T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tanacetum erzincanense ENDEMİK BİTKİSİNİN FARKLI EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İsmail YAPICI

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2018

Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında, İsmail YAPICI tarafından hazırlanan bu çalışma 28/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL	İmza:
Üye	: Doç. Dr. S.Beyza Ö.SARIKAYA	İmza:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY	İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 06. 07 / 2018 tarih ve 24/.5..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Paşa YALÇIN
Enstitü Müdürü

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

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

"*Tanacetum erzincanense* ENDEMİK BİTKİSİNİN FARKLI EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI" isimli "Yüksek Lisans" tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

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

İmza

İsmail YAPICI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tanacetum erzincanense ENDEMİK BİTKİSİNİN FARKLI EKSTRAKTLARININ *İN VİTRO* ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İsmail YAPICI

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışmada, *tanacetum erzincanense* endemik bitkisinden elde edilen metanol ve etil asetat ekstrelerinin in vitro antioksidan kapasitesi ABTS, FRAP ve KUPRAK metotlarıyla, metanol ekstresinin HT-29 (kolon), MCF-7 (göğüs) ve HepG2 (karaciğer) kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivitesi XTT yöntemiyle araştırıldı. Bitkinin toplam fenolik ve flavonoid miktarı sırasıyla Folin-Ciocalteu ve alüminyum nitrat kolorimetrik metoduyla ve ayrıca bireysel fenolik içeriği Q-TOF-LC yöntemiyle kalitatif olarak belirlendi.

Tanacetum erzincanense bitkisinin metanol ve etil asetat ekstrelerinin konsantrasyon arttıkça antioksidan özelliklerinin de arttığı fakat standartların altında bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu, diğer tanacetum türleri arasında orta seviyede bir fenolik madde içerdiği, flavonoid madde miktarı bakımından diğer tanacetum türlerinden daha yüksek flavonoid madde içerdiği ve çok fazla sayıda fenolik bileşiğe sahip olduğu görüldü.

Tanacetum erzincanense bitkisinin metanol ekstresinin test edilen kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin doz ve zaman bağımlı olarak değiştiği gözlendi. Bitki test edilen hücrelere karşı orta derecede sitotoksik etki gösterirken en yüksek aktiviteyi HepG2 hücrelerine karşı sergilediği görüldü.

2018, 97 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Fenolik içerik, Hücre kültürü, Sitotoksisite, *Tanacetum erzincanense.*

ABSTRACT

Master Thesis

IN VITRO ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC POTENTIALS OF DIFFERENT EXTRACTS OF ENDEMIC PLANT "*Tanacetum erzincanense*"

İsmail YAPICI

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

This study was designed to investigate the antioxidant capacities of methanol and ethyl acetate extracts of endemic plant *tanacetum erzincanense* by ABTS, FRAP and CUPRAC methods and evaluate the antiproliferative activity of the methanol extract against HT-29 (colon), MCF-7 (breast) and HepG2 (liver) cancer cell lines in vitro. In addition, total phenolic and flavonoid contents of the plant were determined by Folin-Ciocalteu and aluminium nitrate colorimetric methods, respectively. Moreover, the individual phenolic content was identified qualitatively by Q-TOF-LC.

The antioxidant activity results showed that the antioxidant capacities of both methanol and ethyl acetate extracts of *tanacetum erzincanense* increased with increasing concentration while displaying moderate activity compared to the antioxidant standards α-tocopherol, trolox, BHA and BHT. The plant extracts were found to contain medium level of phenolic content while higher level of flavonoid content when compared to other tanacetum species as well as many individual phenolic compounds.

The anticancer activity results indicated that the cytotoxic potential of the methanol extract changed depending on the concentration and cell type tested. Although the extract displayed moderate level of cytotoxic activity against the cell lines, the highest cytotoxicity was observed on HepG2 cells.

2018, 97 pages

Keywords: Antioxidant activity, Cell culture, Cytotoxicity, Phenolic content, *Tanacetum erzincanense.*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans kayıt ve ders aşamasından tezimi sunup bitirme aşamasına kadar bana yön gösterip hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, daima bana güven veren ve hedef gösteren kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a,

Yüksek lisans ders döneminde, antioksidan çalışmalarında ve tez yazımında bana gösterdiği desteğinden, ilgi ve alakasından dolayı Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA'ya,

Antikanser aktivite çalışmaları ve tez yazımındaki yardım, destek ve ilgisinden dolayı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'den Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY'a,

Ders döneminde bana vermiş oldukları katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Hasan KILIÇGÜN ve Dr. Öğr. Üyesi Fevzi TOPAL'a,

Antioksidan kapasite çalışmaları sırasında laboratuvarda beraber çalıştığımız ve bana yardımını esirgemeyen Cuma ZEHİROĞLU'na,

Son olarak, yüksek lisansa başlayacağımı duydukları andan itibaren hem çok sevinen hem bana devamlı dua eden, başta anne ve babam olmak üzere sevgili ailemin ayrı ayrı tüm fertlerine;

Teşekkür ederim.

İsmail YAPICI
Mayıs, 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER LİSTESİ vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
SİMGELER ve KISALTMALAR ix
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Bitkinin Familyası ve Tanıtımı 2
2.1.1. Asteraceae (papatyagiller) 2
2.1.2. *Tanacetum erzincanense* 2
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar 6
2.2.1. Serbest radikaller 6
2.2.2. Antioksidanlar 10
2.2.2.1. Endojen antioksidanlar 11
2.2.2.2. Ekzojen antioksidanlar 12
2.3 Kanser 22
3. KAYNAK ÖZETLERİ 25
4. MATERYAL ve YÖNTEM 30
4.1. Materyal 30
4.1.1. Yararlanılan cihaz, alet ve malzemeler 30
4.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler 31
4.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması 32
4.1.3.1. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini çözeltileri 32
4.1.3.2. FRAP indirgeme metodu çözeltileri 32
4.1.3.3. Bakır indirgeme kapasitesi tayini (Kuprak metodu) çözeltileri 32
4.1.3.4. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini çözeltileri 33
4.1.3.5. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini çözeltileri 33
4.1.3.6. Q-TOF-LC yöntemi ile fenolik içerik tayini çözeltileri 33

4.1.3.7. Antikanser aktivite testlerinde kullanılan çözeltiler 33
4.2. Yöntem 34
4.2.1. *Tanacetum erzincanense* bitkisinin toplanması, kurutulması ve ekstraktsiyonu 34
4.2.2. Antioksidan aktivite testleri 34
4.2.2.1. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini 34
4.2.2.2. FRAP indirgeme metodu 35
4.2.2.3. Bakır indirgeme kapasitesi tayini (Kuprak metodu) 35
4.2.2.4. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini 35
4.2.2.5. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini 36
4.2.2.6. Q-TOF-LC yöntemi ile fenolik içerik tayini 36
4.2.3. Hücre kültürü 37
4.2.3.1. Hücre kültürü koşulları 37
4.2.3.2. Hücrelerin çözdürülmesi 38
4.2.3.3. Hücrelerin bölünmesi 38
4.2.3.4. Hücrelerin dondurulması 39
4.2.3.5. Hücre sayımı 39
4.2.4. Sitotoksisite testleri 40
4.2.4.1. Metanol ekstresinin çalışma çözeltisinin hazırlanması 40
4.2.4.2. XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü 41
5. ARAŞTIRMA BULGULARI 43
5.1. Antioksidan Araştırma Bulguları 43
5.1.1. $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini bulguları 43
5.1.2. FRAP indirgeme metodu bulguları 44
5.1.3. Bakır indirgeme kapasitesi tayini (Kuprak metodu) bulguları 45
5.1.4. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları 46
5.1.5. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulguları 47
5.1.6. Q-TOF-LC yöntemi ile fenolik içerik tayini bulguları 47
5.2. Antikanser Araştırma Bulguları 51
6. TARTIŞMA ve SONUÇ 53
KAYNAKLAR 82
EKLER 96
EK-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışma 97
ÖZGEÇMİŞ 98

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. *Tanacetum erzincanense* 4

Şekil 2.2. Üç *tanacetum* türünün genel görünüşü; A) *tanacetum erzincanense*, B) *tanacetum germanicopolitanum*, C) *tanacetum pinnatum* 5

Şekil 2.3. Üç *tanacetum* türünün çiçek, yaprak ve gövde farkları; A-D *tanacetum erzincanense*, B-E *tanacetum germanicopolitanum*, C-F *tanacetum pinnatum* . 5

Şekil 2.4. A vitamini'nin kimyasal yapısı 14

Şekil 2.5. C vitamini'nin kimyasal yapısı 14

Şekil 2.6. E vitamini'nin kimyasal yapısı 15

Şekil 2.7. β-karoten'in kimyasal yapısı 17

Şekil 2.8. Salisilik asit'in kimyasal yapısı 18

Şekil 2.9. Kafeik asit ve ferulik asit'in kimyasal yapıları 19

Şekil 2.10. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı 20

Şekil 2.11. Flavon ve flavonolların kimyasal yapıları 20

Şekil 2.12. Kateşin ve flavanonların kimyasal yapıları 21

Şekil 2.13. Auron ve kalkonların kimyasal yapıları 21

Şekil 4.1. Hemositometre ile canlı hücre sayımı 41

Şekil 4.2. XTT tetrazolyum tuzu 42

Şekil 5.1. 50 µg/ml'de metanol ve etil asetat ekstrelerinin % ABTS radikal giderme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (α-tokoferol, troloks, BHA, BHT) karşılaştırılması 43

Şekil 5.2. Metanol ve etil asetat ekstrelerinin FRAP metoduna göre indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (α-tokoferol, troloks, BHA, BHT) karşılaştırılması 44

Şekil 5.3. Metanol ve etil asetat ekstrelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (α-tokoferol, troloks, BHA, BHT) karşılaştırılması 45

Şekil 5.4. Standart olarak kullanılan gallik asit için oluşturulan grafik 46

Şekil 5.5. Standart olarak kullanılan kuersetin için oluşturulan grafik 47

Şekil 5.6. Kateşin'in kromatogramı 48

Şekil 5.7. Kaemferol'ün kromatogramı 48

Şekil 5.8. Klorogenik asit'in kromatogramı 48

Şekil 5.9. p-kumarik asit'in kromatogramı 49

Şekil 5.10. 2,3-Dihidroksibenzoik asit'in kromatogramı 49

Şekil 5.11. Dihidrokuersetin'in kromatogramı 49
Şekil 5.12. Lecaronik asit'in kromatogramı 50
Şekil 5.13. Emodik asit'in kromatogramı 50
Şekil 5.14. Purpurogallin'in kromatogramı 50
Şekil 5.15. Tamarixetin'in kromatogramı 51
Şekil 5.16. Luteolin'in kromatogramı 51
Şekil 6.1. α-tokoferol'ün kimyasal yapısı 56
Şekil 6.2. Troloks'un kimyasal yapısı 56
Şekil 6.3. BHA'nın izomer yapıları 56
Şekil 6.4. BHT'nin kimyasal yapısı 57
Şekil 6.5. ABTS'nin kimyasal yapısı 57
Şekil 6.6. Gallik asit'in kimyasal yapısı 63
Şekil 6.7. Kuersetin'in kimyasal yapısı 67
Şekil 6.8. p-kumarik asit'in kimyasal yapısı 73
Şekil 6.9. Kaemferol'ün kimyasal yapısı 73
Şekil 6.10. Fenazin meto sülfat (PMS) varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT tetrazolyum tuzunun XTT formazana indirgenmesi 74
Şekil 6.11. Genel olarak bir tetrazolyum tuzunun formazana indirgenmesi 75
Şekil 6.12. XTT yöntemine göre metanol ekstresinin konsantrasyon ve zamana bağlı tedavisine cevap olarak HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdesi 75
Şekil 6.13. XTT yöntemine göre metanol ekstresinin konsantrasyon ve zamana bağlı tedavisine cevap olarak HT-29 hücrelerinin canlılık yüzdesi 76
Şekil 6.14. XTT yöntemine göre metanol ekstresinin konsantrasyon ve zamana bağlı tedavisine cevap olarak MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdesi 76

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Reaktif oksijen (ROS) kaynakları 7
Tablo 2.2. Reaktif oksijen türleri ve serbest olmayan radikaller 8
Tablo 4.1. Q-TOF-LC-MS cihazı çalışma koşulları 37
Tablo 6.1. 50 µg/ml konsantrasyonda ABTS radikali giderme yüzdeleri 58
Tablo 6.2. 10 µg/ml konsantrasyondaki ferrik iyonlarını indirgeme kapasitesinin absorbans değerleri 60
Tablo 6.3. 10 µg/ml konsantrasyondaki bakır indirgeme kapasitesinin absorbans değerleri 62
Tablo 6.4. *Tanacetum erzincanense* ve diğer bazı *tanacetum* türlerinin metanol ekstrelerinin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları 66
Tablo 6.5. *Tanacetum erzincanense* ve diğer bazı *tanacetum* türlerinin metanol ekstrelerinin içerdikleri toplam flavonoid madde miktarları 69
Tablo 6.6. *Tanacetum erzincanense*'de bulunan fenolik bileşikler 70
Tablo 6.7. *T. erzincanense* metanol ekstresinin MCF-7, HepG2 ve HT-29 hücre hatları üzerindeki IC_{50} (mg/ml) değerlerinin karşılaştırılması 78

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
L	Litre
m-	Meta
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
o-	Orto
p-	Para
^{o}C	Santigrat derece
cm	Santimetre
V	Volt

Kısaltmalar

ABTS	2,2′-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)
$ABTS^{\bullet+}$	2,2′-Azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
Bkz.	Bakınız
CAT	Katalaz
DF	Seyreltme Faktörü
$DPPH^{\bullet}$	1,1-difenil-2-pikril hidrazil radikali

DMSO	Dimetil Sülfoksit
DS	Seyreltme Faktörü
DW	Kuru Ağırlık
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
FBS	Fetal Sığır Serumu
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
FRAP	Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
GAE	Gallik Asit Ekivalen
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GST	Glutatyon s-Transferaz
IC	İnhibitör Konsantrasyon
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PG	Propil Gallat
PMS	Fenazin Meto Sülfat
QE	Kuersetin Ekivalen
QEE	Kuersetin Ekivalen
Q-TOF-LC	Kuadrupol Uçuş Zamanlı Sıvı Kromatografisi
RE	Rutin Ekivalen
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SD	Standart Sapma
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBHQ	Tersiyer Bütil Hidrokinon
TCA	Triklor Asetikasit
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TPTZ	2,4,6-Tris(2-Pyridyl)-s-Triazine
Troloks	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
XTT	2,3- bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil) -2H tetrazolium -5-karboksanilid

1. GİRİŞ

Ortaklanmamış elektron içeren kararsız atomlar, atom grupları veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır (Akkuş, 1995). Serbest radikaller organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi dış etkenlerle de oluşabilir. Kimya sanayinin ilerlemesi sonucunda oluşan atık maddeler, çözücüler, petrokimya ürünleri hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran serbest radikallerin oluşumunu artırırlar. Beraberinde ciddi sağlık sorunlarını da meydana getirirler (Temur, 2006; Gülçin, 2007a). Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, nükleik asit, karbohidrat ve enzim gibi önemli yapılarına etki ederek çeşitli hasarlara neden olabilmektedirler (Henrikson,1992).

Serbest radikallerin zararlarının engellenmesinde antioksidanların rolü; aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri temizleyerek oksidasyonun tetiklediği hasarları hücresel bazda engellemek, dolayısıyla hastalıkların oluşumunu durdurmaktır. Antioksidanlar, serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerini gidererek onların zararlı etkilerini engelleyen moleküllerdir (Halliwell, 1996; Stadtman, 2002).

İleri teknoloji, artan çevre kirliliği ve modern yaşam tarzının getirdiği stresli yaşam ortamları, beraberinde yüzlerce hastalığı getirmektedir. Bunlardan en önemlisi kanserdir. Dünya üzerinde her yıl binlerce insan bu hastalığa yakalanmakta, yine binlerce insan kanser ve kansere bağlı diğer rahatsızlıklar yüzünden hayatını kaybetmektedir. Tedavi için kullanılan sentetik kemoterapi ilaçları, oldukça maliyetli olmalarının yanı sıra, tedavi sırasında bir çok yan etkiye sahiptir. Bu yan etkileri minimum seviyeye indirmek hatta yan etkisi olmayan bir tedavi yöntemi uygulamak için doğada yetişen bitkilerden kansere karşı etkin tedavi aracı olabilecek moleküllerin izolasyonu, yapı tayini ve ilaç olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi önemli bir çalışma alanı olarak göze çarpmaktadır (Akdulum, 2011).

Bu çalışmada, daha önce doğal ürünler alanında üzerinde çalışma yapılmamış, Erzincan ilinin endemik bir türü olan *tanacetum erzincanense* bitkisinin metanol ve etil asetat ekstreleri hazırlanıp antioksidan aktivitesi ve metanol ekstresinin antikanserojen özelliği incelenerek insan hayatına faydalı olabilecek yönleri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkinin Familyası ve Tanıtımı

2.1.1. Asteraceae (papatyagiller)

Papatyagillerin büyük bölümünü, ılıman bölgelerde yayılış gösteren otsu bitkiler oluşturur. Antarktika kıtası dışında dünyada geniş alanda bulunabilen papatyagiller, özellikle Akdeniz havzası, Meksika ve Güney Afrika gibi tropik ve subtropik bölgelerin yarı kurak kesimlerinde bulunmaktadır. Asteraceae üyeleri ayrıca Afrika'nın ağaç, çalı ve otsu formasyonlarında, Güney Amerika ve Avustralya'da yayılış gösterir. Yalnızca tropikal yağmur ormanlarındaki yayılışı zayıf kalmaktadır (Heywood, 1978). Genellikle tek, iki veya çok yıllık, yarı çalımsı veya otsu, küçük ve orta büyüklükte bitkilerdir ve bunların bir kısmı zehirlidir. Ayrıca zengin uçucu yağ ve terpenoit içeriğine de sahiptir. Asteraceae bitki ailesi, fenolik bileşik ve terpen içeriğinden dolayı tıpta ve eczacılıkta kullanılmaktadır (Mucciarelli ve Maffei, 2002; Wilson, 1986). Çiçekli bitkilerin en büyük familyalarından biri olan asteraceae familyası, dünyada yaklaşık 23.000 tür içerir. Endemik tür açısından Türkiye'nin en zengin familyasıdır (Erik ve Tarıkahya, 2004). Türkiye'de tür sayısı bakımından ilk sırada yer alan asteraceae (compositae) familyasına ait toplam 1.209 tür bulunmaktadır. Bu türlerin 447'si endemiktir (Doğan, 2007; Özhatay ve Kültür, 2006).

Asteraceae ailesinin birçok türü, farmakolojik aktivite göstermektedir. Bu ailedeki türler, flavonoidler başta olmak üzere antibakteriyel, antifungal, antihelmintik, antiinflamatuar, insektisit ve antitümör gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip bileşikler bulundurmaktadır (Koçak, 2008).

2.1.2. *Tanacetum erzincanense*

Tanacetum türleri yarı çalı şeklinde, çok yıllık, rizomlu, küçük-orta büyüklükte veya uzundurlar. Gövde kısımları, yatık-dik, genellikle yapraklı ve dallıdır. Bitkinin yüzeyi tüylerle kaplıdır. Bu tüyler seyrek-sık, basit-çatallı şekilde olabilir. Bazı *tanacetum* türlerinin dip kısımları odunsu şeklindedir. Yapraklar bütün, dişli, pinnatifit veya 1-3

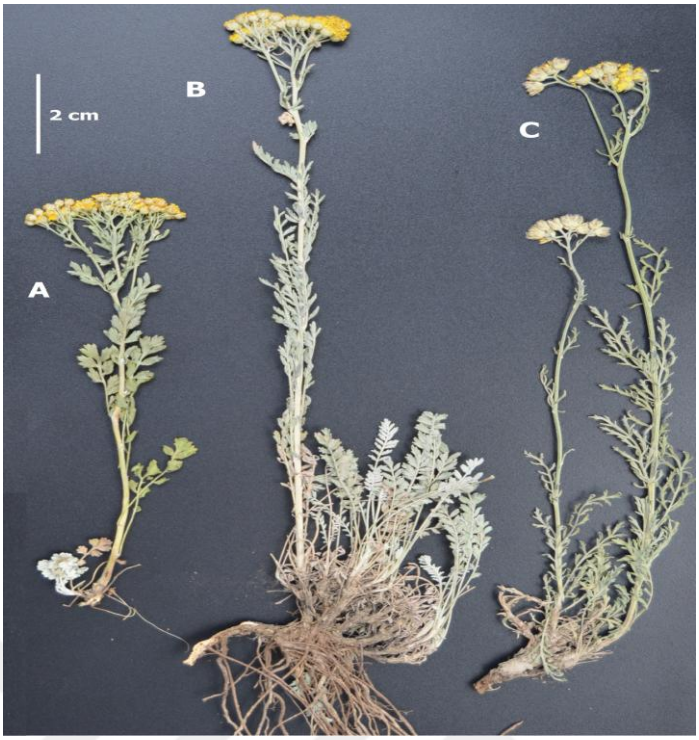
pinnatisektir. Olgunlaştıklarında tam yaprağa benzer durumda olurlar. Genellikle kenarları ve uç kısımları zarsıdır. Dişi çiçekler belirgin şekilde beyaz, sarı veya pembe dilsi biçimdedir (Grierson, 1975).

Tanacetum bitki türlerinden geleneksel tıpta faydalanılmaktadır. Örneğin, böcek ısırıklarına karşı veya böceklerin öldürülmesinde, yanıklarda ve yaraların iyileştirilmesinde, antihelmintik, karminatif, uyuz ilacı, migren tedavisinde, ateş düşürücü, kireçlenme tedavisinde, baş dönmesi tedavisinde, böcek ısırıklarında (D'Amelio ve Roton, 1999) ve böcek öldürücü olarak (Asımgil, 1993; Güven ve Yürekli, 1991), yaraların iyileştirilmesinde (Sezik ve Yeşilada, 1999), ülser, yanık, epilepsi ve tüberküloz tedavilerinde, soğuk algınlığında, ödemlerde, sinir hastalıklarında (Duke, 1987) olmak üzere geleneksel tıpta halk ilacı olarak *tanacetum* türlerinden yararlanılmaktadır. *Tanacetum* türlerinin aynı zamanda parfüm, kozmetik hammaddesi ve gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanımları da bulunmaktadır (Duke, 1987). *Tanacetum* cinsine ait türler, yiyecek olarak kulanıldıkları gibi baharat yapımında da kullanılırlar. Ayrıca biyolojik olarak aktif olan bileşenlerinden dolayı bitkisel ilaç olarak da kullanılırlar (Rohloff vd., 2004).

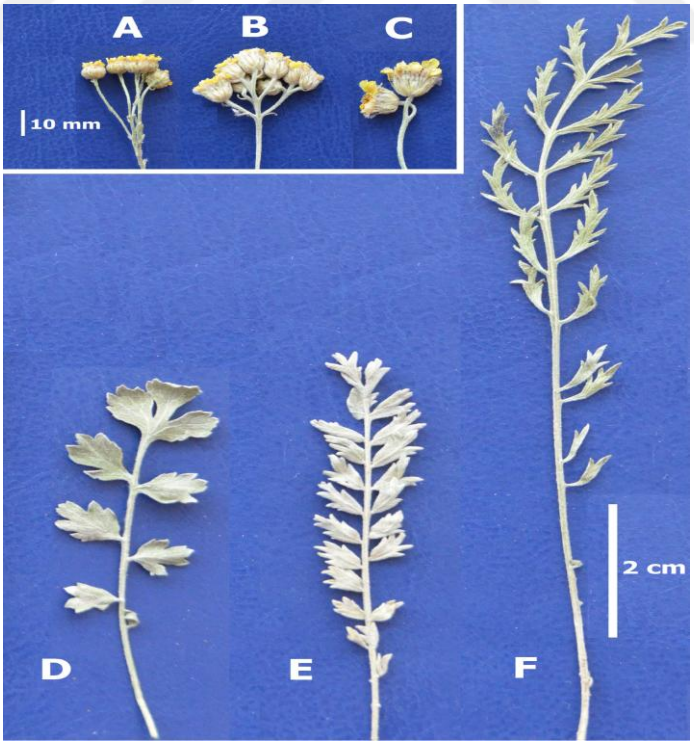
Tanacetum erzincanense (Şekil 2.1) endemik bitkisi, Korkmaz ve arkadaşlarının çalışması ile Erzincan ilinden 2015 yılında yeni bir tür olarak tanımlandı ve DNA verileri kullanılarak yakın türler ile karşılaştırıldı. *Tanacetum erzincanense* Çankırı ilinin endemik bir türü olan *tanacetum germanicopolitanum* ve Erzurum-Oltu, Kars-Kağızman, Van-Erciş, Irak, İran ve Kafkaslar'da bulunan *tanacetum pinnatum*'a benzer. Genetik ve morfolojik olarak *tanacetum germanicopolitanum*'a daha yakındır. Çiçek kısımları *tanacetum pinnatum*'a benzer (Korkmaz vd., 2015).

Bu *tanacetum* türlerinin genel görünüşü Şekil 2.2'de; çiçek, yaprak ve gövdeleri arasındaki farklar ise Şekil 2.3'te verilmiştir.

Şekil 2.1. *Tanacetum erzincanense*



Şekil 2.2. Üç *tanacetum* türünün genel görünüşü; A) *tanacetum erzincanense*, B) *tanacetum germanicopolitanum*, C) *tanacetum pinnatum*



Şekil 2.3. Üç *tanacetum* türünün çiçek, yaprak ve gövde farkları; A-D *tanacetum erzincanense*, B-E *tanacetum germanicopolitanum*, C-F *tanacetum pinnatum*

2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

2.2.1. Serbest radikaller

Atomların orbitallerinde zıt spinli eşleşmiş (ortaklanmış) halde olan iki elektron vardır (Dikici, 1999). Elektronların bu şekilde ortaklanmış olarak çift halde olmaları atoma kararlılık kazandırır. Bu ortaklanmış elektronlar çeşitli sebeplerle ortaklanmamış hale gelirlerse kararlı yapı bozulur (Fırat, 1997). Ortaklanmamış elektron içeren kararsız atomlar, atom grupları veya moleküller *"serbest radikal"* olarak tanımlanır ve atom veya molekülün sağ üst köşesine nokta konarak gösterilir. Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı kararsız moleküllerdir. Aynı zamanda oldukça reaktif olup çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar. Çok kısa ömürlü olmalarına rağmen radikal olmayan maddelerle reaksiyona girip onları da serbest radikal yaparlar ve bir dizi zincir reaksiyonları başlatırlar (Akkuş, 1995; Gülçin vd., 2003).

Serbest radikaller, yüksek sıcaklık ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgaların kovalent bağları kırması sonucu oluşabileceği gibi, radikal olmayan bir atom veya molekülün bir elektron alması veya vermesi sonucu da oluşabilirler (Kılınç ve Kılınç, 2002). Oksidasyon, bir atomdan diğer bir atoma elektronların transfer edilmesi olayı olarak tanımlanır (Davies, 1995). Elektron akışı esnasında, ortaklanmamış elektronlar oluşur. Bu elektronlar ise serbest radikalleri oluşturarak organizmada çeşitli hasarlara yol açabilirler (Gülçin, 2012).

En önemli serbest radikaller, hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) gibi oksijenden oluşan serbest radikallerdir (Akkuş, 1995). Moleküler oksijen (O_2), radikal olmayan maddelerle yavaş ve diğer serbest radikallerle kolay bir şekilde reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmaktadır. ROS biyomolekülleri, oksitleme kapasitesine sahip en az bir tane ortaklanmamış elektron içerirler veya radikal olmayan reaktif bileşiklerdir. Bu türler oksidan veya prooksidan olarak da isimlendirilir (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Sies, 1991; Gülçin, 2012). Reaktif oksijen türleri (ROS) oldukça kararsız moleküllerdir. Kolayca membranda bulunan lipidlerin peroksidasyonunu başlatarak lipid peroksit birikimine yol açabilirler (Halliwell, 1994; Gülçin vd., 2003).

Serbest oksijen radikalleri normal fizyolojik olaylar sırasında sürekli oluşur ve bu oluşum canlı organizmalarda farklı yollarla olur. Bu yollar, *endojen* ve *ekzojen* kaynaklar olmak üzere iki gruba ayrılır (Tablo 2.1). Ekzojen kaynaklar arasında sigara dumanı, organik çözücüler ve zararlı ışınlar sayılabilir. Endojen kaynaklara ise redoks reaksiyonları, bazı enzimler örnek olarak verilebilir.

Tablo 2.1. Reaktif oksijen (ROS) kaynakları

Endojen Kaynaklar	**Ekzojen Kaynaklar**
Mitokondriyal ETS	Diyet faktörleri
Redoks reaksiyonları	Sigara dumanı
Oksidatif reaksiyonlar	Zararlı ışınlar
Otooksidayon[1] reaksiyonları	İlaçlar
Araşidonik asit[2] metabolizması	Organik çözücüler
Bazı enzimler	Pestisitler[3]

(Annakkaya, 2012)

Serbest radikaller, özellikle reaktif tür oksijen içerirler. Süperoksit ($O_2\cdot^-$), hidroksil ($OH^\cdot$), peroksil ($ROO^\cdot$), alkoksil ($RO^\cdot$), nitrik oksit ($NO^\cdot$) radikalleri reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinir (Ames vd., 1993; Gülçin, 2012). Bu ROS radikallere ek olarak, canlı organizmalarda singlet oksijen ($^1O_2$), hidrojen persoksit (H_2O_2), hipoklorik asit (HOCl) gibi radikal olmayan diğer ROS'ler de vardır (Pietta, 2000; Gülçin, 2012). Reaktif oksijen ve azot türleri Tablo 2.2'de verilmiştir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), radikal olmamasına rağmen kolayca serbest oksijen radikal oluşumuna sebep olduğundan radikal grubunda değerlendirilir. H_2O_2, demir-bakır gibi geçiş metalleriyle reaksiyona girerek etkin serbest oksijen radikallerini oluşturur. Ortamda Fe(III) olduğunda, süperoksit radikali ($O_2\cdot^-$) bu Fe(III) ile tepkimeye girerek Fe(II)'ye indirger. Fe(II)'de H_2O_2 ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini ($OH^\cdot$) oluşturur. Bu reaksiyon *Fenton Reaksiyonu* olarak adlandırılır ve mekanizması aşağıdaki gibidir (Donaldson, 1994):

$$Fe\ (III) + O_2\cdot^- \rightarrow Fe\ (II) + O_2$$

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \rightarrow Fe\ (III) + OH^- + OH^\cdot \quad \text{(Fenton Reaksiyonu)}$$

[1]*Otooksidasyon:* Oksidasyonun sürekli kılındığı olay, radikal zincir reaksiyonu.
[2]*Araşidonik asit:* Çoklu doymamış yağ asidi.
[3]*Pestisit:* Zararlı organizmaları engellemek için yapılan karışım.

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) ile direkt olarak da reaksiyona girebilir. Reaksiyon sonucu yine hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşur. Bu reaksiyon *Haber-Weiss Reaksiyonu* olarak adlandırılır ve mekanizması aşağıdaki gibidir (Draper, 1990; Donaldson, 1994):

$$H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + O_2 \quad \text{(Haber-Weiss Reaksiyonu)}$$

Hidroksil radikalinin ($OH^{\cdot}$) en önemli zararı, radikal zincir reaksiyonları olarak bilinen lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu membran yapısına, bileşenlerine, geçirgenliğine zarar vererek hücrenin ölümüne kadar giden olaylara sebep olabilir (Gülçin vd., 2003). Öte yandan hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksidaz ve katalaz enzimleri aracılığıyla hücrelerden uzaklaştırılır (Ahmad vd., 2008).

