ, SAĞLIKLI VE KANSERLİ HÜCRE HATLARI ÜZERİNDE ANTİKANSER VE ANTİPROLİFERATİF KAPASİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceren TANRIÖVER

Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU

Yıl: 2019, Sayfa: 58

Astragalus cinsine ait türler; halk arasında immün sistemi güçlendirici, bağışıklık artırıcı ve mikrobiyal enfeksiyonlara karşı vücudun savunma sistemine destek olan bitkiler olarak bilinmektedir. *Astragalus* cinsine ait *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD (Yazı yoncası) ve *A. neurocarpus* BOISS (Çizik geven) türleri ile ilgili yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda; herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmamış olup; belirlenmiş olan türlerin fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi ve sahip oldukları biyolojik aktivitelerinin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, bitki türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından özütler elde edilmiştir. Bitki özütlerinin, toplam fenolik ve flavonoit içerikleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Antioksidan kapasiteleri, DPPH serbest radikal giderim kapasitesine göre analiz edilmiştir. Özütlerin potansiyel antikanser ve antiproliferatif aktiviteleri ise, A549, H1299, C6 kanser hücreleri ve HUVEC kontrol hücrelerine karşı; MTT ve tripan mavisi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. MTT ve tripan mavisi deneylerinin bir sonucu olarak, test edilen insan akciğer ve beyin karsinomu hücrelerinde doza bağlı antikanser ve antiproliferatif etkiler gözlenmiştir. Artan özüt konsantrasyonunun, kanser hücrelerinin büyüme oranını düşürmesine yol açmasının yanı sıra; test edilen insan kanser hücrelerinde apoptoz gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar; bitki köklerinin, kanser hücrelerinde hücre büyümesini konsantrasyon ve zamana bağlı olarak önleyebildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Astragalus* spp., antikanser, antiproliferatif, antioksidan, polifenolik, sitotoksikite, hücre çoğalması

Bu tez çalışması, finansal olarak Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Proje Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1859LTP1).

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF PHYTOCHEMICAL CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES, INVESTIGATION OF ANTI-CANCER AND ANTIPROLIFERATIVE CAPACITIES ON HEALTHY AND CANCER CELL LINES OF SOME ASTRAGALUS SPECIES

Ceren TANRIÖVER

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Molecular Biology
and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU

Year: 2019, Page: 58

Species belonging to genus *Astragalus* are known as plants that strengthen the immune system, boost immunity and support the body's defense system against microbial infections among the people. In the light of literature survey conducted with *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD (yazı yoncası) and *A. neurocarpus* BOISS (Çizik geven), belonging to genus *Astragalus*, no biological activity study was found, so it is aimed to determine the phytochemical contents of the identified species and analyze their biological activities in a comprehensive manner. For this purpose, extracts were obtained from root and above ground parts of the plant species. Total phenolic and flavonoid contents of plant extracts were determined spectrophotometrically. Antioxidant capacities of the extracts were analyzed according to DPPH free radical scavenging method. Potential anticancer and antiproliferative activities of the extracts were investigated using MTT and trypan blue methods against A549, H1299, C6 cancer cells and HUVEC control cells. As a result of MTT and trypan blue, dose-dependent anticancer and antiproliferative effects were observed in the tested human lung and brain carcinoma cells. In addition to increasing concentration of the extract leads to decrease the growth rate of cancer cells; apoptosis was observed in the tested human cancer cells. The results obtained from this study showed that the plant roots are able to inhibit cell growth in cancer cells depending on concentration and time.

Keywords: *Astragalus* spp., anticancer, antiproliferative, antioxidant, polyphenolic, cytotoxicity, cell proliferation

This study was financially supported by Scientific Research Project Unit of Kilis 7 Aralık University, Kilis-Turkey (Project code no: 1859LTP1).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen, bana karşı her zaman ilgili alakalı hoşgörölü ve sabırlı yaklaşan, çok değerli ve kıymetli danışman hocam Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Ziraat Faköltesi Dekanı, Sayın **Prof. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU'na**,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü desteği veren ve bu tezin her aşamasında çok büyük emeği olan Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Moleköler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi çok değerli hocam, Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Sevgi GEZİCİ'ye**,

Arazi çalışmalarımnda ve eğitimim süresince benden desteğini esirgemeyen Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü öğretim elemanı Sayın **Araş. Gör. Fatih YAYLA'ya**,

Laboratuvar çalışmalarımnda benden yardımını esirgemeyen Biyolog **Didem KOÇUM'a**,

Tez çalışmalarımın yürütölmesinde teknik olarak alt yapı desteği sağlayan Kilis 7 Aralık Üniversitesi, İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İTAMER), Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Laboratuvarı ile Genetik Araştırma Laboratuvarlarına,

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne,

Sabırlarımndan, anlayışımndan ve her zaman desteklerimnden dolayı **Sevgili Aileme**,

Sonsuz teşekkür ederim.

Ceren TANRIÖVER

Eylöl, 2019

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | iv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| FOTOĞRAFLAR DİZİNİ..... | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. MATERYAL VE METOD..... | 16 |
| 2.1. MATERYAL..... | 16 |
| 2.1.1. Bitki materyali..... | 16 |
| 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar..... | 19 |
| 2.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar..... | 19 |
| 2.2. METOT..... | 21 |
| 2.2.1 Bitki Örneklerinden Özütlelerin Hazırlanması..... | 21 |
| 2.2.2 Örneklerin Analizler İçin Hazırlanması..... | 22 |
| 2.2.3 Bitki Özütlelerinin Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi..... | 22 |
| 2.2.4 Bitki Özütlelerinin Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi..... | 23 |
| 2.2.5 Bitki Özütlelerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 24 |
| 2.2.6.Bitki Özütlelerinin Antikanser ve Antiproliferatif Aktivitelerinin Belirlenmesi | |
| | 26 |
| 2.2.6.1 Hücre Hatlarının Elde Edilmesi..... | 26 |
| 2.2.6.2 Hücre Besiyerlerinin Hazırlanması..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 2.2.6.3. Hücre Hatlarını Stoklanması (freezing medium)..... | 27 |
| 2.2.6.4. Bitki Özütlerinin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 27 |
| 2.2.6.5. Bitki Özütlerinin Antiproliferatif Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 27 |
| 2.2.6.6 Hücrelerin Sayılması..... | 28 |
| 2.2.7 İstatistiksel Analizler..... | 28 |
| 3. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 29 |
| 3.1. Özüt Verimliliği..... | 29 |
| 3.2. Toplam Fenolik Madde İçeriği..... | 30 |
| 3.3. Toplam Flavonoit Madde İçeriği..... | 33 |
| 3.4.Bitki Özütlerinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi..... | 35 |
| 3.5. Bitki Özütlerinin Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi..... | 39 |
| 3.6. Bitki Özütlerinin Antiproliferatif Aktivitelerinin Belirlenmesi..... | 43 |
| 4. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 47 |
| 5. KAYNAKLAR..... | 50 |
| 6. ÖZGEÇMİŞ..... | 58 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

1. Simgeler

| | |
|-------|--------------------------------------|
| °C | : Santigrat derece |
| g | : Gram |
| m | : Metre |
| nm | : Nanometre |
| M | : Molar |
| ml | : Mililitre |
| mg | : Miligram |
| mg/ml | : Miligram/mililitre |
| mg/g | : Miligram/gram |
| g/kg | : Gram/kilogram |
| % | : Yüzde |
| µL | : Mikrolitre |
| µg/µl | : Mikrogram/mikrolitre |
| ppm | : Mg çözünen / kg veya litre çözelti |

2. Kısaltmalar

| | |
|-------------------|--------------------------------------|
| SDS | : Sodium Dodecyl Sulfat |
| AlCl ₃ | : Alüminyum Klorür |
| GAE | : Gallik Asit Eşdeğeri |
| TEAC | : Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite |
| DPPH | : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil |
| TCA | : Trikloroasetik Asit |
| Kcal /kg KM | : Kuru maddede |
| ROS | : Reaktif Oksijen Türleri |
| SD | : Standart sapma |
| DMSO | : Dimethyl Sulphoxyde |
| ATCC | : Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu |
| RPMI | : Roswell Park Memorial Institute |
| TAS | : Toprak altı su özütü |
| TÜS | : Toprak üstü su özütü |

| | |
|------------------|---|
| TAE | : Toprak altı etanol özütü |
| TÜE | : Toprak üstü etanol özütü |
| QE | : Kersetin Eşdeğeri |
| AA | : Absorbik asit |
| SS | : Standart sapma |
| IC ₅₀ | : Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1 <i>Astragalus neurocarpus</i> BOISS türünün coğrafik yayılışı (TÜBİVES, 2019) | 17 |
| Şekil 2.2 <i>A. elongatus subsp. nucleiferus</i> WILLD türünün coğrafik yayılışı (TÜBİVES, 2019) | 18 |
| Şekil 2.3 Gallik asit standart kalibrasyon eğrisi | 23 |
| Şekil 2.4 Kersetin standart kalibrasyon eğrisi | 24 |
| Şekil 3.1 Bitki türlerine ait yüzde özüt verimliliği | 30 |
| Şekil 3.2 Bitki özütlerinin DPPH serbest radikal giderim kapasitesi | 37 |
| Şekil 3.3 <i>A. elongatus subsp. nucleiferus</i> WILLD türünün A549, H1299 ve C6 hücre hatlarına karşı hücre canlılık oranları | 44 |
| Şekil 3.4 <i>A. neurocarpus</i> BOISS türünün A549, H1299 ve C6 hücre hatlarına karşı hücre canlılık oranları | 45 |

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

| | |
|--|-----------|
| Fotoğraf 2.1 <i>Astragalus neurocarpus</i> BOISS genel görünümü | 17 |
| Fotoğraf 2.2 <i>A. elongatus subsp. nucleiferus</i> WILLD genel görünümü | 18 |
| Fotoğraf 2.3 Bitki özütlerinin hazırlanması | 22 |
| Fotoğraf 2.4. DPPH serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini görüntüleri | 25 |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|-----------|
| Çizelge 3.1. Bitki türlerinin başlangıç miktarları ve özüt verimliliği (gr/gr) | 29 |
| Çizelge 3.2. Bitki özütlerinin toplam fenolik madde içeriği | 31 |
| Çizelge 3.3 Bitki türlerinin toplam flavonoit madde içeriği | 33 |
| Çizelge 3.4 <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD özütlerinin konsantrasyona bağlı DPPH serbest radikal giderim kapasitesi | 35 |
| Çizelge 3.5 <i>A. neurocarpus</i> BOISS özütlerinin konsantrasyona bağlı DPPH serbest radikal giderim kapasitesi | 36 |
| Çizelge 3.6 Bitki özütlerinin A549 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri | 39 |
| Çizelge 3.7 Bitki özütlerinin H1299 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri | 40 |
| Çizelge 3.8 Bitki özütlerinin C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri | 41 |

1. GİRİŞ

Bitkilerin çağlar boyunca insanoğlu tarafından yaygın olarak şifa kaynaklı kullanıldığı bilinmektedir. Kimyasal ve sentetik ilaçların hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanması ve buna bağlı olarak oluşan olumsuz yan etkilerin görölmesi ile birlikte, bitkisel ilaçların araştırılması ve alternatif olarak kullanılması günümüzde yeniden önem kazanmıştır. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarla bitkilerin tedavi edici özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Tıbbi bitkilerin içeriğinde bulunan maddelerin araştırılarak, içerdikleri etken maddelerin ortaya çıkarılması ile sentetik ilaçların yerine kullanılabilieceği düşünölmektedir. Kimyasal içerikli ilaçların olumsuz yan etkilerinden kurtulmak için bitkilerin kullanımı bir çözüm olarak görölmektedir (Türker ve Köylüoğlu, 2012). Son yıllarda yapılan çalışmaların, bitkisel tedavilerde kullanılan bitkilerin içeriklerini araştırmaya doğru yönelmesindeki en büyük etken, bitkilerden elde edilen ilaçların ucuz maliyetli ve yan etkisinin minimum düzeyde olması olarak görölmektedir. Sentetik ilaçlar tek bir etkiye sahipken bitkisel ilaçlar birden çok etkiye sahip olabilmektedirler. Doğal olmaları sebebiyle vücut içerisine alındıklarında kolay tolere edilen bitkisel ilaçlar iyi değerlendirildiklerinde ölkeler açısından çok büyük bir gelir kapısı olmaktadır (Baytop, 1999; Türker ve Köylüoğlu, 2012).

Bitkisel tedavi de kullanılan tıbbi bitkiler yüzyıllar boyunca kuşaktan kuşağa miras olarak kalmaktadır. Bunun nedeni, insanların çoğunun bitkisel içerikli tedavilere olan güvenleri olarak görölmektedir. Bu nedenle modern tıbbı alternatif olarak insanlar tarafından kullanılmaktadırlar (Ponni ve ark, 2009). Tarihte birçok bulaşıcı hastalığın tedavisi tıbbi bitkilerle yapılmıştır, ancak günümüzde bunun tam tersi olarak tıbbi bitkilerin kullanımının sakıncalı olduğu düşünölmektedir. Bunun sebebinin ise tıbbi bitkilerin içeriklerinin ve etkilerinin bilimsel olarak yeterince çalışılmaması gösterilmektedir (Salehi ve ark., 2013; Manjusha ve ark., 2015)

M.Ö. 5000 yıllarından kalma olduğu tahmin edilen Neanderthal insana ait iskeletlerin bulunduğu mezarlarda, günümüzde tıbbi olarak kullanıldığı bilinen bitkilere ait polenlerin bulunmuş olması, son 5000 yıldır dünya üzerinde bulunan insanların tıbbi bitkiler ile hastalıkları tedavi ettiği görüşünü ortaya koymaktadır. Asurlular, Sümerler, Hititler, eski Mısırlılar ve daha yakın zamanlarda Roma, Grek, Bizans ve Osmanlı

medeniyetlerinin tıbbi bitkileri hastalıkların tedavisinde kullandıkları yapılan araştırmalarda görölmektedir. Günümüzde ise doğal kaynaklı tedavi edici ilaç kullanım oranı gelişmiş ölkelerde %60'a kadar çıkmaktadır.

Etnobotanik çalışmalardan elde edilen bilgiler tıbbi bitkilerin kaynaklarının devamlılığı ve kullanımını açısından önem arz etmektedir (Polat ve ark., 2013). Geleneksel tıp bilgileri göz önünde bulundurulduğunda, 1600 yeni ilacın ortaya çıkması bu bilgilerin ışığında gerçekleşmiştir (Raja ve ark., 2011). Bu nedenle geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan tıbbi bitkilerin araştırılması ve etkinliğini sağlayan sekonder maddelerinin bilimsel olarak biyoanalizlerinin yapılması gerekmektedir (Türker ve Yıldırım, 2013).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 91 ölkenin farmakopeleri ve tıbbi bitkileri üzerine yapılmış olan çalışmaları incelendiğinde, 20.000 kadar bitkinin tedavi amaçlı tıbbi bitki olduğu bilgisi rapor edilmiştir. Dünya üzerinde pek çok yerde olduğu gibi Türkiye'de de yüzyıllardan bu yana yerel halk tarafından tıbbi açıdan önemi olan bitkiler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Türkiye florası incelendiğinde 9.000 in üzerinde bitki türüne sahip olduğu yapılan çalışmalarda raporlanmıştır. Bu bitkilerden 1.000 kadarının tıbbi ilaç ve baharat olarak kullanıldığı bildirilmektedir

Bitkilerin tedavi edici özelliklerinin kaynağı olan sekonder metabolitler bitkiler tarafından herbivorlara ve mikroorganizmalara karşı kendilerini savunmak, neslin devamlılığını sağlamak amaçlarıyla üretilirler (Wink, 1999). Son yıllarda yoğunlaşan bitkilerin tedavi edici özelliklerinin araştırılması üzerine çalışmalarda antimikrobiyal aktivite ve sekonder metabolit gruplarının en önemlilerinden olan antioksidanların üzerinde durulmaktadır (Linda, 2004). Antimutajen, antikanserojen ve antiaging etkileri gibi pek çok aktivitenin antioksidan bileşiklerden kaynaklandığı bilinmekte olup, antioksidan bileşikler biyolojik sistemler için vazgeçilmez ihtiyaçlar arasındadır (Cook, 1996). Bu durum oldukça maliyetli olan doğal antioksidan bileşiklerin yerine sentetiklerin üretimini ve kullanımını beraberinde getirmiş olmakla birlikte, sentetik antioksidanların toksik etkilerini ve kanserojen olabileceklerini gösteren çalışmalar sonucunda sentetik antioksidanların kullanımına sınırlama getirilmiştir (Gtir, 1986). Oldukça yaygın olarak kullanılan ve üretilen sentetik antioksidan bileşikler olan BHA ve BHT'nin her ikisinin de karaciğer hasarına yol açtığı düşünölmektedir (Gao, 1999).

Bu nedenle doğal antioksidan bileşiklere olan ihtiyacın artışı ile bitkisel antioksidanlar üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmıştır (Semiz, 2005).

Biyolojik sıvı ve ekstraktların oksidasyonu yavaşlatma ya da durdurma kapasitesi yani antioksidan kapasitesi belirlenirken temelde elektron ve hidrojen atom transferine dayanan farklı yöntemler kullanılmaktadır. Antioksidan kapasite FRAP, CUPRAC, LDL, oksidasyonun inhibisyonu gibi hidrojene dayalı yöntemlerle belirlenebildiği gibi ORAC, TEAC, β -karoten, DPPH, Folin metodu ve NO radikali temizleme aktivitesi gibi tekli oksijen transferine dayalı yöntemlerle de belirlenebilir. Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde elde edilen sonuçlar Trolox, BHT, Kateşin ve Gallik asit gibi standart bir antioksidan eşdeğeri cinsinden hesaplanırken, en az üç farklı konsantrasyon ile çalışılmaktadır (Yildiz, Balaban, Ozdemir, Bolayir, ve Topaktas, 2011).

Antioksidan bileşiklerin son zamanlarda daha fazla ilgi görmesinin ve öneminin artmasının nedenlerinden birisi de reaktif oksijen türlerinin canlılardaki etki mekanizmasının ve hasarlarının ortaya konduğu çalışmaların artmış olmasıdır. Reaktif oksijenlerin canlılarda çeşitli hastalıklara neden olduğunu gösteren bu çalışmalar hücre onarım sistemi ve savunma mekanizmalarının oksidatif yıkımla ilgili olduğunu göstermiştir (İbadova, 2006). Reaktif oksijen türleri pek çok metabolik olayda görev alan oksijenin metabolik yollarda radikal özellik kazanması ile oluşmaktadır (Halliwell, 1998). Reaktif oksijenlerin DNA mutasyonuna neden olmalarının yanı sıra lipid peroksidasyonu sonucu hedef hücre ve dokuların membran yapılarının bozulmasına da neden oldukları bilinmektedir (Cerutti, 1991, Finkel, 2009). Ayrıca oksidatif stres sonucu da oluşabilen reaktif oksijenlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için antioksidatif bileşiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Halliwell, 1998). Reaktif oksijenlerin yanı sıra dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküllere serbest radikaller denilmektedir. Yüksek derece de reaktif olan bu moleküller endojen ve eksojen olarak oluşabilmektedir. Endojen oluşum oksijenli solunumda fizyolojik respirasyon ve metabolizma işlemleri sırasında oksijenin %10'unun süperoksit anyon radikallerine veya hidrojen peroksite dönüşmesi şeklinde açıklanabilir. Eksojen faktörler ise sigara, radyasyon, alkol, stres, ilaçlar, yetersiz beslenme, enfeksiyonlar, pestisitler, çevresel kirlenmeler gibi pek çok etken sayılabilir (Wojtunik-Kulesza, 2016, Valko, 2006). Serbest radikallerin etkilerinin durdurulması ya

da azaltılmasında antioksidan bileşiklerin görev alıyor olması, bu bileşiklerin öneminin artmasında pay sahibi olurken, bu bileşikler aynı zamanda gıda maddelerinin oksidasyonunu da geciktirerek besin değerlerinde meydana gelen kaybı da en aza indirmektedir (İbadova, 2006).

Flavonoidler, vitaminler, endojen metabolitler ve fenolik bileşikler gibi bitkiler tarafından sentezlenen fitokimyasal bileşikler antioksidan aktivite gösterebilirler (Larson ve Bussard, 1986). Bitkiler tarafından sentezlenen en etkili antioksidan bileşiklerden olan flavonoidler, bitkilerde oligomerik proantosiyaniidler, kateşinler, rutin, kuersetin ve silimarin gibi değişik yapılarda bulunabilirler. Serbest radikallerin reaksiyonlarını durdurarak enzimlerin üretim ve salınımlarını düzenleyen flavonoidler, bu etkiyi oksijen ve metalleri bağlayarak, düşük yoğunluklu lipoprotein ve lipoprotein oksidasyonunu engelleyerek gerçekleştirirler (Tunalier, Kosar, Kupeli, Calis, ve Baser, 2007). Ayrıca alerjik reaksiyonlardan koruma, deri ve bağ dokunun elastikiyetini koruma ve yaraların iyileşmesini hızlandırma gibi etkileri nedeniyle sağlık uygulamalarında da kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Ren vd., 2003). Bitkilerin bünyesinde üretilen flavonoidler ve fenolik bileşikler gibi fitokimyasal bileşiklerin antioksidan etkilerinin yanında antienflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik özellikleri de olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Tüm bu özellikleri neticesinde bu bileşikleri içeren bitkiler kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu olarak kullanılmaktadırlar (Macdougall ve Cooper, 2002). Fenolik bileşikler, kılcal dolaşımında geçirgenliği düzenleyici ve kan basıncını düşürücü etkilere sahip olması nedeniyle bazı kaynaklarda “Permeabilite faktörü” (P faktörü) ya da “P vitamini” olarak ta adlandırılmaktadır. Ayrıca, gıda bileşeni olarak tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşum ve değişimine katılımları ile beslenme fizyolojisindeki olumlu etkileri nedeniyle fenolik bileşikler biyoflavonit olarak ta adlandırılmaktadır (Burak ve Damico, 1999).

Bir fenol halkasına sahip olan, halka yapısına ve sayısına göre isimlendirilen polifenollerin ana grupları flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, stilbenler (resveratrol) ve lignanlar olarak sıralanabilir (M. D'Archivio vd., 2007). Günümüzde tanımlaması yapılmış olan polifenollerin sayısı sekiz binin üzerinde olup, dört binden fazlasının flavonoidler olduğu bilinmektedir (Harborne, 1999).

Flavonoitler on beş karbon atomundan oluşan C₆-C₃-C₆ konfigürasyonuna sahip, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (M. D'Archivio vd., 2007). Bu konfigürasyonda bağlanan hidroksil grupların sayısı, doymamışlık derecesi ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon derecesi flavonoitler arasındaki farkların kaynağıdır. Heterosiklik halka yapısında olan karbon halkasındaki değişimler sonucu flavonoitler; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler, izoflavonlar, flavanonoller ve antosiyanidinler olarak ana bileşiklerine ayrılmakta olup, bu ana gruplardan en yaygın olanlar flavanol ve flavonlardır (D'Archivio, Ruggieri, Mazzeo, ve Tettamanti, 2007).

Kanser; bir takım mutasyonlar sonucu hücrenin kontrolsüz büyümesi, farklılaşması ve normal olmayan bir şekilde yayılması şeklinde oluşan ölümcül bir hastalık olarak tarif edilebilir. Genlerde oluşan birçok mutasyon sonucu kontrolsüz bölünmeye maruz kalan bir hücrenin oluşturduğu primer tümör hücreleri birçok değişik fenotipik özellikler kazanır. Tümör hücreleri, bu değişimler sonucunda kontrolsüz ve sınırsız çoğalırlar. Diğerlerinden bağımsız yaşayabilen bu hücreler, metastaz (başka dokulara hareket edebilme) özelliğinden dolayı, çevresindeki doku ve organlarının işleyişlerini de değiştirebilmektedirler. Hücre çoğalması, neoplazi denilen kitle ya da tümör oluşumuna sebep olabilmektedir. Kontrolsüz büyüme ve metastaz sonucunda, neoplazi kansere dönüşebilmektedir. Metastaz yapmayan tümörler iyi huylu tümörlerdir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Normal hücrelerle kanserli hücreler arasında birtakım farklar vardır. Bunlar;

- Hücre çoğalması, normal hücrelerde ihtiyaç halinde oluşurken kanserli hücrelerde ihtiyaç olmadığı zamanlarda ve kontrolsüz olarak oluşabilmektedir.
- Kanser hücresi, normal hücreye göre daha küçük olduğu halde çekirdeği daha büyük olup, hücre dokuya özelleşmiş olan morfolojik ve yapısal özelliğini kaybetmiştir.
- Kanser olan dokularda, hücre bölünmesinde normal farklılaşma oluşmaz.
- Kanserli hücreler arasında dokuya özel olan temas etkinliğinin engellenmesi gerçekleşmez.
- Kanserli hücrelerde apoptoz olayı gerçekleşmez.
- Kanserli hücrelerin metabolizmaları değişime uğramış olup genel olarak şeker alımını çoğalmış ve anaerobik solunum oranı artmıştır.

- Kanserli hücrelerin enzimlerinde görev ve miktar olarak bazı değişimler gözlenir.
- Kanserli hücrelerin antijenik özellikleri değişmiştir (Dilsiz 2009).

Hücre özelliklerine göre kanserleri dört gruba ayrılabilir. Beyaz kan hücreleri olan lökosit ve lenfositlerin olduğundan fazla miktarda üremesinden kaynaklanan lösemiler ve lenfomalar kanserin iki tipini oluştururlar. Kas, kemik ve kıkırdak gibi embriyolojik mezodermden gelişen dokuların tümörleri sarkomalardır. Kanserlerin %85'ini oluşturan karsinomalar ise; orjinlerini bezler, meme, deri ve ürogenital dokulardan (prostat, rahim ağzı gibi) almaktadırlar (Dilsiz, Aydın, ve Gursan, 2009).

Kansere sebep olan faktörler arasında genetik yatkınlık, mutasyonlar, hormonal farklılaşmalar ve bağışıklık sistemindeki değişikliklerle birlikte, sigara ve alkol bağımlılığı iyi beslenememe ve bazı enfeksiyonlar, radyasyona maruz kalma, hava kirliliği ve bazı kimyasallar gibi çevresel faktörler de kanser oluşumuna yol açabilmektedir (Cairns ve Mak, 2016).

Fizyolojik ve patolojik olarak istenmeyen hasar görmüş ya da neoplastik hücrelerin yok edilmesine apoptozis denilebilir. Dokuların homeostazisi, hücre çoğalması ve apoptozisin dengesinin kurulması ve sürdürülmesi ile alakalıdır. Dengenin kaybolmasının kansere sebep olduğu bilinmektedir (McPhie vd., 2003). Hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve apoptoz olayının azalması, karsinogeneze sebep olabilmektedir (Pore, Hiltermann, ve Kruyt, 2013). Kanserli hücrelerin hücre DNA'sında mutasyona uğramalarından gelişebileceği için hücrelerin apoptozla öldürülmesi hastalık açısından önemlidir.

Gün geçtikçe ülkemizde ve tüm Dünya'da kansere bağlı ölüm oranları giderek artmaktadır. Dünya genelindeki istatistiksel verilere göre; 2017 yılında yaklaşık olarak 1,688,780 kanser vakası öngörülmekte olup, bunların yaklaşık 600,920 kişisinde ölüme sebep olduğu tahmin edilmektedir (Smith, Gordon, Scruton, ve Yang, 2016). Bu verilerden de anlaşılacağı üzere, bir günde ölen her dört kişiden birisinin kanser sebebiyle öldüğü anlaşılmaktadır. Türkiye'de ki istatistiklere bakıldığında ise, 73,997,000 kişiden 90,000 kişinin kanser hastalığı sebebiyle ölmüş olduğu görülmektedir. Verilen değerler incelendiğinde tüm Türkiye'de ve Dünya'da kanser öncelikli bir sağlık sorunu olarak ortaya çıkmaktadır (TÜİK, 2016).

Kanserli hastaların tedavisinde erken tanının önemi çok büyüktür. Kemoterapi, ışın tedavisi, immün tedavisi, hormon tedavisi ve cerrahi müdahale kanserle mücadelede kullanılan yöntemler arasındadır (Dembitsky L., Gloriovova, ve Poroikov, 2015). Hastalığa uygun olarak, bu tedavi yöntemlerinden biri veya birkaçı tercih edilse de, bu yöntemlerin birbirleriyle etkileşimleri sonucunda bazı istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Kanser hastalığında yalnızca hedefe yönelik tedavinin uygulanabilmesi, toksik yan etkilerin minimal düzeye indirilebilmesi için son yıllarda sadece alakalı kanser hücrelerini hedef alan bitkilerin sekonder metabolitlerinden faydalanılarak alternatif tıp adı altında yapılan araştırmalar giderek önem kazanmaktadır.

Antikanser ajanlarının insan tümör hücreleri üzerindeki olumlu etkileri gözlemlenmektedir (Taylor vd., 2013). Antikanser ilaçların önceliği kanser hücreleri olmakla birlikte, antikanser ilaçların kanser hücreleri dışında normal hücreleri de etkileyen çeşitli mekanizmalarla etkin olabilirler. Bu ilaçların toksik araştırmalarının ve ön klinik aşamasındaki sitotoksikite çalışmalarının hayvanlar üzerindeki deneylerin azaltılması nedeniyle hücre kültürü yöntemleriyle araştırılması günümüzde neredeyse bir zorunluluktur. Ayrıca, hücre kültürü yöntemleri antikanser ilaçların sistemler üzerindeki spesifik etkilerinin moleküler düzeyde anlaşılmasını kolaylaştırdığından avantaj sağlamaktadır. Bunların yanı sıra, sitotoksikite deneylerinde kullanılan hücre hatları primer hücre kültürlerinden daha hızlı ve güvenilir sonuç vermesinin yanında maliyetinin daha ucuz olması gibi avantajlara da sahiptir (Wang ve Zheng, 2002).

1700'lü yıllardan bu yana, halk arasında tedavi amaçlı kullanılan *Astragalus* cinsi, takson sayısı olarak dünyanın en büyük bitki cinsidir. Yapılan çalışmalarda, *Astragalus* cinsine ait türlerin en yaygın kullanım alanının tıp olduğu görülmektedir. Bu cinse ait türler, uzun yıllardır Avrupa ülkelerinde yaygın tıbbi bitki olarak kullanılmaktadırlar. *Astragalus* türlerinin kök veya gövdelerinden elde edilen hidrofilik ve kolloidal özelliklere sahip kitre zankı olarak da isimlendirilen yapışkan öz suyu halk tıbbında yatıştırıcı ve ishal önleyici olarak kullanılırken bu özsu yapışkan, sıkılaştırıcı, emülsifiye edici ve katılaştırıcı ajan olarak diş hekimliği (protez yapımı), tekstil ve besin (dondurma yapımı) endüstrisinde de kullanılmaktadır (Anonim 2002). Türkiye'de ise, *Astragalus* türleri genellikle hayvan yemi olarak ve köklerinin toprağı sıkıca sarması sebebiyle erozyonla mücadele yönteminde kullanılabilir. Farklı *Astragalus* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda, bioflavonoidler, kolin ve astragalin B

(bir polisakkarit) ile aminoasitler, triterpen glikozitler, flavonoitler, isoflavonoitler ve saponinler aktif bileşenler olarak elde edilmiştir (Pistelli, Bertoli, Lepori, Morelli, ve Panizzi, 2002).

Astragalus membranaceus türünün köklerinde flavonoitler, polisakkaritler, saponinler, aminoasitler ve bazı eser elementlerin temel olarak var olduğu saptanmış olup, kronik ishal, akut karaciğer ödemi, anormal uterus kanamaları ve şeker hastalığının tamamlayıcı tedavisinde alternatif olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesinde önemli rolü olan polisakkarit fraksiyonları da içermektedir. Bunlar, glukanol olarak tanımlanan Polisakkarit A,B,C ve Polisakkarit D (heteropolisakkaritler)“dir (McKenna D1, 2002) *Astragalus* kökleri ayrıca bir dizi sikloartan triterpen glikozid içerir. Bunlardan bazıları astragaloside I-VIII, asetilastragalosid, isoastragalosid I ve III, astramembrannin II, sikloastragenol, siklosieversigenis, soyasaponin I, soyasapogenol B ve lupeol’dur (He, 1991). Bununla birlikte, *Astragalus* köklerinden izole edilip tanımlanmış ondan fazla flavonoit bulunur. Bunlardan bazıları, kampferol, kuersetin, formononentin, kalikosin, kumatakenin ve çok sayıda izoflavon glikozitlerdir (Lin, LZ 2000).

Astragalus corniculatus Bieb. bitkisinin toprak üstü aksamlarından saflaştırılan saponinlerinin hayvanlar üzerinde yapılan bir deneyde dalak tümör hücre çoğalmasının azaldığı gözlemlenmiştir (Toshkova, Krasteva, ve Nikolov, 2008). *A. gummifer*’in ise öksürüğe iyi gelen (antitüssif) etkinliğinden ötürü alternatif tedavide kullanıldığı bilinmektedir (Boskabady, Aslani, ve Kiani, 2006). Yapılan birçok çalışma *Astragalus* cinsinin soğuk algınlığı hastalığına iyi geldiğini ve hastalık süresinde ve şiddetinde azalma olduğunu desteklemiştir (Geng, 1986).

Cinsin Çin’ de alternatif tıpta kalbi kuvvetlendirmek amacıyla kullanıldığı, bu amaçla yapılan çalışmalarda ise kalp karıncığının görevlerini düzenlediği ve kanı pompalama hacminde iyileşmeler gözlemlendiği belirlenmiştir (Chen, Liao, ve Guo, 1995). Ayrıca, *Astragalus*’un karaciğeri fibrozise karşı koruduğu bilinmektedir (Tan 2006; Gui, 2006). Farelerde yürütülen bir çalışmada, *Astragalus* özütünün farelerde idrar torbası kanserinde yayılma hızında ve görülme sıklığında azalma olduğunu ortaya koymuştur (Gui, 2006). Yapılan farklı çalışmalarda ise, cinsin akciğer kanseri hastalarında tümör ilerleyişini durdurabildiği gözlemlenmiştir (Wei vd., 2003). Bunun yanı sıra, *Astragalus*

ayrıca; makrofajların, T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin uyarılmasını düzenleyebilmektedir (Bedir, Calis, Piacente, Pizza, ve Khan, 2000). T hücreleri virüsler tarafından ele geçirilmiş hücreleri öldüren, bağışıklık sistemi hücrelerine yardımcı olan, hastalıklarla savaşan beyaz kan hücreleridir ve virüs kaynaklı hastalıklarla savaşmada doğrudan etkilidir. Dolayısıyla bu hücrelerin sayısında meydana gelebilecek azalmalar bağışıklık sistemini zayıflatabilir ya da etkinliğini kaybetmesine neden olabilir. Bağışıklık sistemini güçlendirmek ya da T hücrelerinin sayısını arttırmak için yollar bulmak, HIV virüsü gibi T hücrelerini yok ederek bağışık sistemini devre dışı bırakan hastalıklarla mücadele edebilmek için de oldukça önemlidir. *Astragalus* cinsine ait bitkilerin AIDS gibi virüs kökenli hastalıkların tedavisinde bağışık sistemini güçlendirmek amacıyla uzun zamandır kullanıldığı bilinmektedir. Bu noktada, cinse ait türlerin yaşam süresini arttırma potansiyeli AIDS ve kanser gibi hastalıklarda tedavi için alternatif bir yol olarak görülmektedir (Hou, 1989). *Astragalus* türlerinin içeriklerini belirlemeye yönelik çalışmalarda elde edilen saponinlerin enfeksiyon giderici, sakinleştirici, ağrı kesici, idrar söktürücü ve tansiyon düşürücü etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur (Isaev, 1999). Ayrıca, *Astragalus* türlerinin antioksidan ve radikal söndürücü aktiviteler de gösterdiği de saptanmıştır (Godevac, Zdunic, Savikin, Vajs, ve Menkovic, 2008).

Astragalus türleri ile yürütülen araştırmalarda biyolojik etken grupların polisakkaritler ve sikloartan grubu saponinlerin olduğu belirlenmiştir (Rios ve Waterman, 1997; Tang ve Eisenbrand, 1992). Sikloartan bileşiklerinin karaciğer koruyucu, antioksidan, immunostimülan ve antiviral özellikleri olduğu, biyolojik aktivite çalışmaları ile ortaya konmuştur (Rios ve Waterman, 1997). Tüm bunların yanı sıra, *Astragalus* türlerinden izole edilen sikloartan glikozitlerden 8 tanesinin tirozinaz enzimini düşük dozlarda (IC_{50} değerleri: 13.95-102.39 μ M) inhibe ettiği belirlenmiştir (Bedir ve Khan, 2001).

Bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerden olan saponinler. antifungal, molusisidal, antihelmintik, adaptojenik, antitüsisif, ekspektoran, hipokolesterolemik, antiviral, immunositumulant, anti-HIV ve sitotoksik aktivitelere sahiptir (Marston, 1995). İskeletinde şeker bulundurabilen 30 karbonlu bileşikler sınıfı olan saponinler yüksek molekül ağırlığına sahip, uçucu olmayan yüzey aktif bileşiklerdir. Adını latince sabun anlamına gelen “sapo” kelimesinden alan bu grup bileşikler su ile karıştırıldığında sabun gibi köpürmektedir. Bu grup bileşikler triterpenoid ve steroid

glikozitler olarak ikiye ayrılarak sınıflandırılabilirdiği gibi triterpenoidler, spirotanoller ve furostanol saponinler olarak da sınıflandırılabilirler (Marston, 1995). Saponinlerin şeker içermeyen kısımlarına aglikon genin ya da sapogenin adı verilmektedir. Doğal bileşiklerde sadece Buxus grubu alkaloidlerde ve sikloartenollerde 9-19 siklopropan halkası ve steroidal çekirdek bulunmaktadır (Cerny ve Sorm, 1967; Connolly ve Hill, 1996). Sikloartenoller farklı fitosterollerin biyosentezinde önemli bir role sahip olduklarından oldukça önemlidirler ve sadece fotosentez yapan canlılar tarafından üretilirler. Sikloartenollerin biyosentez yolağının araştırılması üzerine yapılan çalışmaların sayısı ve hızı artmış ve günümüzde 400'e yakın türev aydınlatılmıştır. Sikloartenollerin yaygın olduğu familya ve en yaygın olan cinsleri Leguminosea (*Astragalus*), Ranunculaceae (*Thalictrum*, *Beesia*, *Souliea* ve *Cimicifuga*), Meliaceae (*Heynea* ve *Aglaiia*), Orchidaceae (*Cirrhopetalum*, *Pholidata* ve *Otochilus*), Passifloraceae (*Passiflora*), Combretaceae (*Combretum*), Asteraceae (*Balsamorhiza*) ve Anacardiaceae (*Mangifera*) şeklinde sıralamak mümkündür. Üzerinde çalışmalar yürütülen sikloartenollerin 120'ye yakını sadece *Astragalus* cinsinden elde edilmiş olup, Türkiye'de yapılan çalışmalar ile 30'u bilim dünyası için yeni olan 60'a yakın doğal bileşik izole edilmiştir (Bedir, Calis, Aquino, Piacente, ve Pizza, 1998). *Astragalus* türlerinden izole edilen bu sikloartenollerin kardiyotonic, hipokolesteremik, antidepresif, antiblastik ve immünomodülatör etkiler gösterdiği belirlenmiştir (Bedir ve Khan, 2001)

Birçok hastalığın önlenmesinde ya da tedavisinde rolleri bulunduğu anlaşılan terpenlerin ticari önemi her geçen gün artmaktadır. Bilinen 22000'den fazla doğal terpen bulunmaktadır (Carvalho ve Fonseca, 2006). İlaç endüstrisinde yaygın olarak pazarlanan steroid bileşikler ise antiinflamatuar, diüretik, antidrojenik, progestasyonel ve antikanser ajanı olarak kullanılmaktadır. Ticari değere sahip bu bileşikler pek çok özgün reaksiyon sonucu terapotik özellikler kazanmaktadır. Steroid moleküllerinin karmaşık yapısını elde edebilmek için regio- ve stereoselektif reaksiyonların meydana gelmesi gerekmektedir ki, bu reaksiyonlar için özgün biyokatalist kullanımı gerekmektedir.