Tablo 2.2. Reaktif oksijen türleri ve serbest olmayan radikaller

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

(Gülçin, 2012)

Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal fonksiyonlarını yerine getirmelerinde oksidan ve antioksidan sistemler arasında bulunan dengenin bozulmaması gerekir. Bu dengenin bozulması durumunda serbest radikaller oluşur ve metabolizmadaki lipid, protein, nükleik asit ve karbohidrat gibi biyomoleküllerin oksidatif hasarına sebep olurlar (Gülçin vd., 2003; Serafini ve Del Rio, 2004). Serbest radikaller, tek sayıda elektron içerdiklerinden kimyasal olarak çok etkindirler. Çok kısa ömürlü olmalarına rağmen hücredeki çeşitli yapılarla farklı etkileşimlerde bulunarak yapısal bozukluk ve değişikliğe sebep olurlar. Bu etkileşim ve değişikliklerin bir kısmı aşağıda verilmiştir (Donaldson, 1994):

1. Proteinler, tiyoller, nükleik asitler, nükleotidlerle tepkime verirler.
2. Hücre zarı bileşenlerine (lipid, enzim, reseptör) kovalent bağlanırlar.
3. Lipid peroksidasyonunu başlatıcı etki gösterirler.

Bu etkileşimler sonucu oluşan hasarlar; kanser, hipertansiyon, yaşa bağlı bağışıklık sisteminin yetersizliği gibi birçok hastalıkta ve biyolojik yaşlanma sürecinde önemli rol oynar (Çakatay ve Kayalı, 2006; Gülçin, 2007a). Reaktif oksijen türlerinin kalp krizi, felç, asteroskleroz, bağışıklık yetersizliği sendromu, diyabet, kanser ve sıtma gibi 100'den fazla hastalığa neden olduğu gözlemlenmiştir (Tanizawa vd., 1992; Hertog vd., 1993; Alho ve Leinonen, 1999; Gülçin, 2012).

Normal bir hücrede uygun bir prooksidan-antioksidan dengesi vardır. Ancak çeşitli sebeplerle antioksidanların seviyesi azaldığında veya oksijen türlerinin üretimi arttığında denge prooksidanlara doğru değişir. Bu durum oksidatif strese yol açar (Sies, 1997; Gülçin, 2012). Günümüzde birçok hastalığın bir dereceye kadar oksidatif stresle bağlantılı olduğu bilinmektedir (Çakatay ve Kayalı, 2006; Gülçin, 2007a). Reaktif oksijen türleri ile antioksidan koruma sistemleri arasındaki dengesizlik biyolojik olarak çeşitli makromoleküllerde kimyasal değişikliklerle sonuçlanabilir. Bu durum pek çok hastalığın başlangıcı ve gelişimine sebep olan patobiyokimyasal mekanizmalara neden olur (Feredioon vd., 1992).

Yukarıda sayılan zararların yanında düşük miktarlarda olduklarında serbest radikallerin bazı faydaları da vardır. En önemli faydaları hasarlı ve kanserli olan hücrelerin ölümüne yardım etmeleridir. Ayrıca mikroorganizmaların zararsız hale getirilmesi, sitokrom p450 tarafından canlıya zararlı kimyasal maddelerin detoksifikasyonu, enfeksiyonlara karşı savunma, oksidatif fosforilasyon, büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu, tiroksin gibi moleküllerin biyosentezine katılma, gen transkripsiyonu gibi yaşamsal faaliyetlerde kullanılırlar. Örneğin NO, endotel hücreler tarafından kullanılır ve trombozis, lökosit adezyonu, düz kasların kan basıncının düzenlenmesi için gereklidir. Yine NO, taşıyıcı bir maddedir, sinir sistemi ve beyin bağlantılarının düzenlenmesinde, bağışıklığın oluşmasında mediatör gibi rolleri vardır. Yine H_2O_2 ve süperoksit, ikinci haberci gibi davranabilirler (Karabulut ve Gülay, 2016; Devasagayam vd., 2004; Droge, 2002; Valko vd., 2007; Fang vd., 2002).

2.2.2. Antioksidanlar

Serbest radikallerdeki ortaklanmamış elektronlar kararlı duruma geçmek için kararlı halde bulunan diğer bir bileşikten elektron alarak bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline getirirler (Gülçin vd., 2003; Gökpınar vd., 2006). Aerobik (oksijenli solunum yapan) organizmalarda, serbest radikallerin hem oluşumlarını hem zararlı etkilerini engellemek amacıyla *"antioksidan"* olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları bulunmaktadır (Halliwell, 1996). Bu savunma mekanizmaları, serbest radikallerin lipid, protein, nükleik asit gibi biyomoleküllere vereceği hasarı önlerler. Antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerinden metabolizmayı koruyarak birçok kronik hastalığın ilerlemesini engellerler (Lai vd., 2001; Gülçin vd., 2005c).

Yiyeceklerin hazırlanması ve tüketimi esnasında ortaya çıkan değişikliklerden birisi oksidasyondur. Beslenme sisteminin bozulmaya başlamasının ana sebebi lipid oksidasyonudur. Bu oksidasyonlar besinlerin yapısı, besleyiciliği, rengi, kokusu, kalitesi ve güvenilirliğini etkiler. Antioksidanlar, beslenmenin temel bir maddesi olan lipidlerin oksidatif bozulmasını önleme yoluyla gıdaların kalitesini korurlar. Biyolojik sistemlerde antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin varlığı yaşam için temel bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsinojenik, antiaging gibi pek çok biyolojik fonksiyona antioksidanların fayda sağladığı bilinmektedir (Cook ve Samman, 1996). Vücudumuzda kalkan görevi yapan antioksidanlar, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize ederken bu sırada serbest radikal haline gelmemektedirler (Prior ve Cao, 2000). Antioksidan bileşikler, serbest radikallerin zararlı etkilerinden canlı metabolizmasını korudukları gibi, yiyeceklerin ve ilaçların üretimi ve depolanması esnasında bozulmasının ana sebeplerinden biri olan lipid peroksidasyonunu geciktirerek raf ömrünü uzatırlar (Gülçin, 2010). Antioksidanlar, gıdaların bozulmasını engellemek amacıyla katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılırlar. Bu nedenle antioksidanlar gıda endüstrisinde çok önemli rol oynarlar. Eskiden beri yemeklerde kullanılan baharatlar da iyi bir antioksidan kaynağıdır (Gülçin, 2005a).

Antioksidanlar, başlıca 4 yolla oksidanları etkisiz hale getirirler (Gökpınar vd., 2006; Şit, 2011):

1. Giderme etkisi, temizleyici etki (scavenging): Oksidanları yeni bir moleküle dönüştürerek etkisiz hale getirirler. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki ederler (Zintzen, 1997).

2. Söndürme etkisi, baskılayıcı etki (quenching): Antioksidanlar, oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive ederler. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder. Baskılayıcı etki ile reaksiyon hızını azaltırlar (Packer, 1991).

3. Zincir kırıcı etki (chain breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp oksidanların zararlı etkilerini önleyici şekilde etki eder. Hücresel kinaz kayıplarını önleyip oksidasyon reaksiyonlarını durdururlar (Van-Der Meulen vd., 1997).

4. Onarıcı etki (repair): Oksidatif olarak zarar görmüş biyomolekülleri onararak yenilenmelerini sağlarlar (Evelson ve Ordonez, 1997).

Antioksidanlar vücutta sentezlenebildiği gibi diyet ile dışarıdan da alınabilirler. Bir diğer deyişle canlılarda antioksidan savunma sistemi iki ana gruba ayrılır. Bunlar; metabolizmada üretilen *(endojen)* ve dışarıdan diyet ile alınan *(ekzojen)* antioksidan sistemleridir. Endojen antioksidanlar küçük molekül yapısına sahip basit bileşikler olabildiği gibi karmaşık yapıdaki enzimler halinde de olabilirler (Bursal, 2009; Gülçin, 2007a).

2.2.2.1. Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar; H_2O_2 uzaklaştırıcı peroksidaz ve katalaz gibi enzimler, ürik asit gibi küçük moleküller, ferritin ve transferrin gibi bazı metal bağlayıcı proteinler ve glutatyon gibi bileşiklerdir. Bu endojen antioksidanların tamamı reaktif türleri gidererek ROS'nin zararlı etkilerinden metabolizmayı korurlar (Bursal, 2009).

Endojen antioksidanlar, enzim olanlar ve enzim olmayanlar olarak ayrılabilir. Enzim olanlara örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx),

glutatyon s-transferaz (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz verilebilir. Enzim olmayanlara ise melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin verilebilir (Harold, 2006).

Süperoksit dismutaz (SOD), bitkisel ve hayvansal ürünlerde bulunur. Süperoksit radikallerini H_2O_2'ye ve moleküler oksijene dönüştürür (Kwee vd., 1991).

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Katalaz (CAT), hidrojen peroksitin hidroksil radikallerini oluşturmasını engellemektedir. Bitkisel ve hayvansal ürünlerde bulunur (Gaetani vd., 1996). Katalaz, H_2O_2'yi oksijen ve suya parçalar.

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Glutatyon peroksidaz (GPx), eritrosit içerisinde bulunur. Peroksit, hidrojen peroksit ve hidroperoksitlerin alkollere indirgenmesini sağlayarak hidroksil radikallerinin oluşumunu engeller (Sen ve Chakraborty, 2011). Ayrıca hidroperoksitler tarafından hemoglobinin methemoglobine dönüşümünü önler.

2.2.2.2. Ekzojen antioksidanlar

Metabolizmadaki endojen savunma sistemini kuvvetlendirmek amacıyla vücuda dışarıdan takviye edici antioksidan maddeler alınmaktadır. Bu maddeler, ekzojen savunma sistemleri olarak adlandırılmaktadır (Halliwell, 1991). Ekzojen antioksidanlar; vitamin, ilaç ve gıda antioksidan maddeleri şeklinde günlük hayatta kullanılırlar. Vitaminlere örnek olarak α-tokoferol (E vitamini), retinol (A vitamini), β-karoten, askorbik asit (C vitamini), folik asit (folat), ürik asit verilebilir (Harold, 2006). Ekzojen antioksidanlar, *sentetik* ve *doğal* olmak üzere 2 ana grupta incelenebilir.

Sentetik antioksidanlar:

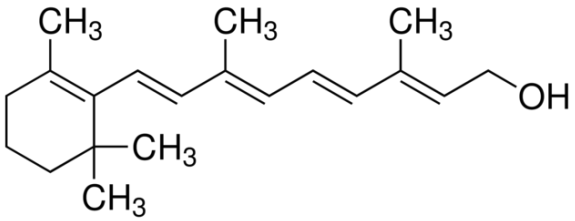
Sentetik antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), propil gallat (PG) ve tersiyer bütil hidrokinon (TBHQ)

verilebilir. Sentetik antioksidanlar genellikle gıda ve farmakoloji uygulamalarında kullanılmaktadır. Gıdada katı ve sıvı yağların çözünürlüğünü artırmak için alkillerle yer değiştirirler. Ancak, sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle kullanımı yasal olarak kısıtlanmıştır (Gülçin, 2012). Bu nedenle sentetik antioksidanların yerini alternatif doğal ürünler almıştır. Doğal kökenli antioksidanların etkilerinden daha fazla faydalanma ve faydalarını artırmak amacıyla son yıllarda bitkisel kökenli doğal antioksidan çalışmaları büyük oranda artmıştır (Gülçin, 2008). 1980'lerden bu yana doğal antioksidanlar, sentetik antioksidanlara alternatif olarak görülmektedir (Gülçin, 2012).

Doğal antioksidanlar:

Doğal antioksidanlar, bitkilerin yaprak, gövde ve tohumları başta olmak üzere bütün dokularında bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, sebze ve meyve bakımından zengin bir beslenmenin hastalıklara yakalanma, kalp-damar hastalıkları, bazı kanser türleri, diyabet, alzheimer hastalığı ve katarakt riskini kayda değer bir şekilde azalttığını göstermiştir (Kalkan, 2007; Ak ve Gülçin, 2008; Gülçin, 2012). Doğal antioksidanlar, en çok yeşil sebzelerde, tohumlarda, baklagillerde, A vitamini, C vitamini, E vitamini ve bazı B vitamini içeren besinlerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, yapraklarda, çiçeklerde ve köklerde bol miktarda bulunmaktadır (Gülçin vd., 2005b; Pratt ve Hudson, 1990; Gülçin, 2007a). Başlıca doğal antioksidanlar; tokoferoller, askorbik asit, fenolik maddeler, kumarinler ve fenolik bileşikler sınıfında yer alan karotenoidler ve flavonoidlerdir. Vitamin C'den başka, bu antioksidanların her bir grubu yapısal olarak farklı bileşikler içerir. Örneğin, bu zamana kadar 600'den fazla karotenoid tanımlanmış ve bunların yaklaşık 50 tanesi insan besin grubunda bulunmaktadır (Gülçin, 2012).

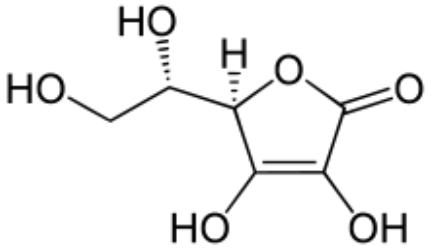
A vitamini (retinol); saf halde açık sarı kristaller halinde olan, yağda ve organik çözücülerde çözünen bir vitamindir, suda çözünmez (Şekil 2.4). Fazlası genellikle karaciğerde depolanır. Molekülündeki çift bağlar ışıkta hava oksijeni tarafından kolaylıkla oksitlenebilir ve aktivitesi kaybolur. Görme, üreme, büyüme ve epitel dokunun sağlamlığı için gerekli olan bir grup bileşiktir. Bu bileşiklere *"retinoidler"* de denir. Retinol, retinoik asit, retinal ve beta–karoten bu grupta bulunur.



Şekil 2.4. A vitamini'nin kimyasal yapısı

Vitamin A'nın öncüsü olan β-C (provitamin A) ve retinoidler, önemli bio-antioksidanlardandır. Bunlar polien zincir atomlarına bağlanarak (Burton ve Ingold, 1984) veya polien zincir atomlarının α-karbonundan proton ayrılmasını sağlayarak reaktif oksi radikallerin ve serbest radikallerin süpürülmesini sağlarlar. β-C ve retinoidler, polien zincirinde singlet oksijen ($^1O_2$) gibi uyarılmış molekülleri etkisiz hale getirirler (Krinsky ve Deneke, 1982).

C vitamini (askorbik asit); suda çözünen esensiyel bir vitamindir (Şekil 2.5). Özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici olarak görev yapar. Demirin emiliminde indirgeyici rolü ile midede ferri demiri (Fe^{3+}) ferro demire (Fe^{2+}) indirgeyerek emilimde görev alır. İmmunite ve yara iyileşmesinde etkilidir. Çok güçlü bir indirgeyici olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidro askorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Bunun yanında, fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demiri oluşturabilir. Yani hidroksil radikalinin üretimine katkıda bulunabilir (Akkuş, 1995).

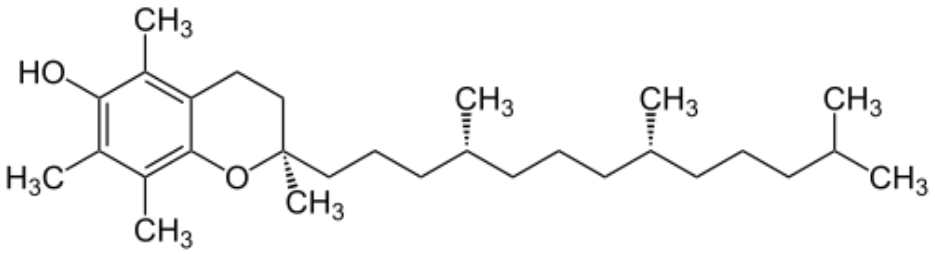


Şekil 2.5. C vitamini'nin kimyasal yapısı

Askorbik asit (C vitamini), en güçlü antioksidanlardan biridir ve doğal antioksidanlar arasında en az toksik olanıdır (Weber vd., 1996). Kolayca hidrojen atomu veren ve bu sırada dehidrokarboksilik asite dönüşen kuvvetli bir indirgeyici ajan, yani antioksidandır (Keha ve Küfrevioğlu, 2007). Askorbik asit, elektron transferiyle radikal zincir reaksiyonlarını kesebilir. Bir konjuge sistem formunda bulunan çift bağlı karbonil grubu ve bir çift hidroksil grubu bulunduran çift bağlardaki gruplar bir karboksilik asit vinil türevi gibi davranır. Diğer bir değişle askorbik asitin deprotonize edilmiş formu stabil olmuş enol gibi kabul edilebilir. ROS ile etkileştiğinde, askorbil serbest radikal aracıları ile dehidroaskorbata dönüşür. ROS'ni giderme etkisine sahip olan askorbik asidin süperoksit radikal anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijene karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Sulu çözeltilerde askorbik asit ayrıca etkin bir şekilde azot oksit türlerini de yok edebilir (Gülçin, 2012).

Bazı bileşikler zayıf bağlı H atomlarına sahiptir. Bunlar serbest radikalleri nötralize etmek için bu H atomlarını kullanırlar. C vitamini de serbest radikale H atomunu vererek onu nötralize ederken kendisi "askorbat radikali" formuna dönüşür. Fakat askorbat radikali rezonans yapısından dolayı oldukça kararlıdır. Serbest radikallere oranla çok daha az reaktiftir (Buettner ve Jurkiewicz, 1996).

E vitamini (tokoferol); bu terim tokoferolün biyolojik olarak aktivite gösteren 8 izomerinin genel bir adıdır. Alfa-tokoferol en çok bulunan ve vücutta en kuvvetli etkiye sahip izomerdir. Suda çözünmeyen, yağda ve organik çözücülerde çözünen, güçlü antioksidan etki gösteren bir vitamindir. Serbest radikalleri nötralize eder ve hücre membranlarının zarar görmesini önler, hücre duvarını korur. Kırmızı kan hücrelerini korumaya yardım eder, kalp hastalıklarından, katarakt ve bazı kanserlerden korunmaya yardımcı olur.



Şekil 2.6. E vitamini'nin kimyasal yapısı

Vitamin E'nin radikal giderme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı onarma mekanizmalarının tümünü kullanabildiği, bu nedenle çok hızlı ve geniş bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Van-Der Meulen vd., 1997).

Tokoferoller, lipid peroksil radikallerine ($LOO^{\cdot}$), hidroksil gruplarının hidrojenini verip tokoferoksil radikalleri oluşturarak serbest radikalleri giderirler ve böylece antioksidan olarak rol oynarlar. Hücrelerin membran ve lipid kısımlarını korurlar. Kolesterolün oksidasyonunu önlerler. Tokoferollerin en önemli antioksidan özellikleri, lipoproteinlerdeki lipid oksidasyonunu önlemede belirleyici rol oynamalarıdır. α-tokoferol, bu etkiden sorumlu esas vitamin E formudur. Serbest radikali gidererek kendisi radikal hale gelen tokoferol, C vitamini ile etkileşerek kararlı forma gelir (Diplock, 1998; Gök ve Serteser, 2003; Saldamlı ve Sağlam, 1998; Anıl, 2006).

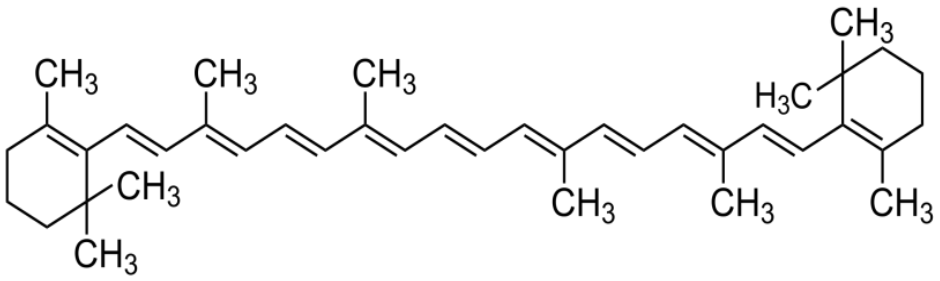
$$LOO^{\cdot} + \text{Toc OH} \rightarrow LOOH + \text{Toc O}^{\cdot}$$

$$\text{Toc O}^{\cdot} + \text{İnd. Vit C} \rightarrow \text{Toc OH} + \text{Oks. Vit C}$$

Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksil radikallerini ve diğer radikalleri indirger (Packer, 1991). Vitamin E, zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Glutatyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidaz, oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E, peroksitlerin sentezini engeller. α-tokoferolün, kuyruğu sayesinde yüzeye yakın olan aktif kroman halkasıyla birlikte zar alt tabakasına yerleşme özelliği vardır. Bu hem lipid antioksidanı olarak iş görmesine hem de diğer antioksidanlarla etkileşime geçerek oksitlenmiş halinden kendi haline yeniden dönüşmesine imkan sağlar. Diğer antioksidanlarla, özellikle de suda çözünenlerle beraber hareket etmesi antioksidan sistemin önemli bir özelliğidir.

Karotenoidler; fotooksidatif süreçlere karşı bitkileri korumada önemli rol oynarlar. Etkili antioksidan çeşitlerinden biridir. Örneğin, peroksil radikalleri ve tekli moleküler oksijeni giderme etkisine sahiptirler (Stahl ve Sies, 2003). A vitamininin ön maddesi olan β-karotenin (Şekil 2.7), singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır (Akkuş, 1995). Karotenoidler konjuge çift bağlarından dolayı singlet oksijeni bastırıcı, serbest radikal toplayıcı, hidrojen peroksidin oluşum hızını

azaltıcı özellik gösterirler. Yapılarındaki çift bağ sayısı arttıkça antioksidan kapasiteleri de artmaktadır (Gök ve Serteser, 2003; Anıl, 2006).

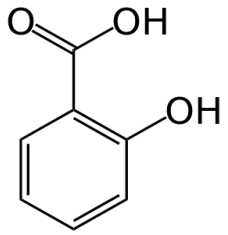


Şekil 2.7. β-karoten'in kimyasal yapısı

Fenolik bileşikler; en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubu bulundururlar. Bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır. Fenolik bileşikler; bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Coşkun, 2006). Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında etkilidir. Bitki kökenli pek çok gıdanın tat ve aromasına katkıda bulunabilirler. Özellikle gıdalarda acılık ve burukluğun kaynağıdırlar. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin renklerinin oluşmasında görev alır (Zor, 2007). Fenolik bileşikler, bitkilerde oldukça fazla miktarda bulunan, canlılar için birinci derecede gerekli olmayan sekonder metabolitlerdir. Bitkileri, böcek ve hayvanların zararlarına karşı korurlar. Yapısal olarak büyük farklılıklarından dolayı bitkilerde ve bunlardan elde edilen ürünlerde binlerce farklı fenolik bileşik bulunmaktadır.

Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılır. Fenolik asitler, hidroksi benzoik ve hidroksi sinamik asit olarak iki gruba ayrılır. Hidroksi benzoik asit olanlara örnek olarak salisilik asit (Şekil 2.8), m-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asit verilebilir. Hidroksi sinamik asitlere örnek olarak ise kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asit verilebilir (Balasundram vd., 2006).

Fenolik bileşikler, doğal antioksidan madde özelliği göstermektedirler. Serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları durdurarak veya engelleyerek kanser, kalp hastalığı ve akciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıkların oluşumuna engel olurlar.



Şekil 2.8. Salisilik asit'in kimyasal yapısı

Fenolik antioksidanlar; serbest radikal sonlandırıcı ve metal şelatör gibi özellikler gösterirler (Stevenson ve Hurst, 2007). Bazı bitki fenolikleri son zamanlarda antioksidan olarak kabul edilmekte ve ticari olarak üretilmektedir. Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

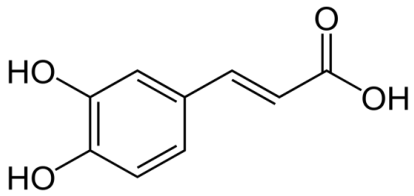
Fenolik antioksidanlar, genel olarak yapılarında bulunan OH grupları sayesinde oksidanlara H atomu vererek antioksidan özellik gösterirler. Lipid radikallere, hızla H^+ vererek lipid oksidasyonu ile etkileşirler. Peroksil (ROO·) ve alkoksil (RO·) radikallerini parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırırlar (Michalak, 2006).

$$ROO^{\cdot} + AH \rightarrow ROOH + A^{\cdot}$$
$$RO^{\cdot} + AH \rightarrow ROH + A^{\cdot}$$
$$ROO^{\cdot} + A^{\cdot} \rightarrow ROOA$$
$$RO^{\cdot} + A^{\cdot} \rightarrow ROA$$

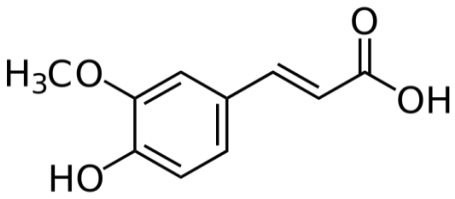
Oluşan fenoksi radikali yeni bir serbest radikal oluşumunu başlatmamalı veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmamalıdır. Bu yönden fenolik antioksidanlar mükemmel H^+ ve e^- donörleridir. Fenoksi radikali, aromatik halka etrafında ortaklanmamış elektronların lokalizasyon değişiklikleri ile dengelenir. Fenolik asitler ve onların esterlerinin antioksidan aktiviteleri molekül içerisindeki OH grubu sayısına bağlıdır (Feredioon vd., 1992). Bir fenolün orto veya para pozisyondaki iki OH grubu onun antioksidan aktivitesini artırır.

Kafeik asit (Şekil 2.9), yağların oksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterir. Ferulik asit (Şekil 2.9), hem doğal bir antioksidan hem kimyasal önleyicidir (Huang vd., 1988; Wargovich vd., 2000). Serbest radikallere H atomu vererek, radikal ve aktif

oksijen türlerini yok ederek ve aktif oksijen üretimine sebep olan UV ışığı absorblayarak antioksidan özellik gösterir.



Kafeik asit



Ferulik asit

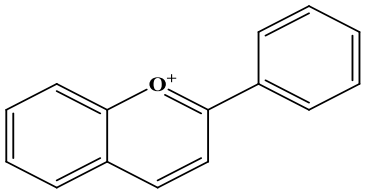
Şekil 2.9. Kafeik asit ve ferulik asit'in kimyasal yapıları

Fenolik bileşiklerin antialerjik, antiinflamatuar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik etkiye sahip olduğu yapılan pek çok araştırma ile tespit edilmiştir (MacDougall, 2002). Antioksidan olarak fenolik bileşikler; kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları ve alzheimer gibi hastalıkları engellemektedirler (Bakkalbaşı, 2009).

Flavonoidler; 15 karbonlu, C6–C3–C6 yapısında olan polifenolik bileşiklerdir (Formica ve Regelson, 1995). Flavonoidler, gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Flavonoidlerin geniş bir grubu gıdaların renklerini veren bileşiklerdir. Flavonoid bileşik sınıfında olan antosiyanidinler, doğal renk maddeleri olup sebzelerin, meyvelerin, meyve sularının pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerinin oluşmasını sağlarlar (Vining, 1990). Flavonoidler, yapısal olarak; antosiyanidinler ve proantosiyanidinler, flavonlar ve izoflavonlar, flavonollar, flavanonlar, kateşinler, kalkon ve auronlar olarak gruplandırılabilir (Halfon, 2005).

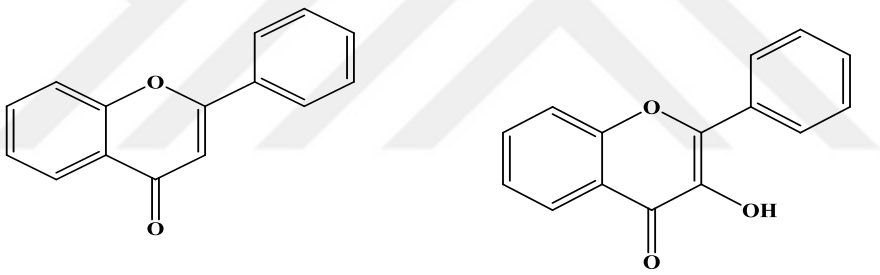
Antosiyanidinler, yaygın ve önemli bir türdür. Bitkilere, sebzelere, meyvelere, meyve sularına ve taç yapraklara pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerini veren fenolik bileşiklerdir (Castaneda-Ovando vd., 2009). Antosiyanidinlere örnek olarak pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin, malvinidin verilebilir (Göğüş ve Fadıloğlu, 2006). Proantosiyanidinler, kateşinlerden veya löykoantosiyanidinlerden oluşan polimerik yapılardır. Kateşin/epikateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa

“prosiyanidin”, kateşin/gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa “prodelfinidin” denir (Shahidi ve Naczk, 1995).



Şekil 2.10. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı

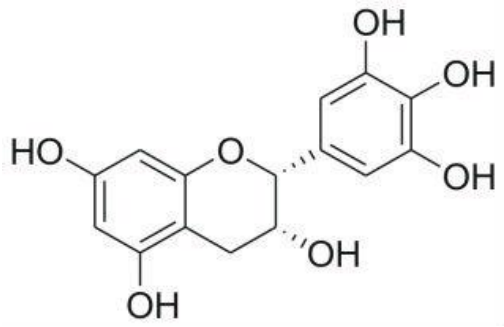
Flavonlara örnek olarak apigenin, luteolin, krisoeriol, trisin verilebilir. Flavonollara örnek olarak kaemferol, kuersetin, mirisetin, isoramnetin verilebilir. Flavanonlar, ortadaki halkada çift bağ olmaması ile flavonlardan ayrılırlar. Bu glikozitler özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunurlar. Örnek olarak naringin, hesperidin, naringenin ve elma ve armutta bulunan floretin ve floridzin verilebilir (Saldamlı, 2007).

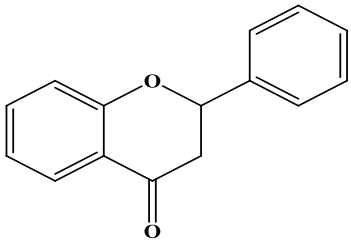


Flavon Flavonol

Şekil 2.11. Flavon ve flavonolların kimyasal yapıları

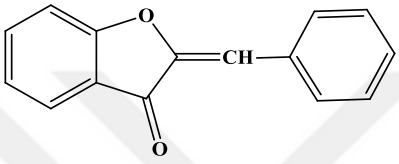
Kateşinlerin kimyasal yapıları, flavon-3-ol’dür. Gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak hava oksijeni ile kolaylıkla kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar. Örnek olarak kateşin, gallokateşin, epikateşin, epigallokateşin verilebilir (Shahidi ve Naczk, 1995). Auron ve kalkonlar da flavonoidlerin önemli bir sınıfıdır.