Astragalus cinsine ait *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD (Yazı yoncası) ve *Astragalus neurocarpus* BOISS (Çizik geven) türleri ile ilgili yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda; herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmamış olup; belirlenmiş olan türlerin fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi ve sahip oldukları

biyolojik aktivitelerinin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, bitki türlerinin kök ve toprak üstü kısımlarından özütler elde edilmiştir. Bitki özütlerinin, toplam fenolik ve flavonoit içerikleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Antioksidan kapasiteleri, DPPH serbest radikal giderim kapasitesine göre analiz edilmiştir. Özütlerin potansiyel antikanser ve antiproliferatif aktiviteleri ise, A549, H1299, C6 kanser hücreleri ve HUVEC kontrol hücrelerine karşı; MTT ve tripan mavisi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Albayrak ve Kaya (2019) çalışmalarında Türkiye endemiği olan *Astragalus argaeus* Boiss.'in toprak altı ve toprak üstü kısımlarının ekstraktlarının insan meme kanseri hücre hattında (MCF-7) sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. MCF-7 hücre hattı ve fibroblast hücrelerinde sitotoksik aktivitenin belirlenmesinde 24 ve 48 saat boyunca 3-(4,5 dimetil tiyazol-2-il) -2,5-difinil tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılmıştır. Çalışmada, bitki ekstraktlarının MCF-7 hücre hattına karşı 24 boyunca zayıf etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Bourezzane ve ark. (2017) çalışmalarında Cezayir'de yayılışı bulunan *Astragalus monspessulanus* L.'nin toprak üstü kısımlarının fitokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. Bilinen 13 bileşiğin izolasyonu ve tanımlanması hedeflenen çalışmada *n*-bütanol ekstraktlarından 7 flavonoit, 2 saponin ve 1 lignan izole edilmiştir. Ayrıca, etil asetat özütünden de 2 fitosterol ve 1 triterpenoid izole edilen çalışmada, izole edilmiş olan tüm bileşiklerin yapıları 1D ve 2D NMR teknikleri, optik rotasyon ölçümü, ESI-MS kütle spektrometresi kullanılarak ve literatürle karşılaştırılarak belirlenmiştir. Ayrıca, *n*-bütanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, DPPH radikal süpürücü ve demir iyon şelatlama yöntemleri ile belirlenmiştir. Yapılan analizler ile *A. monspessulanus n*-bütanol ekstraktlarının test yöntemine bağlı olarak düşük ($EC_{50} = 2.0876 \pm 0.4363$ mg mL⁻¹) ila orta derecede ($IC_{50} = 63.60 \pm 0.01436$ µg mL⁻¹) antioksidan aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir.

Darendelioğlu ve ark. (2016) *Astragalus gummifer* çiçeklerinin etanol özütünün PC-3 ve HUVECs üzerindeki biyolojik aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, ekstraktın normal hücrelerde antioksidan etki gösterirken, kanser hücrelerinde pro-oksidan etki göstererek bu yolla bu hücrelerde apoptoza neden olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada HUVECs'te Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumu ve Lipit Peroksidasyonda (LPO)

normal şartlarda artış olurken, *A. gummifer* çiçeği özütünün bu artışı düşürdüğü görülürken PC-3'te ROS oluşumu ve LPO seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, ekstraktın PC-3 hücrelerinde apoptozla ilgili DNA fragmentasyonuna neden olduğu da belirlenmiştir.

Al-Snafi (2015) çalışmasında Irak florasında yayılışı bulunan ve farmakolojik etkilerinin olduğu bilinen *Astragalus hamosus* ve *Astragalus tribuloides* türlerinin kimyasal içerikleri ve farmasotik etkilerine ilişkin yapılan çalışmaları derlemiştir. Çalışmada, taksonların antioksidan, sitotoksik, antiinflamatuvar, sinir sistemi ve hepatik koruyucu etkileri ayrı ayrı başlıklar altında incelenirken bunlar dışındaki farmasotik etkiler ile geleneksel kullanım yöntemlerine de yer verilmiştir. Ayrıca, bilinen yan etkiler de çalışmada belirtilmiştir.

Teyeb ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Astragalus gombiformis* Pomel. yapraklarından elde edilen ekstraktların antibakteriyel ve sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde kâğıt disk agar difüzyon metodu kullanılmış olup, çok sayıda insan patojeni bakteriye karşı aktivite incelenmiştir. Sitotoksik aktivite ise insan akciğer kanser hücrelerinde kolorimetrik MTT analizi ile belirlenmiştir. En güçlü sitotoksik aktivite A549 akciğer epitelyal karsinom hücre hattına karşı diklorometan ekstraktında $IC_{50}=85\pm 21.7$ µg/mL'de belirlenirken, bu ekstrakt için en iyi inkübasyon süresi de 48 saat olarak tespit edilmiştir. Analiz edilen ekstraktların çoğunun test edilen bakteri suşlarına karşı aktif olduğunun tespit edildiği çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı en etkili ekstraktın metanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir.

Aboul-Enein ve ark. (2011) çalışmalarında Mısır florasında bulunan 23 bitki ile baharat olarak kullanılan 24 bitkinin su ve etanol ekstraktlarının *in vitro* antikanser aktivitesini incelemişlerdir. Antikanser aktivitelerinin belirlenmesinde Ehrlich Asit Tümör hücrelerinde (EACC) tripan mavisi kullanılırken HepG2 hücrelerine karşı SRB tekniği kullanılmıştır. Aynı çalışmada antioksidan aktivitelerin belirlenmesi için DPPH analizi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda bazı bitkilerin hem su hem de etanol özütlerinin yüksek sitotoksik ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu ve kanser hücrelerinin büyümesini engellediği belirlenmiştir. Bazı bitkilerde etanol ekstraktları daha fazla etkiye sahipken bazı bitkilerde ise su ekstraktlarının daha etkili olduğu tespit

edilmiştir. Çalışmada *Astragalus spinosus*'un antikanser aktivite bakımından su özütünde oldukça etkin olduğu görülürken, antioksidan aktivite de etanol özütünün daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Fan (2011) *Astragalus* cinsine ait bitki ekstraktlarının *in vitro* ve *in vivo* antioksidan aktivitesini araştırdığı çalışmasında, 4 farklı ekstrakt kullanmıştır. *In vitro* antioksidan aktiviteleri 2,2-a-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve indirgeme gücü analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir. *In vivo* antioksidan özelliklerin belirlenmesi için Kunming farelerinde etil asetat özütlerinin (EAE) oksidatif stresi indirgeme gücüne bakılmıştır. *In vitro* analiz sonuçları en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan özütlerin etil asetat özütleri olduğunu göstermiştir. Yapılan analizler ile etil asetat özütlerinin yüksek konsantrasyonlarda malondialdehit (MDA) seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü ve farelerde SOD aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Çalışmada *Astragalus* cinsine ait bitkilerin etil asetat özütlerinin antioksidan ve serbest radikal temizleme konusunda etkinlik gösterdiği tespit edilmiş olup, potansiyel olarak zengin bir antioksidan kaynağı olduğu belirtilmiştir.

Peng ve ark. (2011) Çalışmalarında *Astragalus membranaceus* sulu ekstraktlarının *in vitro* antioksidan ve antitümör etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda sulu ekstraktların süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) radikallerini etkin bir şekilde süpürebildiği belirlenmiştir. Ayrıca, 2,2'azobis (2-amidinopropan) hidroklorür (AAPH) ile indüklenmiş insan eritrositleri hemolizini de azaltabildiği tespit edilmiştir. Çalışmada, *A. membranaceus* sulu ekstraktlarının insan gastrik hücre hattı (SGC 7901) ve insan hepatom (SMMC 7721) hücrelerinde büyümeyi verilen doz aralığında doza bağlı olarak inhibe edebildiği belirlenmiştir.

Yan ve ark. (2010) *Astragalus mongholicus* polisakkaritlerinin kimyasal analizini yaptıkları çalışmalarında, polisakkaritlerin antioksidan aktivitelerini de belirlemişlerdir. Çalışmada, polisakaritin başlıca işlevsel grupları, Fourier iletimi-kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve gaz kromatografisi (GC) ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda başlıca grubun mannozlardan oluştuğu ve bunun dışında glikoz, galaktoz ve arabinozlar tespit edilmiştir. Çalışmada, polifenollerin ve furan halkasının varlığı da belirlenirken polisakkaritlerle yürütülen farmasötik deneylerde, polisakkaritlerin verilmesinin

farelerde serum ve karaciğer antioksidan enzim aktivitelerini önemli ölçüde artırabildiği ve peroksidatif lipid düzeylerini azaltabildiği gösterilmiştir.

Rui ve ark. (2010) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Fourier dönüşümü infrared (FT-IR) kullanarak analiz ettikleri *Astragalus* polisakkaritlerinin antioksidan aktiviteleri ile polisakkaritlerin ve siRNA'nın antitümör aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmada gerçekleştirilen farklı test yöntemlerinin tamamında glukoz bileşikleri olduğu tespit edilen *Astragalus* polisakkaritlerinin antioksidan aktivite gösterdiğini belirlenmiştir. Buna ek olarak çalışmada polisakkaritlerin antitümör aktivite de gösterdiği tespit edilmiştir. CD40 geni siRNA plasmidi oluşturularak siRNA antitümör etkisini de değerlendiren ekip *Astragalus* polisakkaritlerinin siRNA'dan daha fazla antitümör etkisi gösterdiğini belirlemiştir.

Yan ve ark. (2009), yapmış oldukları çalışmada affinite kromatografisi metoduyla *A. mongholicikileri* bitkisinin köklerinden özütleyip saflaştırdıkları bir lektin (AMML) molekülünün insanda rahim ağzı kanser hücreleri (HeLa), kemik kanseri hücreleri (MG63) ve kan kanseri hücreleri (K562) üzerindeki çoğalma, ölüm ve hücre döngüsünde büyüme inhibisyonunun sırasıyla, HeLa hücrelerinde (%92)>K562 hücrelerinde (%84)>MG63 hücrelerinde ise (%48) gerçekleştiğini saptamışlardır. Saflaştırılan lektin molekülünün bu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği çalışma sonucundan anlaşılmıştır.

Li ve ark. (2009), (*Li, Peng, Shi, ve Zhao, 2009*) *A. membranaceus* bitkisinin kök kısımlarından sıcak su ekstraksiyonu, anyon değişimi ve jel permasyon kromatografisi yöntemleri ile elde edilen APS isimli C-6 pozisyonunda bir tek -D-glukoz içeren - (1→4)-D-glukan yapısında bir polisakkarit elde etmişler ve bu polisakkaritin böbrek üzerindeki koruyuculuğunu deney farelerinde katyonik sığır serum albumini (C-BSA) ile birlikte uygulamış çalışma sonucunda APS'nin proteinuri den kaynaklanan idrar protein seviyesinde belirgin bir azalmaya ve glomerüllerde morfolojik değişikliklere neden olduğunu belirlemişlerdir ve glomerülonefrit tedavisinde APS'nin etkin olabileceği sonucuna varmışlardır.

Xue ve ark. (2008) *A. Complanatus* R. Brown bitkisinin tohumlarından son yirmi yılda izole edilen 16'dan fazla flavonoit çeşidinin fareler üzerindeki antihipertansif etkilerinin araştırılmasının sonucunda *A. complanatus* total flavonoitlerinin portal ven'de

dilatasyona neden olduğunu bunun da Anjiotensin II reseptörlerinin bloke olduğunu bildirmişlerdir.

Cho ve Leung (2007) Çin’de yaygın olarak kullanılan bir tıbbi bitki olan *Astragalus membranaceus*’un *in vitro* ve *in vivo* anti-tümör etkilerini araştırmışlardır. *A. membranaceus* kökünden izole edilen 5 biyoaktif fraksiyon arasından murin splenositleri üzerindeki mitojenitesine en etkili olanı AI olarak belirlenen fraksiyon olarak bulunmuştur. Çalışmada, AI fraksiyonunun makrofaj fonksiyonu, tümör nekroz faktörü üretimi, lenfokin ile aktive edilmiş katil hücrelerin indüksiyonu ve tümör hücresi farklılaşması üzerindeki faaliyetleri de incelenmiştir. Çalışma sonucunda, farklı hücre hatlarına uygulanan *A. membranaceus*’un konakçıya ait anti-tümör bağışıklık mekanizmasını harekete geçirerek hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-tümör etkileri gösterebileceğini tespit etmişlerdir.

Tawaha ve ark. (2007) Ürdün’de yayılışı bulunan toplam 51 bitkinin toplam fenolik içeriğini ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bitkilerin su ve metanol ekstraktları ile çalışılan araştırmada geliştirilmiş ABTS[®]+ yöntemi ve Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi kullanılmıştır. Hem metanol hem de su ekstraktlarında antioksidan aktivite ile fenolik içerik arasında pozitif doğrusal bir ilişki tespit edilmiş olan çalışmada, *Astragalus berytheus* Boiss. ve Blanche ve *Astragalus peregrinus* Vahl. bitkileri de değerlendirilmiştir. *A. berytheus* bitkisinin su ve metanol ekstraktları için antioksidan aktivite sırasıyla 63.2±3.1 µmol TE/g ve 43.9±1.4 µmol TE/g olarak belirlenirken, toplam fenolik içerikleri sırasıyla 14.2±1.1 mg GAE/g ve 13.5±0.3 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. *A. peregrinus* su ve metanol ekstraktları için ise antioksidan aktivite sırasıyla 53.9±5.9 µmol TE/g ve 38.7±1.2 µmol TE/g olarak belirlenirken, toplam fenolik içerikleri sırasıyla 11.7±0.4 mg GAE/g ve 14.6±0.3 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir.

Wong ve ark. (2006) Çin’de kullanılan 30 tıbbi bitkinin antioksidan aktivitelerini ve fenolik içeriklerini ferrik indirgeyici antioksidan güç testi ve Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Bitkilerin ekstraktlarını geleneksel yöntemle suda kaynatarak ve %80 metanol ile elde ettikleri çalışmada, hem su hem de metanol ekstraktlarında antioksidan ile toplam fenolik içerik arasında anlamlı ve doğrusal bir korelasyon tespit etmişlerdir. Kullanılan ekstraksiyon yöntemlerini karşılaştırdıklarında,

su ekstraksiyonunda fenolik bileşiklerin daha verimli bir şekilde ekstrakte edilmiş olduğunu ve ekstrenin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada değerlendirilen *Astragalus complanatus* R. Br. ve *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. İçin antioksidan kapasite test sonuçları sırasıyla 66.9 ± 1.4 $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ ve 12.2 ± 0.4 $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ olarak belirlenirken total fenolik madde içerikleri sırasıyla 10.3 ± 0.10 mg GAE/g ve 5.27 ± 0.06 mg GAE/g olarak belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Bitki materyali

Tez çalışmasında, *Astragalus neurocarpus* BOISS (çizik geven) ve *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD (yazı yoncası) türlerinin toprak üstü ve toprak altı kısımları kullanılmıştır. Bitki türleri, Gaziantep ve çevresinden toplanmış olup; Gaziantep Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Botanik ABD'dan Sistemik Botanikçi Arş. Gör. Fatih Yayla tarafından teşhis edilmiştir. Her bir bitki türünün herbaryumu yapılmış ve Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda herbaryum kayıt numarası (GAUN 5054 ve 5055) ile kayıt altına alınmıştır. Araziden toplanan örnekler temizlendikten sonra, toprak üstü ve toprak altı kısımları birbirinden ayrılarak karanlık ve steril ortamda, laboratuvar koşullarında kurumaya bırakılmıştır.

A. neurocarpus BOISS türü, çok yıllık otsu bir bitki olup; genellikle çakıllı-kırsal alanlarda ve 600 mt yükseklikteki tepe yamaçlarda yetişmektedir. Bitki, Nisan ve Mayıs aylarında çiçek açmaktadır. Endemik bir tür değildir, İran-Turan bölgesine ait bir bitkidir. Türkiye'de daha çok Doğu Anadolu'da yayılım gösterirken, Dünya'da ise Suriye çöllerinde bu türe rastlanmaktadır. Tür, Türkiye'de genellikle Gaziantep, Kilis, Şanlıurfa ve Siirt illerinde yayılım göstermektedir.

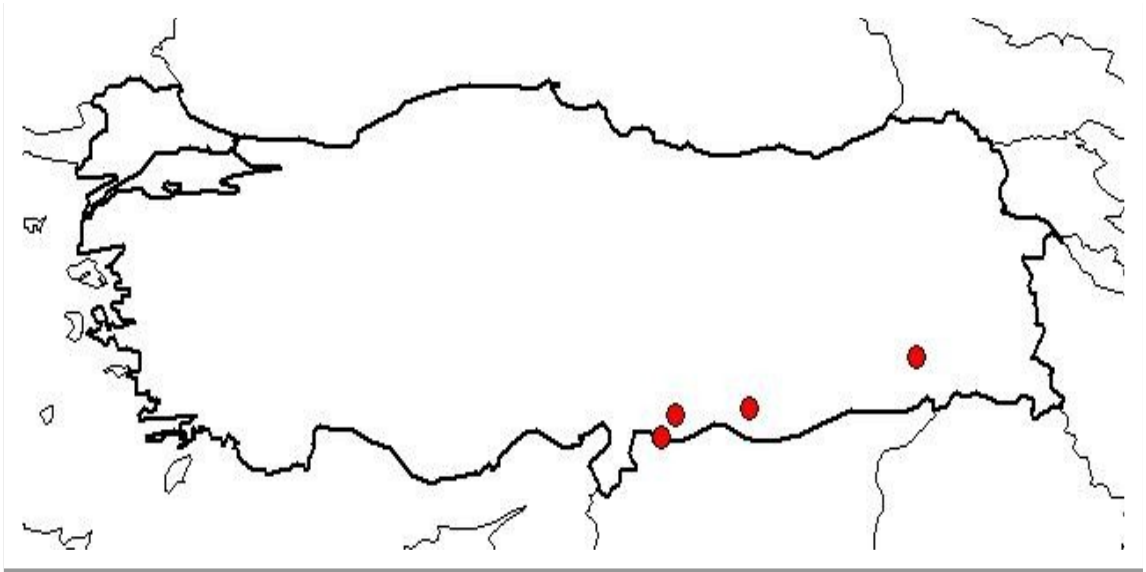
Tez çalışmasında kullanılan diğer bir *Astragalus* türü ise, *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkidir. Bu tür de çok yıllık otsu bir bitki olup; meşe çalılığı ve bozkırlarda 310-1500 mt yükseklikte görülmektedir. Bitkinin haziran ve temmuz dönemlerinde çiçeklendiği görülmektedir. İran Turan Bölgesi'nde yetişen tür, endemik bir bitki türüdür. Ülkemizde genel olarak Orta Anadolu Bölgesi'nde (Kastamonu,

Ankara, Denizli, Eskişehir, Kayseri, Kütahya, Kahramanmaraş ve Karaman) yayılış göstermektedir..

Çalışmaya dâhil edilen *Astragalus* türlerine ilişkin arazi görüntüleri (Fotoğraf 2.1 ve 2.2.) ve türlerin Türkiye'deki yayılış alanları (Şekil 2.1. ve 2.2.) de verilmiştir



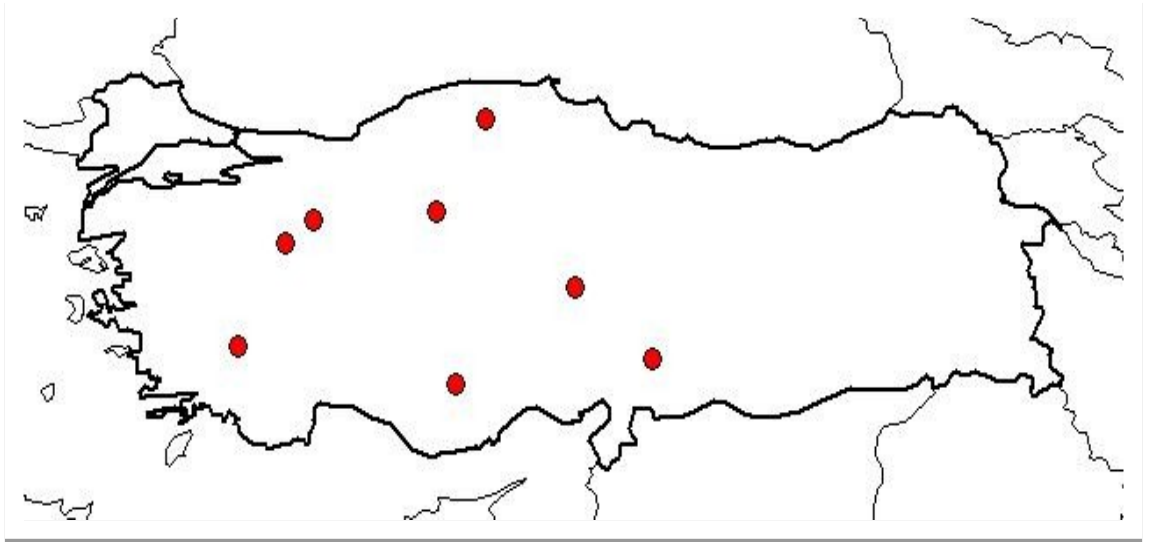
Fotoğraf 2.1 *Astragalus neurocarpus* BOISS genel görünümü



Şekil 2.1 *Astragalus neurocarpus* BOISS türünün coğrafik yayılışı (TÜBİVES, 2019)



Fotoğraf 2.2 *A. elongatus subsp. nucleiferus* WILLD genel görünümü



Şekil 2.2 *A. elongatus subsp. nucleiferus* WILLD türünün coğrafik yayılışı (TÜBİVES, 2019)

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Buzdolabı (+4°C) (Bosch)
- Balon joje (50 ml PYREX)
- Çalkalayıcı (shaker)(Orbital)
- Derin Dondurucu (-20°C ve -86°C) (Bosch)
- Elisa microplate (Imark)
- Floresans Mikroskop (Nikon)
- Hassas terazi (KERN ABJ)
- Hücre sayım cihazı (Cedex XS Analyzer, Roche)
- İnkübatör (Thermo Fischer Scientific)
- İverted (ters) Mikroskop (Olympus)
- Laminar Flow Hücre Kültürü Kabini (Thermo Fischer Scientific),
- Liyofilizatör (Tetra)
- Otomatik pipet (Ependorf)
- Öğütücü-blender (BOSCH)
- Parafilm(Pechiney)
- pH metre (Hanna H1)
- Rorary evaporatör, (UV /VIS)
- Santrifüj (Thermofisher Scientific)
- UV/VIS Spektrofotometre (VersaMax Molecular Devices, ABD)
- Vorteks (IKA)
- Saf su cihaz (MIKROTEK)

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Solüsyonlar

- Alüminyum klorür (MERCK)
- Asetik Asit (MERCK)
- Askorbik Asit (Sigma)
- BHT (butillenmişhidroksitoluol) (Sigma)
- Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma)
- DMEM/ Ham's F12(Thermofisher scientific)

- DPPH (2.2-difenil-1- pikrilhidrazil)(Sigma)
- Etanol (MERCK).
- Fetal sığır serumu (FBS,)(GIBCO)
- Folin-Ciocalteu reaktifi (MERCK)
- Gallik Asit(MERCK)
- Kersetin(MERCK)
- L-Glutamin(Pan Biotec)
- Metanol (MERCK)
- MTT (SİGMA)
- Penisilin/Streptomisin (PAN BIOTEC)
- Phosphate buffered saline (PBS, Sigma)
- Potasyum asetat (MERCK)
- RPMI(THERMOFISHER)
- Sodyum karbonat (MERCK)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS,)(MERCK)
- TCA (trikloroasetik asit).(Kimya)
- Tripan mavisi (Biochrome)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma)

Çalışmada kullanılan bazı çözeltilerin hazırlanması

%10'luk Folin-Ciocalteu reaktifi hazırlanması: Ticari olarak satın alınan Folin-Ciocalteu Reaktifi seyreltilmiştir. 10 (microlitre) µl FCR (Folin-Ciocalteu Reaktifi) üzerine 90 ml distile su ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%20'lik sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 20 mg Na₂CO₃ alınmış ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Gallik asit çözeltisi: 1 mg gallikasit 1 ml distile suda çözülmüştür.

Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 8,2 g CH₃CO₂K alınmış ve bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Alüminyum klorür çözeltisinin hazırlanması: 10 g AlCl₃ alınmış ve 80 ml distile su, içerisinde çözülmüştür.

Kersetin çözeltilisinin hazırlanması: 25 g kersetin 25 ml etanol içerisinde çözülmüştür,

DPPH çözeltilisinin hazırlanması: 0.002 g DPPH (2.2-difenil-1-pikrilhidrazil) alınmış ve 50 ml metanolde çözülmüştür.

2.2. METOT

2.2.1 Bitki Örneklerinden Özütlerin Hazırlanması

Astragalus cinsine ait, *A. elongatus* subsp. *elongatus* (yazı yoncası) ve *A. neurocarpus* (çizik geven) türleri Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında bitkinin çiçekli döneminde Gaziantep ve çevresinden toplanarak, Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda Davis (1972) 'ye göre teşhis edilmiş olup, Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumu'nda kayıt altına alınmıştır.

Astragalus türlerinin, toprak altı (kök) ve toprak üstü (çiçek, gövde ve yaprak) kısımları öğütücüde toz haline getirildikten sonra, biyolojik aktivite açısından farklılıklarının gözlemlenmesi amacıyla; her iki aksam da ayrı ayrı özütleme işlemine tabi tutulmuştur. Bitki örnekleri (40 gr) distile su (dH₂O)ve etanol (EtOH) çözücüleri kullanılarak oda ısısında çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 16-24 saat boyunca maserasyon yöntemi ile özütlenmiştir (Senol ve ark. 2018; Gezici ve Sekeroglu, 2019). Özütleme işlemi sonrasında, su ile özütlenen örnekler filtre kâğıdı ile süzülmuş ve liyofilizatörde kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Etanol ile hazırlanan örneklerde rotary evaporatörde çözücü uzaklaştırılmış ve sonrasında liyofilizatörde kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Toz haline getirilen özütler analizlerde kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bitki özütlerinin hazırlanmasına ilişkin laboratuvar resimleri Fotoğraf 2.3'de verilmiştir.



Fotoğraf 2.3 Bitki özütlerinin hazırlanması

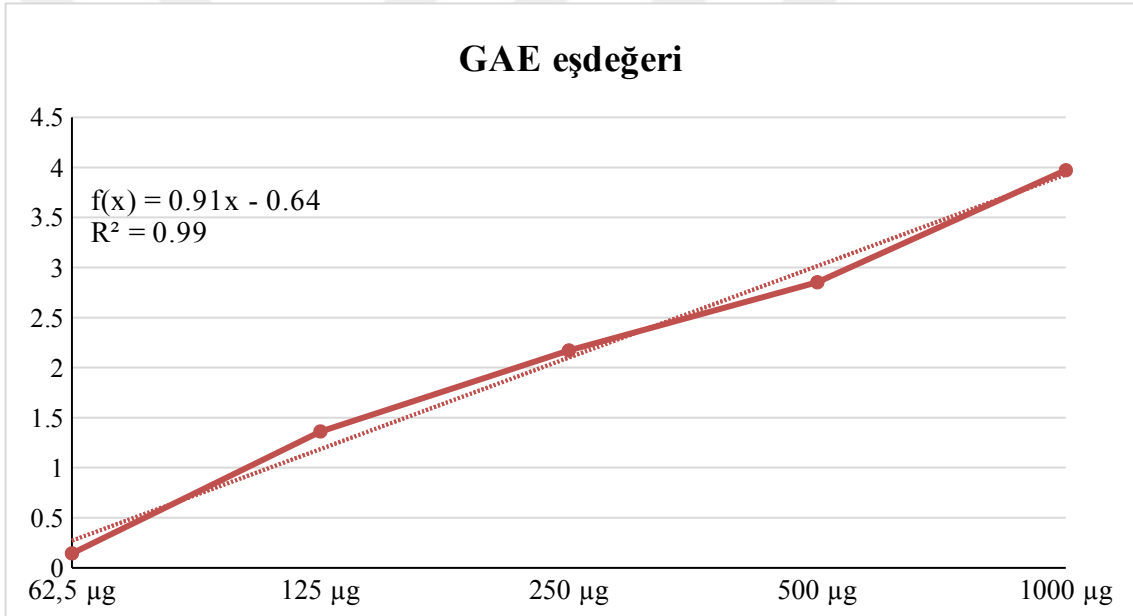
2.2.2 Örneklerin Analizler İçin Hazırlanması

Bitki türlerinin farklı kısımlarından su ve etanol çözücüleri ile elde edilen her bir özüt, tez çalışmasında yapılacak olan analizler için farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Özütler DMSO içerisinde en yüksek konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde çözümlenerek, homojen hale getirilmiştir.

2.2.3 Bitki Özütlerinin Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi

Bitki türlerinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerin sahip olduğu toplam fenolik madde miktarları Singleton ve Rossi (1965) tarafından belirlenen Folin-Ciocalteu yönteminde bazı değişiklikler yapılarak

belirlenmiştir (Sekeroglu ve ark., 2017; Gezici ve Sekeroglu, 2019). Bu yöntemde, 96 kuyucuklu microplate A₁ kuyucuğundan başlayarak seyreltilmiş özütlerden her kuyucuğa 100'er microlitre konulmuştur. Özütlerin üzerine Folin Ciocalteu reaktifi ve %20'lik doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Karışım, karanlık ortamda yaklaşık 90 dk kadar bekletilmiştir. Karışımında meydana gelen mavi rengin absorbansı 96 kuyucuklu mikroplate okuyucu spektrofotometrede (VersaMax Molecular Devices, ABD) 765 nm'de okunmuştur. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde standart fenolik olarak gallik asit (GA) kullanılmıştır. Standart gallik asit çözeltisinin 62.5-1000 µg/mL aralığındaki 5 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ($R^2=0.9905$) ve standarda ait mg/g olarak gallik asit eşdeğeri (GAE) grafik Şekil 2.3'de verilmiştir.

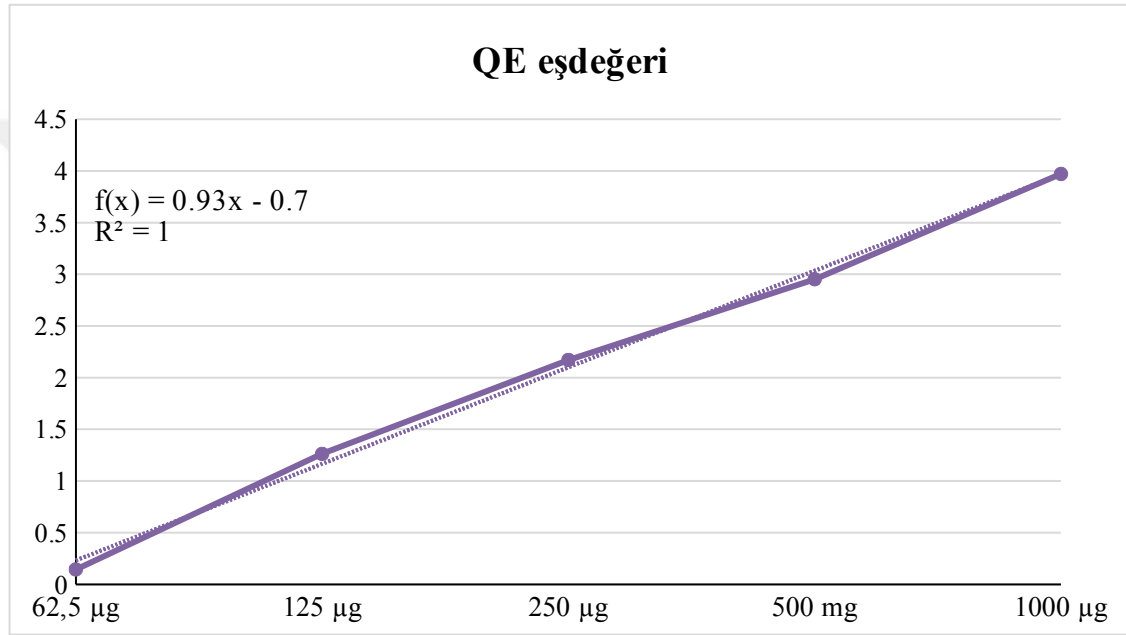


Şekil 2.3 Gallik asit standart kalibrasyon eğrisi

2.2.4 Bitki Özütlerinin Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi

Özütlerin toplam flavonoit madde içerikleri Woisky ve Salatino (1998) tarafından belirlenen Alüminyum klorid kolorimetrik yöntemi temel alınarak belirlenmiş olup, yöntemin uygulanmasında kısmi değişiklikler yapılmıştır (Sekeroglu ve ark., 2017; Gezici ve Sekeroglu, 2019). Doksan altı kuyucuklu Elisa microplate'de gerçekleştirilen bu yöntemde, özütler farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek her bir kuyucuğa 100'er microlitre konulmuştur. Özütlerin üzerine 1M potasyum asetat solüsyonu ve $AlCl_3$

çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen karışım, karanlık ortamda yaklaşık 40-45 dk kadar bekletilmiştir. Karışımda meydana gelen sarı rengin absorbansı 96 kuyucuklu mikropate okuyucu spektrofotometrede (VersaMax Molecular Devices, ABD) 415 nm'de okunmuştur. Toplam flavonoit madde miktarının belirlenmesinde standard flavonoit olarak kersetin (Q) kullanılmıştır. Standart kersetin çözeltisinin 62.5-1000 µg/mL aralığındaki 5 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ($R^2=0.9967$) ve standarda ait mg/g olarak kersetin eşdeğeri (QE) grafik Şekil 2.4'de verilmiştir.

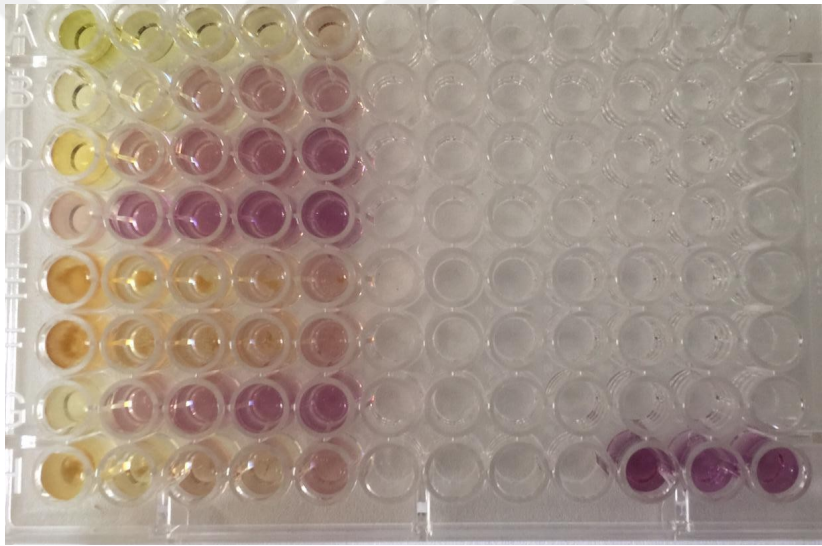
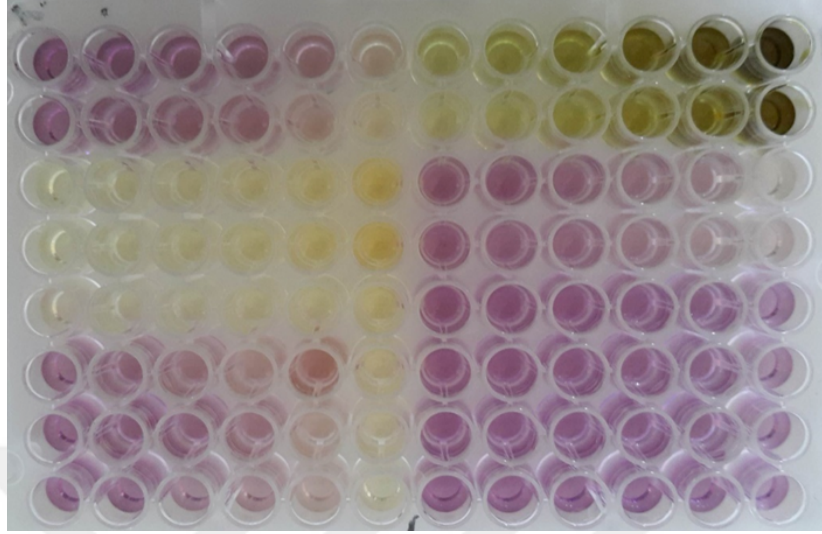


Şekil 2.4 Kersetin standart kalibrasyon eğrisi

2.2.5 Bitki Özütlерinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki özütlerinin serbest radikal süpürme aktivitesinin değerlendirilmesi mikropate DPPH (diphenyl-2-picryl-hydrazil) yöntemi ile yapılmıştır (Gezici ve Sekeroglu, 2019). Bitki özütlerinin serbest radikal giderim kapasiteleri 96 kuyucuklu ELISA platelerde çalışılmıştır. DPPH analizleri öncesinde, bitki özütleri 1mg/ml konsantrasyondan başlayarak en az beş dilüsyon yapılarak üç tekerrürlü olarak analiz edilmiştir. Bitki özütleri ELISA platelerin her bir kuyucuğuna 40'ar µl olacak şekilde konulmuş ve dilüsyonları yapılmıştır. Özütlerin üzerine metanol ile hazırlanan DPPH solüsyonu eklenmiş ve karanlık ortamda yaklaşık 30 dk bekletilerek meydana gelen renk

değişimleri gözlenmiştir. Elde edilen ELISA plate görüntüleri Fotoğraf 2.4'de verilmiştir.



Fotoğraf 2.4. DPPH serbest radikalleri giderme aktivitesi tayini görüntüleri

Örneklerin absorbanları, spektrofotometre (VersaMax Molecular Devices, ABD) ile 517 nm dalga boyunda ölçülmüş ve özütlerin farklı konsantrasyonlarda ki DPPH serbest radikal süpürme aktivitesileri yüzde inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Yüzde inhibisyon hesaplaması aşağıda verilen eşitliğe göre yapılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak bilinen standard antioksidan olan askorbik asit (AA), kontrol olarak bitki özütlerinin dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan DMSO, kör olarak ise DPPH kullanılmıştır.

$$\text{DPPH serbest radikal süpürme kapasitesi (\%)} = (1 - \text{Ac} / \text{As}) \times 100$$

[Ac: bitki özütü içermeyen kontrol kuyucuğuna ait absorbans değeri, As: bitki özütü içeren kuyucuğun absorbans değeri].

2.2.6.Bitki Özütlerinin Antikanser ve Antiproliferatif Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bitki özütlerinin antikanser, sitotoksik ve antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesine yönelik çalışmada; temel olarak aşağıda verilen aşamalar gerçekleştirilmiştir.