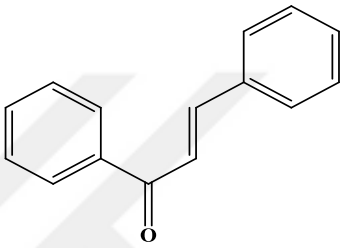


Kateşin Flavanon

Şekil 2.12. Kateşin ve flavanonların kimyasal yapıları



Auron



Kalkon

Şekil 2.13. Auron ve kalkonların kimyasal yapıları

Flavanoidler; bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Flavonoidler ve diğer bitki fenolikleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Süperoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit gibi radikalleri temizleyerek antioksidan etki gösterdikleri gibi, demir ve bakır şelasyonu, α-tokoferol rejenerasyonu gibi fonksiyonlar da gösterirler. Ayrıca antitümör, antialerjik, antiviral, antiinflamatuar, antitrombotik, immünstimülan etkileri de vardır. Fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuar (iltihap önleyici) özellik gösterirler (Formica ve Regelson, 1995). Bazı flavonoidler antikanser ve antihepatoksik özelliklerinden dolayı ilaç olarak kullanılmaktadır.

2.3 Kanser

Kanser, günümüzün önemli sağlık problemlerinden biri olup kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanan ve belirsiz etyopatolojisi bulunan ilerleyici bir hastalıktır (Weaver ve Hedrick, 1997). Kanser, daha çok genetik bir hastalık olup hücresel gelişimi kontrol eden hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili genlerdeki bozukluklar sonucu kontrolsüz hücre büyümeleri ile karakterize edilen patolojik bir durumdur (Karp, 2005). Kanser, kontrolsüz çoğalan hücrelerin normal hücreleri öldürmeleri sonucu ortaya çıkan, 200'den fazla türü tanımlanan bir hastalık grubudur. Vücuttaki tüm doku ve organlarda kanser gelişebilmektedir (Yıldız, 2008). Kanserin gelişmesine, kalıtsal faktörlerin yanında zararlı ışınlar, sigara, çevre kirliliği, yanlış beslenme gibi çevresel faktörler de etki eder. Deneyler ve epidemiyolojik çalışmalar, beslenme ve kanser arasında kuvvetli ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Besinler, bir yandan kanser yapıcı maddeleri içerirken, diğer yandan da kanser önleyici maddeleri içermektedir (Yıldız, 2008). Kanser hastalıklarını tedavi etme yöntemleri genelde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapi gibi yöntemlerdir. Bu yöntemler, hastaların bireysel özelliklerine ve hastalık evresine göre kullanılır. Bir yöntem kafi gelmezse birden fazla yöntem de kullanılabilmektedir (Ertürk, 2006). Bunun yanında kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi ve kemoterapi yöntemlerinin bilinen birçok toksik etkisi vardır (Pouzet ve Travis, 1992).

Kanser çok basamaklı bir süreçtir. Hücreler zamansız ve aşırı çoğalır. Bağışıklık sisteminin gözetiminden kaçar ve uzaktaki dokuları da istila eder. Metabolik ve davranışsal değişiklikler meydana getirir (Merlo vd., 2006). İnsan vücudunda normal olarak hücrelerin gelişim ve ölümü bir düzen içinde yürütülür. Kanserde ise bu durum kontrolden çıkmıştır ve hücreler anormal bir şekilde çoğalır. Aslında buna sebep olan bozuk genlerdir. Normal süreçte hücrelerin işlevlerini genler yönlendirir. Hücreler, genlerden aldıkları komutlara göre çoğalırlar. Bazı genlerin yapısı aşırı güneş ışığı, sigara vb. sebeplerle değişir. Bu değişen ve bozulan genler (onkogen), hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olur veya herhangi bir şekilde hasara uğramış hücrelerin ölmesini engeller. Gittikçe anormal derecede fazlalaşan hücreler "*tümör*" olarak adlandırılan kitleleri oluştururlar (Sönmez vd., 2005). Tümörler iyi ve kötü huylu olarak ikiye ayrılır. *İyi huylu tömörler* kanser değildir, vücudun diğer taraflarına yayılmazlar. Hayati

riskleri yok denecek kadar azdır, genelde cerrahi müdahale ile alınırlar ve tekrarlanmazlar. *Kötü huylu tümörler* kanserdir. Buradaki hücreler anormaldir, kontrolsüz ve düzensiz bölünürler, normal dokuları sıkıştırabilir, içine sızabilir ya da tahrip edebilirler. Kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa kan ya da lenf dolaşımı aracılıcığla vücudun diğer taraflarına gidebilirler, orada yeni tümör kolonileri oluşturarak bölünmeye devam ederler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer taraflarına yayılmasına "*metastaz*" denir.

Kansere neden olan çeşitli risk faktörleri vardır. Bunlar *genetik, çevresel, biyolojik, davranışsal* risk faktörleri olarak dört grupta incelenebilir. Genetik risklere aileden kalıtımsal olarak geçen genler; çevresel risklere hava kirliliği, radyasyon, UV ışınları; biyolojik risklere cinsiyet, yaş, ırk; davranışsal risklere sigara-alkol tüketimi, yanlış diyet vb. örnek olarak verilebilir.

Kolon kanseri (HT-29), kalın bağırsakta görülen bir hastalıktır. Toplamda 160 cm civarında olan kalın bağırsağın yaklaşık 145 cm'si kolon kısmıdır. Kolonun görevi difüzyondur. Yiyeceklerden besin ve suyu alır, geriye kalan atığı anüs yoluyla dışarı gönderir. Kolon kanserinin önemli bir sebebi, bağırsak mukozasından çıkan "polip" olarak adlandırılan tomurcuklardır. Kolon kanseri sık görülen ilk 5 kanser hastalığı arasındadır. Genelde 50 yaşından sonra görülür ve erkek-kadın farkı yoktur. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2014 yılı verilerine göre Türkiye'de 5.342 kişide (tüm kanserler içerisinde % 8) kolon kanseri vakası görülmüştür (HSGM, 2014).

Göğüs kanseri (MCF-7), meme dokusundaki hücrelerden kaynaklanır. Meme kanallarından kaynaklanan "duktal" kanser, süt bezlerinden kaynaklanan "lobüler" kanser gibi çeşitleri vardır. Kadınlarda görülen kanser tipleri arasında birinci sırada yer alır. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün 2014 yılı verilerine göre Türkiye'de 16.246 kişide (tüm kanserler içerisinde % 25) göğüs kanseri vakası görülmüştür (HSGM, 2014).

Karaciğer kanseri (HepG2), nispeten nadir görülen kanser türüdür. Özellikle hepatit-B enfeksiyonu olan toplumlarda daha çok görülür. Genellikle "hepatosit" denilen karaciğer hücrelerinden kaynaklanır.

Kanser tedavileri genel olarak beş yolla yapılır:

1. Cerrahi tedavi: Kanserli dokunun vücuttan çıkarılmasıdır. Pek çok kanser türünde uygulanan ilk yöntemdir.

2. Kemoterapi: Normal hücrelere en az zarar verecek şekilde, kanserli hücreleri öldürebilen bir ilaç tedavisi yöntemidir. Kemoterapi, kanserli hücrelerin çoğalmasını engeller, bu arada normal hücrelere de etki edebilir.

3. Radyoterapi: Işınla tedavi yöntemidir. Kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebilir. Normal hücreleri de etkileyebilir fakat bu hücreler daha sonra iyileşebilir.

4. İmmünoterapi: Bağışıklık sistemi, vücudu enfeksiyon ve hastalıklara karşı koruyan bir sistemdir. Bağışıklık sistemi, normal ve kanserli hücreler arasındaki farkı ayırt edebilir. İmmünoterapide, bağışıklık sistemini uyaran (kanserle savaşabilmek için) ilaçlar kullanılmaktadır.

5. Hormon tedavisi: Bazı kanser türleri (prostat ve göğüs kanserleri gibi) vücut tarafından salgılanan hormonlardan beslenir ve gelişir. Vücudun bu hormonları üretmesi engellenebilir. Hastalar ya ilaçla tedavi edilir ya da hormonları üreten bez/organları ameliyatla alınabilir.

Bu tedavi yöntemleri tek başına uygulanabileceği gibi kanserin türüne göre birden fazla yöntem de uygulanabilir (Ertürk, 2006). Kanser tedavisi amacıyla birçok modern antikanser ilaçlar geliştirilmiş olmasına rağmen çoğu kanser tipi için kesin olarak tedavi edici ürün henüz bulunamamıştır. Bu nedenle kanser tedavisinde kullanılabilecek antikanser ilaçların geliştirilmesine yönelik araştırmalar artarak devam etmektedir (Avendano ve Menendez, 2008).

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Baczek ve arkadaşları (2017), *tanacetum balsamita* ve *tanacetum vulgare* bitkilerinde antioksidan ve antibakteriyel aktivite araştırması yapmıştır. *Tanacetum vulgare*'nin *tanacetum balsamita*'dan daha yüksek antioksidan potansiyeli olduğunu, bitkilerde fenolik asit olarak kafeik asit, ferulik asit, klorogenik asit, rosmanirik asit, cichoric asit bulunduğunu, flavonoid bileşik olarak kuersetin, kozmosin, luteolin 7-O-glukozit, chrysoeriol bulunduğunu belirtmişlerdir.

Devrnja ve arkadaşları (2017), *tanacetum vulgare* bitkisinde sitotoksik ve antibakteriyel aktivite araştırmıştır. Bitkide birçok fenolik ve flavonoid bileşikleri tespit etmişler, antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip biyolojik aktif maddeler kaynağı olduğunu, HeLa ve MRC-5 hücrelerine karşı antiproliferatif etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Geçibesler (2017), *tanacetum abrotanifolium* bitkisi üzerinde antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal biyolojik aktivite çalışmaları yapmıştır. *Tanacetum abrotanifolium'*un ham ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (250 ve 500 µg/ml) önemli antiproliferatif aktivite gösterdiği, farklı polarite solvent özlerinin, fraksiyonların ABTS'ye karşı önemli temizleme aktivitesi gösterdiği ve orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Şen ve arkadaşları (2017), *tanacetum argenteum subsp. argenteum* endemik bitkisinin biyolojik aktivitesini incelemiştir. 30 µg/ml konsantrasyonda kloroform ekstresinin HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarının gelişimini sırasıyla % 89 ve % 73, n-hekzan ekstresinin HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarının gelişimini sırasıyla % 75 ve % 74 inhibe ederek önemli bir antiproliferatif aktivite gösterdiği, kloroform ekstresinin orta derecede antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Topdemir ve arkadaşları (2017), yaptıkları bir çalışmada bazı *tanacetum* türlerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Farklı in vitro metodlar kullanarak antioksidan aktivitelerini incelemişler, 61,86 ile 70,77 arasında değişen % inhibisyon bulmuşlar ve birbirine yakın ve çok iyi ABTS radikal giderme aktivitesi gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Arıtuluk ve arkadaşları (2016), bazı *tanacetum* türlerinin antioksidan aktivitesini, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarını araştırmışlar ve tüm bitki özlerinin antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP analizlerinin benzer sonuçlar ortaya koyduğunu, *tanacetum praeteritum subsp. massicyticum'*un en yüksek fenolik (149,93 mgGAE/g ekstrakt) ve flavonoid (33,42 mgQE/g ekstrakt) madde miktarına sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Marzouk ve arkadaşları (2016), *tanacetum sinaicum* bitkisinde fenolik bileşikler araştırmıştır. Bitkide 8 flavonoid aglikon, 4 flavonoid glikozid ve 3 fenolik bileşik belirlenmiştir.

Servi (2016), bazı *tanacetum* L. türleri üzerinde fitokimyasal araştırma ve biyoaktivite çalışmaları yapmıştır. Bitkilerin uçucu yağının çok düşük oranda PRAP antioksidan aktivite gösterdiği, hücre hatlarına karşı ise herhangi bir sitotoksik aktivite göstermediği belirtilmiştir.

Şimşek (2016), *tanacetum alyssifolium* bitkisinden axillarin bileşiği izole etmiş ve antikanserojen ve antioksidan aktivitelerini incelemiştir. Fe^{3+} indirgeme kapasitesinin standart olan troloks'tan daha fazla olduğu, Cu^{2+} indirgeme kapasitesinin troloks'tan daha az olduğu, HeLa hücresine karşı en yüksek antikanserojen etkiyi 100 ve 50 µg/ml konsantrasyonda gösterdiği belirtilmiştir.

Yur (2016), *tanacetum haussknechtii* bitkisinin uçucu yağının kimyasal, enantiomerik ve biyolojik aktivite yönlerini incelemiştir. Metanollü ekstreler ve çiçek kısmından elde edilen etil asetatlı ekstrenin BHT ve gallik asite göre orta derecede antioksidan aktiviteye sahip olduğu ancak uçucu yağların uygulanan deney sistemlerinde antioksidan etkili olmadığı belirtilmiştir.

Altay (2015), *salvia fruticosa* bitkisinin antioksidan ve sitotoksik özelliklerini araştırmıştır. DPPH ve ABTS radikallerine karşı yüksek sönümleme aktivitesi ve yüksek oranda demir (II) iyonları şelatlama aktivitesi gösterdiği, HT-29 kanser hücrelerine karşı 0,6 mg/ml konsantrasyonda % 90'dan fazla sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

İrtem Kartal (2015), *salvia absconditiflora* bitki ekstrelerinin antioksidan ve HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik özelliklerini araştırmıştır. Bitkinin haziran su ekstresinin en yüksek radikal giderme kapasitesi gösterdiği, nisan metanol ekstresinin 108,77 mg GAE/g ekstre ile en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğu, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 gen ifadelerinin metanol ekstresi uygulandığında inhibe edildiği belirtilmiştir.

Yumrutaş ve arkadaşları (2015), *asteraceae* familyasındaki bazı bitki türlerinde antioksidan ve antiproliferatif aktivite araştırması yapmıştır. Bitkilerin metanol ekstraktının önemli toplam fenolik miktara sahip olduğunu, 100 µg/ml konsantrasyonda bitki ekstraktlarının güçlü antiproliferatif etki sergilediğini, özellikle 100 ve 250 µg/ml'de ekstrakt konsantrasyonlarının MCF-7 hücre canlılığını azalttığını belirtmişlerdir.

Hisarlı (2013), *salvia absconditiflora* bitkisinin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında sitotoksik etkisini araştırmıştır. Sulu ekstrenin hücre proliferasyonunu zamandan bağımsız ve doza bağlı olarak engellediğini belirtmiştir.

Yılmaz (2013), *salvia absconditiflora* bitkisinin antioksidan ve sitotoksik özelliklerini araştırmıştır. DPPH radikallerine karşı % 80,43 radikal sönümleme aktivitesi gösterdiği, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine karşı farklı metotlar sonucu hücre çoğalmasının % 50 engellenmesine sebep olan IC_{50} konsantrasyonu için değerlerin değişken olduğu belirtilmiştir.

Çetin (2012), *asteraceae* familyasından olan *scolymus hispanicus* bitkisinin antioksidan özelliğini farklı metotlar kullanarak araştırmıştır. Bitkinin bakır indirgeme gücü için 0,2 mg/ml konsantrasyon ve 450 nm'deki absorbans değerinin 0,11 olduğu, toplam fenolik içeriğinin 111,32 mgGAE/g, toplam flavonoid içeriğinin 24,50 mgRE/g olduğu belirtilmiştir.

Çınar (2012), *asteraceae* familyasından olan *ınula helenium* taksonlarının metanol, etanol, su ve etil asetat ekstrelerinin biyoaktivitelerini (antioksidan, antiradikal, antimikrobiyal) incelemiştir. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarlarının 4,18-102,91 mgGAE/g kuru ekstre arasında olduğu, DPPH yöntemiyle en yüksek antiradikal

aktiviteyi 8,89 µg/ml IC_{50} değeriyle *ınula helenium subsp. orygalis* bitkisinin metanol ekstresinin gösterdiği belirtilmiştir.

Erdoğan (2012), *tanacetum balsamita* L. *subsp. balsamita* bitkisinin biyolojik aktivitelerini incelemiştir. Bitkinin bazı ekstrelerinin standart antioksidanlar olan BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks'a yakın değerlerde oksidanlara karşı etkili olduğu, antimikrobiyal aktivite yönünden iyi bir antibiyotik olan *streptomisin*'e göre daha düşük çıkmasına rağmen sonuçların yeterli derecede iyi olduğu belirtilmiştir.

Aktümsek ve arkadaşları (2011), beş *centaurea* türünün antioksidan potansiyellerini ve yağ asidi profillerini incelemişlerdir. Tüm özütlerin önemli bir antioksidan kapasite gösterdiği, c*entaurea cheirolophaen* bitkisinin en yüksek miktarda toplam fenolik ve flavonoid içerdiği, 30 yağ asidi tespit edildiği, palmitik, linoleik, oleik, linolenik asit'in ana bileşen olarak saptandığı belirtilmiştir.

Albayrak ve arkadaşları (2010), *asteraceae* familyasından 16 *helichrysum* türünün in vitro antioksidan, radikal temizleme ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır. Tüm ekstraktların güçlü antioksidan ve radikal temizleme etkisi gösterdiği, mikroorganizmalara karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Öztekin (2010), *tanacetum kotschyi* bitkisinin üzerinde fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmaları yapmıştır. Bitkiden flavonoid ve fenolik bileşikler izole edilmiş, bir seskiterpen lakton olan achillin'in *tanacetum* türlerinden ilk defa izole edildiği belirtilmiştir. Saf maddeler ve ekstreler içinde en yüksek antioksidan etkiyi MeOH ekstresinin verdiği, yine saf maddelerin ve gövde ekstresinin *candida parapsilosis*'e karşı yüksek inhibe edici ve selektif aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Polatoğlu (2009), *tanacetum chiliophyllum* bitkisinin çeşitli varyeteleri üzerinde insektisit, antimikrobiyal, sitotoksik ve antioksidan aktivite araştırması yapmıştır. *Tanacetum chiliophyllum* var. *oligocephalum* bitkisinin etil asetat ve metanol ekstrelerinin yüksek DPPH radikali giderici etki gösterdiği, yine aynı bitki ekstrelerinin tahıl zararlısı *s. granarius*'a karşı diğer varyetelere göre daha yüksek kontak toksisite gösterdiği, bazı uçucu yağların *bacillus cereus* ve *bacillus subtilis* gibi gıda patojenlerine karşı yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Koçak (2008), Elazığ ve çevresinde yetişen bazı *tanacetum* türlerini taksonomik yönden araştırmıştır. Bitkilerde ana bileşen olarak α-pinen, β-pinen, 1,8-sineol, borneol, endobornilasetat, trans-krizantenol, trans-verbenol, karyofillenoksit, santolinatrien, spatulenol, intermedeol, kamfen, kamfor, krizantenon, kopaen, naftalen olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik-morfometrik özellikleri bakımından Türkiye Florasındaki betimiyle uygunluk gösterdiği, uçucu yağ bakımından birbirlerinden oldukça farklı oldukları saptanmıştır.

Yucayurt (2008), *laurocerasus officinalis roem.* bitkisinde fenolik bileşik analizi ve antioksidan aktivite araştırması yapmıştır. Genel olarak kabuk ekstraktlarının daha iyi antioksidan sonuçlar verdiğini, bitkide gallik asit, protokatekaldehit, vanilik asit, klorogenik asit, kafeik asit, siringik asit, benzoik asit gibi fenolik bileşikler olduğunu belirtmiştir.

Aydemir (2005), dört farklı lokaliteden toplanan *tanacetum parthenium* bitkilerinin çiçek kısımlarının metanol ve etil asetat ekstrelerinde iki farklı yöntemle (Kısmi Küçük Kareler Kalibrasyonu ve Kromatografik) parthenolide miktarı araştırması yapmış ve bitkilerde parthenolide bulunduğunu tespit etmiştir. Her iki yöntemdeki parthenolide miktarının birbirine yakın olduğu belirtilmiştir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Yararlanılan cihaz, alet ve malzemeler

- Beher
- Buzdolabı
- CO_2 inkübatör
- Deney tüpü
- Derin dondurucu
- Erlen
- Falkon tüpü
- Hassas terazi
- Magnetik karıştırıcı
- Mikropipet
- Mikroskop
- Otomatik pipet
- pH metre
- Saf su cihazı
- Sıvı azot tankı
- Spatula
- Spektrofotometre
- Spektrofotometre kuveti
- Steril kabin
- Su banyosu
- T75 Flask
- Vorteks
- 96 kuyucuklu plaka

4.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler

- ABTS
- $Al(NO_3)_3$
- Besi yeri
- CH_3COOK
- CH_3COONa
- CH_3COONH_4
- $CuCl_2$
- Dimetil sülfoksit
- Etanol
- Etil asetat
- $FeCl_3.6H_2O$
- $FeCl_2.3/4H_2O$
- Ferrozin
- Folin-Ciocalteu reaktifi
- Fosfat tamponu
- Fosfat tamponlu salin
- HCl
- $K_3Fe(CN)_6$
- $K_2O_8S_2$
- Kuersetin
- Metanol
- Na_2CO_3
- Na_2HPO_4
- Neokuprin
- Saf su
- Sülfirik asit
- TCA
- TPTZ
- Tripan boyası
- XTT çözeltisi

4.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

4.1.3.1. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini çözeltileri

1. *2 mM'lık ABTS çözeltisi:* 0,1 M, pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna 11 mg ABTS eklenerek yaklaşık 12 saat tamamen çözününceye kadar magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. *2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi:* 0,1 M, pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna 66,25 mg $K_2O_8S_2$ eklenerek tamamen çözüldü. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3. *0,1 M'lık fosfat tamponu çözeltisi (pH:7,4):* 2,84 g Na_2HPO_4 180 ml saf suda çözüldü. pH metre ile pH'sı 7,4'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı.

4.1.3.2. FRAP indirgeme metodu çözeltileri

1. *0,3 M'lık asetat tamponu çözeltisi:* 80 ml saf suya 2,46 g CH_3COONa eklenerek çözüldü. pH metre ile pH'sı 3,6'ya ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. *40 mM'lık HCl çözeltisi:* % 37'lik HCl çözeltisinden 0,334 ml alınarak toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3. *10 mM'lık TPTZ çözeltisi:* 0,312 g TPTZ, 100 ml 40 mM'lık HCl içerisinde çözüldü.

4. *20 mM'lık $FeCl_3$ çözeltisi:* 100 ml saf suya 0,54 g $FeCl_3.6H_2O$ eklenerek çözüldü.

5. *FRAP reaktifi:* 10 hacim 0,3 M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20 mM'lık $FeCl_3.6H_2O$ çözeltisi karıştırılarak oluşturuldu.

4.1.3.3. Bakır indirgeme kapasitesi tayini (Kuprak metodu) çözeltileri

1. *0,01 M'lık $CuCl_2$ çözeltisi:* 50 ml saf suya 47 mg $CuCl_2$ eklenerek çözüldü.

2. *$7{,}5x10^{-3}$M etanolik neokuprin çözeltisi:* 50 ml etanole 78 mg neokuprin eklenerek çözüldü.

3. *1 M'lık CH_3COONH_4 tamponu (pH:6,5):* 80 ml saf suya 7,7 g CH_3COONH_4 eklenerek çözüldü. pH metre ile pH'sı 6,5'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4.1.3.4. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini çözeltileri

1. *Standart gallik asit çözeltisi:* 10 ml saf suya 10 mg gallik asit eklenerek çözüldü.
2. *Folin-Ciocalteu reaktifi*
3. *% 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi:* 80 ml saf suya 2 g Na_2CO_3 eklenerek çözüldü. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4.1.3.5. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini çözeltileri

1. *Standart kuersetin çözeltisi:* 25 ml etanole 25 mg kuersetin eklenerek çözüldü.
2. *% 10'luk $Al(NO_3)_3$ çözeltisi:* 90 ml saf suya 10 g $Al(NO_3)_3$ eklenerek çözüldü.
3. *1 M'lik CH_3COOK çözeltisi:* 80 ml saf suya 9,9 g CH_3COOK eklenerek çözüldü. Toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

4.1.3.6. Q-TOF-LC yöntemi ile fenolik içerik tayini çözeltileri

5 mM'lık amonyum asetat çözeltisi: 80 ml saf suya 0,04 g CH_3COONH_4 eklenerek çözüldü. Toplam hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

4.1.3.7. Antikanser aktivite testlerinde kullanılan çözeltiler

1. *XTT çözeltisi:* 5 ml XTT kitinin üzerine XTT aktivatöründen 100 µl konulup çözüldü.
2. Diğer çözeltiler (tripan boyası, dimetil sülfoksit, fosfat tamponlu salin, besi yeri) satın alındığı şekliyle kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. *Tanacetum erzincanense* bitkisinin toplanması, kurutulması ve ekstraktsiyonu

Bitki materyali Erzincan ili, Çayırlı ilçesi, Mantarlı ve Akyurt köyleri arasında yaklaşık 1.620 m yükseklikten toplandı. Karanlık ve havadar bir odada kurutuldu. Kurutulduktan sonra ince toz haline getirildi. Ekstraktsiyonları metanol ve etilasetat çözücüleri ile gerçekleştirildi. Bunun için öncelikle toz haline getirilen bitki iki ayrı cam balona alındı. Üzerlerine numune tozunun beş katı olacak şekilde metanol ve etil asetat eklendi. Ağızları kapatıldı ve oda şartlarında 24 saat karıştırılarak inkübe edildi. Elde edilen ekstraktlar whatman kağıdı ile filtrelenerek süzüldü. Daha sonra cam balonlar bir döner buharlaştırıcı olan evaporatöre ayrı ayrı yerleştirildi. 40 ^{o}C'de metanol ve etil asetat çözücüleri uzaklaştırıldı. Sonunda özütler, 50 ^{o}C ve 5 μm Hg basınç altında liyofilize edildi. Numuneler daha sonra deneysel çalışmalarda kullanılacak şekilde sıkıca kapatılmış plastik bir şişede -20 ^{o}C'de saklandı. Antioksidan test çalışmaları yapılırken numune stok çözeltilerinin hazırlaması sırasında metanol ekstresi metanolde, etil asetat ekstresi etil asetatta çözüldü. Antikanser çalışmalarında stok numune çözeltisi hazırlanırken metanol ekstresi besi yeri çözeltisinde çözüldü.

4.2.2. Antioksidan aktivite testleri

4.2.2.1. ABTS radikali giderme aktivitesi tayini

ABTS radikali giderme aktivitesi tayini Re ve arkadaşlarının (1999) yöntemine göre yapıldı. İlk olarak 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiye 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretildi. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0,1 M ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu ile 0,750±0,025 nm'ye ayarlandı. Numune olarak daha önce stok olarak hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonlarındaki çözeltiler kullanıldı. Standart olarak kullanılan α-tokoferol, troloks, BHA ve BHT için etanol eklenerek hacim 2 ml olacak şekilde 50 μg/ml konsantrasyonu hazırlandı. Yine etanol eklenerek hacim 2 ml olacak şekilde metanol ve etil asetat ekstraktı için 50 μg/ml konsantrasyonu hazırlandı ve

deney tüplerine konuldu. Her bir deney tüpüne 1'er ml ABTS radikal çözeltisi ilave edildi, vortekste karıştırıldı ve yarım saat inkübe edildi. Etanolden oluşan köre karşı 734 nm'de absorbanslar okunarak kaydedildi.

4.2.2.2. FRAP indirgeme metodu

Öncelikle deney tüplerine stok (1 mg/ml) standart çözeltilerden ve numune ekstraktı çözeltilerinden alındı. Üzerlerine asetat tampon çözeltisi ilave edilerek hacim 0,5 ml olacak şekilde 10-20-30 µg/ml konsantrasyonları elde edildi. 10 hacim 0,3 M'lık asetat tamponu, 1 hacim 10 mM'lık TPTZ ve 1 hacim 20 mM'lık $FeCl_3.6H_2O$ çözeltisi karıştırılarak FRAP reaktifi oluşturuldu. Daha sonra deney tüplerine sırasıyla 2250 µl 20 mM'lık $FeCl_3$ çözeltisi ve 2250 µl FRAP reaktifi ilave edilerek toplam hacim 5 ml'ye tamamlandı. Deney tüpleri vortekste karıştırıldı. 10 dakika inkübeden sonra 593 nm'de okutulup absorbansları kaydedildi. Kör olarak asetat tamponu kullanıldı. Kontrol olarak 500 µl asetat tamponu, 2250 µl $FeCl_3$, 2250 µl FRAP reaktifi karışım çözeltisi kullanıldı.

4.2.2.3. Bakır indirgeme kapasitesi tayini (Kuprak metodu)

Kuprak metodu Apak ve arkadaşlarının yöntemi hafif değiştirilerek yapıldı (Ak ve Gülçin, 2008). Stok standart ve numune çözeltileri deney tüplerine alındı. Üzerlerine saf su eklenerek hacim 1,5 ml olacak şekilde 10-20-30 µg/ml konsantrasyonları hazırlandı. Sonra her bir tüpe sırasıyla 0,01 M $CuCl_2$ çözeltisinden 0,25 ml, $7{,}5x10^{-3}$ M etanolik neokuprin çözeltisinden 0,25 ml ve 1 M'lık CH_3COONH_4 tampon çözeltisinden 0,25 ml eklendi ve karıştırıldı. Yarım saat inkübe edildikten sonra 450 nm'de köre karşı absorbans değerleri ölçüldü. Kör olarak saf su kullanıldı.

4.2.2.4. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini

Toplam fenolik bileşik miktarı tayini Folin-Ciocalteu reaktifi ile belirlendi (Singleton vd., 1999). Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Gallik asit çözeltisi 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde gallik asit saf suda çözülerek hazırlandı. Bu çözeltiden 100 µg, 200 µg, 400 µg, 500 µg ve 600 µg'lık konsantrasyonlar hazırlanarak

hacim 23 ml'ye saf suyla tamamlandı. Sonra üzerlerine 0,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi ve 3 dakika sonra da 1,5 ml % 2'lik Na_2CO_3 ilave edildi. Numuneler 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda numunelerin 760 nm'deki absorbansı, saf sudan oluşan köre karşı okundu. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit ekivalen (GAE) miktarı standart grafikten elde edilen denklem yardımıyla tespit edildi. Sonuçlar gallik asit ekivalen (GAE) olarak verildi.

4.2.2.5. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini

Toplam flavonoid miktarı tayini Park ve arkadaşlarının (1997) yapmış olduğu metoda göre yapıldı. Standart flavonoid bileşiği olarak kuersetin kullanıldı. Kuersetin çözeltisi 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde kuersetin saf suda çözülerek hazırlandı. Bu çözeltiden 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg'lık konsantrasyonlar hazırlandı. Daha sonra 0,1 ml (1 M) suda hazırlanmış CH_3COOK ve 0,1 ml (% 10) $Al(NO_3)_3$ çözeltilerini içeren 4,3 ml etanol çözeltisi ile seyreltilerek vortekste karıştırıldı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm'de absorbansları kaydedildi. Standart kuersetin grafiğinden elde edilen denklemden toplam flavonoid miktarı, kuersetin ekivalen (QE) olarak belirlendi.

4.2.2.6. Q-TOF-LC yöntemi ile fenolik içerik tayini

*Tanacetum erzincanense'*de bulunan fenolik bileşikleri kalitatif olarak belirlemek için Q-TOF-LC yöntemi kullanıldı. Bunun için bir elektrosprey iyonizasyon kaynağı olan LC-MS sistem cihazı kullanıldı. Cihazın çalışma koşulları Tablo 4.1'de verilmiştir. Cihaz iki farklı yöntemle pozitif veya negatif elektrosprey iyonizasyonu ile 2 GHz Genişletilmiş Dinamik Aralık modunda çalıştırıldı. Ayırma işlemi ters çevrilmiş bir Poroshell 120 EC-C18 kolonu üzerinde yapıldı. Kolon sıcaklığı 35 ^oC'ye ayarlanarak akış oranı dakikada 0,6 ml olacak şekilde 20 dakika boyunca analiz yapıldı. Pozitif referans iyon olarak 121.0509, 922.0098, negatif referans iyon olarak da 112.9855, 980.0147, 1033.9881 kullanıldı. Veriler, MassHunter yazılımı tarafından kaydedildi.