- Hücre Hatlarının Elde Edilmesi
- Besiyerlerinin Hazırlanması
- Hücre Hatlarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması
- Hücre Hatlarını Stoklanması (freezing medium)
- MTT Yöntemi ile Hücre Canlılıklarının Belirlenmesi
- Tripan Mavisi Yöntemi ile Antiproliferatif Aktivitenin Belirlenmesi
- Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

2.2.6.1 Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

Bitki özütlerinin *in vitro* antikanser aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, ticari olarak ATCC (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu, ABD)'den satın alınan insan kanser hücre hatları: A549 (akciğer karsinoma), H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve C6 (beyin glioma) hücre hatları ve kanserli olmayan HUVEC (insan göbük ven endotel hücreleri) kontrol hücre hatları kullanılmıştır.

2.2.6.2 Hücre Besiyerlerinin Hazırlanması

HUVEC ve C6 Glioma hücre soyları DMEM/Ham's F12 (Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): Ham's F12 nutrient medium (1:1), ThermoFisher Scientific) içeren besi ortamında, A549 ve H1299 Akciğer hücre soyları ise RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium -RPMI, ThermoFisher Scientific) içeren besiyerinde çoğaltılmıştır. HUVEC ve C6 hücreleri; %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco®), %1 antibiyotik (100U/mL penisilin-100µg/mL streptomisin (Pan Biotech) ve %1 L- glutamin (Pan Biotech) içeren 5ml DMEM: Ham's F12 (1:1) besiyeri içerisinde; A549 ve H1299 Akciğer hücreleri ise; %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco®), %1 antibiyotik

(100U/mL penisilin-100µg/mL streptomisin (Pan Biotech) ve %1 L-glutamin (Pan Biotech) içeren 5ml RPMI besiyeri içerisinde yetiştirilerek pasajlanmıştır.

2.2.6.3. Hücre Hatlarını Stoklanması (freezing medium)

Hücre hatlarından, DMSO ve besiyeri içeren karışım ile hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonları 1 ml (yaklaşık 1×10^6 hücre/ml) steril 2 ml kriyovialler içerisine alınarak, sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve yaklaşık 24 saat sıvı azotta bekletildikten sonra -80°C 'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

2.2.6.4. Bitki Özütlерinin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki türlerinden elde edilen farklı özütlерin *in vitro* antikanser etkinliklerinin belirlenmesi için sitotoksikite temeline dayanan ve ilk kez Mosmann ve arkadaşları tarafından (1983) belirlenmiş olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi kullanılmıştır. Tez çalışmalarında MTT yöntemi daha önceki yayınlarda belirtildiği şekilde kısmen modifiye edilerek uygulanmıştır (Gezici, 2018; Gezici, 2019). Çalışmaya dâhil edilen hücre hatları 96 kuyucuklu ELISA kültür kaplarına her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilecek ve 37°C 'de, %5 CO_2 içeren ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin ekim yapıldığı her bir kuyucuğa su ve etanol çözücülerini kullanılarak elde edilen bitki özütlерinin farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Bitki özütleri ile muamele edilen hücreler 37°C 'de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında her bir kuyucuğa 50µl MTT (Sigma-Aldrich) (5mg/mL) solüsyonu ilave edilerek karanlık ortamda 37°C 'de %5 CO_2 ihtiva eden inkibatörde 4 saat inkübe edilmiş ve MTT solüsyonuna tabii bıraktığımız hücrelerde mavi-mor renkli formazan kristalleri oluşumu gözlenmiştir. Formazan kristalleri SDS yardımıyla çözülmüş ve oluşturdukları absorbans değerleri spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir özütl ve her bir hücre hattı için, hücrelerin %50'sini inhibe eden IC_{50} (µg/mL) değerleri hesaplanmıştır.

2.2.6.5. Bitki Özütlerrinin Antiproliferatif Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki özütlerrinin antiproliferatif aktiviteleri, daha önce Strober (2001) tarafından belirlenen tripan mavisi (trypan blue exclusion) yöntemi kullanılarak A549, H1299 ve C6 ve HUVEC hücre hatlarına karşı analiz edilmiştir. Bu yöntemde, DMSO ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki özütlerrinin, zamana ve konsantrasyona bağlı hücre canlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bitki özütlerreri ile muamele edilen kanserli hücre hatları 37 °C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda hücreler sayılmıştır. Sayım işlemi için, 100 µL hücre toplanmış ve 1 mL % 0.05 tripsin-EDTA ilave edilmiştir ve daha sonra fosfat tamponlu tuzlu su (PBS, Sigma-Aldrich, ABD) ile hücreler yıkanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj (ThermoFisher Scientific) edilerek toplanmıştır. Süpernatantın çıkarılmasından sonra, hücre peletine (hücre süspansiyonununun 1:1 seyreltilmesi) 20 uL% 0.4 tripan mavisi çözeltisi ilave edilmiştir. Hücre canlılığı mikroskop (Nicon, Japonya) altında belirlenmiş ve sonrasında canlı hücreler, otomatik hücre sayım cihazında sayılmıştır.

2.2.6.6 Hücrelerin Sayılması

Bitki özütlerrinin sitotoksik ve antiproliferatif etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile, hücre hatları bitki özütü uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra hücre sayım cihazında (Cedex XS Analyzer, Roche) sayılmıştır. Hücrelerdeki canlılık yüzdeleri aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

Hücrelerin % Canlılık Oranı = $[100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalaması}) / (\text{Kontrol hücre absorbansı ortalaması} - \text{kör ortalaması})]$

2.2.7 İstatistiksel Analizler

Analizler sonucunda elde edilen veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak ifade edilmiş olup, her bir analiz en az üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. İstatistiksel analiz için GraphPad InStat version 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. İkili grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında Student t testi, üçlü grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında ise ANOVA testinden yararlanılmıştır. Elde edilen skorlar Mann Whitney U testi ile değerlendirilerek p<0.05 değeri istatistiksel olarak önemli, p<0.01 değeri ise çok önemli olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Gaziantep ve çevresinde doğal olarak yetişen iki farklı *Astragalus* spp. türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarından farklı çözücüler ile elde edilen özütlerin toplam polifenolik içerikleri, antioksidant kapasiteleri ve insan kanser hücre hatları üzerinde antikanser ve antiapoptotik, potansiyellerinin araştırıldığı bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

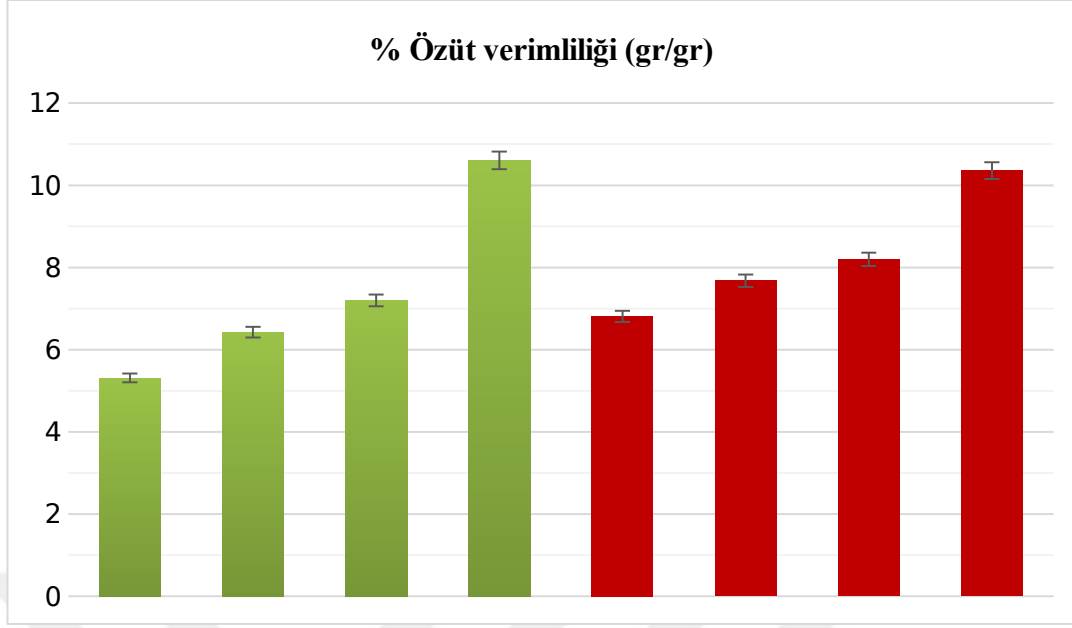
3.1. Özüt Verimliliği

Bitki türleri başlangıç miktarları 40 gram olacak şekilde özütleme işlemine tabi tutulmuş olup, elde edilen özüt miktarları yüzde özüt verimliliği (gr/gr) olarak Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bitki türlerinin başlangıç miktarları ve özüt verimliliği (gr/gr)

| <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD türünün özüt verimliliği (% gr/gr) | | | |
|---|--------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | Bitki özütü | Başlangıç miktarı (gr) | Özüt verimliliği (gr) |
| Su özütü | toprak altı | 40 gr | 5,312575 |
| | toprak üstü | 40 gr | 6,426 |
| Etanol özütü | toprak altı | 40 gr | 7,1985 |
| | toprak üstü | 40 gr | 10,6065 |
| <i>A. neurocarpus</i> BOISS türünün özüt verimliliği (% gr/gr) | | | |
| | Bitki özütü | Başlangıç miktarı (gr) | Özüt verimliliği (gr) |
| Su özütü | toprak altı | 40 gr | 6,812 |
| | toprak üstü | 40 gr | 7,676 |
| Etanol özütü | toprak altı | 40 gr | 8,198 |
| | toprak üstü | 40 gr | 10,356 |

Şekil 3.1’de görüldüğü gibi, etanol ile elde edilen özütler su özütlerine göre daha yüksek miktarda özüt verimliliğine sahiptir. Çalışmaya dâhil edilen her iki *Astragalus* türünün toprak üstü kısımlardan, kök kısımlarına nazaran daha fazla miktarda özüt elde edilmiştir.



Şekil 3.1 Bitki türlerine ait yüzde özüt verimliliği

[TAS: Toprak altı su özütü; TUS: Toprak üstü su özütü; TAE: Toprak altı etanol özütü; TUE: Toprak üstü etanol özütü]

Türkiye florası için endemik olan *Astragalus argaeus* bitkisinin toprak üstü ve altı kısımlarından elde edilen metanollü ekstratların, ekstre veriminin kuru madde üzerinden sırasıyla %19.31 ve %15.60 olarak tespit etmişlerdir (Albayrak ve Kaya, 2019). Teyeb ve ark. (2012) ise *Astragalus gombiformis* Pomel bitkisinin toprak üstü ve kök kısımlarının metanollü ekstresi eldesinde, ekstre verimini %10.10 – 20.08 arasında belirlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen ekstre verimleri araştırmacıların elde ettikleri verimlere göre daha düşüktür. Kullanılan çözücülerin kimyasal yapısına, özütlenen bitki ve bu bitkinin farklı kısımlarının fitokimyasal kompozisyonuna bağlı olarak özüt verimleri değişmekte, bu da bitkinin farklı kısımlarından elde edilen özütlerin verimine etki etmekte ve biyolojik olarak etkinliğinde önem arz etmektedir.

3.2. Toplam Fenolik Madde İçeriği

Bitki özütlerinin toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesi amacıyla, özütler başlangıç konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmış ve en az beş dilüsyon yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. *A. elongatus*

subsp. *nucleiferus* WILLD ve *A. neurocarpus* BOISS türlerinin toplam fenolik madde miktarları mg/g gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Bitki özütlerinin toplam fenolik madde içeriği

| Bitki Türü | Bitki Özütü ^a | Fenolik madde içeriği (mg/g GAE) ^b |
|---|--------------------------|--|
| <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD | TAS | 145.368 ± 0.561** |
| | TÜS | 96.344 ± 0.780* |
| | TAE | 119.777 ± 1.342** |
| | TÜE | 151.438 ± 1.203** |
| <i>A. neurocarpus</i> BOISS | TAS | 110.755 ± 1.686* |
| | TÜS | 91.342 ± 0.841* |
| | TAE | 102.847 ± 0.120** |
| | TÜE | 117.153 ± 1.063** |

^a (TAS: Toprak altı su özütü; TÜS: Toprak üstü su özütü; TAE: Toprak altı etanol özütü; TÜE: Toprak üstü etanol özütü)

^b Veriler mg/g GAE ± SS (standart sapma) olarak ifade edilmiştir.

* $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$

Çalışmaya dâhil edilen bitki türlerinden *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD türünün toplam fenolik madde içeriğinin daha yüksek olduğu yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Genel olarak, bitki türlerinin farklı kısımları arasında fenolik madde içeriği bakımından ciddi bir farklılık gözlenmemekle birlikte; toprak üstü kısımlarının daha yüksek fenolik içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 3.2’de verildiği gibi, en yüksek fenolik madde içeriği *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD türünün toprak üstü etanol özütlerinde (151.438±1.203 mg/g GAE, $p < 0.01$), en düşük seviyede fenolik madde içerdiği ise *A. neurocarpus* BOISS bitki türünün toprak üstü kısmından su ile elde edilen özütünde belirlenmiştir (91.342±0.841 mg/g GAE, $p < 0.05$).

Çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde geleneksel ilaç olarak kullanılan veya sağlıklı bir yaşam için koruyucu hekimlikte önemli roller üstlendiği inanılan tıbbi ve aromatik bitkilerdeki fenolik maddelerin oranı ve bileşimi büyük önem taşımaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerle ilgili olarak yapılan önceki çalışmalarda toplam fenolik madde miktarları oldukça farklı bulunmuştur. Ürdün’de yayılış gösteren 51 bitkinin toplam fenolik içeriği ile antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Bu araştırmada incelenen bitkiler arasında, *Astragalus berytheus* Boiss. ve Blanche ve *Astragalus peregrinus* Vahl. bitkileri de değerlendirilmiştir. Bu çalışmada ele alınan *Astragalus* türleri için toplam fenolik içerikleri sırasıyla 11.7±0.4 mg GAE/g ve 14.6±0.3 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir.

Çin’de kullanılan otuz tıbbi bitkinin antioksidan aktivitelerini ve fenolik içeriklerini ferrik indirgeyici antioksidan güç testi ve Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak değerlendirilmişlerdir. Bitkilerin ekstraktlarını geleneksel yöntemle suda kaynatarak ve %80 metanol ile elde ettikleri çalışmada, hem su hem de metanol ekstraktlarında antioksidan ile toplam fenolik içerik arasında anlamlı ve doğrusal bir korelasyon tespit etmişlerdir. Çalışmada değerlendirilen *Astragalus complanatus* R. Br. ve *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. total fenolik madde içerikleri sırasıyla 10.3 ± 0.10 mg GAE/g ve 5.27 ± 0.06 mg GAE/g olarak belirlenmiştir (Wong ve ark., 2006).

Keskin ve ark. (2018) tarafından yürütülen ve *Astragalus diptherites* var. *diptherites* ile *Astragalus gymnaopecias* türlerinin gövde ve kök kısımlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, en yüksek toplam fenolik madde miktarı ($76.1 \mu\text{g GAE/mg}$ ekstre) *A. diptherites* bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinden, en düşük değer ($48.2 \mu\text{g GAE/mg}$ ekstre) ise aynı türün köklerinin aseton ekstresinden elde edilmiştir. Asgarpanah ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Astragalus squarrosus* Bunge. bitkisinin etanol ekstrelerinde toplam fenolik madde içeriğinin 23.3 mg/g olduğunu tespit etmişlerdir. Li ve ark. (2019) *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* bitkisinin çiçeklerinin fitokimyasal karakterizasyonu ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada; elde ettikleri farklı fraksiyonlara göre toplam fenolik madde miktarını kuru ağırlık üzerinden 12.29 ± 0.52 mg klorojenik asit/mg ile 108.42 ± 0.89 mg klorojenik asit/mg arasında bulmuşlardır. Başka bir çalışmada ise *Astragalus gombiformis* Pomel bitkisinin farklı bitki kısımlarının metanollü ekstresindeki toplam fenolik madde oranı 3.340 ± 0.491 ile 9.194 ± 0.273 mg GAE/g kuru madde arasında tespit edilmiştir (Teyeb ve ark., 2012). Zengin ve ark. (2016), *Astragalus lagurus* bitki türünün etil asetat, metanol ve sulu ekstrelerinde toplam fenolik madde miktarını 20.34 ile 20.72 mg GAEs/g arasında belirlemişlerdir.

Yukarıda görüldüğü üzere farklı iklimlerde ve farklı *Astragalus* türleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen fenolik madde miktarları oldukça farklılık göstermektedir. Bilindiği üzere tıbbi ve aromatik bitkilerde etken madde oranı ve bileşimi bitki türü, bitki kısımları, bitkinin yetiştirme koşulları, hasat zamanı, analizlerde kullanılan bitki kısımlarının tazeliği gibi pek çok faktör tarafından etkilenmektedir. Ayrıca, değişik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstrelerin de sekonder madde içerikleri ve

bileşimleri oldukça farklı olabilmektedir. Bu çalışmada elde edilen fenolik madde değerleri, önceki çalışmalara göre oldukça yüksek değerlere sahiptir. Bu durum yukarıda belirtilen birçok faktörden kaynaklanmış olabilir.

3.3. Toplam Flavonoit Madde İçeriği

Toplam flavonoit madde içeriğinin belirlenmesi analizlerinde de, bitki özütleri başlangıç konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde alınmış ve en az beş dilüsyon yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Bitki türlerinin toplam flavonoit madde miktarları mg/g kersetin eşdeğeri (QE) olarak Çizelge 3.3’de verilmiştir. Toplam fenolik madde içerik sonuçlarına benzer şekilde, *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD türünün toplam flavonoit madde içeriğinin *A. neurocarpus* BOISS türünden genel itibari ile daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Bitki türlerinin toplam flavonoit madde içeriği

| Bitki Türü | Bitki Özütü ^a | Flavonoit madde içeriği (mg/g QE) ^b |
|---|--------------------------|--|
| <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD | TAS | 73.309 ± 1.022* |
| | TÜS | 119.622 ± 0.965* |
| | TAE | 70.954 ± 0.560** |
| | TÜE | 125.347 ± 1.105** |
| <i>A. neurocarpus</i> BOISS | TAS | 42.088 ± 0.732** |
| | TÜS | 108.224 ± 0.455* |
| | TAE | 49.735 ± 1.562* |
| | TÜE | 179.339 ± 1.020** |

^a (TAS: Toprak altı su özütü; TÜS: Toprak üstü su özütü; TAE: Toprak altı etanol özütü; TÜE: Toprak üstü etanol özütü)

^b Veriler mg/g GAE ± SS (standart sapma) olarak ifade edilmiştir.

*p<0.05 ve **p<0.01

Çizelge 3.3’de verildiği gibi, bitki türlerinin toprak üstü aksamlarından elde edilen özütler daha yüksek miktarda flavonoit madde içeriğine sahiptir. En yüksek flavonoit madde içeriği *A. neurocarpus* BOISS türünün toprak üstü etanol özütünde (179.339±1.020 mg/g QE, p<0.01) tespit edilirken; en düşük flavonoit içeriği ise, yine aynı bitki türünün toprak altı aksamından elde edilen su özütünde (42.088±0.732 mg/g QE, p<0.01) belirlenmiş olup, bunu sırasıyla etanol özütü (49.735±1.562 mg/g QE, p<0.05) takip etmektedir.

Toplam polifenolik (fenolik ve flavonoit) madde miktarı belirleme analizlerinden elde edilen veriler doğrultusunda; genel olarak bitki türlerinin toprak üstü aksamlarından

elde edilen özütlerin fenolik ve flavonoit madde içerikleri toprak altı kısımlarına oranla daha yüksek bulunmuştur. Çözücü farklılıklarından kaynaklanan toplam fenolik ve flavonoit içeriklerindeki değişimlere bakıldığı zaman, su ile elde edilen özütlerin içeriği etanol özütlerinden daha yüksektir veya etanol özütleri daha yüksek içeriğe sahiptir şeklinde bir genelleme yapılamamaktadır. Bitki türüne ve toprak altı/üstü kısımlarına göre içerik miktarı değişkenlik göstermektedir.

Astragalus diphtherites var. *diphtherites* ile *Astragalus gymnaopecias* türlerinin gövde ve kök kısımlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, en yüksek toplam flavonoit madde miktarı (80.15 µg QE/mg ekstre), *A. gymnaopecias* bitkisinin toprak üstü kısımlarının aseton ekstresinden elde edilirken, en düşük değer (4.23 µg QE/mg ekstre) aynı bitki türünün köklerinin etil asetat ekstrelerinde belirlenmiştir (Keskin ve ark., 2018). Asgarpanah ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *Astragalus squarrosus* Bunge. bitkisinin etanol ekstrelerinde toplam flavonoit madde içeriğinin 26.0 mg/g olduğunu belirlemişlerdir. *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* bitkisinin çiçeklerinin fitokimyasal karakterizasyonu ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada; farklı fraksiyonlara göre toplam flavonoit madde miktarı kuru ağırlık üzerinden 6.58 ± 0.39 mg rutin/mg ile 265.71 ± 21.51 mg rutin/mg arasında tespit edilmiştir Li ve ark. (2019).

Diğer bir çalışmada ise *Astragalus gombiformis* Pomel bitkisinin farklı bitki kısımlarının metanollü ekstresindeki toplam flavonoit madde oranı 0.767 ± 0.051 ile 3.133 ± 0.344 mg kateşin/g kuru madde arasında bulunmuştur (Teyeb ve ark., 2012). *Astragalus lagurus* bitkisinin etil asetat, metanol ve sulu ekstrelerinde toplam flavonoit madde miktarı 219.58-31.10 mg REs/g arasında tespit edilmiştir (Zengin ve ark., 2016).

Bu çalışmada elde edilen toplam flavonoit madde miktarı değerleri farklı *Astragalus* türleri ile daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Önceki çalışmaların sonuçları ile bu çalışmada elde edilen değerlerin farklılığın, çalışılan bitki türünün farklılığı, analize konu olan bitki kısımlarının değişik olması, bitkinin yetiştirme koşulları, toplama veya hasat zamanı, laboratuvar analizlerinde kullanılan bitki kısımlarının tazeliği ve çözücü farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

3.4.Bitki Özütlelerinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Bitki özütlelerinin antioksidan kapasitesi DPPH serbest radikal süpürme aktivitesine göre yapılmıştır. DPPH analizleri öncesinde bitki özütlelerinin farklı konsantrasyonları (62.5, 125, 250, 500 ve 1000µg/mL) hazırlanmış ve yüzde inhibisyonları hesaplanmıştır. Bitki türlerinden elde edilen özütlelerin konsantrasyona bağlı olarak serbest radikal giderim kapasiteleri yüzde inhibisyon olarak Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.4 *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD özütlelerinin konsantrasyona bağlı DPPH serbest radikal giderim kapasitesi

| | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
|---|----------------------|--------------------|--------------------|
| Toprak üstü kısım – su özütü | 1000µg/mL | 0,106 | 82,003 |
| | 500µg/mL | 0,117 | 80,135 |
| | 250µg/mL | 0,198 | 66,383 |
| | 125µg/mL | 0,291 | 50,594 |
| | 62,5µg/mL | 0,318 | 46,011 |
| | | | |
| Toprak altı kısım – su özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,261 | 55,687 |
| | 500µg/mL | 0,313 | 46,859 |
| | 250µg/mL | 0,378 | 35,823 |
| | 125µg/mL | 0,451 | 23,429 |
| 62,5µg/mL | 0,523 | 11,205 | |
| | | | |
| Toprak üstü kısım – etanol özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,103 | 82,512 |
| | 500µg/mL | 0,146 | 75,212 |
| | 250µg/mL | 0,187 | 68,251 |
| | 125µg/mL | 0,219 | 62,818 |
| 62,5µg/mL | 0,37 | 37,181 | |
| | | | |
| Toprak altı kısım – etanol özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,127 | 78,438 |
| | 500µg/mL | 0,174 | 70,458 |
| | 250µg/mL | 0,311 | 47,198 |
| | 125µg/mL | 0,41 | 30,390 |
| 62,5µg/mL | 0,486 | 17,487 | |

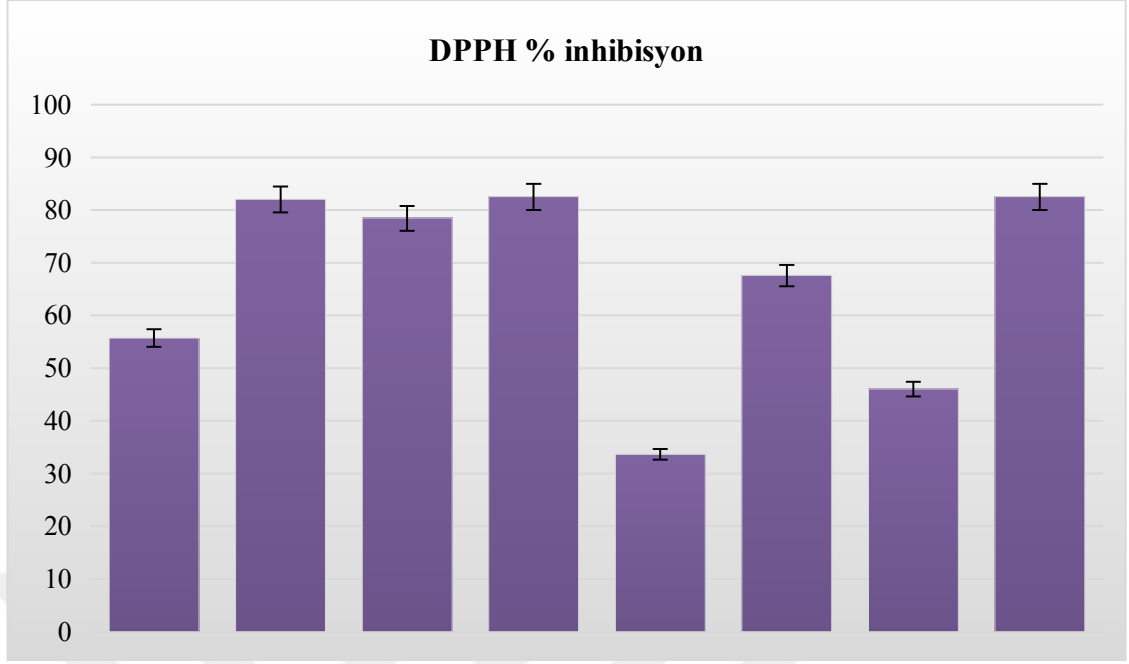
Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5’de özetlendiği üzere, bitki özütlelerinin konsantrasyonları arttıkça DPPH radikali üzerine inhibisyon kapasiteleri de artmaktadır. Çalışmaya dâhil edilen *Astragalus* türlerinin toprak üstü aksamaları, toprak altı kök kısmına kıyasla daha yüksek seviyede antioksidan kapasite göstermiştir. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkisinin toprak üstü kısmından elde edilen özütlelerde, su ve etanol özütlelerinin

DPPH serbest radikal süpürme kapasiteleri birbirine çok yakın değerlerde bulunurken, en düşük serbest radikal giderim kapasitesi toprak altı aksamının su özütünde (% 55.687±1.060 inhibisyon, 1000µg/mL) belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 *A. neurocarpus* BOISS özütlerinin konsantrasyona bağlı DPPH serbest radikal giderim kapasitesi

| | | | |
|---|----------------------|--------------------|--------------------|
| Toprak üstü kısım – su özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,191 | 67,573 |
| | 500µg/mL | 0,317 | 46,179 |
| | 250µg/mL | 0,395 | 32,937 |
| | 125µg/mL | 0,432 | 26,655 |
| | 62,5µg/mL | 0,46 | 21,901 |
| Toprak altı kısım – su özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,391 | 33,616 |
| | 500µg/mL | 0,45 | 23,599 |
| | 250µg/mL | 0,493 | 16,298 |
| | 125µg/mL | 0,52 | 11,714 |
| | 62,5µg/mL | 0,575 | 2,376 |
| Toprak üstü kısım – etanol özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,103 | 82,510 |
| | 500µg/mL | 0,142 | 75,891 |
| | 250µg/mL | 0,187 | 68,251 |
| | 125µg/mL | 0,261 | 55,687 |
| | 62,5µg/mL | 0,389 | 33,955 |
| Toprak altı kısım – etanol özütü | konsantrasyon | DPPH Değeri | %inhibisyon |
| | 1000µg/mL | 0,318 | 46,015 |
| | 500µg/mL | 0,414 | 29,711 |
| | 250µg/mL | 0,497 | 15,619 |
| | 125µg/mL | 0,534 | 9,337 |
| | 62,5µg/mL | 0,58 | 1,528 |

A. neurocarpus BOISS türünün, toprak üstü aksamından elde edilen özütler daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki türünde olduğu gibi, en yüksek DPPH serbest radikal giderim kapasitesi *A. neurocarpus* BOISS bitkisi toprak üstü kısmının etanol özütünde (%82.510±1.641 inhibisyon, 1000µg/mL) tespit edilmiştir. Bitkinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarından etanol ile elde edilen özütlerin en yüksek bitki konsantrasyonunda DPPH inhibisyon kapasiteleri (%82.510±1.641 ve 67.573±0.906 inhibisyon, sırasıyla), su ile elde edilen özütlerle kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge3.5).



Şekil 3.2 Bitki özütlerinin DPPH serbest radikal giderim kapasitesi

Çalışmada kullanılan *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD ve *A. neurocarpus* BOISS bitki özütlerinin analiz edilen en yüksek konsantrasyon olan 1000µg/mL'deki DPPH serbest radikal giderimi yüzde inhibisyon değeri olarak Şekil 3.2'de verilmiştir. Çalışmada ticari olarak satın alınan askorbik asit (AA) standart antioksidan olarak kullanılmış olup, yüzde inhibisyon değeri 77.680 ± 0.548 olarak hesaplanmıştır.

Haşimi ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, Anadolu'da yetişen üç endemik *Astragalus* türünün (*Astragalus leporinus* var. *hirsutus*, *Astragalus distinctissimus* ve *Astragalus schizopterus* kimyasal içeriği ile bazı biyolojik aktivitelerini belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre; çalışılan *Astragalus* türlerinden *A. schizopterus* türünün metanollü ekstresinin lipit peroksidasyon ($19,62 \pm 0,29$), DPPH serbest radikal ($54,61 \pm 0,38$), ABTS katyon radikali süpürücü aktivitesi ($22,01 \pm 0,07$), ve CUPRAC yönteminde en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada; *Astragalus lagurus* bitkisinin etil asetat, metanol ve sulu ekstralarının antioksidan kapasitesi farklı yöntemlerle araştırılmış olup, bitkinin sulu ekstraları yüksek oranda aktivite göstermiştir. Çalışmada elde edilen değerler; DPPH (20.65 mg TEs/g), ABTS (67.43 mg TEs/g), CUPRAC (73.98 mg TEs/g) ve FRAP (53.49 mg TEs/g), Amilaz ve -glukosidaz inhibisyonları (0.12-0.56 ve 1.45-1.82 mmol ACAEs/g) şeklindedir (Zengin ve ark., 2016). *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* bitkisinin çiçeklerinin

fitokimyasal karakterizasyonu ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada; farklı fraksiyonlara ve antioksidan kapasite belirleme yöntemlerine ile elde edilen sonuçlara göre; BHT ($25.28 \pm 0.59 \mu\text{g/mL}$) ile kıyaslandığında, en yüksek antioksidan kapasite $35.10 \mu\text{g/mL}$ IC_{50} değeri le DPPH yönteminden elde edilmiştir. Ayrıca, farklı fraksiyonlar için kullanılan değişik antioksidan kapasite belirleme yöntemleri arasında da belirgin farklılıklar ortaya konulmuştur (Li ve ark. 2019). Farklı bir çalışmada, *Astragalus argaeus* Boiss. bitkisinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarından elde edilen metanollü ekstrelerin antioksidan kapasiteleri araştırılmış olup, çalışma sonunda, farklı bitki kısımlarına göre antioksidan aktivite değeri $108.40 \pm 0.2 - 121.56 \pm 1.8 \text{ mg AAE/g}$, β –karoten İnhibisyon değeri $\%37.31 \pm 0.0 - 47.26 \pm 1.72$, DPPH için IC_{50} değeri $194.28 - 140.96 \mu\text{g/ml}$, H_2O_2 için IC_{50} değeri $187.93 - 212.65 \mu\text{g/ml}$ ve FRAP değeri ise $0.49 - 0.68 \text{ mM/L}$ arasında tespit edilmiştir (Albayrak ve Kaya, 2019).

Yukarıda görüldüğü üzere farklı *Astragalus* türlerinin değişik bitki kısımlarından farklı çözücülerle elde edilen ekstrelerin değişik antioksidan kapasite belirlenme yöntemleri ile araştırılması sonucunda birbirinden oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin farklı antioksidan kapasite göstermeleri oldukça normal karşılanmakta olup, çalışmalarda ortaya çıkan farklı sonuçların, araştırmaya konu olan bitki türünün farklılığı, kullanılan bitki kısımları değişik olması, toplanan veya üretilen bitkinin yetiştirme koşullarının farklılığı, hasat zamanının farklı olması, analizlerde kullanılan bitki kısımlarının tazeliği ve daha birçok etkenden kaynaklanmış olabileceği ve kullanılan çözücüler, kimyasallar ve analiz yöntemlerinin de sonuçları önemli düzeyde etkilemiş olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, *Astragalus* türlerinin bileşimlerindeki fenolik ve flavonoit maddeler dolayısıyla önemli antioksidan kaynağı olarak öne çıkmaktadır.

3.5. Bitki Özütlерinin Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi

Astragalus türlerinden elde edilen özütlерin antikanser aktiviteleri sitotoksik potansiyellerine bağlı olarak $62,5$ ile $1000 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında insan akciğer kanseri (A549 ve H1299) ve beyin glioma (C6) hücrelerine karşı test edilmiştir. Konsantrasyona ve uygulama zamanına bağlı olarak sitotoksik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Her bir hücre hattına karşı bitki özütlерinin IC_{50} değeri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.6 Bitki özütlerinin A549 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri

| Bitki Türü | Bitki Özütü ^a | IC ₅₀ değeri (µg/mL) ^b |
|---|--------------------------|--|
| <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD | TAS | 6.144 ± 0.025** |
| | TÜS | 10.081 ± 1.145* |
| | TAE | 8.156 ± 0.182** |
| | TÜE | 13.072 ± 0.640** |
| <i>A. neurocarpus</i> BOISS | TAS | 8.204 ± 0.102** |
| | TÜS | 14.108 ± 0.651* |
| | TAE | 11.125 ± 0.469** |
| | TÜE | 16.020 ± 1.020** |
| Dokсорubisin ^c | | 4.210 ± 0.032 |
| DMSO (dimetil sülfoksit) ^d | | 0 |

^a (TAS: Toprak altı su özütü; TÜS: Toprak üstü su özütü; TAE: Toprak altı etanol özütü; TÜE: Toprak üstü etanol özütü)

^b Veriler IC₅₀ (µg/mL) ± SS (standart sapma) olarak ifade edilmiştir (n=3).

^c Dokсорubisin, pozitif kontrol

^d DMSO, ngative kontrol

*p<0.05 ve ** p<0.01

Antikanser aktivite analizlerinde, A549 akciğer karsinoma hücrelerine karşı *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki özütleri IC₅₀ değerleri 6.144±0.025 ile 13.072±0.640 µg/mL arasında değişen aralıkta olmak üzere diğer bitki türünden daha etkili bulunmuştur. Test edilen her iki bitki türünün, toprak altı kısmından elde edilen özütler toprak üstü aksamından elde edilen özütlerden daha yüksek antikanser aktivite göstermiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.7 Bitki özütlerinin H1299 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri

| Bitki Türü | Bitki Özütü ^a | IC ₅₀ değeri (µg/mL) ^b |
|---|--------------------------|--|
| <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD | TAS | 5.815 ± 0.468* |
| | TÜS | 7.863 ± 0.140** |
| | TAE | 7.166 ± 1.011* |
| | TÜE | 10.750 ± 0.161** |
| <i>A. neurocarpus</i> BOISS | TAS | 11.004 ± 0.662* |
| | TÜS | 18.860 ± 1.001* |
| | TAE | 15.102 ± 0.079** |
| | TÜE | 21.560 ± 0.910* |
| Dokсорubisin ^c | | 4.210 ± 0.032 |
| DMSO (dimetil sülfoksit) ^d | | 0 |

^a (TAS: Toprak altı su özütü; TÜS: Toprak üstü su özütü; TAE: Toprak altı etanol özütü; TÜE: Toprak üstü etanol özütü)

^b Veriler IC₅₀ (µg/mL) ± SS (standart sapma) olarak ifade edilmiştir (n=3).

^c Dokсорubisin, pozitif kontrol

^d DMSO, ngative kontrol

* $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$

H1299 hücrelerine karşı en yüksek antikanser aktivite *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkisinin toprak altı su özütlerinde ($IC_{50} = 5.815 \pm 0.468 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$) saptanmıştır, bunu sırası ile bitkinin toprak altı etanol ve toprak üstü aksamından su ile elde edilen özütler (IC_{50} değerleri sırasıyla $7.166 \pm 1.011 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.05$ ve $7.863 \pm 0.140 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$) takip etmiştir. Benzer şekilde *A. neurocarpus* BOISS türünün toprak üstü kısmından etanol ile elde edilen özütü $21.560 \pm 0.910 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$) IC_{50} değeri ile test edilen kanser hücre hattına karşı en düşük antikanser aktivite göstermiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8 Bitki özütlerinin C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri

| Bitki Türü | Bitki Özütü ^a | IC_{50} değeri ($\mu\text{g/mL}$) ^b |
|---|--------------------------|--|
| <i>A. elongatus</i> subsp. <i>nucleiferus</i> WILLD | TAS | $10.683 \pm 0.195^{**}$ |
| | TÜS | $12.691 \pm 0.462^{**}$ |
| | TAE | $16.011 \pm 1.150^*$ |
| | TÜE | $18.247 \pm 0.120^*$ |
| <i>A. neurocarpus</i> BOISS | TAS | $16.522 \pm 1.201^{**}$ |
| | TÜS | $24.088 \pm 1.012^*$ |
| | TAE | $20.475 \pm 0.116^{**}$ |
| | TÜE | $29.210 \pm 0.315^{**}$ |
| Doksorubisin ^c | | 4.210 ± 0.032 |
| DMSO (dimetil sülfoksit) ^d | | 0 |

^a (TAS: Toprak altı su özütü; TÜS: Toprak üstü su özütü; TAE: Toprak altı etanol özütü; TÜE: Toprak üstü etanol özütü)

^b Veriler IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm SS (standart sapma) olarak ifade edilmiştir ($n=3$).

^c Doksorubisin, pozitif kontrol

^d DMSO, negatif kontrol

* $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$

MTT analizleri sonucunda; *A. neurocarpus* BOISS bitki türü en yüksek antikanser aktiviteyi A549 akciğer karsinoma hücre hatlarına karşı gösterirken; *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki türü ise H1299 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattına karşı en yüksek aktivite göstermiştir. En düşük antikanser aktivite ise, C6 beyin glioma hücre hattına karşı belirlenmiştir (Çizelge 3.8).