Tablo 4.1. Q-TOF-LC-MS cihazı çalışma koşulları

Kolon	Agilent Poroshell 120 EC-C18 kolon 3,0 mm x 50 mm x 2,7 µm
Kolon sıcaklığı	35 °C
Enjeksiyon hacmi	5 µl
Çalışma zamanı	20 dk
Mobil faz A	5 mM suda amonyum asetat
Mobil faz B	Metanol
Akış hızı	0,6 ml/dk
Gradient	0 dk- 10 % B
	0,3 dk- 10 % B
	2 dk- 30 % B
	6 dk-70 % B
	9 dk- 95 % B
	12 dk- 95 % B
	12,1 dk- 10 % B
	14 dk- 10 % B
İyonizasyon modu	Jet akış teknolojili pozitif/negatif elektrosprey iyonizasyon modu
Kurutma gaz sıcaklığı	200 °C
Kurutma gaz akışı	14 L/dk
Nebuliser	35 psi
Gaz sıcaklığı	400 °C
Gaz akışı	11 L/dk
Kılcal Voltaj	3000 V
Nozzle Voltaj	500 V
Kütle aralığı	50-1200 amu (akb)
Referans iyonları	121.0509, 922.0098 pozitif çalışma için, 112.9855, 980.0147, 1033.9881 negatif çalışma için

4.2.3. Hücre kültürü

4.2.3.1. Hücre kültürü koşulları

Hücre kültürü, tek bir hücre veya hücrelerin doku ile bağıntısı olmadan laboratuvar şartlarında *(in vitro)* çoğaltılmasıdır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Canlı ortamda (*in vivo*) yapılamayan denemeler, belirli bir hücre

hattından çoğaltılan hücrelerde laboratuvar şartlarında *(in vitro)* yapılabilir. Fiziksel ve kimyasal koşullar değiştiğinde, çevreye duyarlılıklarından dolayı hücrelerin çoğu bu durumdan etkilenir. Kanser hücreleri, besin maddeleri ile fizyolojik koşullarda beslenmelidir. Bu koşulların ikisi oksijensiz ortam ve insan vücut sıcaklığıdır. Böylece canlılıklarını sürdürür ve hücre bölünmesi yapabilirler. Hücrelere bu ortamı sağlamak amacıyla genellikle karbondioksit inkübatörü kullanılır. Hücre kültürü çalışmaları steril bir ortam sağlamak amacıyla Class II Güvenlik Kabini'nde yapıldı. MCF-7 (göğüs) ve HepG2 (karaciğer) kanser hücreleri % 10 fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin streptomisin (Pen-Strep) çözeltisi içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ortamında, HT-29 (kolon) kanser hücreleri ise % 10 fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin streptomisin (Pen-Strep) çözeltisi içeren McCoys'un 5A ortamında yetiştirildi. Hücre kültürleri, 37 ^{o}C'de % 95 nem % 5 CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Fetal sığır serumu, büyümeyi teşvik eden yüksek içeriğinden dolayı hücre kültürü ortamı için en yaygın kullanılan büyüme takviyelerinden biridir.

4.2.3.2. Hücrelerin çözdürülmesi

2 ml besi yeri (DMSO'lu) içeren kriyotüp içerisinde dondurulmuş olan kanserli hücreler, sıvı azot tankından alınarak çoğaltmak için T75 hücre kültürü şişesine aktarıldı. Büyüme ortamı sağlamak için üzerine 8 ml daha besi yeri konup 37 ^{o}C'de % 95 nem % 5 CO_2 inkübatöründe üremeye bırakıldı. 24 saat sonra büyüme ortamı, yenisi ile değiştirildi ve yine % 5 CO_2 inkübatörüne yerleştirildi.

4.2.3.3. Hücrelerin bölünmesi

Hücreler % 80 konfluent olduğunda hücrelerin bulunduğu T75 flask inkübatörden alınıp içerisindeki besi yeri ortamı vakum yardımıyla boşaltıldı. Ölü hücrelerin, atıkların-kirliliklerin ve safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla yaklaşık 10 ml PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. PBS ile yıkama yapılırken T75 flask dibine yapışmış olan canlı hücrelerin dağılmasına sebep olmayacak şekilde pipet yardımıyla şişeye konuldu. Yıkama yapıldıktan sonra boşaltıldı. Sonra T75 flask dibine yapışmış olan canlı hücreleri kaldırmak için şişeye 2-3 ml tripsin/EDTA konulup, 37 ^{o}C'de % 95 nem % 5 CO_2 inkübatörüne konuldu. 5-10 dakika boyunca inkübe edilip hücrelerin ayrışması

sağlandıktan sonra inkübatörden alınıp, tripsinin inaktive olması için üzerine 8 ml besi yeri eklendi. Pipet yardımıyla iyice karıştırılarak hücreler birbirinden ayrıştırıldı. Bu hücre süspansiyonundan 2 ml alınarak yeni bir T75 şişesine aktarıldı. Üzerine 7-8 ml gelişme-büyüme ortamı ilave edildi. Bölünen hücre kültürleri 37 ^{o}C'de % 95 nem % 5 CO_2 inkübatörüne konuldu. Bu işlem haftada 3-4 defa tekrarlandı.

4.2.3.4. Hücrelerin dondurulması

Bölünen hücreler % 80 konfluent olunca bir kısmına daha sonra kullanılması amacıyla dondurma işlemi yapıldı. T75 şişesi inkübatörden alınıp içerisindeki besi yeri ortamı boşaltıldı. Ölü hücrelerin, atıkların-kirliliklerin ve safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla 10 ml PBS (fosfat tamponlu salin) ile yıkandı. Şişe dibine yapışık olan canlı hücrelerin kalkması için üzerine daha önceden ısıtılan tripsin/EDTA solüsyonundan 2 ml konulup 5-10 dakika CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Tüm hücreler ayrılınca tripsinin inaktive olması için üzerine 5-6 ml taze besi yeri-gelişme ortamı ilave edildi. Bu hücre süspansiyonu, 15 ml'lik bir falkon tüpüne aktarılarak 37 ^{o}C'de 1000 × g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst katman falkon tüpünden alındı ve pelet, serum ile takviye edilmiş tam bir büyüme ortamında (% 10 DMSO içeren 3 ml dondurma ortamı) yeniden süspanse edildi. Sonra bu hücre süspansiyonu kriyotüplere aktarıldı ve hemen - 80 ^{o}C dondurucuya konuldu. Bir hafta sonra, kriyotüpler daha uzun süre depolama için yaklaşık -196 ^{o}C'de sıvı azot tankına aktarıldı.

4.2.3.5. Hücre sayımı

Kanserli hücreler ekim için T75 şişesine konulup üzerine 8 ml besi yeri eklendi ve 37 ^{o}C'de CO_2 inkübatöründe üremeye bırakıldı. 24 saat sonra besi yeri boşaltılıp 5 ml PBS ile yıkandı. 2 ml tripsin ile hücreler ayrıldıktan sonra üzerine 10 ml taze besi yeri ortamı ilave edildi. Hücre ekimi ve çoğalması yapıldıktan sonra tripan mavisi ile boya dışlama tekniği kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Bu teknikte tripan boyası, hücreleri daha görünür hale getirir. Ayrıca canlı ve cansız hücreleri ayırt eder. Cansız hücreler boyayı içine aldığı için mavi, canlı hücreler boyayı içine almadığı için sarı görünür. İyice ayrıştırılan hücreler ayrı ependorflara aktarıldı. Üzerlerine tripan boyası ilave edilerek boyama yapıldı. Sonra ışık mikroskobu ve hemositometre kullanılarak hücre sayımı

yapıldı. 1 ml'de yaklaşık 100.000 hücre hedeflendi. Hücrelerin sayısına bağlı olarak hücre süspansiyonu ve tripan mavisi oranı değiştirildi. Hücre süspansiyonu ve tripan mavisi karışımından hemositometrenin (Şekil 4.1) iki gözüne (odacığına) 10'ar µl konuldu. Işık mikroskobunda odacıklardaki hücreler sayılıp ortalaması alındı ve ml başına hücre sayısı aşağıdaki formülden hesaplandı:

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

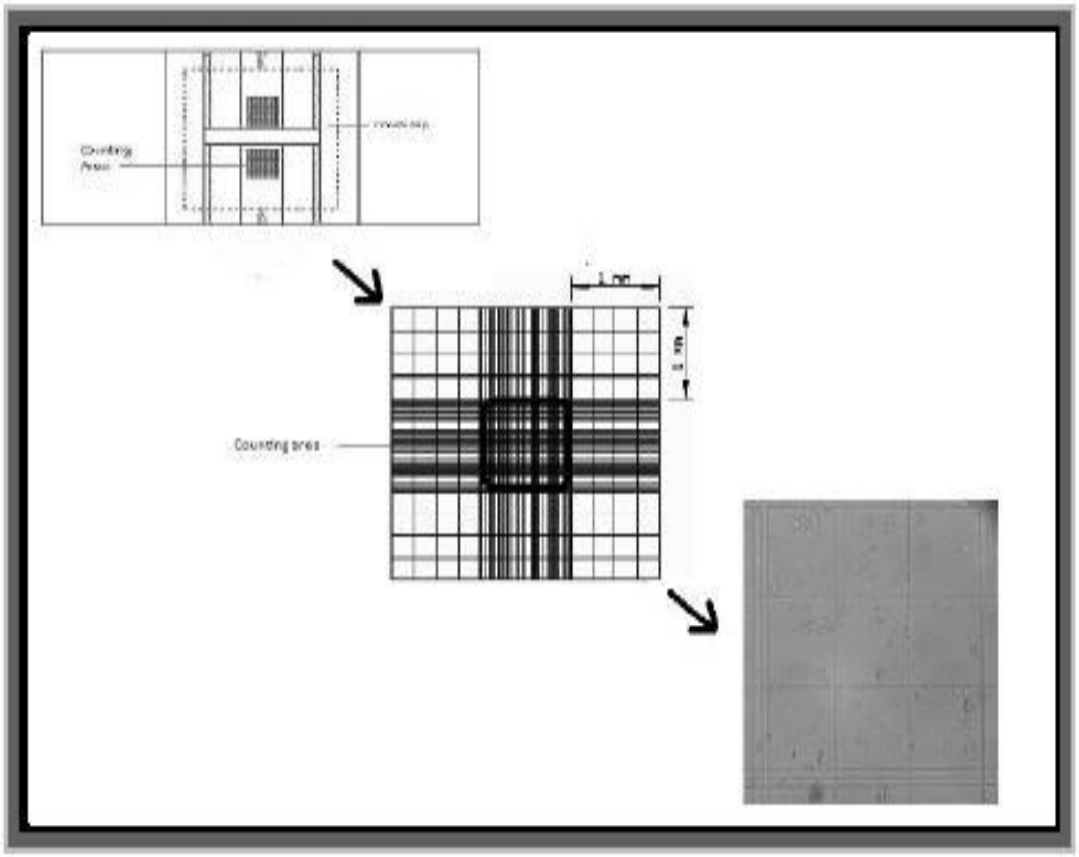
4.2.4. Sitotoksisite testleri

4.2.4.1. Metanol ekstresinin çalışma çözeltisinin hazırlanması

0,2 g metanol ekstraktı tartıldı. Üzerine 4 ml besi yeri (% 0,2 DMSO ve fenol kırmızısı içeren McCoys'un 5A ve EMEM ortamı) konulup çözüldü. Burada DMSO, ekstraktın çözünmesine yardım eder. Konsantrasyonu 5000 µg/ml olan ana stok çözeltisi hazırlanmış oldu. Daha sonra bu çözeltiden besi yeri ile seyreltme yapılarak 5000 µg/ml'den başlayıp 100 µg/ml'ye kadar inen farklı konsantrasyonlarda çalışma numune çözeltileri hazırlandı. En son metanol ekstraktı konsantrasyonları işlemler sırasında her kuyucukta 100 µg/ml ile 1000 µg/ml arasında değişti.

DF: Tripan boyası ile yapılan seyreltme faktörü.

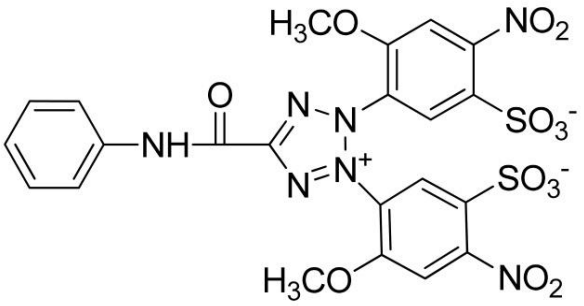
10^4: Lamdaki odacık boyutlarından hesaplanan faktör (Hemositometredeki her odanın boyutları 1 cm uzunluğunda, 1 cm eninde ve 0,1 cm yüksekliktedir, hacim 0,1 cm^3 veya 1 mm^3 tür).



Şekil 4.1. Hemositometre ile canlı hücre sayımı

4.2.4.2. XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü

Metanol ekstresinin HT-29, MCF-7 ve HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi, Hücre Proliferasyon XTT Kiti Biyolojik Endüstrileri kullanılarak araştırıldı. Canlı hücrelerde mitokondri enzimleri, tetrazolyum tuzu olan XTT'yi (Şekil 4.2) turuncu renkli formazan ürününe indirger. Oluşan formazan ürünü suda çözünür. Bu nedenle 415 nm'de eliza okuyucuda kolaylıkla ölçülebilir. Ekimi ve çoğaltılması yapılan HT-29, MCF-7 ve HepG2 hücrelerinden 100'er µl 96 kuyucuklu plakadaki kuyucuklara ekildi ve büyümeleri için tekrar inkübatöre konuldu. 24 saat inkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plakalar alınıp kuyucuklardaki besi yerleri boşaltıldı (Canlı hücreler kuyucuk dibine yapışık). Her bir kuyucuk yaklaşık 75 µl PBS ile yıkandı ve bu da boşaltıldı. Kuyucuklarda yalnızca dibe yapışık olan canlı hücreler kaldı. Bu hücrelerin üzerine 50'şer µl besi yeri konuldu. Üzerlerine 50'şer µl farklı konsantrasyonlardaki numune çözeltilerinden (3 tekrar olacak şekilde) ilave edildi ve karıştırıldı.



Şekil 4.2. XTT tetrazolyum tuzu

Kontrol kuyucuklarından ikisi sadece besi yeri (100 µl büyüme ortamı) içerir. Diğer iki kuyucuk % 0,2 DMSO'lu büyüme ortamı içerir. İki farklı zaman dilimi için 48 saat ve 72 saat inkübasyon için tekrar 37 ^{o}C'de % 95 nem, % 5 CO_2 inkübatörüne konuldu. İnkübe süresi dolduktan sonra plakalar inkübatörden alındı. 5 ml XTT kitinin üzerine XTT aktivatöründen 100 µl konulup çözüldü. Bu çözeltiden her bir kuyucuğa 50'şer µl konulup karıştırıldı. Sonra plakalar, XTT reaktifi karışımı ile 8 saat inkübe olması için CO_2 inkübatörüne konuldu. İnkübasyon süresinden sonra eliza okuyucu ile 415 nm'de okutuldu. Hücre canlılığı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

% Hücre Canlılığı = [Abs(ekstrakt ile muamele görmüş hücreler) - Abs(hücresiz ortamdaki ekstrakt)] / [Abs(muamele görmemiş hücreler)-Abs(hücresiz ortam)]×100

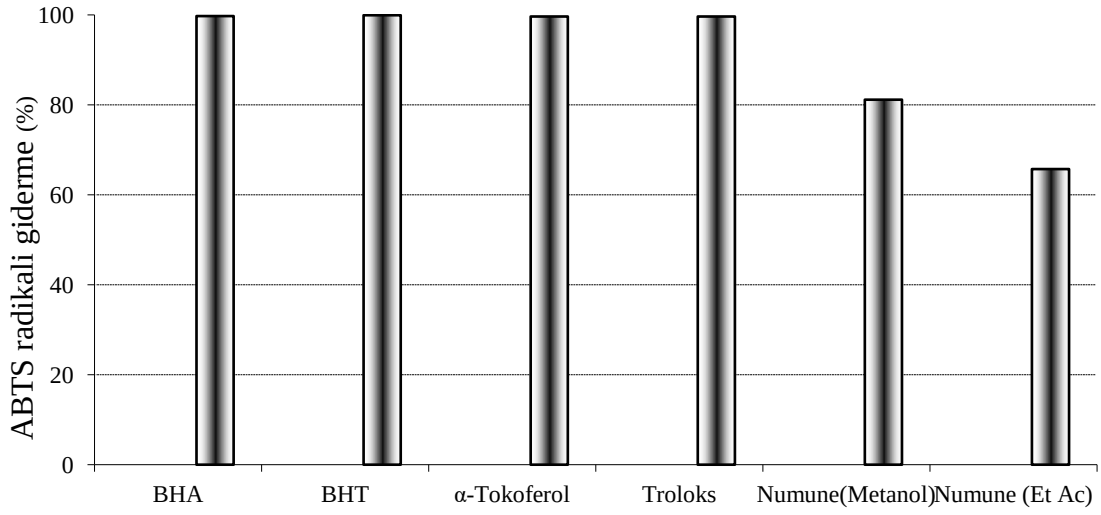
Elde edilen sonuçlara göre, son konsantrasyonlar ile hücre canlılığı karşılaştırıldı ve IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} değeri, hücre canlılığını % 50 azaltmak için gereken numune konsantrasyonudur.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Antioksidan Araştırma Bulguları

5.1.1. $ABTS^{\bullet+}$ giderme aktivitesi tayini bulguları

Radikal giderme aktivitelerinin hesaplanmasında sıklıkla kullanılan (Miller, 1996; Gülçin vd., 2007b) bu yöntemde öncelikle ABTS'den ABTS radikalleri oluşturuldu. Bunun için önce erlene 0,1 M, pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisine 2 mM'lık ABTS çözeltisi eklendi. Sonra bu çözeltiye 2,45 mM'lık potasyum persülfat ilave edildi (Gülçin, 2007a). Erlenin dış yüzeyi alüminyum folyo ile kaplandı, manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırıldı. Çözelti hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorbans değeri 0.750±0.025 olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltildi. Her bir numune tüpüne ABTS radikal çözeltisi ilave edildikten sonra yarım saat inkübe edilip 734 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı % radikal giderme grafiği oluşturuldu. Grafik, Şekil 5.1'de verilmiştir.

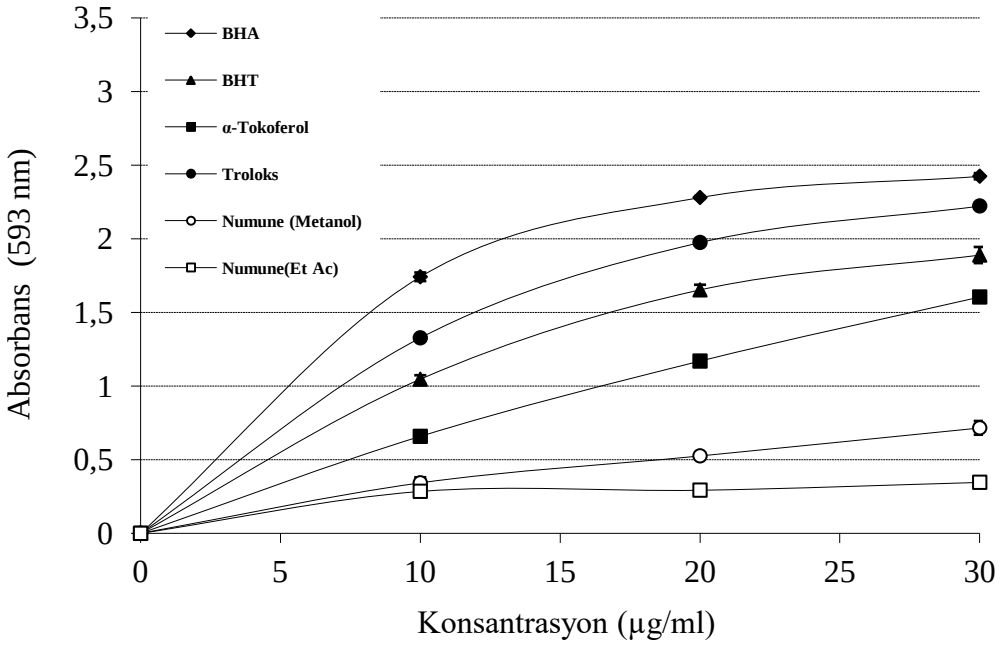


Şekil 5.1. 50 μg/ml'de metanol ve etil asetat ekstrelerinin % ABTS radikal giderme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (α-tokoferol, troloks, BHA, BHT) karşılaştırılması

Her iki numune ekstresinin konsantrasyon arttıkça ABTS radikal giderme aktiviteleri de artmaktadır. Ancak standart antioksidanlara kıyaslandığında ekstrelerin radikal giderme aktivitelerinin daha az olduğu görüldü. 50 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstresinin % 81,130, etil asetat ekstresinin % 65,708 ABTS radikal giderme kapasitesinin olduğu görüldü.

5.1.2. FRAP indirgeme metodu bulguları

Bu metotta ferrik iyonları (Fe^{3+}), ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenir. Oluşan ferröz (Fe^{2+}) iyonları trispiridil triazin (TPTZ) ile mavi renkli bir kompleks oluşturur. Bu mavi renkli kompleks ise 593 nm'de maksimum absorbans gösterir. 10-20-30 µg/ml konsantrasyonlarındaki standartlar ve numune çözeltilerine $FeCl_3$ çözeltisi ve FRAP reaktifi ilave edilerek 10 dakika inkübeden sonra 593 nm'de okutuldu. Çıkan sonuçlarla konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 5.2).

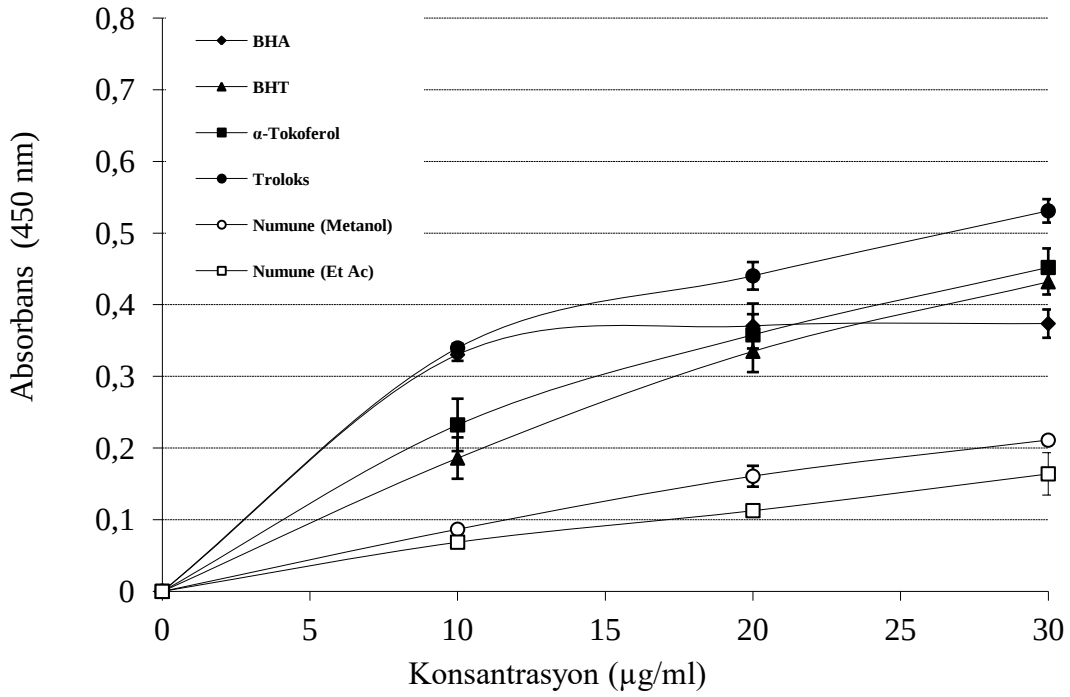


Şekil 5.2. Metanol ve etil asetat ekstrelerinin FRAP metoduna göre indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (α-tokoferol, troloks, BHA, BHT) karşılaştırılması

Ortaya çıkan grafikte, metanol ve etil asetat ekstrelerinin konsantrasyonu arttıkça FRAP metoduna göre indirgeme kapasitelerinin de arttığı fakat standartlardan daha az indirgeme kapasitelerinin olduğu görüldü. Metanol ekstresinin etil asetat ekstresine göre daha iyi ve standartlardan α-tokoferol'e yakın bir indirgeme kapasitesinin olduğu görüldü. 10 µg/ml konsantrasyonda standartlardan α-tokoferol 0,658 absorbans değeri gösterirken metanol ekstresi 0,343, etil asetat ekstresi 0,285 absorbans değeri göstermiştir.

5.1.3. Bakır indirgeme kapasitesi tayini (Kuprak metodu) bulguları

Metanol ve etil asetat ekstrelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitesi, farklı konsantrasyondaki (10-20-30 µg/ml) çözeltilerinin 450 nm'deki absorbansları ölçülerek belirlendi. Absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği çizildi (Şekil 5.3).

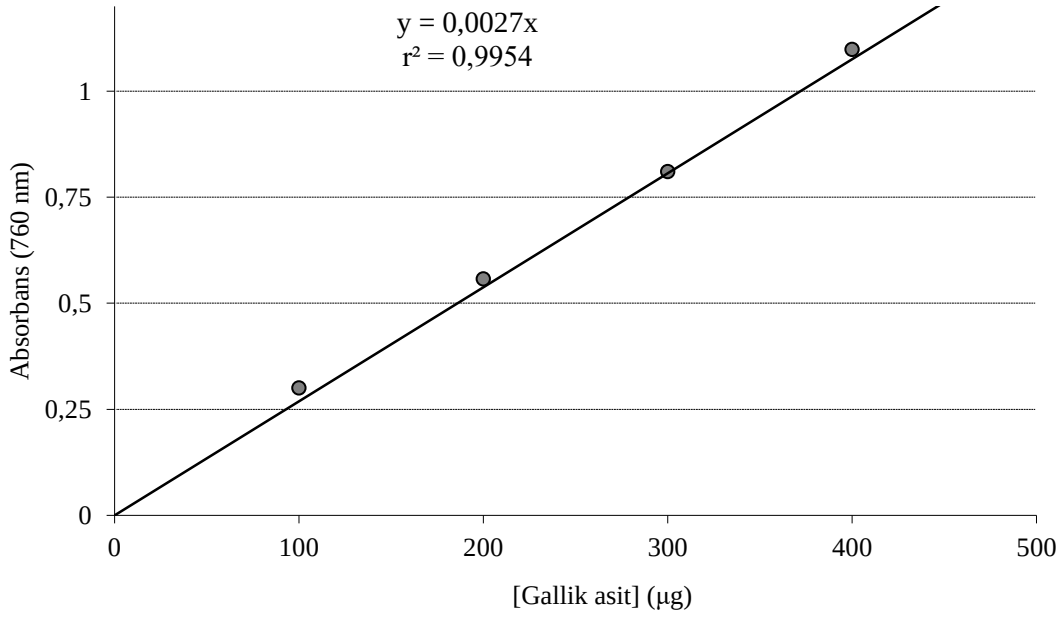


Şekil 5.3. Metanol ve etil asetat ekstrelerinin kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (α-tokoferol, troloks, BHA, BHT) karşılaştırılması

Metanol ve etil asetat ekstrelerinin konsantrasyonu arttıkça kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitelerinin de arttığı fakat standartlardan daha az indirgeme kapasitelerinin olduğu görüldü. Metanol ekstresinin etil asetat ekstresine göre daha iyi ve standartlardan BHT'ye yakın bir indirgeme kapasitesinin olduğu görüldü. 10 µg/ml konsantrasyonda standartlardan BHT 0,186 absorbans değeri gösterirken metanol ekstresi 0,087, etil asetat ekstresi 0,069 absorbans değeri göstermiştir.

5.1.4. Toplam fenolik bileşik miktarı tayini bulguları

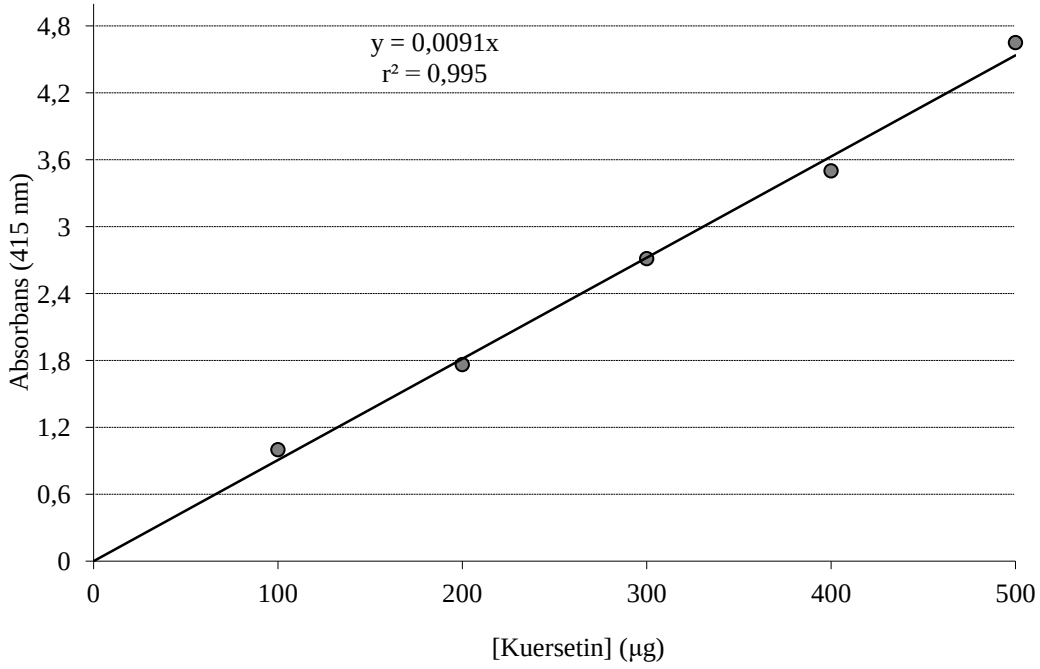
Metanol ve etil asetat ekstrelerinde bulunan toplam fenolik bileşik miktarı tayini için standart fenolik bileşik olarak gallik asit (Bkz. Şekil 6.6) kullanıldı. Gallik asit için konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 5.4). Standart grafikten elde edilen denklem yardımıyla toplam fenolik bileşik miktarı gallik asit ekivaleni (GAE) olarak hesaplandı (r^2: 0,9954). Bu değerler; metanol ekstresi için 64,444 mgGAE/g ekstre ve etil asetat ekstresi için 41,48 mg GAE/g ekstre olarak bulundu.



Şekil 5.4. Standart olarak kullanılan gallik asit için oluşturulan grafik

5.1.5. Toplam flavonoid bileşik miktarı tayini bulguları

Metanol ve etil asetat ekstrelerinde bulunan toplam flavonoid bileşik miktarı tayininde standart olarak kuersetin (Bkz. Şekil 6.7) kullanıldı. Standart grafikten (Şekil 5.5) elde edilen denklem yardımıyla metanol ve etil asetat ekstrelerinde bulunan toplam flavonoid miktarı kuersetin ekivaleni (QE) olarak hesaplandı (r^2: 0,995). Bu değerler; metanol ekstresi için 62,20 mgQE/g ekstre ve etil asetat ekstresi için 40,00 mgQE/g ekstre olarak bulundu.

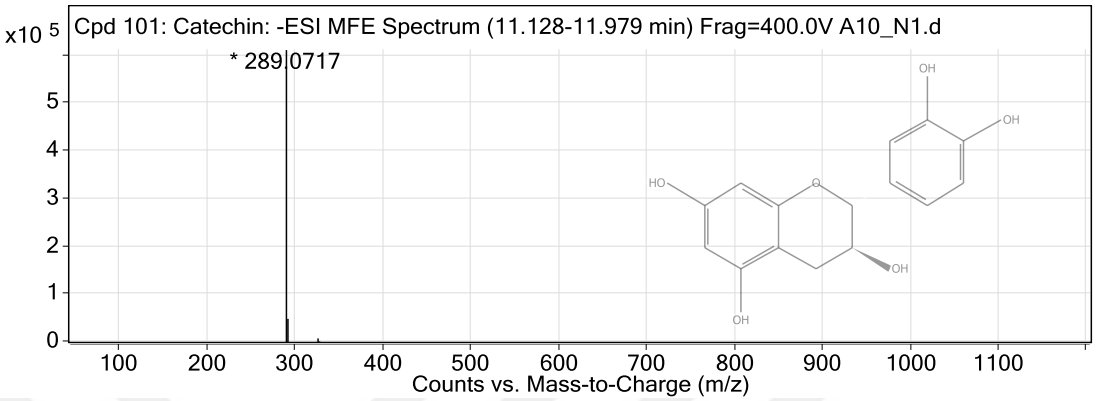


Şekil 5.5. Standart olarak kullanılan kuersetin için oluşturulan grafik

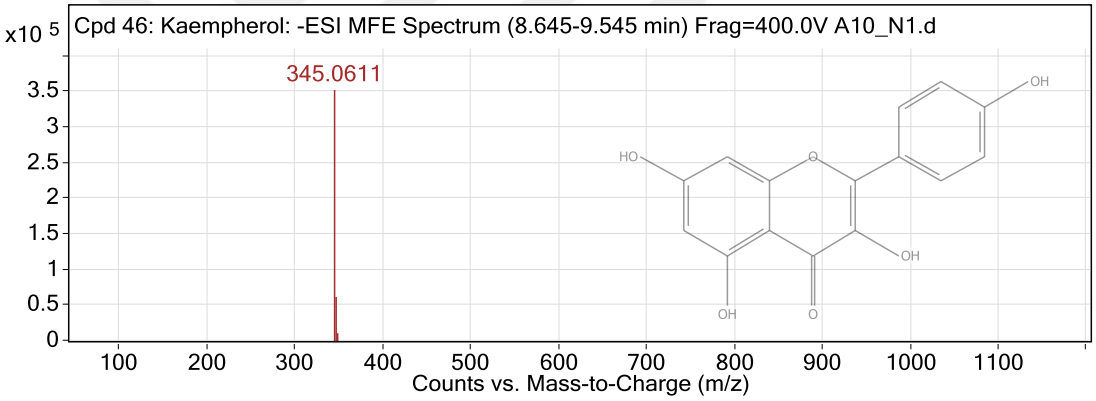
5.1.6. Q-TOF-LC yöntemi ile fenolik içerik tayini bulguları

Poroshell EC C-18 kolonu üzerinde 35 ^{o}C'de iki mobil faz kullanılarak 20 dakika boyunca analiz yapıldı. İki mobil faz olarak su içerisinde 5 mM'lık amonyum asetat ve metanol kullanıldı. Sonuçlar MassHunter B 06.00 yazılımı kullanılarak kaydedildi. Ekstrakt içerisinde klorogenik asit, kateşin, p-kumarik asit, apigenin, emodik asit, lecaronik asit, dihidrokuersetin, kuersitrin, 2,3-Dihidroksibenzoik asit, luteolin, genistein, koparin, kaemferol, purpurogallin, cefamandol ve tamarixetin gibi birçok

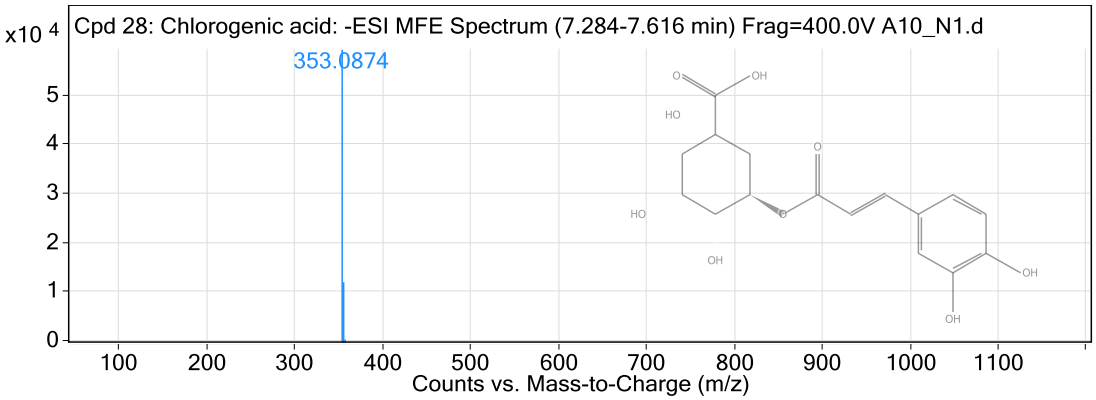
fenolik bileşik olduğu belirlendi. Belirlenen bazı fenolik bileşiklere ait kromatogramlar Şekil 5.6; Şekil 5.7; Şekil 5.8; Şekil 5.9; Şekil 5.10; Şekil 5.11; Şekil 5.12; Şekil 5.13; Şekil 5.14; Şekil 5.15; Şekil 5.16'da verilmiştir.



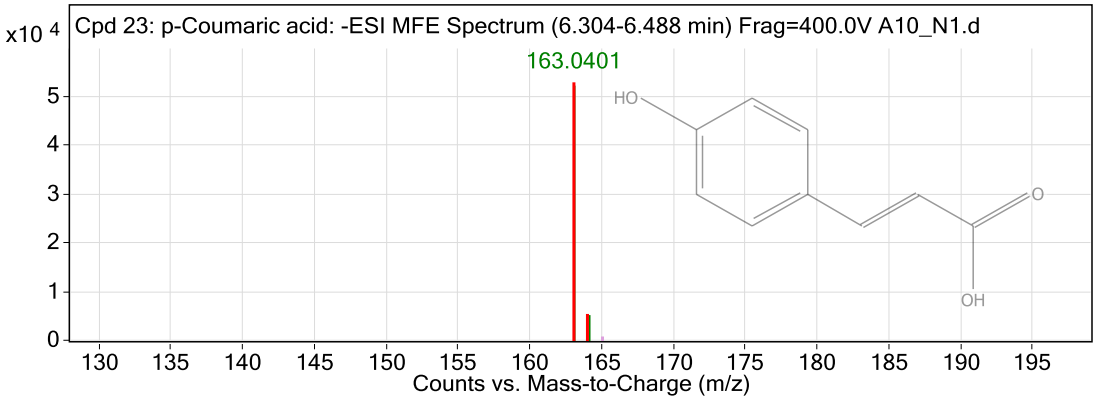
Şekil 5.6. Kateşin'in kromatogramı



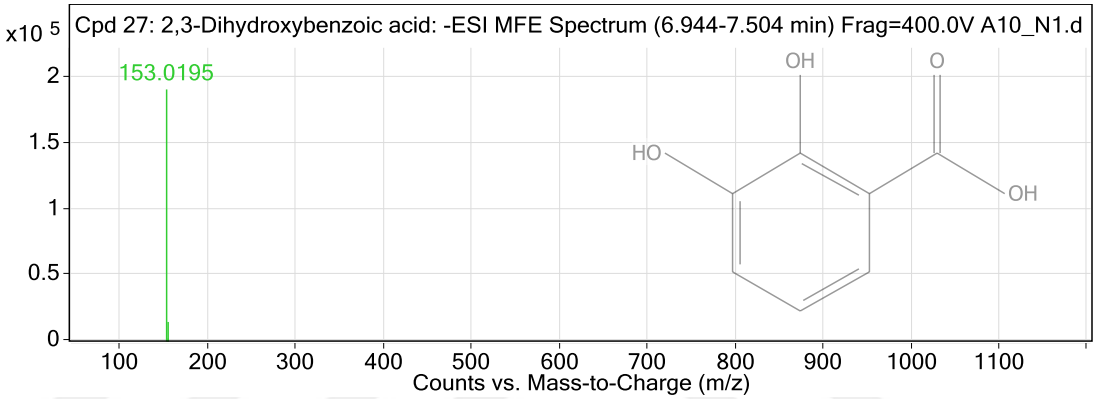
Şekil 5.7. Kaemferol'ün kromatogramı



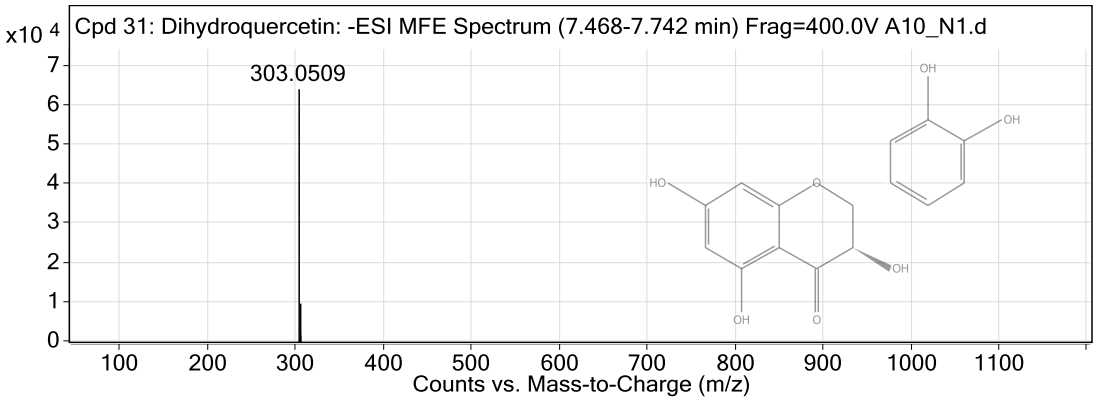
Şekil 5.8. Klorogenik asit'in kromatogramı



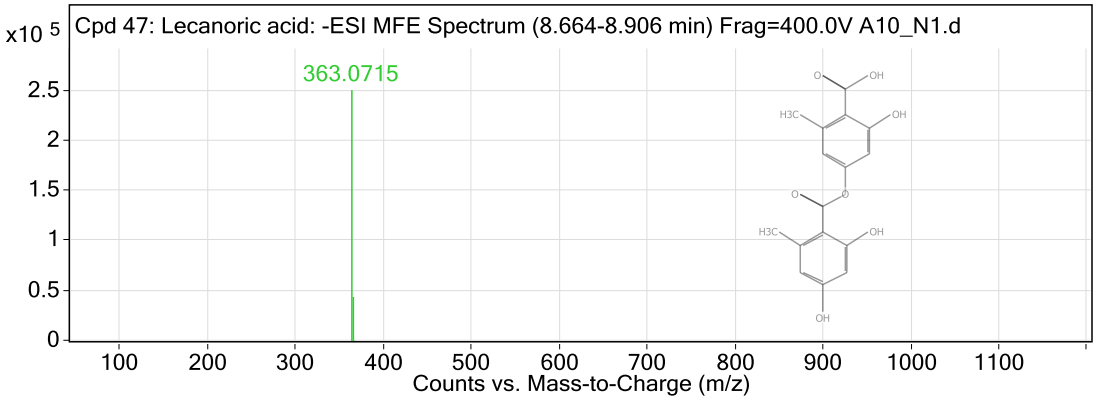
Şekil 5.9. p-kumarik asit'in kromatogramı



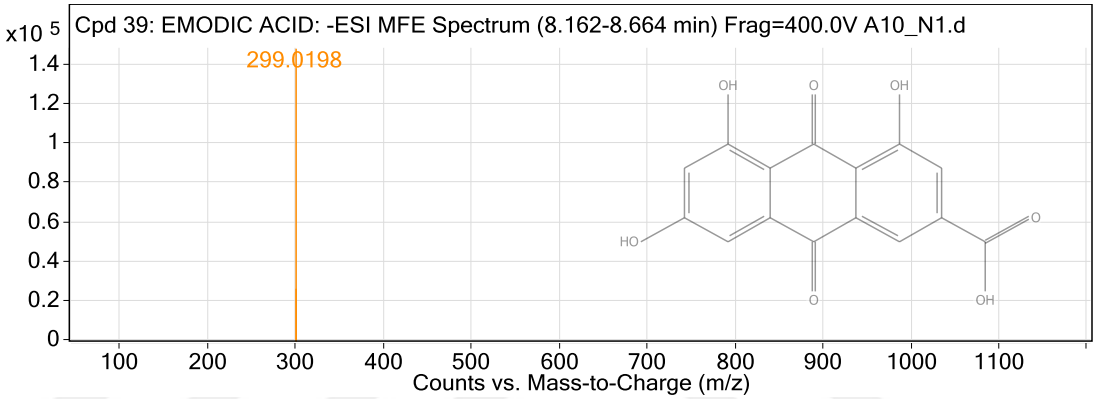
Şekil 5.10. 2,3-Dihidroksibenzoik asit'in kromatogramı



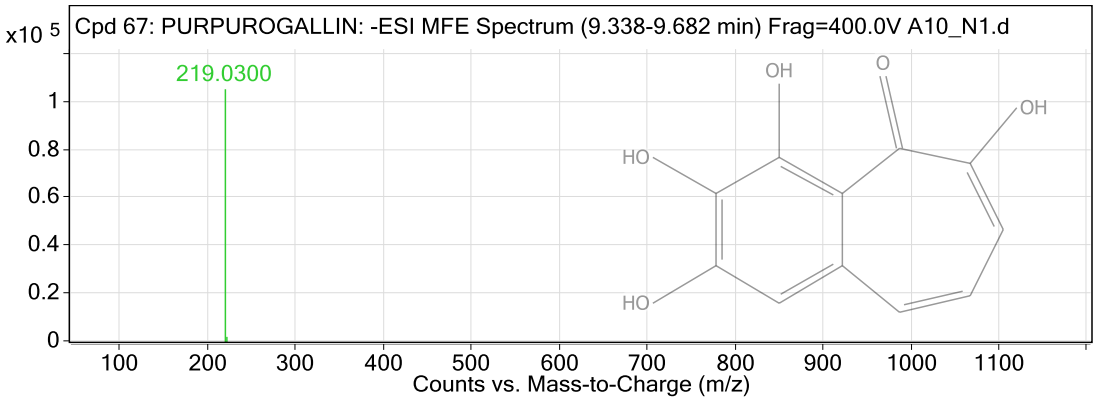
Şekil 5.11. Dihidrokuersetin'in kromatogramı



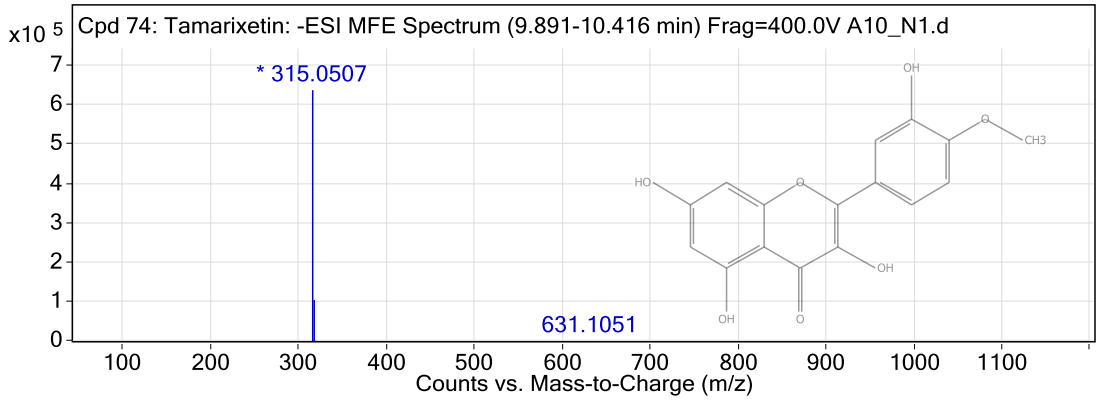
Şekil 5.12. Lecaronik asit'in kromatogramı



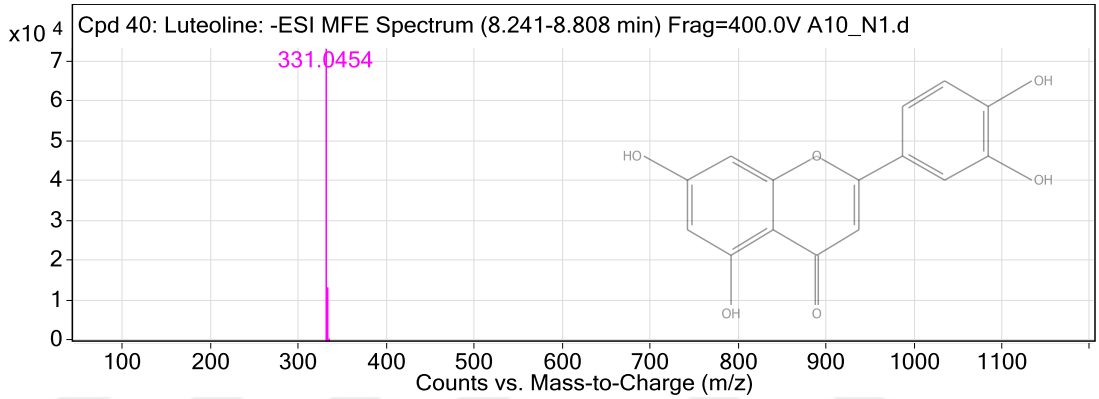
Şekil 5.13. Emodik asit'in kromatogramı



Şekil 5.14. Purpurogallin'in kromatogramı



Şekil 5.15. Tamarixetin'in kromatogramı



Şekil 5.16. Luteolin'in kromatogramı

5.2. Antikanser Araştırma Bulguları

XTT yöntemi kullanılarak HT-29, MCF-7 ve HepG2 kanser hücrelerine karşı metanol ekstresinin sitotoksik etkisi araştırıldı. Antikanser aktivite testleri, iki ayrı zaman dilimi yani 48 ve 72 saat uygulama yapılarak ve farklı numune konsantrasyonları kullanılarak yapıldı. Hücre ekimi, çoğaltılması ve test işlemleri steril ortamda yapıldı. Bu amaçla Class II Safety Cabinet ve CO_2 inkübatörü kullanıldı. Hücre sayımı işleminde TBE (Tripan Blue Dışlama) yöntemi kullanıldı. Akademik olarak yapılan antikanser çalışmalarında genel olarak kabul gören 1 ml'de yaklaşık 100.000 hücre sayısı elde edilmeye çalışıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlardaki numune çözeltisi eklendikten sonra 48 ve 72 saat boyunca CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon zamanları tamamlandıktan sonra her bir kuyucuğa 50 µl XTT kiti konuldu. Altı ile sekiz saat arası yeniden inkübe edildi ve daha sonra 415 nm'de eliza okuyucuda absorbanslar alındı. Elde edilen sonuçlarla her üç hücre türü için de konsantrasyona karşı % hücre

proliferasyonu grafikleri çizildi (Bkz. Şekil 6.12; Şekil 6.13; Şekil 6.14). Metanol ekstresinin konsantrasyonu arttıkça orantılı olarak kanser hücrelerini öldürme kapasitesinin de arttığı görüldü. 0,5 mg/ml konsantrasyonda HepG2 hücrelerini hem 48 hem 72 saat inkübasyon sonunda yaklaşık % 50; 1 mg/ml konsantrasyonda ise % 90'dan fazla öldürdüğü görüldü. MCF-7 hücrelerini 72 saat inkübasyon sonunda 0,5 mg/ml konsantrasyonda % 35; 1 mg/ml konsantrasyonda ise yaklaşık % 90 öldürdüğü görüldü. HT-29 hücrelerini 72 saat inkübasyon sonunda 0,5 mg/ml konsantrasyonda % 65; 1 mg/ml konsantrasyonda ise % 80 öldürdüğü görüldü.

Ayrıca hücre canlılığını % 50 düşürmek için gereken konsantrasyonu ifade eden IC_{50} değerleri hesaplandı (Bkz. Tablo 6.7). IC_{50} değerlerine göre 48 saat için en yüksek aktiviteyi 0,53 değeriyle HepG2 kanser hücresinde gösterdiği görüldü. 48 ve 72 saat için IC_{50} değerlerinin küçükten büyüğe sıralaması şöyledir:

48 saat için, HepG2 < HT-29 < MCF-7

72 saat için, HT-29 < HepG2 < MCF-7

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri öteki atoma). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırırlar. Bu durum serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar. Çoğu elektronlar çift halde bulunurken, serbest radikal bu elektronları birbirinden ayırarak reaksiyonu durdurur. Ama sonuçta serbest radikal kendine bir elektron alarak elektron çifti haline geçer, diğer elektron serbest radikal olur. Radikaller, son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir ve bu ortaklanmamış elektronlarından dolayı zararlıdırlar (Altınışık, 2000).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşmasını engelleyerek ya da mevcut olan radikalleri gidererek hücrenin hasara uğramasını engelleyen ve genellikle yapılarında fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir. Vücutta kalkan gibi olan bu bileşiklerin özelliği, elektronlarını vererek serbest radikalleri gidermeleri ve bu sırada kendilerinin serbest radikal halini almamalarıdır (Nagai vd., 2005; Cao ve Prior, 1999).

Birçok hastalıkta serbest radikallerin rolü açık bir şekilde ortaya konulmuştur. Vücudumuzdaki reaktif oksijen türleri bazı biyokimyasal reaksiyonlar ile üretilirler ve bunlar hayati biyomolekülerde hasara sebep olurlar. Eğer hücresel bileşenler tarafından etkili bir şekilde süpürülmezlerse hastalıklara yol açarlar. Serbest radikallerin zararlı etkileri, serbest radikalleri gideren ve organizmayı koruyan antioksidan maddeler tarafından ortadan kaldırılabilir. Serbest radikallerle ilgili yapılan birçok araştırma, antioksidanlar yönünden zengin yiyeceklerin kardiyovasküler hastalıkların, kanserlerin, parkinson ve alzheimer dahil nörodejeneratif hastalıkların önlenmesinde ayrıca inflamasyonun, hücre ve deri yaşlanmasının neden olduğu problemlerin önlenmesinde önemli rol oynadıklarını açıkça göstermektedir (Gençaslan, 2007).

Doğal antioksidan kaynakları; baharatlar, şifalı bitkiler, çaylar, yağlar, tohumlar, tahıllar, kakao kabuğu, hububatlar, meyveler, sebzeler, enzimler, proteinler olarak sayılabilmektedir. Araştırmacılar flavonoidler, kateşinler, fenoller (karnosol, rosmanol,

rosamaridifenol) ve fenolik asit (karnosik asit, rosmarinik asit) gibi çeşitli antioksidanları kapsayan bitki özlerinin yanı sıra, C vitamini, tokoferoller ve karotenoitlere de yoğunlaşmaktadırlar (Gökalp, 2006).

Antioksidan gücü belirleme yöntemleri, reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfa ayrılabilir:

1. Tek elektron transferi reaksiyonu (ET).
2. Hidrojen atomu transferi reaksiyonu (HAT).

ET ve HAT yöntemleri genellikle radikal giderme kapasitesini ölçmeye yöneliktir. HAT yöntemi ET yöntemine göre daha hızlıdır ve pH, çözücü gibi faktörlerden etkilenir (Apak vd., 2007). ET yönteminde reaksiyon karışımı iki bileşen içerir: Antioksidan ve oksidan. Oksidan, antioksidandan bir elektron alır ve bu durum oksidanda renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır (Huang vd., 2005). Antioksidan kapasite yöntemlerinde sıklıkla kullanılan DPPH metodu H atomu transferi yöntemine, ABTS metodu ile FRAP metodu ise elektron transferi yöntemine örnektir (Kaviarasan vd., 2006).

Antioksidan bileşikler, antioksidan etkilerini geçiş metal iyonlarını bağlama-indirgeme, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu önleme, radikal giderme gibi farklı mekanizmalarla gösterebilirler (Diplock, 1997; Gülçin, 2002). Antioksidan bileşiklerin radikal giderme aktiviteleri, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin sağlığa olan zararlı etkilerini gidermek açısından oldukça önemlidir (Min, 1998). Bitkilerde antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin başında fenolik bileşikler ve flavonoidler gelmektedir (Connor vd., 2002; Guo vd., 2003).

Son zamanlarda sentetik serbest radikallerin giderilmesi ile ilgili birçok metot geliştirilmiştir. Bunların başında DPPH radikal giderme aktivitesi (Gülçin, 2006b) ve ABTS radikal giderme aktivitesi gelmektedir (Gülçin, 2006a).

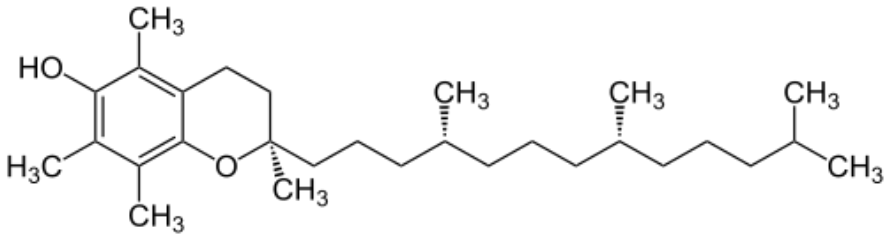
DPPH ve ABTS radikallerinin kullanımına dayanan metotlar, saf maddeler, yiyecek, içecek ve bitkisel ekstrelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılan popüler spektrofotometrik metotlardır. Ayrıca DPPH ve ABTS radikal giderme metotları hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı

saf maddelerin, ekstre veya izole bileşiklerin aktivitesini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özçelik vd., 2003). Bir antioksidan madde, bu radikal çözeltilerinden birine eklendiğinde, DPPH$^{\bullet}$ ve ABTS$^{\bullet}$'nin oluşumunu tersine çevirir ve bu reaktif türleri indirgeyerek bir renksizleşme oluşur. Bu metotlar yüksek duyarlılığa sahiptir ve aynı zamanda çok sayıda paralel çalışmanın analizine rahatlıkla uygulanabilir (Awika vd., 2003).

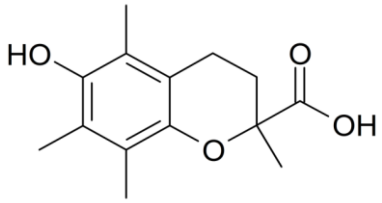
Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen antioksidan ve antiradikal yöntemlerle elde edilen sonuçlar, gıda ve farmokoloji endüstrisinde yaygın olarak kullanılan α-tokoferol, troloks, BHA, BHT, gallik asit ve kuersetin gibi standartlar kullanılarak değerlendirilmektedir.

Tokoferoller, lipid peroksil radikallerine hidroksil gruplarının hidrojenini vererek antioksidan olarak rol oynarlar. Aromatik halka yapısının varlığı tek elektronun delokalizasyonunu sağlar ve bileşik büyük ölçüde stabil hale gelir. Bileşiklerin bu grubu yüksek lipofiliktir ve lipoproteinler ile membranlarda etkindir. Tokoferollerin en önemli antioksidan özellikleri, lipid peroksidasyonunu gidermeleridir (Diplock, 1998). Güçlü bir antioksidan olan α-tokoferol (Şekil 6.1), çok kolay oksitlenebilme yeteneğine sahiptir. Vitamin E'nin biyolojik ortamlarda gerçekleştirdiği işlev büyük oranda bu özelliğine dayanmaktadır. Antioksidan karakteri nedeniyle vitamin E, aktif radikallerle reaksiyona girerek oksidasyona duyarlı moleküler yapıların istenmeyen oksidasyonlarının önlenmesi ya da azaltılmasında etkili olur (Dündar ve Aslan, 2000).

Troloks [6-hidroksi - 2,5,7,8 - tetrametilkroman-2-karboksilik asit, (Şekil 6.2)], E vitamininin suda çözünen eşdeğeridir (Re vd., 1999). Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan aktivite tayin yönteminde standart olarak kullanılır. Genellikle belli bir derişim aralığında troloks antioksidan olarak kullanılarak bir çalışma grafiği hazırlanır ve bilinmeyen antioksidanın aktivitesi bu grafikten troloks eşdeğeri olarak okunur.



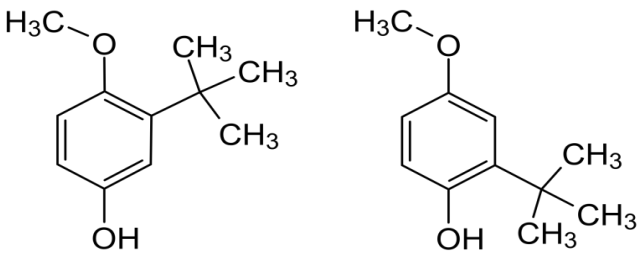
Şekil 6.1. α-tokoferol'ün kimyasal yapısı



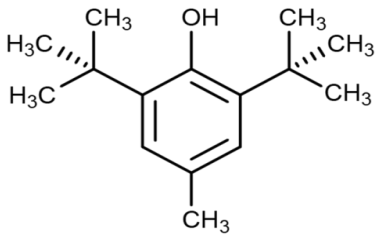
Şekil 6.2. Troloks'un kimyasal yapısı

BHA, 3-BHA ve 2-BHA izomerlerinin (Şekil 6.3) bir karışımı olarak kullanılır. 3-izomer, 2- izomerinden daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermektedir. Balmumu gibi beyaz katı bir mono fenoliktir ve yağda çözünür. Hayvansal yağların oksidasyonunu önlemede etkilidir ancak bitkisel yağlar için etkisizdir (Reische vd., 2002). BHA özellikle uçucu yağların renk, tat ve kokularının korunmasında, bilhassa kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkilidir. Genellikle tahıllı ve şekerli ürünlerde kullanılır (Çakmakçı ve Çelik, 2000).

BHT (Şekil 6.4) yaygın olarak kullanılan mono fenolik bir antioksidandır. Beyaz, katı ve kristal yapıda olup yağda çözünür. Yüksek sıcaklıkta işlem için uygun olan bir antioksidandır. Ancak BHA kadar stabil değildir (Reische vd., 2002).