Albayrak ve Kaya (2019) endemik *Astragalus argaeus* türünün toprak üstü ve altı kısımlarından elde edilen ekstraların MCF-7 (insan meme kanser hücre hattı) ve fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini 24 ve 48 saat uygulama sonrasında MTT yöntemi ile belirlemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda, incelenen ekstraların 24 saat sonrasında MCF-7 hücrelerine karşı zayıf sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Teyeb ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Astragalus gombiformis* Pomel. yapraklarından elde edilen ekstraktların sitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Sitotoksik aktivite ise insan akciğer kanser hücrelerinde kolorimetrik MTT analizi ile belirlenmiştir. En güçlü sitotoksik aktivite A549 akciğer epitelyal karsinom hücre hattına karşı diklorometan ekstraktında $IC_{50}=85\pm 21.7 \mu\text{g/mL}$ 'de belirlenirken, bu ekstrakt için en iyi inkübasyon süresi de 48 saat olarak tespit edilmiştir. Aboul-Enein ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada Mısır florasında bulunan 23 bitki ile baharat olarak kullanılan 24 bitkinin su ve etanol ekstraktlarının *in vitro* antikanser aktivitesini incelemişlerdir. Antikanser aktivitelerinin belirlenmesinde Ehrlich Asit Tümör hücrelerinde (EACC) tripan mavisi kullanılırken HepG2 hücrelerine karşı SRB tekniği kullanılmıştır. Aynı çalışmada antioksidan aktivitelerin belirlenmesi için DPPH analizi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda bazı bitkilerin hem su hem de etanol özütlerinin yüksek sitotoksik ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu ve kanser hücrelerinin büyümesini engellediği belirlenmiştir. Bazı bitkilerde etanol ekstraktları daha fazla etkiye sahipken bazı bitkilerde ise su ekstraktlarının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada *Astragalus spinosus*'un antikanser aktivite bakımından su özütünde oldukça etkin olduğu görülürken, antioksidan aktivite de etanol özütünün daha etkin olduğu belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise *Astragalus membranaceus* sulu ekstraktlarının *in vitro* antioksidan ve antitümör etkilerini incelenmiştir. Çalışma sonucunda, bitkinin sulu ekstraktların 2,2'azobis (2-amidinopropan) hidroklorür (AAPH) ile indüklenmiş insan eritrositleri hemolizini de azaltabildiği tespit edilmiştir. Çalışmada, *A. membranaceus* sulu ekstraktlarının insan gastrik hücre hattı (SGC 7901) ve insan hepatom (SMC 7721)

hücrelerinde büyümeyi verilen doz aralığında doza bağlı olarak inhibe edebildiği belirlenmiştir (Peng ve ark. (2011)).

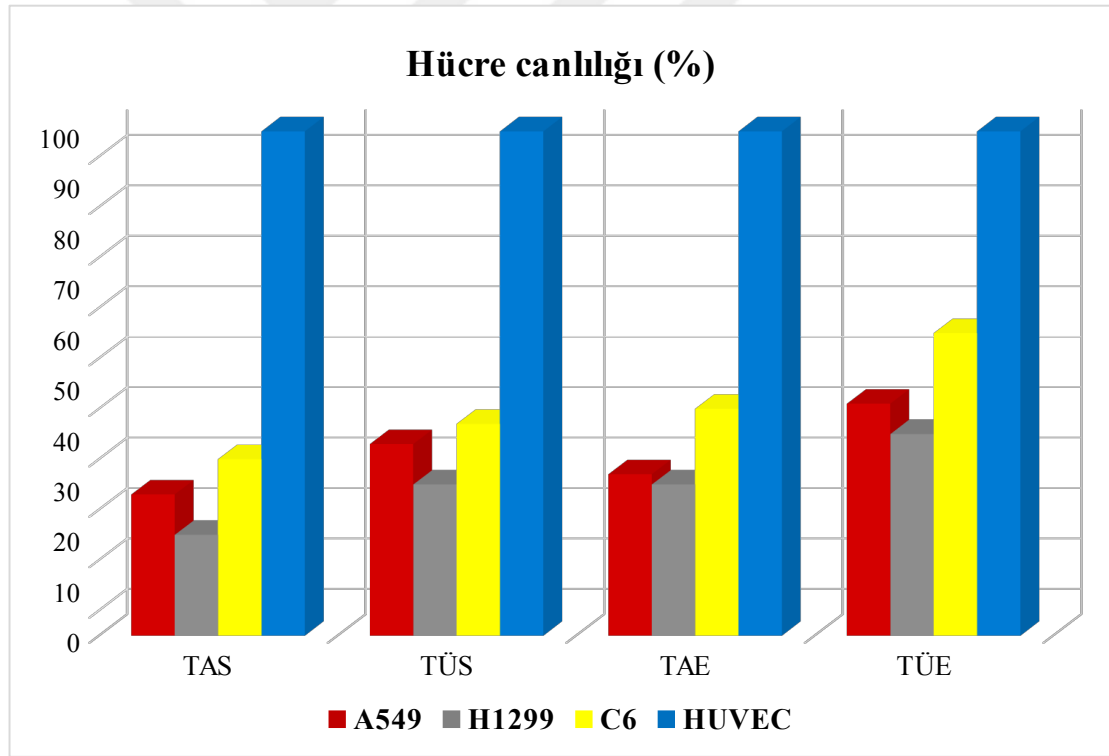
Rui ve ark. (2010) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Fourier dönüşümü infrared (FT-IR) kullanarak analiz ettikleri *Astragalus* polisakkaritlerinin antioksidan aktiviteleri ile polisakkaritlerin ve siRNA'nın antitümör aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, polisakkaritlerin antitümör aktivite de gösterdiği tespit edilmiştir. CD40 geni siRNA plasmidi oluşturularak siRNA antitümör etkisini de değerlendiren ekip *Astragalus* polisakkaritlerinin siRNA'dan daha fazla antitümör etkisi gösterdiğini belirlemişlerdir. Yan ve ark. (2009) ise yapmış oldukları çalışmada affinite kromatografisi metoduyla *A. mongholicikileri* bitkisinin köklerinden özütleyip saflaştırdıkları bir lektin (AMML) molekülünün insanda rahim ağzı kanser hücreleri (HeLa), kemik kanseri hücreleri (MG63) ve kan kanseri hücreleri (K562) üzerindeki çoğalma, ölüm ve hücre döngüsünde büyüme inhibisyonunun sırasıyla, HeLa hücrelerinde (%92)>K562 hücrelerinde (%84)>MG63 hücrelerinde ise (%48) gerçekleştiğini saptamışlardır. Saflaştırılan lektin molekülünün bu hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği çalışma sonucundan anlaşılmıştır. Farklı bir çalışmada; Çin'de yaygın olarak kullanılan bir tıbbi bitki olan *Astragalus membranaceus*'un *in vitro* ve *in vivo* anti-tümör etkileri araştırılmış, *A. membranaceus* kökünden izole edilen 5 biyoaktif fraksiyon arasından murin splenositleri üzerindeki mitojenitesine en etkili olanı AI olarak belirlenen fraksiyon olarak bulunmuştur. Çalışmada, AI fraksiyonunun makrofaj fonksiyonu, tümör nekroz faktörü üretimi, lenfokin ile aktive edilmiş katil hücrelerin indüksiyonu ve tümör hücresi farklılaşması üzerindeki faaliyetleri de incelenmiştir. Çalışma sonucunda, farklı hücre hatlarına uygulanan *A. membranaceus*'un konakçıya ait anti-tümör bağışıklık mekanizmasını harekete geçirerek hem *in vitro* hem de *in vivo* anti-tümör etkileri gösterebileceğini tespit etmişlerdir (Cho ve Leung. 2007).

Farklı *Astragalus* türleri üzerinde yapılan çalışmalar, zengin etken madde içerikleri ile bu bitkilerin kanser tedavisinde bu türlerin önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmaya konu olan *Astragalus* türlerinden elde edilen özütlerin antikanser aktivitelerinin, sitotoksik potansiyellerine bağlı olarak 62,5 ile 1000µg/mL konsantrasyon aralığında insan akciğer kanseri (A549 ve H1299) ve beyin glioma (C6) hücrelerine karşı test edilmiş olup, çalışma sonucunda konsantrasyona ve uygulama zamanına bağlı olarak

sitotoksik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Her bir hücre hattına karşı bitki özütlerinin IC₅₀ değerleri de hesaplanmıştır.

3.6. Bitki Özütlerinin Antiproliferatif Aktivitelerinin Belirlenmesi

A549, H1299 ve C6 kanser hücre hatlarına karşı, *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD ve *A. neurocarpus* BOISS türlerinden elde edilen farklı özütlerin hücre canlılıkları üzerine etkinlikleri tripan mavisi analizleri ile belirlenmiştir. Antikanser aktivite analizlerinde olduğu gibi, bitki özütleri farklı dozlarda (62.5 ile 1000 µg/mL) ve 24, 48 ve 72 saat boyunca hücre hatları üzerine uygulanmıştır. Hücreler farklı zaman dilimlerinde, uygulanan bitki dozuna bağlı olarak sayılmış ve hücre canlılık oranları tespit edilmiştir. Kanserli hücre hatlarından elde edilen hücre canlılık oranları, kontrol amacıyla kullanılan HUVEC hücre hatlarındaki canlılık oranına göre kıyaslanmıştır. Elde edilen veriler yüzde hücre canlılığı olarak Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’de sunulmuştur.

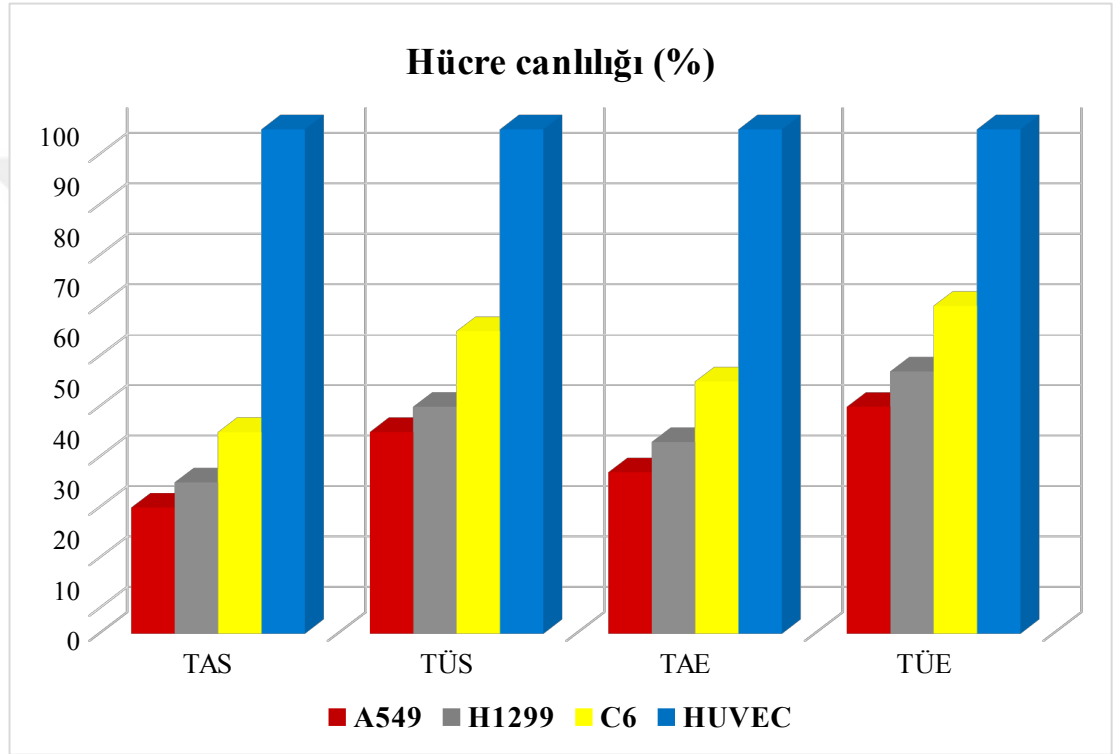


Şekil 3.3 *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD türünün A549, H1299 ve C6 hücre hatlarına karşı hücre canlılık oranları

* Veriler 48 saat uygulama sonrasında hücrelerdeki yüzde canlılık olarak ifade edilmiştir.

** HUVEC hücreleri kontrol hücreler olarak kullanılmış ve canlılık oranları % 100 olarak kabul edilmiştir.

MTT analizleri ile uyumlu olarak, bitki özütleri doz ve zamana bağlı olarak kanserli hücrelerde hücre büyümesini ve canlılığını azaltmıştır. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkisine ait toprak altı su özütü, hücre canlılığını en yüksek oranda H1299 hücre hattına karşı azaltırken, bunu sırası ile %28 ve %35 hücre canlılığıyla A549 ve C6 hücre hatları takip etmektedir. Bitkinin toprak üstü aksamından etanol ile elde edilen özüt ise; hücre canlılığı üzerinde en az etkin olan özüt olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.4 *A. neurocarpus* BOISS türünün A549, H1299 ve C6 hücre hatlarına karşı hücre canlılık oranları

* Veriler 48 saat uygulama sonrasında hücrelerdeki yüzde canlılık olarak ifade edilmiştir.

** HUVEC hücreleri kontrol hücreler olarak kullanılmış ve canlılık oranları % 100 olarak kabul edilmiştir.

A. neurocarpus BOISS türünün ise, toprak altı su özütü, hücre canlılığını en yüksek oranda A549 hücre hattına karşı azaltırken, hücre canlılığındaki en az azalma C6 hücrelerine karşı gözlenmiştir. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki özütleri ile yapılan antiproliferatif aktivite sonuçlarıyla benzer şekilde; *A. neurocarpus* BOISS

bitkisinin de toprak üstü aksamından etanol özütü; hücre canlılığı üzerinde en az etkin olan özüt olarak her üç hücre hattına karşı tespit edilmiştir (Şekil 3.4).

Bu tez çalışması, çalışmaya dâhil edilen *Astragalus* spp. türlerinin akciğer kanseri ve beyin glioma hücre hatlarında, hücre büyümesini doza bağlı bir şekilde engellediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, artan maruz kalma süresi, kanser hücrelerinde hücre büyümesinde önemli bir inhibisyon ile sonuçlanmıştır. İlgili *Astragalus* spp. Türleri, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını *in vitro* koşullar altında önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahip, antikanser bir ajan niteliği taşımaktadır. Ekstraktların antikanser ve büyüme önleyici etkileri, bitkinin daha önce belirlendiği gibi zengin sekonder metabolit bileşenlerinden kaynaklanıyor olabilir (Block ve Mead, 2003; Shao ve ark, 2004; Ionkova ve ark, 2014; Ranjbar ve Mahmoudian, 2015).

Son yüzyılda görülme sıklığı ve ölüm oranı ciddi oranda artış gösteren ve bu nedenle çağımızın hastalığı olarak nitelendirilen kanserin, bitkisel yöntemlerle tedavi edilmesine yönelik alternatif tıp tekniklerine yönelim giderek popüler hale gelmektedir. Kanser hastalığının hızlı ve agresif olarak yayılmasından dolayı uygulanan halihazırdaki tedavi yöntemleri pek başarılı olamamakla birlikte; ilgili kanser hücresi üzerinde spesifik olarak etkili olamamaktadır. Kanser hücrelerine etki ederken, aynı zamanda kanser hücrelerinin çevresindeki tümörlü olmayan hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle hedefe yönelik terapötik ilaçlar ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve antikanser özellikte ilaç eldesi gerekmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren, gıda olarak, endüstriyel ve tıbbi amaçlarla kullanılma potansiyeline sahip olan bitkilerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi, içerdikleri etken maddelerin belirlenmesi, belirlenen etken maddelerin farmasötik alanda ilaç ham maddesi olarak kullanımı ve böylece bitkisel tedavi olanaklarının oluşturulması son derece önemlidir. Bu çalışmada, Gaziantep ve çevresinden toplanan *Astragalus* cinsine ait, *Astragalus elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD (yazı yoncası), *A. neurocarpus* BOISS (çizik geven) türlerinin sahip oldukları toplam polifenolik (fenolik ve flavonoit) içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesinin yanı sıra; farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütlerin sahip oldukları antikanser aktiviteleri kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir. Bu kapsamda, bitki özütlerinin; antikanser, sitotoksik ve antiapoptotik potansiyele sahip olup olmadığı, potansiyel antioksidan kapasiteleri ile kombine edilerek detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur.

Yapılan laboratuvar analizlerinden elde edilen sonuçlara göre;

- Çalışmaya konu olan *Astragalus* türlerinden elde edilen ekstre verimleri; %5.31 ile 10.61 aralığında değişmiş olup, etanol ile elde edilen özütlerin su özütlerine göre daha yüksek miktarda özüt verimliliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen her iki *Astragalus* türünün toprak üstü kısımlardan, kök kısımlarına nazaran daha fazla miktarda özüt elde edilmiştir.
- Toplam fenolik madde içeriği bakımından *Astragalus elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD türünün daha yüksek içeriğe sahip olduğu yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Genel olarak, araştırmaya konu olan türlerin farklı bitki kısımları arasında toplam fenolik madde içeriği bakımından önemli bir farklılık gözlenmemekle birlikte; toprak üstü kısımlarının daha yüksek fenolik içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Toplam flavonoit madde miktarları, toplam fenolik madde içerik sonuçlarına benzer şekilde, *Astragalus elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD türünde, *Astragalus neurocarpus* BOISS türüne göre daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca, bitki türlerinin toprak üstü aksamlarından elde edilen özütler daha yüksek miktarda flavonoit madde içeriğine sahiptir.
- Bitki özütlerinin konsantrasyonları arttıkça DPPH radikali üzerine inhibisyon kapasiteleri de artmaktadır. Çalışmaya dâhil edilen *Astragalus* türlerinin toprak

üstü aksamaları, toprak altı kök kısmına kıyasla daha yüksek seviyede antioksidan kapasite göstermiştir. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkisinin toprak üstü kısmından elde edilen özütlerde, su ve etanol özütlerinin DPPH serbest radikal süpürme kapasiteleri birbirine çok yakın değerlerde bulunurken, en düşük serbest radikal giderim kapasitesi toprak altı aksamının su özütünde belirlenmiştir. *A. neurocarpus* BOISS türünün, toprak üstü aksamından elde edilen özütler daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki türünde olduğu gibi, en yüksek DPPH serbest radikal giderim kapasitesi *A. neurocarpus* BOISS bitkisi toprak üstü kısmının etanol özütünde tespit edilmiştir. Bitkinin toprak üstü ve toprak altı kısımlarından etanol ile elde edilen özütlerin en yüksek bitki konsantrasyonunda DPPH inhibisyon kapasiteleri, su ile elde edilen özütlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

- MTT analizleri sonucunda; *Astragalus neurocarpus* BOISS bitki türü en yüksek antikanser aktiviteyi A549 akciğer karsinoma hücre hatlarına karşı gösterirken; *Astragalus elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki türü ise H1299 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattına karşı en yüksek aktivite göstermiştir. En düşük antikanser aktivite ise, C6 beyin glioma hücre hattına karşı belirlenmiştir.
- MTT analizleri ile uyumlu olarak, bitki özütleri doz ve zamana bağlı olarak kanserli hücrelerde hücre büyümesini ve canlılığını azaltmıştır. *Astragalus elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkisine ait toprak altı su özütü, hücre canlılığını en yüksek oranda H1299 hücre hattına karşı azaltırken, bunu sırası ile %28 ve %35 hücre canlılığıyla A549 ve C6 hücre hatları takip etmektedir. Bitkinin toprak üstü aksamından etanol ile elde edilen özüt ise; hücre canlılığı üzerinde en az etkin olan özüt olarak belirlenmiştir. *Astragalus neurocarpus* BOISS türünün ise, toprak altı su özütü, hücre canlılığını en yüksek oranda A459 hücre hattına karşı azaltırken, hücre canlılığındaki en az azalma C6 hücrelerine karşı gözlenmiştir. *Astragalus elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitki özütleri ile yapılan antiproliferatif aktivite sonuçlarıyla benzer şekilde; *Astragalus neurocarpus* BOISS bitkisinin de toprak üstü aksamından etanol özütü; hücre canlılığı üzerinde en az etkin özüt olarak 3 hücre hattına karşı tespit edilmiştir.

Çalışmaya dâhil edilen *Astragalus* spp. türleri ile (bitkinin toprak altı ve toprak üstü kısımları ayrı ayrı farklı çözücüler ile özütlenerek) daha önce antioksidan, antikanser, ve antiproliferative analizleri içeren kapsamlı bir çalışma yapılmamış olup; ilgili çalışma literatür için ilk veriler niteliğinde özgün bir çalışmadır. Bu nedenle gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen veriler, kanser tedavisinde antikanser ve sitotoksik etkileriyle yararlı olabilecek tıbbi, farmosötik ve farmakolojik çalışmalara ön veri sunmakla birlikte, bu alanda daha sonra yapılacak olan *in vivo* araştırmalara ve klinik çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.