Şekil 6.3. BHA'nın izomer yapıları



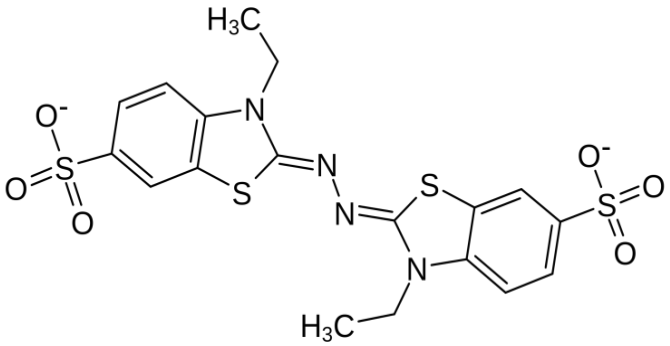
Şekil 6.4. BHT'nin kimyasal yapısı

İlk olarak 1993 yılında Miller ve arkadaşları tarafından bulunan ve 1999 yılında Re ve arkadaşları tarafından geliştirilen ABTS metodu; ABTS radikal katyonunun ($ABTS^{\bullet+}$) oluşumu ve 734 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır. Bunun için öncellikle ABTS radikali oluşturmak gerekmektedir. ABTS radikalinin oluşumu için ABTS (Şekil 6.5) ve potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) reaksiyona sokulur. Potasyum persülfat varlığında ABTS'den ABTS radikalleri oluşur. Reaksiyonların devamında mavi-yeşil renkli $ABTS^{\bullet+}$ doğrudan oluşur. Oluşan bu radikal katyon, spektrofotometrik olarak ölçülür (Apak vd., 2007).

$$K_2S_2O_8 + ABTS \rightarrow K_2SO_4 + SO_4^{\bullet-} + ABTS^{\bullet+}$$

ABTS radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktiftirler ve bir H atom transferini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferini içerir (Kaviarasan vd., 2006).

$$ABTS^{\bullet+} + A \rightarrow ABTS^{+} + A^{\bullet}$$



Şekil 6.5. ABTS'nin kimyasal yapısı

Bu metotta, ABTS [2,2′-azino-bis(3-etilbenzttiyazolin-6-sülfonik asit)] peroksil veya diğer oksidanlara okside olur ve ABTS radikal katyonu oluşur. Oluşan $ABTS^{\bullet+}$ oldukça şiddetli (mavi-yeşil) bir renge sahiptir. Antioksidan kapasite, test bileşeninin ABTS radikal katyonu ile direkt olarak reaksiyona girmesi ile renk şiddetindeki azalma ölçülerek belirlenir (Prior vd., 2005).

ABTS radikali hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir, dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir (Osman vd. 2006). $ABTS^{\bullet+}$ 415, 645, 734, 815 nm'de maksimum absorbsiyona sahiptir. Bunlardan 415 ve 734 nm birçok araştırmacı tarafından ABTS radikal katyonu ve antioksidan arasındaki reaksiyonu spektrofotometrik olarak gözlemlemek için seçilmiştir (Prior vd., 2005). Bu tezde 734 nm'de çalışıldı. Elde edilen sonuçlarla standartlar ve numuneler için 50 µg/ml konsantrasyonda % ABTS radikali giderme grafiği çizildi (Bkz. Şekil 5.1). 50 µg/ml konsantrasyonda ABTS radikali giderme kapasitelerinin sıralaması aşağıdaki gibidir:

BHT > BHA > α-tokoferol = Troloks > metanol eks. > etil asetat eks.

Standartlar ve numune ekstrelerinin 50 µg/ml konsantrasyonda ABTS radikali giderme yüzdeleri Tablo 6.1'de verilmiştir.

Tablo 6.1. 50 µg/ml konsantrasyonda ABTS radikali giderme yüzdeleri

Bitki ekstraktları ve standartlar	ABTS radikali giderme (%)
BHT	99,904
BHA	99,712
α-tokoferol	99,616
Troloks	99,616
Metanol eks.	81,130
Etil asetat eks.	65,708

Tablo 6.1'de de görüldüğü gibi standartların tümünün 50 µg/ml konsantrasyonda % 99'un üzerinde ABTS radikali giderme aktivitesi gösterdikleri gözlendi. Aynı

konsantrasyonda metanol ekstresinin % 81,13 ve etil asetat ekstresinin % 65,708 ABTS radikali giderme aktivitesi gösterdiği gözlendi.

Topdemir ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada bazı *tanacetum* türlerinin birbirine yakın ve çok iyi ABTS radikali giderme aktivitesi gösterdiklerini belirtmişler ve bu türlerle standartların ABTS radikali giderme yüzdelerini sırasıyla şöyle bulmuşlardır: BHT (% 96,16), α-tokoferol (% 96,15), BHA (% 96,04), *T. aureum var. oligocephalum* (% 95,99), *T. balsamitoides* (% 95,97), *T. parthenium* (% 95,95), *T. zahlbruckneri* (% 95,92) (Topdemir vd., 2017).

FRAP yönteminin avantajı elektron transfer reaksiyonu olmasıdır. Bu yöntemde 0,7 V'tan küçük redoks potansiyeli olan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri belirlenir (Benzie ve Strain, 1996). Ayrıca hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygundur. FRAP yönteminin en önemli avantajı, basitliği, hızı, ucuzluğu ve sağlamlığıdır. Özel bir ekipman gerektirmez. Yöntem sadece demir iyonunu temel almakta olup mekanik ve fizyolojik antioksidan aktiviteleri için uygun değildir. Ancak, diğer yöntemlere oranla daha basit, hızlı ve ucuzdur (Prior vd., 2005). Yöntemin dezavantajları da vardır. Örnek olarak, fizyolojik pH'da aktivite göstermemesi, tiyol tipi (glutatyon gibi) antioksidanları ölçememesi verilebilir (Benzie ve Strain, 1996). FRAP yöntemi demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3.6) gerçekleştirilir. Düşük pH değerinde, Fe(III)-TPTZ kompleksi, Fe(II) formuna indirgenir (Benzie, 1996). Bu metotta ferrik iyonları (Fe^{3+}), trispiridil triazin (TPTZ) ile reaksiyonu sonucu oluşan [Fe(III)-TPTZ] kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe^{2+} trispiridil triazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenmektedir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavi olup 593 nm'de maksimum absorbans verir. Absorbansın yüksek olması ferrik iyonlarının (Fe^{3+}), ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgendiğinin göstergesidir (Yıldız, 2007).

Tez çalışmasında FRAP metodu uygulaması sonucu elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Bkz. Şekil 5.2). Bu grafiğe göre metanol ve etil asetat ekstrelerinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasiteleri değerlendirildi. Ekstrelerin konsantrasyonları arttıkça ferrik iyonlarını indirgeme kapasitelerinin de arttığı gözlendi. Yine ekstrelerin pozitif kontrol olan standartlardan daha düşük bir aktivite gösterdikleri de gözlendi. 10 µg/ml konsantrasyonda standartlar, metanol

ekstresi ve etil asetat ekstresinin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}), ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitelerinin büyükten küçüğe doğru aşağıdaki gibi olduğu gözlendi:

BHA > Troloks > BHT > α-tokoferol > metanol eks. > etil asetat eks.

10 µg/ml konsantrasyondaki absorbans değerleri Tablo 6.2'de verildi. En yüksek indirgeme kapasitesini BHA (absorbans: 1,741) standardının gösterdiği görüldü. Ekstrelerden metanol ekstresinin 0,343, etil asetat ekstresinin 0,285 absorbans değerleri ile standartlardan α-tokoferol'e (absorbans: 0,658) yakın indirgeme kapasitelerinin olduğu görüldü.

Şimşek'in yaptığı bir çalışmada, *tanacetum alyssifolium* bitkisinden izole edilen axillarin bileşiğinin Fe^{3+} indirgeme kapasitesinin standart olan troloks'tan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Şimşek, 2016). *Tanacetum erzincanense'*nin Fe^{3+} indirgeme kapasitesi ise her iki ekstrede de troloks'tan azdır. Çetin, yaptığı bir çalışmada, *asteraceae* familyasından olan *scolymus hispanicus* bitkisinin metanol ekstraktının demir indirgeme gücünü bulmak için farklı bir metot kullanmış, 0,2 mg/ml konsantrasyon ve 700 nm'deki absorbans değerini 0,15 olarak bulmuştur (Çetin, 2012). *Tanacetum erzincanense'*nin metanol ekstresinin FRAP metodundaki demir indirgeme gücünün 10 µg/ml konsantrasyon ve 593 nm'deki absorbans değeri 0,343'tür. Metotlarda farklılık olmakla birlikte kıyaslandığında *tanacetum erzincanense*'nin *scolymus hispanicus*'tan çok yüksek demir indirgeme gücünün olduğu görülür.

Tablo 6.2. 10 µg/ml konsantrasyondaki ferrik iyonlarını indirgeme kapasitesinin absorbans değerleri

Bitki ekstraktları ve standartlar	Absorbans (593 nm) ± SD (10 µg/ml)
BHA	1,741 ± 0,029
Troloks	1,327 ± 0,010
BHT	1,046 ± 0,027
α-tokoferol	0,658 ± 0,037
Metanol eks.	0,343 ± 0,037
Etil asetat eks.	0,285 ± 0,012

Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği kuprak yöntemi, antioksidanlar tarafından Cu^{2+}'nin Cu^{1+}'e indirgenmesi esasına dayanır. Bu yöntemde; 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin'in (Neokuprin veya Nc) Cu^{2+} ile oluşturduğu bakır(II)-neokuprin kompleksinin [Cu(II)-Nc], bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] şelatına indirgenmesi ve bu bileşiğin 450 nm'de maksimum absorbans vermesi ile antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. Fenantrolin kompleksleri suda çok düşük çözünürlüğe sahiptirler ve % 95'lik etanol gibi organik çözücülerde çözünmelidirler (Apak, 2004). Kuprak metodunda $CuCl_2$ ve etanolde hazırlanan neokuprin çözeltisi kullanılır. Neokuprin heterosiklik organik bir bileşiktir ve şelatlayıcıdır. Hazırlanan çözeltilerin 450 nm'deki absorbans artışı gözlemlenir. Bu artış, indirgenme miktarının yani numunenin antioksidan kapasitesinin bir ölçütü olarak değerlendirilir. Bu yöntem kolay, fizyolojik pH'ya yakın bir pH'da (pH:7) uygulanabilen, hızlı, kararlı ve düşük maliyetlidir. Hem lipofilik hem hidrofilik olan çeşitli antioksidanlar için uygulanabilen bir yöntemdir (Gülçin, 2012). KUPRAK reaktifi, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için yeterince hızlıdır. ABTS ve DPPH gibi, kromojenik radikal reaktiflerden daha kararlıdır ve daha kolay temin edilebilir. Renkli Cu(I)-Nc şelatı veren redoks reaksiyonu, hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmez (Apak, 2004).

Kuprak metoduna göre yapılan testlerde, ekstrelerin konsantrasyonları arttıkça bakır iyonlarını indirgeme aktivitelerinin de arttığı gözlendi (Bkz. Şekil 5.3). Yine ekstrelerin pozitif kontrol olan standartlardan daha düşük bir aktivite gösterdikleri de gözlendi. 10 µg/ml konsantrasyondaki aktivite sırası aşağıda verilmiştir:

Troloks > BHA > α-tokoferol > BHT > metanol eks. > etil asetat eks.

Yine 10 µg/ml konsantrasyondaki absorbans değerleri Tablo 6.3'te verilmiştir. En yüksek indirgeme kapasitesini 0,340 absorbans değeriyle troloks standardının gösterdiği, ekstrelerden metanol ekstresinin 0,087, etil asetat ekstresinin 0,069 absorbans gösterdiği görüldü. Bu değerler ile standartlardan BHT'ye (absorbans: 0,186) yakın indirgeme kapasitelerinin olduğu belirlendi.

Tablo 6.3. 10 μg/ml konsantrasyondaki bakır indirgeme kapasitesinin absorbans değerleri

Bitki ekstraktları ve standartlar	Absorbans (450 nm) ± SD (10 μg/ml)
Troloks	0,340 ± 0,006
BHA	0,330 ± 0,009
α-tokoferol	0,232 ± 0,037
BHT	0,186 ± 0,029
Metanol eks.	0,087 ± 0,003
Etil asetat eks.	0,069 ± 0,005

Şimşek'in yaptığı bir çalışmada, *tanacetum alyssifolium* bitkisinden izole edilen axillarin bileşiğinin Cu^{2+} indirgeme kapasitesinin standart olan troloks'tan daha az olduğu belirtilmiştir (Şimşek, 2016). *Tanacetum erzincanense'*nin de Cu^{2+} indirgeme kapasitesi her iki ekstrede troloks'tan azdır.

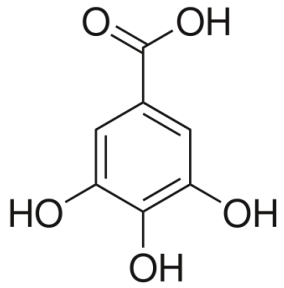
Çetin'in yaptığı bir çalışmada, *asteraceae* familyasından olan *scolymus hispanicus* bitkisinin metanol ekstraktının 0,2 mg/ml konsantrasyondaki bakır indirgeme gücünün 450 nm'deki absorbans değeri 0,11 olduğu belirtilmiştir (Çetin, 2012). *Tanacetum erzinanenese*'nin metanol ekstresinin 10 μg/ml konsantrasyonda 450 nm'deki absorbans değeri 0,087'dir. Kıyaslandığında *tanacetum erzinanenese'*nin *scolymus hispanicus'*tan çok daha yüksek bir bakır indirgeme gücüne sahip olduğu söylenebilir.

Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak fenolik bileşiklerin kalitatif–kantitatif tayininin yapılması yaygın bir yöntemdir. Yöntemin esası fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir (Albayrak vd., 2010). Yöntemin sınırlılığının bazıları, nispeten uzun zaman alması, sulu fazda gerçekleştiği için lipofilik bileşikler için uygulanamaması ve fenolik bileşenlerin sadece bazik ortamda reaksiyon vermesidir (Prior vd., 2005; Albayrak vd., 2010). Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir ($3H_2O.P_2O_5.13WO_3.5MoO_3.10\ H_2O$). FCR metodunda bir örneğin indirgeme kapasitesi ölçülür. Fenolik bileşikler, FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler. Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun

oluşmasına neden olur. Fenolat ve FCR arasında oluşan mavi renkli kompleks bileşiklerin absorbansı 760 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından (örneğin vitamin C, aromatik aminler, Cu(I) gibi) indirgenebileceği için, sadece fenolik bileşiklere özel değildir (Huang vd., 2005). Fenolik bileşikler, FCR içerisindeki molibdenyum elementi ile alkali ortamda elektron transfer ederek kendileri yükseltgenirken, metal ise indirgenir:

$$Mo(VI)(sarı) + e^{-}(antioksidan) \rightarrow Mo(V)(mavi)$$

Standart olarak genellikle *gallik asit* kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir. Bunun yanında son zamanlarda yapılan çalışmalarda gallik asit yerine *tannik asit, klorogenik asit, kafeik asit, protokateşik asit, vanilik asit* ve *ferulik asit* de kullanılmaktadır (Prior vd., 2005). Fenolik bileşikler ve flavonoidler, çıkış maddeleri fenol olan organik bileşiklerdir. Güneş ışığı sayesinde bitkilerin meyve, çiçek, dal ve yapraklarında fotomorfogenez reaksiyonu sonucu oluşurlar. Birden fazla fenol grubu içerdiklerinden dolayı polifenoller olarak da adlandırılırlar. Fenolik bileşikler; meyveler, sebzeler ve bitkisel yağlarda bol miktarda bulunan fitokimyasalların çok çeşitli bir grubudur. Polifenoller önemli antioksidan bileşiklerdir. Bu bileşikler, lipid peroksidasyonunu inhibe edici ve metal şelatlayıcı gibi etkilerle oksidasyonu azaltırlar (Stevenson ve Hurst, 2007). Gallik asit, epikateşin, kuersetin, p-kumarik asit önemli polifenollerdir.



Şekil 6.6. Gallik asit'in kimyasal yapısı

Toplam fenolik bileşik tayininde standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı (Şekil 6.6). Gallik asitin ve ekstrelerin farklı konsantrasyonlarında hazırlamış çözeltilerinin 760 nm'de absorbansları ölçüldü. Hem standart hem numune ekstrelerinin konsantrasyonu artıkça absorbanslarının da arttığı görüldü. Standart olarak kullanılan

gallik asit için konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi (Bkz. Şekil 5.4). Standart grafikten aşağıdaki eşitlik elde edildi:

$$\text{Absorbans } (\lambda 760 \text{ nm}) = 0{,}0027 \times [\text{GAE}] \qquad (r^2: 0{,}9954)$$

Bu eşitlikten ekstrelerde bulunan toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit ekivaleni (GAE) olarak hesaplandı. Bu değerler; metanol ekstresi için 64,444 mgGAE/g ekstre ve etil asetat ekstresi için 41,48 mg GAE/g ekstre olarak bulundu.

Yur'un yaptığı bir çalışmada *tanacetum haussknechtii* bitkisinin topraküstü, sap-yaprak ve çiçek kısımlarının metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarlarının *tanacetum haussknechtii* çiçek kısmı için 34,14 mgGAE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* sap-yaprak kısmı için 36,00 mgGAE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* topraküstü kısmı için 34,82 mgGAE/g ekstre olduğu belirtilmiştir. Etil asetat ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarlarının ise *tanacetum haussknechtii* çiçek kısmı için 33,40 mgGAE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* sap-yaprak kısmı için 14,78 mgGAE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* topraküstü kısmı için 16,59 mgGAE/g ekstre olduğu belirtilmiştir (Yur, 2016). Geçibesler'in çalışmasında, *tanacetum abrotanifolium* bitkisinin metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı 246,16 µgGAE/g DW ve etil asetat ekstresinin toplam fenolik madde miktarı 63,26 µgGAE/g DW olduğu belirtilmiştir (Geçibesler, 2017). Bu çalışmadaki sonuçlarla kıyaslandığında *tanacetum erzincanense'*nin her iki ekstrede de hem *tanacetum haussknechtii* bitkisinden hem de *tanacetum abrotanifolium* bitkisinden daha yüksek bir fenolik madde miktarına sahip olduğu görülür (*Tanacetum erzincanense* metanol eks.: 64,444 mgGAE/g ekstre, *tanacetum erzincanense* etil asetat eks.: 41,48 mgGAE/g ekstre).

Arıtuluk ve arkadaşlarının yayınladıkları bir makalede beş *tanacetum* türünün (*T. armenum, T. cadmeum ssp. cadmeum, T. cilicicum, T. praeteritum ssp. massicyticum, T. praeteritum ssp. praeteritum)* metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarlarının sırasıyla 58,86 mgGAE/g ekstre, 131,24 mgGAE/g ekstre, 33,14 mgGAE/g ekstre, 149,93 mgGAE/g ekstre, 112,67 mgGAE/g ekstre olduğu belirtilmiştir (Arıtuluk vd., 2016). Arıtuluk ve arkadaşlarının çalışmasındaki bitkilerin metanol ekstrelerinin fenolik madde miktarı ile bu çalışmadaki *tanacetum erzincanense* bitkisinin metanol ekstresinin (64,444 mgGAE/g ekstre) fenolik madde miktarı kıyaslandığında; *tanacetum*

erzincanense, iki *tanacetum* türünden (*T. armenum, T. cilicicum*) daha yüksek, üç *tanacetum* türünden (*T. cadmeum ssp. cadmeum, T. praeteritum ssp. massicyticum, T. praeteritum ssp. praeteritum)* daha düşük bir fenolik madde miktarı içermektedir.

Erdoğan'ın yaptığı bir çalışmada *tanacetum balsamita* L. *subsp. balsamita* bitkisinin toplam fenolik madde miktarı metanol ekstresi için 103,25 mgGAE/g ekstre; etil asetat ekstresi için ise 63,90 mgGAE/g ekstre olarak belirtilmiştir (Erdoğan, 2012). Aktümsek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *asteraceae* familyasından olan *centaurea ptosimopappoides* bitkisinin metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı 82,273 mgGAE/g olduğu belirtilmiştir (Aktümsek vd., 2011). Albayrak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *asteraceae* familyasından olan *helichrysum orientale, helichrysum peshmenianum, helichrysum kitianum* bitkilerinin metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 73,70 mgGAE/g, 66,74 mgGAE/g, 75,16 mgGAE/g olduğu belirtilmiştir (Albayrak vd., 2011). Çetin'in çalışmasında yine *asteraceae* familyasından olan *scolymus hispanicus* bitkisinin metanol ekstraktının toplam fenolik madde miktarı 111,32 mgGAE/g olduğu belirtilmiştir (Çetin, 2012). Bu çalışmadaki bulunan değerler ile karşılaştırıldığında *tanacetum erzincanense'*nin bu bitkilerden biraz daha düşük fenolik madde içerdiği görülür.

Çınar'ın yaptığı bir çalışmada *asteraceae* familyasından olan *ınula helenium* bitkisinin bazı taksonlarının metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları *ınula helenium subsp. turcarasemosa* taksonu için 13,32 mgGAE/g, *ınula helenium subsp. vanensis* taksonu için 24,82 mgGAE/g, *ınula helenium subsp. pseidohelenium* taksonu için 23,13 mgGAE/g, *ınula helenium subsp. orygalis* taksonu için 102,91 mgGAE/g olduğu belirtilmiştir. Etil asetatlı ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları *ınula helenium subsp. turcarasemosa* taksonu için 4,18 mgGAE/g, *ınula helenium subsp. vanensis* taksonu için 5,24 mgGAE/g, *ınula helenium subsp. pseidohelenium* taksonu için 6,42 mgGAE/g, *ınula helenium subsp. orygalis* taksonu için 9,6 mgGAE/g olduğu belirtilmiştir (Çınar, 2012). Bu sonuçlara göre *tanacetum erzincanense'*nin, *ınula helenium subsp. orygalis* bitkisinin metanol ekstresi hariç diğer bitkilerden her iki ekstrede de çok daha yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu görülür.

Tanacetum erzincanense ile bazı diğer *tanacetum* türlerinin metanol ekstrelerinin 1 g ekstrede içerdikleri toplam fenolik madde miktarı Tablo 6.4'te verilmiştir. Tablo 6.4'te de görüldüğü gibi *tanacetum erzincanense* bazı türlerden yüksek, bazı türlerden düşük fenolik madde miktarına sahiptir. Bu türler arasındaki fenolik madde miktarı sıralaması şöyledir:

T. praeteritum ssp. massicyticum > *T. cadmeum ssp. cadmeum* > *T. praeteritum ssp. praeteritum* > *T. balsamita L. ssp. balsamita* > ***Tanacetum erzincanense*** > *T. armenum* > *T. haussknechtii (sap-yaprak kısmı)* > *T. haussknechtii (çiçek kısmı)* > *T. haussknechtii (topraküstü kısmı)* > *T. cilicicum*

Tablo 6.4. *Tanacetum erzincanense* ve diğer bazı *tanacetum* türlerinin metanol ekstrelerinin içerdikleri toplam fenolik madde miktarları

Bitki ekstreleri (metanol)	Toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/g ekstre)
Tanacetum erzincanense	**64,444**
T. cadmeum ssp. cadmeum	131,24
T. cilicicum	33,14
T. praeteritum ssp. massicyticum	149,93
T. praeteritum ssp. praeteritum	112,67
T. armenum	58,86
T. balsamita L. ssp. balsamita	103,25
T. haussknechtii (çiçek kısmı)	34,82
T. haussknechtii (sap-yaprak kısmı)	36,00
T. haussknechtii (topraküstü kısmı)	34,14

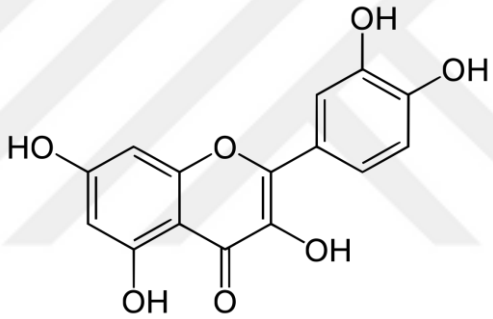
Fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını flavonoidler oluşturur. Flavonoidler, çeşitli besin ve bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkilerde tat, koku ve renk gibi özelliklerin oluşmasına sebep olmaktadırlar. Temel yapıları 2 tane aromatik fenil benzo piren halkasından oluşmaktadır. Bu aromatik halkalar 3 karbon içeren bir zincir ile birbirleriyle bağlanırlar. Bir veya daha fazla şeker bileşiği ile –OH grubu veya karbon–karbon bağları ile bağlanıp, O-glikozit ve C-glikozit bileşiklerini oluştururlar. Flavonoidler doğada genellikle serbest, glikozit ve bazen aglikonlar halinde bulunmaktadırlar.

Asteraceae familyasındaki bitkilerin yapılarında luteolin, apigenin, krisin gibi önemli flavon bileşikleri bulunmaktadır (Huang vd., 2009).

Toplam flavonoid miktarını belirlemek için standart olarak kuersetin kullanıldı (Şekil 6.7). Kuersetinin farklı konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltilerinin 415 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı absorbans standart grafiği çizildi (Bkz. Şekil 5.5). Standart grafikten aşağıdaki eşitlik elde edildi:

$$\text{Absorbans } (\lambda 415 \text{ nm}) = 0{,}0091 \times [\text{QE}] \qquad (r^2: 0{,}995)$$

Bu eşitlikten ekstrelerde bulunan toplam flavonoid miktarları kuersetin ekivaleni olarak hesaplandı. Bu değerler; metanol ekstresi için 62,20 mgQE/g ekstre ve etil asetat ekstresi için 40,00 mgQE/g ekstre olarak bulundu.



Şekil 6.7. Kuersetin'in kimyasal yapısı

Arıtuluk ve arkadaşlarının yayınladıkları bir makalede, beş *tanacetum* türünün (*T. armenum, T. cadmeum ssp. cadmeum, T. cilicicum, T. praeteritum ssp. massicyticum, T. praeteritum ssp. praeteritum)* metanol ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarlarının sırasıyla 7,69 mgQE/g ekstre, 23,83 mgQE/g ekstre, 18,73 mgQE/g ekstre, 33,42 mgQE/g ekstre, 10,71 mgQE/g ekstre olduğu belirtilmiştir (Arıtuluk vd., 2016). Kıyaslandığında; *tanacetum erzincanense'*nin metanol ekstresinin bu bitkilerin hepsinden daha yüksek miktarda flavonoid madde içerdiği görülür.

Yur'un yaptığı bir çalışmada *tanacetum haussknechtii* bitkisinin topraküstü, sap-yaprak ve çiçek kısımlarının metanol ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarlarının *tanacetum haussknechtii* çiçek kısmı için 18,39 mgQE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* sap-yaprak kısmı için 10,00 mgQE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii*

topraküstü kısmı için 12,82 mgQE/g ekstre olduğu belirtilmiştir. Etil asetat ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarlarının ise *tanacetum haussknechtii* çiçek kısmı için 30,44 mgQE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* sap-yaprak kısmı için 10,65 mgQE/g ekstre, *tanacetum haussknechtii* topraküstü kısmı için 12,47 mgQE/g ekstre olduğu belirtilmiştir (Yur, 2016). Erdoğan'ın çalışmasında *tanacetum balsamita* L. *subsp. balsamita* bitkisinin toplam flavonoid madde miktarı metanol ekstresi için 40,27 mgQE/g ekstre, etil asetat ekstresi için ise 36,77 mgQE/g ekstre olarak belirtilmiştir (Erdoğan, 2012). Bu çalışmadaki sonuçlarla kıyaslandığında *tanacetum erzincanense'*nin her iki ekstrede de bu iki bitkiden daha yüksek bir flavonoid madde miktarına sahip olduğu görülür (*Tanacetum erzincanense* metanol eks.: 62,20 mgQE/g ekstre, *tanacetum erzincanense* etil asetat eks.: 40,00 mgQE/g ekstre).

Geçibesler'in yaptığı bir çalışmada, *tanacetum abrotanifolium* bitkisinin metanol ekstresinin toplam flavonoid madde miktarı 142,53 µgQEE/g DW ve etil asetat ekstresinin toplam flavonoid madde miktarı 85,34 µgQEE/g DW olduğu belirtilmiştir (Geçibesler, 2017). Bu çalışmadaki sonuçlarla kıyaslandığında *tanacetum erzincanense'*nin *tanacetum abrotanifolium*'dan çok daha yüksek bir flavonoid madde miktarına sahip olduğu görülür.

Çetin'in yaptığı bir çalışmada *asteraceae* familyasından olan *scolymus hispanicus* bitkisinin metanol ekstraktının toplam flavonoid madde miktarı 24,50 mgRE/g olduğu belirtilmiştir (Çetin, 2012). Aktümsek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *asteraceae* familyasından olan *centaurea rigida* bitkisinin metanol ekstraktının toplam flavonoid madde miktarı 76,252 mgRE/g olduğu belirtilmiştir (Aktümsek vd., 2011). Standart olarak farklı bileşikler kullanılmakla birlikte kıyaslandığında *tanacetum erzincanense'*nin (62,20 mgGAE/g ekstre), *scolymus hispanicus'den* çok daha fazla, *centaurea rigida'*dan biraz daha az toplam flavonoid madde miktarı içerdiği görülür.

Tanacetum erzincanense ile bazı diğer *tanacetum* türlerinin metanol ekstrelerinin 1 g ekstrede içerdikleri toplam flavonoid madde miktarı Tablo 6.5'te verilmiştir. Tablo 6.5'te de görüldüğü gibi *tanacetum erzincanense,* diğer *tanacetum* türlerinin hepsinden daha yüksek bir toplam flavonoid madde miktarına sahiptir. Bu türler arasındaki toplam flavonoid madde miktarı sıralaması şöyledir:

Tanacetum erzincanense *> T. balsamita* L. *subsp. balsamita > T. praeteritum ssp. massicyticum > T. cadmeum ssp. cadmeum > T. cilicicum > T. haussknechtii (çiçek kısmı) > T. haussknechtii (topraküstü kısmı) > T. praeteritum ssp. praeteritum > T. haussknechtii (sap-yaprak kısmı) > T. armenum*

Tablo 6.5. *Tanacetum erzincanense* ve diğer bazı *tanacetum* türlerinin metanol ekstrelerinin içerdikleri toplam flavonoid madde miktarları

Bitki ekstreleri (metanol)	Toplam flavonoid madde miktarı (mgQE/g ekstre)
Tanacetum erzincanense	**62,20**
T. cadmeum ssp. cadmeum	23,83
T. cilicicum	18,73
T. praeteritum ssp. massicyticum	33,42
T. praeteritum ssp. praeteritum	10,71
T. armenum	7,69
T. balsamita L. subsp. balsamita	40,27
T. haussknechtii (çiçek kısmı)	18,39
T. haussknechtii (sap-yaprak kısmı)	10,00
T. haussknechtii (topraküstü kısmı)	12,82

Fenolik bileşikler, bir ya da daha fazla aromatik halka içeren ve bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grup içeren bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkilerde en fazla bulunan ikincil metabolitlerdir. Genellikle bitkilerin kök, gövde, yaprak, meyve, tohum ve çiçek kısımlarında doğal olarak sentezlenirler. Bugüne kadar 8.000'den fazla fenolik bileşik ve türevleri tanımlanmıştır. Bu bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler, kumarinler, lignanlar, kuinonlar ve kurkuminoidler olarak sınıflandırılmaktadır (Fresco vd., 2006).

Kalitatif olarak fenolik profili belirlemek için Q-TOF-LC yöntemi kullanıldı. Bu yöntemdeki cihaz sistemi, çift sprey hızlı akış elektrosprey iyonizasyon kaynağı olan LC-MS ile donatılmış sistemdir. Analiz sonucunda, klorogenik asit, apigenin, p-kumarik asit, emodik asit, lecaronik asit, dihidrokuersetin, kuersitrin, luteolin, genistein, koparin, purpurogallin, cefamandol, tamarixetin, 2,3-Dihidroksibenzoik asit, kateşin, citraconik asit, kaemferol, 2-pentadekenoik asit gibi önemli fenolik bileşikler tespit edildi. Analizde tespit edilebilen bileşiklerin listesi Tablo 6.6'da verilmiştir.

Tablo 6.6. *Tanacetum erzincanense*'de bulunan fenolik bileşikler

Formülü	Adı
$C_4H_6O_5$	Diglikolik asit
$C_4H_6O_4$	Eritrono-1,4-lakton
$C_{15}H_{10}O_5$	Apigenin
$C_5H_6O_4$	Citraconik asit
$C_7H_{12}O_5$	2-İzopropilmalik asit
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Maltoz
$C_{12}H_{14}O_7$	Fenil glukuronid
$C_9H_8O_4$	3-(4-Hidroksifenil) pruvik asit
$C_8H_{14}O_5$	3-hidroksisuberik asit
$C_{16}H_{14}N_4O_4$	Asetilaminodantrolen
$C_{16}H_{12}ClFN_2O$	Fludizepam
$C_{16}H_{18}O_9$	Klorogenik asit
$C_9H_8O_3$	p-kumarik asit
$C_{12}H_{18}O_4$	epi-4'-hidroksijasmonik asit
$C_{26}H_{25}FO_8S$	Sulindac sülfit glukuronid
$C_7H_6O_4$	2,3-dihidroksibenzoik asit
$C_{15}H_{20}O_7$	Nivalenol
$C_{15}H_{12}O_7$	Dihidrokuersetin
$C_{18}H_{18}N_6O_5S_2$	Cefamandol
$C_{15}H_{10}O_6$	Luteolin
$C_{15}H_8O_7$	Emodik asit
$C_8H_8O_4$	3-Hidroksimandelik asit
$C_{15}H_{10}O_6$	Kaemferol
$C_{16}H_{14}O_7$	Lecaronik asit
$C_{21}H_{20}O_{11}$	Kuersitrin
$C_3H_2ClF_5O$	İzofluran
$C_{15}H_{12}O_6$	Eriodictyol
$C_{11}H_8O_5$	Purpurogallin
$C_{18}H_{34}O_5$	9S,10S,11R-trihidroksi-12Z-oktadekenoik asit
$C_{16}H_{12}O_7$	Tamarixetin
$C_{15}H_{10}O_6$	Fisetin
$C_{14}H_{14}N_2O_5S_2$	O-Desacetilcefalothin
$C_9H_{13}N_3O_9P$	N5-karboksiaminoimidazol ribonükleotid
$C_{15}H_{10}O_5$	Genistein
$C_{16}H_{12}O_5$	Brazilein
$C_{16}H_{12}O_6$	Koparin
$C_2H_4O_2$	Glikolaldehit
$C_{18}H_{29}NO_3$	Dihidrocapsaicin
$C_8H_6O_4$	Terefitalik asit
$C_{15}H_{14}O_6$	Kateşin
$C_{14}H_{30}O_4S$	Sodyum tetradesil sülfat
$C_{18}H_{32}O_3$	13R-hidroksi-9E,11Z-oktadekadienoik asit
$C_{18}H_{34}O_3$	9R-hidroksi-12E-oktadekenoik asit
$C_{20}H_{26}N_4O$	Lisurid
$C_7H_{14}O_6$	D-Glukozid
$C_{14}H_{26}O_2$	5-metil-2E-tridekenoik asit

$C_{13}H_{26}O_2$	2,6-dimetil-undekanoik asit
$C_{16}H_{28}O_2$	6,9-hexadekadienoik asit
$C_{15}H_{28}O_2$	2-pentadekenoik asit
$C_{14}H_{28}O_2$	4,8-dimetil-dodekanoik asit
$C_{16}H_{30}O_2$	7-palmitoleik asit
$C_{15}H_{30}O_2$	İzopentadesilik asit
$C_{18}H_{32}O_2$	13E,17-oktadekadienoik asit
$C_{17}H_{32}O_2$	9-heptadesilenik asit
$C_{14}H_{22}O$	Carylofillen oksit
$C_{18}H_{34}O_2$	5-oktadesilenik asit
$C_{17}H_{34}O_2$	10-metil-hexadekanoik asit
$C_{18}H_{28}O_3$	8-hidroksi-9,11-oktadekadiynoik asit
$C_{20}H_{36}O_2$	5,11-Eicosadienoik asit
$C_{19}H_{36}O_2$	17-metil-6Z-oktadekenoik asit
$C_{18}H_{36}O_2$	Stearik asit
$C_{22}H_{44}O_2$	Calcifediol
$C_{22}H_{44}O_4$	13,14-dihidroksi-dokosanoik asit
$C_{38}H_{72}O_5$	1-heptadekanoyl-2-(9Z-oktadekenoyl)-sn-gliserol
$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	Cyclofosfamit
$C_2H_6O_3S_2$	Mesna (2-Merkaptoetanesulfonik asit)

Baczek ve arkadaşları, *tanacetum balsamita* ve *tanacetum vulgare* bitkilerinde fenolik asit olarak kafeik asit, ferulik asit, klorogenik asit, rosmanirik asit, cichoric asit bulunduğunu, flavonoid bileşik olarak kuersetin, kozmosin, luteolin 7-O-glukozit, chrysoeriol bulunduğunu belirtmişlerdir (Baczek vd., 2017).

Marzouk ve arkadaşları, *tanacetum sinaicum* bitkisinde apigenin, acacetin, luteolin, chrysoeriol, cirsilineol, jaceidin, chrysosplenetin, vitexicarpin (cascitin), apigenin 7 –O-β glukopiranozit, apigenin 7 –O-β glukuronid, luteolin 7 –O-β glukuronid, luteolin 7 –O-β glukopiranosid, 4-hidroksi-3-metoksi benzoik asit, 3,4-dimetoksi benzoik asit, 4-hidroksi asetofenon bileşiklerini belirlemişlerdir (Marzouk vd., 2016).

Devrnja ve arkadaşları, *tanacetum vulgare* bitkisinde 1-caffeoylquinic asit, neoklorojenik asit, klorojenik asit, kriptoklorojenik asit, saponarin, caffeoyl metil kinik asit, izokuersetin, miquelianin, gossypetin-8-O-glukozit, kersetin-O-glikosid, kersetin-O-glukozit, luteolin-7-glukozid, luteolin-7-O-glukuronid, 3,4-O-dicaffeoylquinic asit, 3,5-O-dicaffeoylquinic asit, 4,5-O-dicaffeoylquinic asit, scutellarin, petunidin-3-O-glukozit, baicalin, dicaffeoylquinic asit, luteolin, nepetin, 3,4,5-tricaffeoylquinic asit,

kuersetagetin-3,6-dimetileter, apigenin, hispidulin, eupalitin bileşiklerini tespit etmişlerdir (Devrnja vd., 2017).

Yucayurt, *laurocerasus officinalis roem.* bitkisinde gallik asit, protokatekaldehit, vanillik asit, klorogenik asit, kafeik asit, siringik asit, benzoik asit gibi fenolik bileşikler olduğunu belirtmiştir (Yucayurt, 2008).

Tanacetum erzincanense ile yukarıdaki bitkilere bakıldığında ortak fenolik bileşikler bulundurdukları görülür. Ancak bitkilerde farklılık gösteren bileşikler daha çoktur.

Antikanserle ilgili kullanılan bazı kelimelerin anlamları şu şekilde verilebilir:

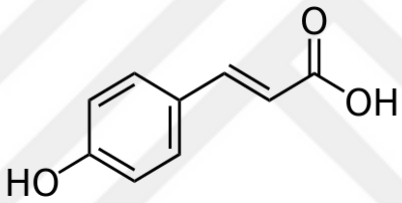
- *Sitotoksik etki:* Hücreye toksik olarak etki edip hücreyi öldürme.
- *Antiproliferatif etki:* Hücre çoğalmasını önleme etkisi.

Kanser çağımızın en tehlikeli hastalıklarından birisidir. Bu amansız hastalığın tedavi edilebilmesi amacıyla birçok sitotoksik özellik araştırması yapılmıştır. Halen de çözüme ulaşabilmek için antiproliferatif deneyler sık sık yapılmaktadır. Kansere karşı yeni maddeler bulup tedavide kullanmak amacıyla sebze ve meyvelerde çalışmalar yapılmıştır. Paralel olarak bitkilerde de çalışmalar yoğunlaşmıştır.

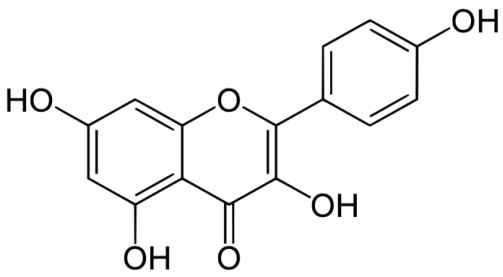
Bitki türlerinde sitotoksik etki çalışmalarının yapılmasında önemli bir etken fenolik bileşiklerdir. Çünkü fenolik bileşiklerin, kanser oluşumunu başlangıcından itibaren çeşitli evrelerde inhibe etme potansiyeli vardır. Bu özellikleriyle kanser riskini azaltırlar. Hayat için çok gerekli olan oksijen molekülü eksik indirgendiği zaman zararlı ROS molekülleri oluşmaktadır. Bu şekilde oluşan özellikle hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibi birçok serbest radikal, DNA'da bulunan nükleik asit ve bazların değişmesine, yine DNA zincirlerinin kırılmasına sebep olarak kanser oluşumuna, hücrelerin yaşlanması ve ölümüne neden olmaktadırlar (Moldovan and Moldovan, 2004). Burada dikkat çeken nokta serbest radikallerin kanser oluşumuna neden olabildikleridir. Fenolik bileşikler ise serbest radikalleri ortadan kaldıran en etkili doğal antioksidan sınıfında olduklarından kanser riskini de azaltmaktadırlar.

Hudson ve arkadaşları (2000), *p-kumarik asit*'in (Şekil 6.8) antiproliferatif etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. *Kafeik asit*'in cilt tümörüne karşı koruma yaptığı (Kaul

ve Khanduja, 1998), MCF-7 göğüs kanseri hücrelerine karşı kemoterapi artırıcı bir etken olduğu (Ahn vd., 1997) bildirilmiştir. *Klorogenik asit,* kolon kanserine (Tanaka vd., 1990; Matsunaga vd., 2002), mide kanserine (Shimizu vd., 1999) karşı etkilidir. *Gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin-3-gallat* bileşiklerinin MCF-7 göğüs kanseri, HT-29 kolon kanseri ve UACC-375 melanoma kanserlerine karşı yüksek antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Valcic vd., 1996). *Kuersetin*'in orta derece agresif DU-145 prostat kanseri ve oldukça agresif PC-3 prostat kanseri hücre hattının büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği (Nair vd., 2004), yine MCF-7 göğüs kanseri hücre hattında büyüme inhibisyonunu indüklediği (Choi vd., 2001) belirtilmiştir. *Kaemferol*'ün (Şekil 6.9), A549 akciğer kanser hücre canlılığında doza ve zamana bağlı azalmaya neden olduğu (Nguyen vd., 2003), MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinin sayısını 35,0 ve 70,0 μM konsantrasyonlarında önemli ölçüde azalttığı (Hung, 2004) belirtilmiştir.



Şekil 6.8. p-kumarik asit'in kimyasal yapısı



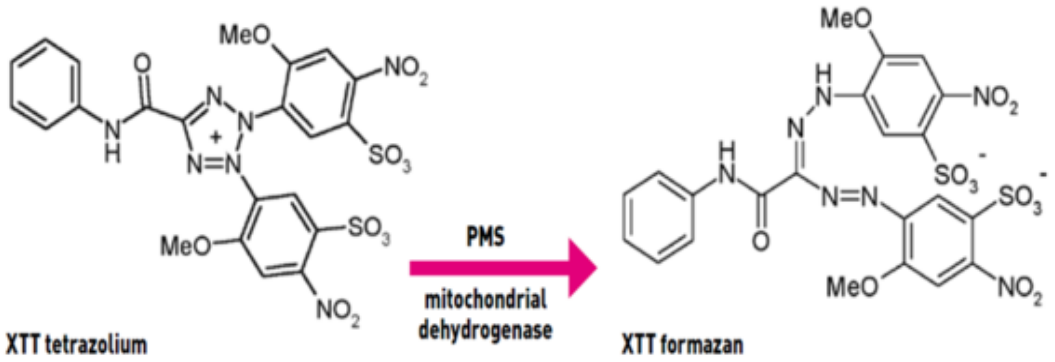
Şekil 6.9. Kaemferol'ün kimyasal yapısı

Tez çalışmasında literatüre yeni giren bir tür olan *tanacetum erzincanense* bitkisinin sitotoksik özelliği araştırılmaya çalışıldı. Bu çalışmada yapılan antioksidan testlerinde, *tanacetum erzincanense* bitkisinin metanol ekstresinin etil asetat ekstresine göre daha yüksek antioksidan kapasitesinin olduğu görülmesinden dolayı antikanser çalışmaları metanol ekstresi üzerinde yapıldı.

Sitotoksik özellik araştırmalarında kullanılan yöntemlerin bazıları şunlardır:

XTT yöntemi, TBE yöntemi, SRB (Sulforhodamine B) yöntemi, BrdU dahil etme testi, MTT yöntemi, WST-1 yöntemi.

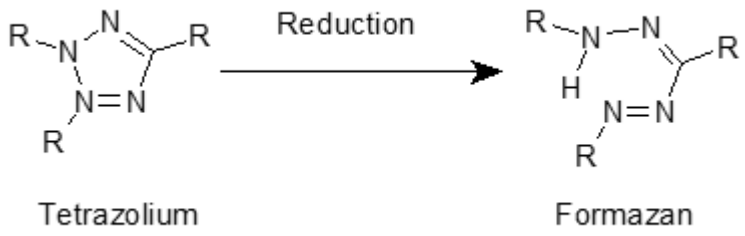
Bu çalışmada metanol ekstresinin sitotoksik etkisini araştırmak için üç farklı kanser hücresi kullanıldı. Bunlar HT-29, HepG2 ve MCF-7 kanser (insan) hücreleridir. Yöntem olarak XTT analiz yöntemi kullanıldı. Ek olarak hücre sayımı için Tripan Blue Dışlama (TBE) yöntemi kullanıldı. XTT bir tetrazolyum tuzudur (Bkz. Şekil 4.2). Canlı ve aktif hücrelerin mitokondrilerindeki sukkinat dehidrogenaz enzimleri, bu tetrazolyum tuzunu portakal renkli bir formazan ürününe indirger (Şekil 6.10). İndirgenme sırasında tetrazolyum tuzundaki dört azot atomunun bulunduğu halkada dört bağ yapmış durumda olan ve + yüklü olan azot (N^+) atomundaki bağın birisi kırılarak halka yapısı açılır, + yüklü azot atomu da yüksüz ve azot atomunun normal bağ sayısı olan üç bağ yapmış hale gelir. Sonunda formazan ürünü oluşur (Şekil 6.11). Bu formazan ürünü turuncu renklidir ve absorbansı aktif hücrelerin sayısıyla orantılı olarak 415 nm'de eliza plaka okuyucuda okutulur.



Şekil 6.10. Fenazin meto sülfat (PMS) varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT tetrazolyum tuzunun XTT formazana indirgenmesi

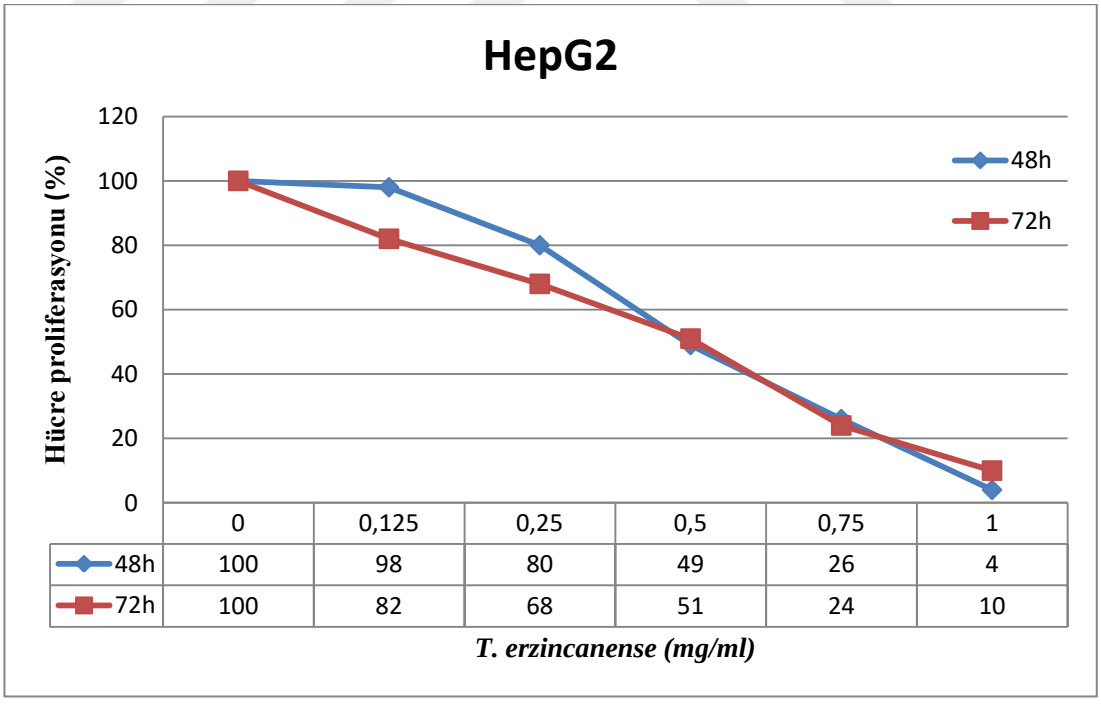
Hücre sayımı için kullanılan TBE yönteminin ana prensibi hücre zarı geçirgenliğine dayanır. Ölmüş olan hücrelerin hasar görmüş veya görmemiş zarları, tripan mavisi boyasını içeri alır ve ışık mikroskobunda mavi renkli görünürler. Canlı hücreler ise

boyayı içeri almaz ve ışık mikroskobunda sarı renkte görünürler. Yöntem, basit oluşundan dolayı yaygın olarak kullanılır (Kim vd., 2011).



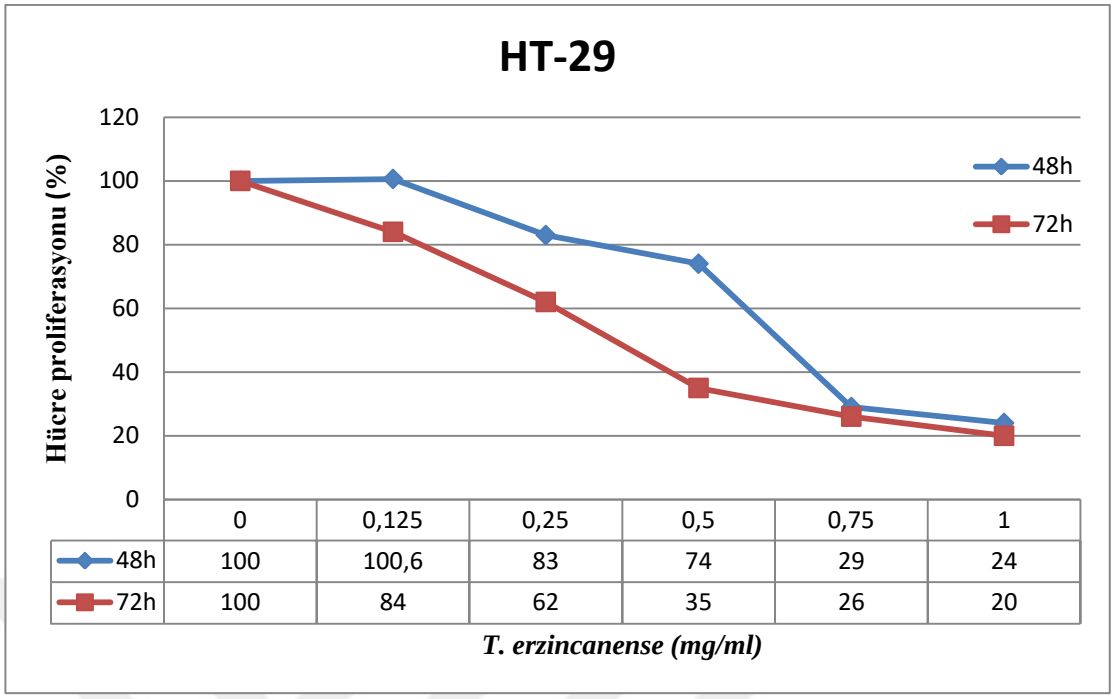
Şekil 6.11. Genel olarak bir tetrazolyum tuzunun formazana indirgenmesi

Metanol ekstresinin HT-29, HepG2 ve MCF-7 kanserli hücrelerine etkisi, hem zaman (48 ve 72 saat) hem de konsantrasyona bağlı olarak araştırıldı. Hücre canlılığı, metanol ekstresinin HT-29, HepG2 ve MCF-7 kanser hücrelerine muamelesinden 48 ve 72 saat sonra ölçüldü. Elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı kanserli hücrelerin canlılık yüzdesi grafikleri çizildi (Şekil 6.12; Şekil 6.13; Şekil 6.14).

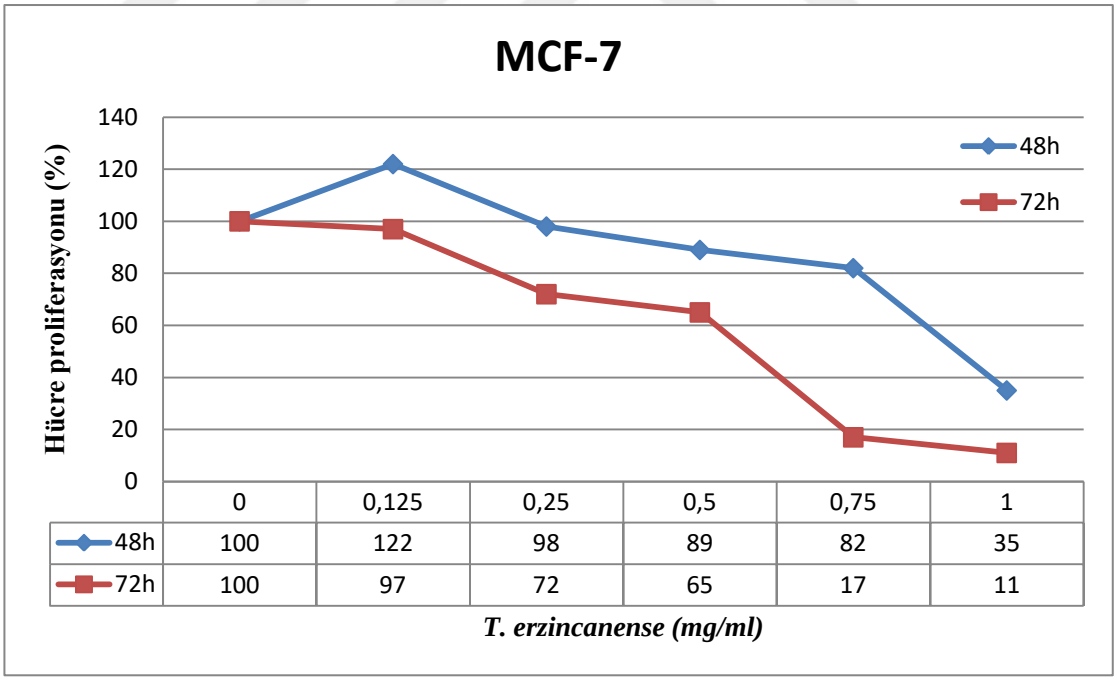


	0	0,125	0,25	0,5	0,75	1
48h	100	98	80	49	26	4
72h	100	82	68	51	24	10

Şekil 6.12. XTT yöntemine göre metanol ekstresinin konsantrasyon ve zamana bağlı tedavisine cevap olarak HepG2 hücrelerinin canlılık yüzdesi



Şekil 6.13. XTT yöntemine göre metanol ekstresinin konsantrasyon ve zamana bağlı tedavisine cevap olarak HT-29 hücrelerinin canlılık yüzdesi



Şekil 6.14. XTT yöntemine göre metanol ekstresinin konsantrasyon ve zamana bağlı tedavisine cevap olarak MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdesi

Metanol ekstresinin konsantrasyonu arttıkça HT-29, HepG2 ve MCF-7 kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesinin de genel olarak arttığı ve hücre ölümü gerçekleştirdiği görüldü. Yalnız grafikler incelendiğinde 48 saat inkübasyon için 0,125 mg/ml konsantrasyonda MCF-7 ve HT-29 hücre proliferasyonu yüzdelerinin çok az bir miktar arttığı görülür. 72 saat inkübasyon için ise aynı konsantrasyonda MCF-7 ve HT-29 hücre proliferasyonu yüzdelerinin düşmeye başladığı görülür. Bu durumda metanol ekstresinin 0,125 mg/ml konsantrasyonda MCF-7 ve HT-29 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermek için 48 saat inkübasyonun yeterli olmadığı ya da 48 saat inkübasyon için 0,125 mg/ml konsantrasyonun yeterli olmadığı söylenebilir. Nitekim konsantrasyon 0,25 mg/ml'ye çıktığında 48 saat inkübasyonda MCF-7 ve HT-29 hücrelerine karşı sitotoksik etkinin başladığı görülür. Üç kanser hücresi arasında en yüksek aktiviteyi HepG2 kanser hücresine karşı göstermiştir. 1 mg/ml konsantrasyonda 48 saat için HepG2 kanser hücrelerinde % 96, HT-29 kanser hücrelerinde % 76, MCF-7 kanser hücrelerinde ise % 65 hücre ölümü olmuştur. Yine 1 mg/ml konsantrasyonda 72 saat için HepG2 kanser hücrelerinde % 90, HT-29 kanser hücrelerinde % 80, MCF-7 kanser hücrelerinde ise % 89 hücre ölümü olduğu gözlendi.

Şen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *tanacetum argenteum subsp. argenteum* bitkisinin kloroform ekstresinin 30 µg/ml konsantrasyonda HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarının gelişimini sırasıyla % 89 ve % 73, n-hekzan ekstresinin aynı konsantrasyonda HT-29 ve MCF-7 hücre hatlarının gelişimini sırasıyla % 75 ve % 74 inhibe ettiği belirtilmiştir. Metanol ekstraktının ise 100 µg/ml konsantrasyonda MCF-7 kanser hücrelerinin çoğalmasını % 64,76 inhibe ettiği belirtilmiştir (Şen vd., 2017). Yumrutaş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *tanacetum argenteum subsp. argenteum* bitkisinin metanol ekstraktının MCF-7 kanser hücrelerinin çoğalmasını 100 µg/ml konsantrasyonda % 47,42 inhibe ettiği belirtilmiştir (Yumrutaş vd., 2015). Bu iki çalışmadaki sonuçlarla kıyaslandığında *tanacetum erzincanense*'nin daha düşük bir etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Altay'ın 2015 yılında yaptığı bir çalışmada, benzer bir tür olan *salvia fruticosa* bitkisinin HT-29 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi, 48 ve 72 saat inkübasyon için 0,6 mg/ml konsantrasyonda % 90'dan fazla olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada referans olarak kullanılan kafeik asit ve rosmanirik asitin ise 0,3 mg/ml

konsantrasyonda % 90'dan fazla etki gösterdiği belirtilmiştir (Altay, 2015). Bu çalışmada metanol ekstresinin HT-29 kanser hücrelerine karşı 1 mg/ml konsantrasyonda 48 ve 72 saat için sırasıyla % 76 ve % 80 etki gösterdiği görüldü.

Metanol ekstresinin HT-29, HepG2 ve MCF-7 kanser hücrelerine karşı hücre canlılığını % 50 düşürmek için gereken konsantrasyonun IC_{50} değerleri Tablo 6.7'de gösterildi. IC_{50} değerinin düşük olması, yüksek antiproliferatif aktivite anlamına gelir. 48 saat için en düşük IC_{50} değeri HepG2 hücre hattında olduğu görüldü. Bu da metanol ekstresinin kanser hücrelerinin canlılığını % 50 düşürmek için üç hücre türü içinde 48 saat için en yüksek aktiviteyi HepG2 hücre hattında gösterdiği anlamına gelir. 72 saat için ise HT-29 ile HepG2 hücre hatlarında 0,47 ve 0,49 değerleri ile birbirine çok yakın IC_{50} değerleri olduğu görüldü.

Tablo 6.7. *T. erzincanense* metanol ekstresinin MCF-7, HepG2 ve HT-29 hücre hatları üzerindeki IC_{50} (mg/ml) değerlerinin karşılaştırılması

	Hücre Hatları	**IC_{50} (mg/ml) ± SD**	
		48h	72h
Tanacetum erzincanense metanol ekstresi	MCF-7	0,89 ± 0,025	0,54 ± 0,034
	HT-29	0,64 ± 0,045	0,47 ± 0,026
	HepG2	0,53 ± 0,035	0,49 ± 0,028

48 saat ve 72 saat için metanol ekstresinin hücre hatlarındaki IC_{50} değerlerinin küçükten büyüğe sıralaması şöyledir:

48 saat için; HepG2 < HT-29 < MCF-7

72 saat için; HT-29 < HepG2 < MCF-7

Apoptoz (programlı hücre ölümü) mekanizmasında üç temel grup rol oynar (Hetts, 1998):

1. Ölüm reseptörleri.
2. Adaptör proteinler.
3. Proteolitik enzimler (kaspazlar).

Ölüm reseptörleri, TNF (Tumour Necrosis Factor) reseptör gen familyasındandırlar ve polipeptidlerin sitoplazmik bölümlerinde ölüm alanı denilen bir aminoasit dizisini oluştururlar. Bu reseptörler, hücre yüzeyine gelen ölüm sinyallerini hücre içine iletirler ve adaptör proteinlere bağlanırlar (Büyükgebiz ve Caferler, 2001). Ölüm reseptörlerine örnek olarak, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL-R1 (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand), TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 verilebilir (Eichhorts ve Krammer, 2001). Adaptör proteinler, ölüm reseptörlerinden gelen sinyal sonrası kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Adaptör proteinlere örnek olarak, REL proteinleri, WNT1, β-Catenin, Fas, CD95 verilebilir. Bu adaptör proteinlerin etkisiyle kaspaz dizisi aktifleşir. Kaspazlar, bir seri olaylar dizisi şeklinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; "başlatıcılar" (kaspaz 2,8,10) ve "uygulayıcılar" (kaspaz 3,6,7) olarak iki sınıftırlar (Budihardjo ve Oliver, 1999). Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar, ölüme yönlendirirler ve uygulayıcı kaspazları aktif ederler. Ölümü gerçekleştiren, uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Sonuçta aktif hale gelen DNaz enzimi DNA yıkımına sebep olur (Büyükgebiz ve Caferler, 2001).

Bu çalışmada elde edilen IC_{50} değerlerine bakıldığında, metanol ekstresinin HepG2 hücrelerine daha fazla etki ettiği görülür. Bunun sebebi, metanol ekstresinin, HepG2 hücrelerinin ölüm reseptörleri ile sinyal bağı kurarak onları uyarmakta daha etkili olması olabilir.

Akalgan'ın yaptığı bir çalışmada, feverfew (*tanacetum parthenium*) bitkisinin etanol ekstresinin MCF-7 hücre hattına karşı gösterdiği antikanser etki için hesaplanan IC_{50} değerinin 2,1 mg/ml olduğu belirtilmiştir (Akalgan, 2012). Yılmaz'ın çalışmasında, *salvia absconditiflora* bitkisinin MCF-7 hücre hattına sitotoksik etkisi için 48 saat inkübasyonda XTT yöntemine göre bulunan IC_{50} değeri 2,285 mg/ml, TBE yöntemine göre bulunan IC_{50} değeri 1,961 mg/ml olduğu belirlenmiştir (Yılmaz, 2013). Yine *salvia absconditiflora* bitkisini çalışan Hisarlı, MCF-7 hücre hattına sitotoksik etkisi için 48 saat inkübasyonda XTT yöntemine göre bulunan IC_{50} değerinin 2,18 mg/ml, TBE yöntemine göre bulunan IC_{50} değerinin 1,982 mg/ml olduğunu belirtmiştir (Hisarlı, 2013). Bu çalışmada *tanacetum erzincanense* bitkisinin MCF-7 hücre hattına sitotoksik etkisi için 48 saat inkübasyonda bulunan IC_{50} değeri 0,89 mg/ml'dir. Kıyaslama

yapıldığında *tanacetum erzincanense'*nin MCF-7 hücre hattına sitotoksik etkisinin her iki bitkiden çok daha yüksek olduğu görülür.