5. KAYNAKLAR

Agzamova A.M. ve Isaev I.M., 1999, Triterpene Glycosides Of Astragalus And Their Genins Lix. Structure Of Cyclocanthoside F, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 35, No. 3.

Ahmed M. Aboul-Enein, Faten Abu El-Ela, Emad A. Shalaby and Hany A. El-Shemy 2012 Traditional medicinal plants research in Egypt: Studies of antioxidant and anticancer activities, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(5), pp. 689-703, 9 February,.

Albayrak, S., Kaya, O., 2019. Türkiye’den Endemik Astragalus argaeus Boiss.’in Antioksidan, Antimikrobiyal ve Sitotoksik Aktivitesi. Hacettepe J. Biol. ve Chem., 2019, 47 (1), 87–97. DOI: 10.15671/HJBC.2019.278

Al-Snafi, Ali Esmail 2015 Chemical Constituents and Pharmacological Effects of Astragalus hamosus and Astragalus triboloides Grown in Iraq, Asian Journal of Pharmaceutical Science ve Technology, Vol: 5, Issue:4, 321-328.

Anonim, 2002, <http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>

Aytaç, Z., Ekici, M., Akan, H. 2012. çizikgeven. Şu sitede: Bizimbitkiler (2013). <<http://www.bizimbitkiler.org.tr>>, [er. tar.: 28 06 2019].

Baytop, T., 1999, Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul, 978-9-754-20021-8.

Bedir E., Çalış İ., Aquino R., Piacente S., Pizza C. and Khan A.I., 2000, A New Flavonoll Glycoside From The Aerial Parts Of Astragalus vulneraria, Chem.Pharm. Bull. 48(12), 1994-1995 pp.

Bedir, E., ve Khan, I. A. 2001. A new cyclolanostanol arabinoside from the rhizome of Cimicifuga racemosa. Pharmazie, 56(3), 268-269.

Bedir, E., Calis, I., Aquino, R., Piacente, S., ve Pizza, C. 1998. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of Astragalus brachypterus and Astragalus microcephalus. J Nat Prod, 61(12), 1469-1472. doi:10.1021/np9801763

Bedir, E., Calis, I., Piacente, S., Pizza, C., ve Khan, I. A. 2000. A new flavonol glycoside from the aerial parts of Astragalus vulneraria. Chem Pharm Bull (Tokyo), 48(12), 1994-1995. doi:10.1248/cpb.48.1994

Boskabady, M. H., Aslani, M. R., ve Kiani, S. 2006. Relaxant effect of Thymus vulgaris on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). Phytother Res, 20(1), 28-33. doi:10.1002/ptr.1796

Burak, L. J., ve Damico, A. 1999. Effects of direct-to-consumer advertising of pharmaceutical products on college students. Health Mark Q, 17(2), 19-29. doi:10.1300/J026v17n02_03

Cairns, R. A., ve Mak, T. W. 2016. Lung Cancer Resets the Liver's Metabolic Clock. *Cell Metab*, 23(5), 767-769. doi:10.1016/j.cmet.2016.04.028

Carvalho, C.C.C.R., Fonseca, M. M. R., 2006, Biotransformation of Terpenes, *Biotechnology Advances*, 24, 134-142pp.

Cerny, V., Sorm, F., 1967, *The Alkaloids Chemistry And Physiology*, Academic Press., New York, 9: 375-406pp.

Chen, L. X., Liao, J. Z., ve Guo, W. Q. 1995. [Effects of *Astragalus membranaceus* on left ventricular function and oxygen free radical in acute myocardial infarction patients and mechanism of its cardiotoxic action]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 15(3), 141-143.

Chi-Chun Wong, Hua-Bin Li, Ka-Wing Cheng, Feng Chen 2006 A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay, *Food Chemistry*, 97 (4): 705-711, August

Cho, W. C., ve Leung, K. N. 2007. In vitro and in vivo anti-tumor effects of *Astragalus membranaceus*. *Cancer Lett*, 252(1), 43-54. doi:10.1016/j.canlet.2006.12.001

D'Archivio, A. A., Ruggieri, F., Mazzeo, P., ve Tettamanti, E. 2007. Modelling of retention of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography: quantitative structure-retention relationships based on solute quantum-chemical descriptors and experimental (solvatochromic and spin-probe) mobile phase descriptors. *Anal Chim Acta*, 593(2), 140-151. doi:10.1016/j.aca.2007.04.058

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., ve Masella, R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*, 43(4), 348-361.

Darendelioglu, E., Aykutoglu, G., Tartik, M., ve Baydas, G. 2016. Turkish propolis protects human endothelial cells in vitro from homocysteine-induced apoptosis. *Acta Histochem*, 118(4), 369-376. doi:10.1016/j.acthis.2016.03.007

Davis, P.H., 1972. *Flora of Turkey and East Aegean Island*, University Press, Edinburgh., 4, 49–254 pp.

Dembitsky, V. M., Glorizova, T. A., ve Poroikov, V. V. 2015. Naturally occurring plant isoquinoline N-oxide alkaloids: their pharmacological and SAR activities. *Phytomedicine*, 22(1), 183-202. doi:10.1016/j.phymed.2014.11.002

Dilsiz, A., Aydin, T., ve Gursan, N. 2009. Capillary hemangioma as a rare benign tumor of the oral cavity: a case report. *Cases J*, 2, 8622. doi:10.1186/1757-1626-0002-0000008622

Geng C.S. *Advances in Immunopharmacological Studies on *Astragalus membranaceus**. *Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 1986, 6, (1), 62–64.

Gezici, S., ve Sekeroglu, N. 2019. Neuroprotective potential and phytochemical composition of acorn fruits. *Industrial Crops and Products*, 128, 13-17.

Gezici, S., Sekeroglu, N., ve Kijjoa, A. 2017. In vitro Anticancer Activity and Antioxidant Properties of Essential Oils from *Populus alba* L. and *Rosmarinus officinalis* L. from South Eastern Anatolia of Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3), S498-S503.

Godevac, D., Zdunic, G., Savikin, K., Vajs, V., ve Menkovic, N. 2008. Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia*, 79(3), 185-187. doi:10.1016/j.fitote.2007.10.001

Gui, S.Y.; Wei, W.; Wang, H.; Wu, L.; Yi-Sun, W.; Chen W.b.; Wu, C. 2006. Effects and Mechanisms of Crude Astragalosides Fraction on Liver Fibrosis in Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, , 103,(2), 16, 154–159.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radical in Biology and Medicine*, 3rd Edition. Oxford Universty Pres, Chapter 3, London. 1998.

Hanahan, D., ve Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Harborne, J. B. 1999. Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep*, 16(4), 509-523.

Haşimi, N., Ertaş, A., Yılmaz, M.A., Boğa, M., Temel, H., Demirci, S., Yılmaz-Özden, T., Yener, İ., Kolak, U., 2017. LC-MS/MS and GC-MS analyses of three endemic *Astragalus* species from Anatolia towards their total phenolicflavonoid contents and biological activities. *Biological Diversity and Conservation – 10* (1): 18-30.

Hou, J. 1989. [Multiple stepwise regression analysis of etiological factors of esophageal cancer in Cixian county]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 11(1), 25-27.

Huang, X., Wang, D., Hu, Y., Lu, Y., Guo, Z., Kong, X., ve Sun, J. 2008. Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infectious bursal disease virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2), 166-171.

Hunot S Flavell RA. Apoptosis. Death of a monopoly? *Science* 2001; 292(5518): 865-6.).

Ibadova, S., 2006. ‘Bazı *Hypericum* Türlerinin Fenolik Bileşimi İle Antioksidan Ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri’,Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Keskin, C., Özen, H.Ç., Toker, Z., Kızıllı, G., Kızıllı, M., 2018. *Astragalus diphtherites* FENZL var. *diphtherites* ve *Astragalus gymnaopecias* RECH. FIL’in Gövde ve Kök Kısımlarından Farklı Çözücüler ile Elde Edilen Özütlere İnvitro Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 21(2):157-166.

Khan H.T.M., Choudhary I.M., Atta-ur-Rahman., Mamedova P.R., Agzamova A.M., Sultankhodzhaev N.M. and Isaev I.M., 2006, Tyrosinase Inhibition Studies Of Cycloartane And Cucurbitane Glycosides And Their Structure-Activity Relationships, *Bioorganic ve Medicinal Chemistry* 14, 6085-6088 pp

Larson, R. L., ve Bussard, J. B. 1986. Microsomal flavonoid 3'-monooxygenase from maize seedlings. *Plant Physiol*, 80(2), 483-486. doi:10.1104/pp.80.2.483

Larson, R.A. The Antioxidants of Higer Plants, *Phytochemistry* 1998, 4, 969-978.

Li, S. G., ve Zhang, Y. Q. 2009. Characterization and renal protective effect of a polysaccharide from *Astragalus membranaceus*. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 343-348.

Li, Y., Chen, D. H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R. A., Zhang, Y. ve Chen, T. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1), 4-10.

Li, Y., Gou, S., Zhu, Y., Yn, H., Qian, D., Wang, H., Yu, J., Duan, J., 2019. Flowers of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* as a Novel High Potential By-Product: Phytochemical Characterization and Antioxidant Activity Molecules, 24, 434; doi:10.3390/molecules24030434

Li, Y., Peng, J., Shi, P., ve Zhao, B. 2009. The effect of Cd on mycorrhizal development and enzyme activity of *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices* in *Astragalus sinicus* L. *Chemosphere*, 75(7), 894-899. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.046

Lin Rui, Chen Wei-Chang, Wang Wei-Peng, Tian Wen-yan, Zhang Xue-Guang 2010 Antioxidant activity of *Astragalus* polysaccharides and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA, *Carbohydrate Polymers*, 82; 240-244

Lin, LZ.; He, X.G.; Lindenmaier, M. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Study of the Flavonoids of the Roots of *A. mongholicus* and *A. membranaceus*. *Journal of Chromatografi A*, 2000, 876, 87-95.

Linda, E.; Graham, Lee.; Wilcox, W.; IÇık, K. (ed). *Bitki Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, s: 25-28, Mayıs, 2004.

Luo A, Fan Y 2011. Antioxidant activities of various fractions extracted from *Astragalus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(10): 1297-1302.

Macdougall, I. C., ve Cooper, A. 2002. The inflammatory response and epoetin sensitivity. *Nephrol Dial Transplant*, 17 Suppl 1, 48-52. doi:10.1093/ndt/17.suppl_1.48

Mamedova, R. P., ve Isaev, M. I. 2004. Triterpenoids from *Astragalus* plants. *Chemistry of natural compounds*, 40(4), 303-357.

Manjusha, C., Vipin, K., Hitesh, M., Surender, S., 2015, Medicinal plants with potential antiarthritic activity, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2), 147-179.

Marston, J. 1995. Building patient rapport. Developing positive attitudes toward the dentist and staff. *J Ala Dent Assoc*, 79(1), 32-33.

McKenna, D. J., Hughes, K., ve Jones, K. 2002. Astragalus. *Alternative therapies in health and medicine*, 8(6), 34: 134-140.

McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., . . . Neve, R. L. 2003. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci*, 23(17), 6914-6927.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Peng, J., Li, Y., Shi, P., Chen, X., Lin, H., ve Zhao, B. 2011. The differential behavior of arbuscular mycorrhizal fungi in interaction with *Astragalus sinicus* L. under salt stress. *Mycorrhiza*, 21(1), 27-33. doi:10.1007/s00572-010-0311-9

Pistelli, L., Bertoli, A., Lepori, E., Morelli, I., ve Panizzi, L. 2002. Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*. *Fitoterapia*, 73(4), 336-339.

Polat, R., Cakilcioglu, U., Satil, F., 2013, Traditional use of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey), *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 951-963.

Ponni, V., Thenmozhi, S., Rajan, S., 2009, Screening of bioactive potentials and phytochemical nature of *Solanum trilobatum* extracts. *Journal of Basic Applied Biology*, 3(4), 134-39.

Pore, M. M., Hiltermann, T. J., ve Kruyt, F. A. 2013. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Lett*, 332(2), 359-368. doi:10.1016/j.canlet.2010.09.012

Raja, R. D. A., Jeeva, S., Prakash J. W., Antosinamy, J. M., Irudayaraj, V., 2011, Antibacterial activity of selected ethnomedicinal plants from South India, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2011, 375-378.

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., Lu, Y., Wang, Z. 2003. Molecular basis of Fas and cytochrome c pathways of apoptosis induced by tartary buckwheat flavonoid in HL-60 cells. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 25(6), 431-436.

Rios J.L., Waterman P.G., 1997, A Review Of The Pharmacology And Toxicology Of *Astragalus*, *Phytotherapy Research*, 11, 411-418 pp.

Salehi, A., Kariminik, A., Hasanabadi, Z., 2013, Antibacterial activity of methanol extracts of 4 plants used in traditional herbal medicine of Kerman, Iran, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 7(12), 911-914.

Sawsen Bourezzane, Hamada Haba, Christophe Long, Mohammed Benkhalel, 2018 Chemical composition and antioxidant activity of *Astragalus monspessulanus* L.

growing in semiarid areas of Algeria; Journal of the Serbian Chemical Society, vol 83, no 1,

Sekeroglu, N., Uurlu, E., Kulak, M., Gezici, S., ve Dang, R. 2017. Variation in Total Polyphenolic Contents, DNA Protective Potential and Antioxidant Capacity from Aqueous and Ethanol Extracts in Different Plant Parts of *Hypericum perforatum* L. L. Indian J Pharm Educ Res, 51(Suppl 2), S1-7.

Semiz, K.D.; Sarıkürkçü, C.; Yıldız, D. Asma ve Dut Yapraklarının Etanol Özütlelerinin Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası. 2005.

Shan, M., Yu, S., Yan, H., Guo, S., Xiao, W., Wang, Z., ... ve Li, S. F. Y. 2017. A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicology of Geniposide, a Natural Product. Molecules, 22(10), 1689.

Singleton, V. and Rossi, J. 1965. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158.

Smith, L., Gordon, D., Scruton, A., ve Yang, L. 2016. The potential yield of Tai Chi in cancer survivorship. Future Sci OA, 2(4), FSO152. doi:10.4155/fsoa-2016-0049

Warren Strober 2001 Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, Current Protocols in Immunology, Vol 21, Issue 1,

Şenol, F. S., Şekeroğlu, N., Gezici, S., Kilic, E., ve Orhan, İ. E. 2018. Neuroprotective potential of the fruit (acorn) from *Quercus coccifera* L. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 42(2), 82-87.

Tan, Y.; Lv, Z.P.; Bai, X.C.; Liu, X.Y.; Zhang, X.F. 2006. Traditional Chinese Medicine Bao Gan Ning Increase Phosphorylation of CREB in Liver Fibrosis in vivo and in vitro, Journal of Ethnopharmacology, , 105, 1-2, 21, 69–75.

Tawaha, K., Alali, F. Q., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., . . . Oberlies, N. H. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. Nat Prod Res, 21(12), 1121-1131. doi:10.1080/14786410701590285

Taylor, P. R., Ma, Y., Adjemian, S., Mattarollo, S. R., Yamazaki, T., Aymeric, L., . . . Kroemer, G. 2013. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. Immunity, 38(4), 729-741. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.003

Teyeb, H., Zouari, S., Douki, W., Najjar, M. F., ve Neffati, M. 2011. Variation in volatiles of *Astragalus gombiformis* Pomel. Z Naturforsch C J Biosci, 66(1-2), 1-6.

Toshkova, R. A., Krasteva, I. N., ve Nikolov, S. D. 2008. Immunorestitution and augmentation of mitogen lymphocyte response in Graffi tumor bearing hamsters by

purified saponin mixture from *Astragalus corniculatus*. *Phytomedicine*, 15(10), 876-881. doi:10.1016/j.phymed.2007.11.026

TUBIVES, 2019. *Astragalus neurocarpus* BOISS. ve *Astragalus elongatus* WILLD. subsp. *nucleiferus* (BOISS.) CHAMBERLAIN'ın ülkemizdeki coğrafi yayılışı. <http://www.tubives.com/>

Tunalier, Z., Kosar, M., Kupeli, E., Calis, I., ve Baser, K. H. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. *J Ethnopharmacol*, 110(3), 539-547. doi:10.1016/j.jep.2006.10.024

Turker, A.U., Koyluoglu, H., 2012, Biological activities of some endemic plants in Turkey, *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 6949-6961.

Turker, A.U., Yildirim, A. B., 2013, Evaluation of Antibacterial and Antitumor Activities of Some Turkish Endemic Plants, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 1003-1010.

TÜİK, 2016, Türkiye Kanser İstatistikleri,. <https://dosyasb.saglik.gov.tr/Eklenti/13183,sy2016turkcepdf.pdf?0> Erişim Tarihi: 12.06.2019

Uysal, İ. 1997. *Astragalus trojanus* Stev. Endemik Turunun Morfolojisi Anatomisi ve Ekolojisi Üzerinde Gözlemler.

Wang, Y. Y., ve Zheng, X. X. 2002. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro. *J Immunol Methods*, 268(2), 179-188. doi:10.1016/s0022-1759(02)00190-4

Wei, H., Sun, R., Xiao, W., Feng, J., Zhen, C., Xu, X., ve Tian, Z. 2003. Traditional Chinese medicine *Astragalus* reverses predominance of Th2 cytokines and their upstream transcript factors in lung cancer patients. *Oncol Rep*, 10(5), 1507-1512.

Wink, M. 1999 Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology, CRP Pres..

Woisky, R.G. and Salatino, A. 1998 Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 99-105.

Wong, C.C.; Li, B.H.; Cheng, W.K.; Chen, F. A 2006 Systematic Survey of Antioxidant Activity of 30 Chinese Medicinal Plants Using the Ferric Reducing Antioxidant Power Assay, *Food Chemistry*, 2006, 97, 705-717.

Xue, B., Li, J. X., Chai, Q., Liu, Z. X., ve Chen, L. 2008 Effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* R. Brown on angiotensin II-induced portal-vein contraction in hypertensive rats. *Phytomedicine*, 15(9), 759-762.

Yan, Q., Li, Y., Jiang, Z., Sun, Y., Zhu, L., ve Ding, Z. . 2009. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. *Phytomedicine*, 16(6-7), 586-593.

Yıldız, A., 2011, Trabzon yöresine ait yaban mersini(*Vaccinium myrtillus* L.)'nin HPLC ile fenolik yapısının aydınlatılması ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. Biyoloji Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Yildiz, O. K., Balaban, H., Ozdemir, S., Bolayir, E., ve Topaktas, S. 2011 Anti-GQ1b-Negative Miller Fisher Syndrome with Acute Areflexic Mydriasis and Cholinergic Supersensitivity. *Neuroophthalmology*, 35(1), 40-42. doi:10.3109/01658107.2010.539761

Zengin, G., Ceylan, R., Guler, G.O., Carradori, S., Uysal, S., Aktumsek, A., 2016. Enzyme Inhibitory Effect and Antioxidant Properties of *Astragalus lagurus* Extracts. *Current Enzyme Inhibition*. 12(2): 177-182. DOI: 10.2174/1573408012666160127231058

Zhao, P., Su, G., Xiao, X., Hao, E., Zhu, X., Ren, J. 2008. Chinese Medicinal Herb *Radix Astragali* Suppresses Cardiac Contractile Dysfunction and Inflammation in a Rat Model of Autoimmune Myocarditis, *Toxicology Letters*, 182, 29-35.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ceren TANRIÖVER

Doğum Yeri : Gaziantep

Doğum Tarihi : 29.07.1980

E - Posta : cerenstariover@gmail.com

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Orta Öğretim : Özel Güney Fırat Koleji

Lisans : Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji, 2015,
Gaziantep

Yüksek Lisans : Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı,
2017, Gaziantep