İrtem Kartal'ın yaptığı bir çalışmada, *salvia absconditiflora* bitkisinin farklı ekstraktlarının HepG2 hücre hattına sitotoksik etkisi için XTT metoduyla 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda bulunan IC_{50} değerlerinin 0,74 ile 3,78 mg/ml arasında değiştiği gözlenmiştir (İrtem Kartal, 2015). *Tanacetum erzincanense*'nin metanol ekstraktının HepG2 hücrelerine karşı 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda gösterdiği sitotoksik etki için bulunan IC_{50} değerleri sırasıyla 0,53 mg/ml ve 0,49 mg/ml'dir. Sonuçlar kıyaslandığında her iki inkübasyon zamanı için de *tanacetum erzincanense'*nin çok daha yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğu görülür.

Altay'ın çalışmasında *salvia fruticosa* bitki ekstraktının HT-29 kanser hücrelerine sitotoksik aktivite için XTT yöntemiyle 72 saat inkübasyonda bulunan IC_{50} değeri 0,229 mg/ml'dir. Yine Altay, çalışmasında Giovina Fiore ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada dört *salvia* türü bitkinin metanol özlerinin HT-29 kanser hücrelerine sitotoksik aktiviteleri için MTT yöntemini kullanarak yayınladıkları 72 saat inkübasyon için IC_{50} değerlerinin 95,3 ile 196,1 µg/ml arasında değiştiğini belirtmiştir (Altay, 2015).

Bu çalışmada metanol ekstresinin HT-29 kanser hücrelerine sitotoksik etkisi için bulunan IC_{50} değeri 72 saat inkübasyon için 0,47 mg/ml'dir. Giovina Fiore vd. ve Altay'ın çalışmalarındaki sonuçlarla bu çalışmadaki IC_{50} değerleri kıyaslandığında, HT-29 kanser hücrelerine karşı *tanacetum erzincanense*'ye göre Giovina Fiore vd. ve Altay'ın çalıştığı bitki türlerinin biraz daha yüksek bir antiproliferatif etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak;

Tanacetum erzincanense bitkisinin metanol ve etil asetat ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin bulunduğu fakat bu aktivitenin yaygın olarak kullanılan standart antioksidanlardan daha az olduğu görüldü.

Metanol ekstresinin toplam fenolik madde miktarı 64,444 mgGAE/g ekstre olarak bulundu. Bu değer ile *asteraceae* familyası bitki türleri içinde orta seviyede bir fenolik madde içerdiği söylenebilir. Ayrıca bitkide apigenin, citraconik asit, klorogenik asit, p-kumarik asit, luteolin, emodik asit, kaemferol, kuersitrin, tamarixetin, fisetin, genistein, koparin, kateşin, stearik asit, calcifediol, purpurogallin gibi önemli fenolik bileşikler bulunduğu belirlendi.

Metanol ekstresinin toplam flavonoid madde miktarı 62,20 mgQE/g ekstre olarak bulundu. Bu değer birçok *tanacetum* türünün değerlerinden daha yüksektir. Dolayısıyla *tanacetum* türleri içerisinde yüksek flavonoid madde içeriğine sahiptir.

Tez çalışmasında kullanılan ABTS, FRAP ve KUPRAK metotlarında metanol ekstresinin etil asetat ekstresine göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görüldü. Aynı şekilde toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarında da metanol ekstresinin daha yüksek değerlere sahip olduğu görüldü.

Metanol ekstresinin antikanser özelliğine bakıldığında, farklı inkübasyon süreleri için üç farklı kanser hücresi üzerinde 0,47 ile 0,89 arasında değişen IC_{50} değerleri bulundu. Bu değerler bazı bitki türlerinin sitotoksik etki için verilen IC_{50} değerlerinden daha yüksek, bazı bitki türlerinin IC_{50} değerlerinden ise daha düşüktür. Bu da orta derecede bir sitotoksik etkiye sahip olduğunun göstergesi olabilir.

KAYNAKLAR

Ahmad, P., Jhon, R., Sarwat, M., Umar, S. (2008) "Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress", ***International Journal of Plant Production***, 2(4), 353-365.

Ahn, C.H., Choi W.C., Kong, J.Y. (1997) "Chemosensitizing activity of caffeic acid in multidrug-resistance MCF-7/Dox human breast carcinoma cells", ***Anticancer Research***, 17, 1913-1917.

Ak, T., Gülçin, İ. (2008) "Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. chemico-biological", ***Interaction,*** 174, 27-37.

Akalgan, D. (2012) "*Tanacetum argenteum* (Lam.) *wildd. subsp. argenteum* bitkisinin partenolit yönünden değerlendirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara, 74-106.

Akdulum, B. (2011) "*Echinacea pallida*'nın köklerindeki bileşiklerin izolasyonu, yapı tayini ve antiproliferatif aktivitelerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Kimya Anabilim Dalı 1-2.

Akkuş, İ. (1995) ''Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri'', ***Mimoza Yayınları,*** Konya, 106-111.

Aktümsek, A., Zengin, G., Güler, G.O., Çakmak, Y.S., Duran, A. (2011) "Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *centaurea* L. species from Turkey Flora", ***Food and Chemical Toxicology,*** 49, 2914-2920.

Albayrak, S., Aksoy, A., Sağdıç, O., Hamzaoğlu, E. (2010) "Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum (Asteraceae)* species collected from Turkey", ***Food Chemistry,*** 119, 114-122.

Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. (2010) "Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler", ***Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, 26(4), 401-409.

Altay, A. (2015) "Antioxidant and cytotoxic properties of *salvia fruticosa m.* and its effects on gene expressions of some cyp450 and antioxidant enzymes in HT-29 cell line", Doktora Tezi, ***Middle East Technical University,*** 79-85.

Altınışık, M. (2000) "Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar", ***Adnan Menderes Üniversitesi,*** Aydın.

Alho, H., Leinonen, J. (1999) "Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods", ***Method in Enzymology,*** 299, 3-15.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) "Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging", ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,*** 90, 7915-7922.

Anıl, M. (2006) "Antioksidan olarak tahıllar", ***Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi***, 7-8 Eylül, Gaziantep.

Annakkaya, P. (2012) "Turna yemişi (*Vaccinium macrocarpon*) ve mersinin (*Myrtus communis*) liyofilize edilmiş su ekstrelerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve fenolik içeriklerinin aydınlatılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Erzurum.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004) "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method", ***Journal Agricultural Food Chemistry,*** 52, 7970-7981.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu B., Berker, K.I., Özyurt, D. (2007) "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the cuprac assay", ***Molecules,*** 12, 1496-1547.

Arıtuluk, Z.C., Tatlı Çankaya, İ.İ., Gençler Özkan, A.M. (2016) "Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of some *tanacetum* L. (asteraceae) taxa growing in Turkey", ***FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, Research Article,*** 41, 20-22.

Asımgil, A. (1993 "Şifalı bitkiler", ***Timaş Yayınları,*** İstanbul, 218-219.

Avendano, C., Menéndez, J.C. (2008) "Medicinal Chemistry Of Anticancer Drugs", WS ***Elsevier Science Press, 1nd edition,*** Amsterdam, The Netherlands, 400.

Aydemir, M. (2005) "Değişik yörelerden toplanan *tanacetum parthenium* L. türünde parthenolide'in kısmi en küçük kareler spektroskopik kalibrasyon (PLS) yöntemiyle miktar tayini ve ince tabaka kromatografisi yöntemiyle karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** İstanbul.

Awika, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. (2003) "Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum product", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 51, 6657-6662.

Baczek, K.B., Kosakowska, O., Przybyl, J.L., Pioro-Jabrucka, E., Costa, R., Mondello, L., Gniewosz, M., Synowiec, A., Weglarz, Z. (2017) "Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum* balsamita L.) and tansy (*Tanacetum* vulgare L.)", ***Industrial Crops and Products***, 102, 154-163.

Bakkalbaşı, E. (2009) "Farklı Ambalaj Mataryalleri ve Depo Koşullarının Ceviz İçi Bileşimine Etkisi", Doktora Tezi, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) "Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", ***Food Chemistry,*** 99, 191-203.

Benzie I.F. (1996) "An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA)", ***Clinical Biochemistry,*** 29, 111-116.

Benzie, I.F., Strain, J.J. (1996) "Ferric Reducing Ability Of Plasma (Frap) As A Measure Of Antioxidant Power; Frap assay", ***Analytical Biochemistry,*** 239, 70-76.

Budihardjo, I., Oliver, H.L.M. (1999) "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis", ***Annual Review of Cell and Developmental Biology,*** 15, 269-290.

Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1996) "Catalytic, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid", ***Radiation Research***, 145(5), 532-541.

Bursal, E. (2009) "Kivi meyvesinin (*Actinidia deliciosa*) antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu", Doktora Tezi, ***Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Erzurum.

Burton, G.W., Ingold, K.U. (1984) "β-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant", ***Science***, 224, 569-573.

Büyükgebiz, O., Caferler, J.S. (2001) "Apoptosis", ***Sendrom***, 13(1), 102-107.

Cao, G., Prior, R.L. (1999) "In Vivo Antioxidant Capacity: Comparion Of Different Analytical Methods", ***Free Radikal Biology & Medicine,*** 27, 1173-1182.

Castaneda-Ovando, A., De Lourdes Pacheco-Hernandez, M.A., Elena Paez-Hernandez, M.A., Rodrigez, J.A. and Galan-Vidal, C.A. (2009) "Chemical studies of anthocyanins: a review", ***Food Chemistry,*** 113, 859-871.

Choi, J.A., Kim, J.Y., Lee, J.Y. *et al.* (2001) "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin", ***International Journal of Oncology***, 19, 837-844.

Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkheimer, S., Hanson, E.J. (2002) "Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 50, 893-898.

Cook, N.C., Samman, S. (1996) "Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources", ***Nutrational Biochemistry,*** 7, 66-76.

Coşkun, F. (2006) "Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular", ***Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi,*** 2, 27-33.

Çakatay, U., Kayalı, R. (2006) "Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi", ***Cerrahpaşa Tıp Dergisi,*** 37, 162-167.

Çakmakçı, S., ve Çelik, I. (2000) "Gıda Katkı Maddeleri", Ders Notu, ***Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi,*** Erzurum, 249.

Çetin, A. (2012) "*Scolymus hispanicus* L. *(asteraceae)*'un in vitro antioksidan özelliklerinin farklı metodlar ile araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Konya, 21-30.

Çınar, A.E. (2012) "Türkiye'de yetişen *ınula helenium* L. *(asteraceae)* taksonlarının biyoaktivitelerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Kayseri, 25-27.

D'Amelio, F., Roton, B. (1999) "Botanicals a phytochemical desk reference", ***CRC Press,*** Florida, 199.

Davies, K.J. (1995) "Oxidative stress: the paradox of aerobic life", ***Biochemical Society Symposium,*** 61, 1-31.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K. *et al.* (2004) "Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects", ***Journal Association Physicians India,*** 52, 794-804.

Devrnja, N., Andelkovic, B., Arandelovic, S., Radulovic, S., Sokovic, M., Krstic-Milosevic, D., Ristic, M., Calic, D. (2017) "Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts", ***South African Journal of Botany***, 111, 212-221.

Dikici, İ. (1999) "Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması", Uzmanlık Tezi, ***Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı,*** Konya, 73.

Diplock, A.T. (1997) "Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease", ***Free Radical Research,*** 27, 511-532.

Diplock, A. (1998) "Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients", ***ILSI Europe concise monograph series,*** Belgium, 59.

Doğan, B. (2007) "Türkiye Jurinea cass. (Asteracea) cinsinin revizyonu", Doktora Tezi, ***Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Konya.

Donaldson, W.E. (1994) "Nutritional factors", ***İn: İntroduction a Biochemical Toxicology, Second Edition,*** Appleton and Lange, Norwalk, Connnecticut.

Draper, H.H. (1990) "Nutritional modulation of oxygen radical pathology", ***İn: Advences in Nutritional Research, Plenum Press,*** New York, 119-145.

Droge, W. (2002) “Free radicals in the physiological control of cell function”, ***Physiological Reviews,*** 82(1), 47-95.

Duke, J.A. (1987) “CRC Handbook of medicinal herbs”, ***CRC Press,*** Florida, 474-475.

Dündar, Y., Aslan, R. (2000) “Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar”, ***Kocatepe Üniversitesi Yayınları,*** Afyon.

Eichhorst, S.T., Krammer P.H. (2001) “Derangement of apoptosis in cancer”, ***The Lancet,*** 358, 345-346.

Erdoğan, M.K. (2012) “*Tanacetum balsamita* L. *subsp. balsamita* bitki ekstrelerinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, ***Bingöl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Bingöl, 52-72.

Erik, S., Tarıkahya, B. (2004) “Türkiye florası üzerine”, ***Kebikeç,*** 17, 139-163.

Ertürk, B. (2006) “Akciğer kanserli hastalarda malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile oksidan-antioksidan dengenin araştırılması”, Doktora Tezi, ***Süreyyapaşa Göğüs ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi,*** İstanbul, 8-20.

Evelson, P., Ordonez, C.P. (1997) “Oxidative stress”, ***Photochemistry Photobiology.***

Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. (2002) “Free radicals, antioxidants and nutrition”, ***Nutrition,*** 18(10), 872-879.

Feredioon, S., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., (1992) “Phenolic Antioxidants”, ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition,*** 32(1), 67-103.

Fırat, S. (1997) “Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-tarnsferaz düzeyleri ve N-asetil sistein’in bu sistem üzerindeki etkisi”, Uzmanlık Tezi, ***Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara, 95.

Formica, J.V., Regelson, W. (1995) “Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids”, ***Food Chemical Toxicology,*** 33(12), 1061-1080.

Fresco, P., Borger, F., Diniz, C. and Marques, M.P.M. (2006) “New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols”, ***Medicinal Research Reviews,*** 26, 747-766.

Gaetani, G., Ferraris, A., Rolfo, M., Mangerini, R., Arena, S., Kirkman, H. (1996) “Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes”, ***Blood Journal***, 87(4), 1595-1599.

Geçibesler, İ.H. (2017) “In vitro biological activity studies on *tanacetum abrotanifolium* (L.) druce (asteraceae)”, ***Anadolu Universty Journal of Science and Technology A- Applied Sciences and Engineering,*** 18(2), 444-452.

Gençaslan, G. (2007) "Türkiyede tıbbi amaçla kullanılan bazı bitkilerin antioksidan özelliklerinin taranması", Yüksek Lisans Tezi, ***Ankara Üniversitesi***, Ankara.

Göğüş, F., Fadıloğlu, S. (2006) "Food Chemistry", ***Nobel Yayın Dağıtım,*** Ankara, 319-339.

Gök, V., Serteser, A. (2003) "Doğal antioksidanların biyoyararlılığı", ***3. Gıda Mühendisliği Kongresi***, 2-4 Ekim, Ankara.

Gökalp, N. (2006) "Doğal antioksidanlar" , Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, ***Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara.

Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y. (2006) "Algal antioksidanlar", ***Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,*** 23, 85-89.

Grierson, A.J.C. (1975) "*Tanacetum* L. In: Davis P.H, editor. Flora of Turkey and the East Aegean Islands", ***Vol.5. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press,*** 256-292.

Guo, A., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jaing, Y. (2003) "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruit as determined by FRAP assay", ***Nutrition Research,*** 23, 1719-1726.

Gülçin, İ. (2002) "Isırgan otunun (*Urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi", ***Atatürk Universitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Erzurum, 114.

Gülçin, İ., Oktay, M., Kireçci, E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2003) "Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts", ***Food Chemistry***, 83, 371-382.

Gülçin, İ. (2005a) "The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds", ***International Journal of Food Sciences and Nutrition***, 56, 491-499.

Gülçin, İ., Alici, H.A., Cesur, M. (2005b) "Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol", ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, 53, 281-285.

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Şat, I.G., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2005c) "Evolution of antioxidant activity of cornelian cherry (*Cornus mas* L.)", ***Acta Alimentaria,*** 34, 193-202.

Gülçin, İ. (2006a) "Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid)", ***Toxicology,*** 217, 213-220.

Gülçin, İ. (2006b) "Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine", ***Life Sciences***, 78, 803–811.

Gülçin, İ. (2007a) "Comparison of *in vitro* antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa", ***Amino Acids***, 32, 431-438.

Gülçin, İ., Köksal, E., Elmastas, M., Aboul-Enein, H.Y. (2007b) "Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. Koch var. joannis", ***Research Journal of Biological Sciences***, 2, 372-382.

Gülçin, İ. (2008) "Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent", ***Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry***, 23, 871-876.

Gülçin, İ. (2010) "Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight", ***Innovative Food Science and Emerging Technologies***, 11, 210-218.

Gülçin, İ. (2012) "Antioxidant activity of food constituents: an overview", ***Archives of Toxicology,*** 86, 345-391.

Güven, A., Yürekli, A.K. (1991) "Fırat havzasında yayılış gösteren *tanacetum* türlerinin ekonomik potansiyeli", ***6-8 Ekim 1986 Fırat Havzası Tıbbi Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu,*** Editörler: Baltepe, Ş., Babaç, M.T., Evren, H., Elazığ, 251-259.

Halfon, B. (2005) "Natural Products Lecture Notes", ***Boğaziçi University Press,*** İstanbul.

Halliwell B., Gutteridge, J.M.C. (1989) "Free radicals in biology and medicine, 2nd edition", ***Clarendon Press,*** Oxford, 543.

Halliwell, B. (1991) "Drug antioxidant effects", ***Drug,*** 42, 569-605.

Halliwell, B. (1994) "Free Radicals and antioxidants: A personal view", ***Nutritional Review,*** 52, 253-265.

Halliwell, B. (1996) "Oxidative stres, nutrition and health: Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans", ***Free Radical Research,*** 25, 57-74.

Harold, V. (2006) "Panglossi Antioxidants: New Research", ***Nova Publishers,*** 9-13.

Henrikson, J. (1992) "Cellular Metabolism and Endurance, Endurance in Sport", Editors: Shephard R.J., Astrand P.O., ***Blackwell Science,*** London.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993) "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the zupthen eldery study", ***Lancet***, 342, 1007-1014.

Hetts, S.W. (1998) "To die or not to die", ***The Journal of The American Medical Association (JAMA),*** 279, 300-307.

Heywood, V.H. (1978) "Flowering plants of the world", ***Oxford University Press,*** Oxford, UK, 263-268.

Hisarlı, N.D. (2013) "The effect of *salvia absconditiflora* extract on the gene expressions of GSTO1 and GSTZ1 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells", Master Thesis, ***Middle East Thecnical University***, Ankara, 43-47.

Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L. (2005) "The chemistry behind antioxidant capasity assays", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 53, 1841-1856.

Huang, M.T., Smart, R.C., Wong, C.Q., Conney, A.H. (1988) "Inhibitory effect of curcumin, cholorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate", ***Cancer Research,*** 48, 5941-5946.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y. (2009) "Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention", ***Nutrition and Cancer,*** 62(1), 1-20.

Hudson, E.A., Dinh, P.A., Kokubun, T. (2000) "Characterzation of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells", ***Cancer Epidomiology, Biomarkers, Prevention***, 9, 1163-1170.

Hung, H. (2004) "Inhibition of estrogen receptor alpha expression and function in MCF-7 cells by kaempferol", ***Journal of Cellular Physiology***, 198, 197-208.

HSGM. "2014 Yılı Türkiye Kanser İstatistikleri", Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Kanser Daire Başkanlığı, http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html.

İrtem Kartal, D. (2015) "Antioxidant properties of *salvia absconditiflora* extracts and their effects on phase I and phase II gene expressions in HepG2 cell line", Doktora Tezi, ***Middle East Technical University***, Ankara, 80-84.

Kalkan, İ. (2007) "Çeşitli pişirme yöntemlerinin sebzelerin fenolik bileşik antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi", Doktora Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara.

Kaul, A., Khanduja, K.L. (1998) "Polyphenols inhibit promotional phase of tumorigenesis: Relevance of superoxide radicals", ***Nutrition Cancer***, 32, 81-85.

Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016) "Serbest Radikaller", ***MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,*** 4(1), 50-59.

Karp, G. (2005) "Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments", ***John Wiley and Sons Press, 4th edition,*** Hokoben, USA, 864.

Kaviarasan, S., Naik, G.H., Gangabhagirathi, R., Anuradha C.V., Priyadarsini In, K.I. (2006) "In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds", ***Food Chemistry,*** 103, 31-37.

Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2007) "Biyokimya"***, Aktif Yayınevi,*** Erzurum.

Kılınç, K. ve Kılınç, A. (2000) "Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri", ***Hacettepe Tıp Dergisi,*** 33(2), 110-118.

Kim, J.S., Nam, M.H., An, S.S., Lim, C.S., Hur, D.S., Chung, C., Chang, J.K. (2011) "Comparison of the automated fluorescence microscobic viability test with the conventional and flow cytometry methods", ***Journal Clinical Laboratory Analysis,*** 25, 90-94.

Koçak, A. (2008) "Elazığ ve çevresinde yetişen *Tanacetum* L. (asteraceae) taksonların taksonomik yönden araştırılması", Doktora Tezi, ***Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Elazığ.

Korkmaz, M., Kandemir, A., İlhan, V., Y.Doğan, N. (2015) "*Tanacetum erzincanense* (Asteraceae), a new species from Erzincan, Turkey", ***Research Article, TÜBİTAK***.

Krinsky, N.I., Deneke, S.M. (1982) "Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids", ***Journal* of the *National Cancer Institute***, 69, 205-209.

Kwee, J.K., Mitidien, E., Alfonso, O.R. (1991) "Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B 16 melanoma cells", ***Cancer Letters,*** 57, 199-202.

Lai, L.S., Chou, S.T., Chao, W.W. (2001) "Studies on the antioxidative activities of Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum", ***Journal of Agricultural Food Chemistry,*** 49, 963-968.

MacDougall, D.B. (2002) "Colour in Food Improving Qality", ***Woodhead Publishing Limited,*** Cambridge, England, 179-221.

Marzouk, M.M., Mohamed, T.A., Elkhateeb, A., El-toumy, S.A., Hegazy, M.E.F. (2016) "Fhenolics from *Tanacetum sinaicum* (Fresen.) Delile ex Bremer Humphries (Asteraceae)", ***Biochemical Systematics and Ecology***, 65, 143-146.

Matsunaga, K., Katayama, M., Sakata, K. *et al.* (2002) "Inhibitory effects of chlorogenic acid azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats", ***Asian Pacific Journal of Cancer Prevention***, 3, 163-166.

Merlo, L.M., Pepper, J.W., Reid, B.J., Maley, C.C. (2006) "Cancer as an evolutionary and ecological process", ***Nature Reviews Cancer,*** 6, 924-935.

Michalak, A. (2006) "Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress", ***Polish Journal of Environmental Studies***, 15(4), 523-530.

Miller, D.D. (1996) "Mineral Food Chemistry, Fennema, O.R. (Ed.)", ***Dekker***, New York, 618-649.

Min, D.B. (1998) “Lipit oxidation of edible oil. In Food Lipits chemistry, nutrition and biotechnology”, Akoh, C.C., Min, D.B., (Eds), ***Marcel Dekker***, New York, 283-296.

Moldovan, L., Moldovan, N.I. (2004) “Oxygen free radicals and redox biology of organelles”, ***Histochemistry and Cell Biology***, 122, 395-412.

Mucciarelli, M., Maffei, M., Wright, C.W. (2002) İn Editors “Introduction to the genus”, ***Taylor and Francis Publishing,*** Newyork, 1-51.

Nagai, T., Myoda, T. and Nagashima, T. (2005) “Antioxidative Activities Of Water Extract And Ethanol Extract From Field Horsefail Equisetum Arvense”, ***Food Chemistry,*** 91, 389-394.

Nair, H.K., Rao, K.V., Aalinkeel, R. (2004) “Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes”, ***Cliniacl Diagnostic Laboratory Immunology***, 11, 63-69.

Nguyen, T.T., Tran, E., Ong, C.K. (2003) “Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK”, ***Journal of Cellular Physiology,*** 197, 110-121.

Osman, A.M., Wong, K.K.Y., Hill S.J., Fernyhough, A. (2006) “Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols”, ***Biochemical Biophysical Research Communications,*** 340, 597-603.

Özçelik, B., Lee, J.H., Min, D.B. (2003) “Effects of light, oxigen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants”, ***Journal of Food Sciences,*** 68, 487-490.

Özhatay, N. ve Kültür, Ş. (2006) “Check-list of additional taxa to the supplement flora of Turkey III”, ***Turkish Journal Botany,*** 30, 281-316.

Öztekin, T. (2010) “*Tanacetum kotschyi* (Boiss.) bitkisi üzerinde fitokimyasal araştırmalar ve biyoaktivite çalışmaları”, Yüksek Lisans Tezi, ***Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** İstanbul.

Packer, L. (1991) “Protective role of vitamin E”, ***Clinical Nutrition,*** 53, 1050-1055.

Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L. (1997) “Comparison of flavonoid aglycone contents of apis mellifera propolis from various regions of Brazil”, ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, 40, 97-106.

Pietta, P.G. (2000) “Flavonoids as antioxidants”, ***Journal of Natural Products,*** 63, 1035-1042.

Polatoğlu, K. (2009) “*Tanacetum chiliophyllum* (Fisch.- Mey.) schultz bip. türü varyeteleri üzerinde karşılaştırmalı fitokimyasal ve biyolojik araştırmalar”,

Doktora Tezi, ***Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** İstanbul, 329-330.

Pouzet M. T., Travis E. L. (1992) "No change in repair capacity of mouse lung irradiated three mounths after a single dose of cyclophosphamide", ***Cancer Research***, 52, 1096-1100.

Pratt, D.E., Hudson, B.J.F. (1990) "Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants", Hudson B.J.F., Ed., ***Elvesier***, Amsterdam, 17-192.

Prior, R.L., Cao, G. (2000) "Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications", ***Horticulture Science,*** 35, 588-592.

Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K. (2005) "Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dieatry supplements", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry,*** 53(8), 3110-3113.

Re, R., Pellegrini, N., Protrggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", ***Free Radical Biology and Madicine,*** 26, 1231-1237.

Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R. (2002) "Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology (ed. Akoh, C.C, Min, D.B.)", ***Marcel Dekker,*** New York, 335-542.

Rohloff, J., Mordal, R. and Dragland, S. (2004) "Chemotypical variation of Tansy (*Tanacetum* vulgare L.) from 40 different locations in Norway", ***Journal of Agricultural Food Chemistry,*** 52, 1742-1748.

Saldamlı, İ. (2007) "Gıda Kimyası", ***Hacettepe Üniversitesi Yayınları,*** Ankara, 463-492.

Saldamlı, İ., Sağlam, F. (1998) "Vitaminler ve mineraller", Gıda Kimyası, Ed: Saldamlı, İ., ***Hacettepe Üniversitesi Yayınları,*** Ankara, 337-398.

Sen, S., Chakraborty, R. (2011) "The role of antioxidants in human health", Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention and Therapy, ***Chapter 1***, 1-5.

Serafini, M., Del Rio, D. (2004) "Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool", ***Redox Report,*** 9, 145-152.

Servi, H. (2016) "Türkiye'de yetişen bazı *tanacetum* L. türleri üzerinde fitokimyasal araştırmalar ve biyoaktivite çalışmaları", Doktora Tezi, ***Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** İstanbul.

Sezik, E., Yeşilada, E. (1999) "Essential oils, uçucu yağ taşıyan türk halk ilaçları", ***Anadolu Üniversitesi Yayınevi,*** Eskişehir, 98-123.

Shahidi, F., Naczk, M. (1995) "Food Phenolics", ***Technomic Publishing Company Book,*** Lanchester, USA, 199-225.

Shimizu, M., Yoshimi, N., Yamada, Y. *et al.* (1999) "Suppressive effects of chlorogenic acid on N-methyl-N-nitrosourea-induced glandular stomach carcinogenesis in male F344 rats", ***Journal Toxicological Sciences***, 24, 433-439.

Sies, H. (1991) "Oxidative stress: from basic research to clinical application", ***American Journal of Medicine,*** 91, 31-39.

Sies, H. (1997) "Oxidative stress: oxidants and antioxidants", ***Experimental Physiolgy,*** 82, 291-295.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent", ***Methods in Enzymology***, 299, 152-178.

Sönmez, H.M., İliçin, G., Biberoğlu, K., Süleymanlar, G., Ünal, S. (2005) "İç Hastalıkları Özet Kitabı", ***Güneş Tıp Kitabevleri***.

Stadtman, E.R. (2002) "Importance of individuality in oxidative stress and aging", ***Free Radical Biology and Medicine,*** 33, 597-604.

Stahl, W., Sies, H. (2003) "Antioxidant activity of carotenoids", ***Molecular Aspects of Medicine,*** 24, 345-351.

Stevenson, D.E. and Hurst, R.D. (2007) "Polyphenolic phytochemicals just antioxidants or much more", ***Cellular and Molecular Life Sciences,*** 64, 2900-2916.

Şen, A., Bingöl Özakpınar, Ö., Birteksöz Tan, S., Kültür, Ş., Uras, F., Bitiş, L. (2017) "Biological activities of aerial parts extracts of endemic *Tanacetum argenteum subsp. argenteum*", ***Marmara Pharmacuetical Journal,*** 21(2), 286-290.

Şimşek, S. (2016) "*Tanacetum alyssifolium* bitkisinden axillarin bileşiğinin izolasyonu, antikanserojen ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Erzincan.

Şit, L. (2011) "Çeşitli bitkilerin antioksidan özelliklerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Edirne.

Tanaka, T., Nishikawa, A., Shima, H. (1990) "Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyprenoic acid E-5166, or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters", ***Basic Life Science***, 52, 429-440.

Tanizawa, H., Ohkawa, Y., Takino, Y., Ueno, A., Kageyama, T., Hara, S. (1992) "Studies on natural antioxidants in citrus species. I. Determination of antioxidant activities of citrus fruits", ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin,*** 40, 1940-1942.

Temur, N. (2006) "Çam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (*Viscum album l.*) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi***, Tokat.

Topdemir, S., Alan, Y., Savcı, A., Kurşat, M. (2017) "Determination of antioxidant and antimicrobial activities of some taxa of the genus *tanacetum* L." ***International Congress on Medicinal and Aromatic Plants***, May 10-12, 2017-Konya, 866.

Valcic, S., Timmermann, B.N., Alberts, D.S. *et al.* (1996) "Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines", ***Anticancer Drugs***, 7, 461-468.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J. *et al.* (2007) "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease", ***International Journal Biochemistry Cell Biology,*** 39, 44-84.

Wargovich, M.J., Jimenez, A., McKee, K. (2000) "Abnormal crypt formation in rat colon of potential chemopreventive agents and their effect on progression", ***Carcinogenesis***, 21, 1149-1155.

Weaver, R.F., Hedrick, P. W. (1997) "Genetics", ***WC Brown Publishers, 3rd Edition,*** Dubuque, Iowa, USA, 638.

Weber, P., Bendich, A., Schalch, W. (1996) "Vitamin C and human health a review of recent data relevant to human requirements", ***International Journal for Vitamin and Nutrition Research,*** 66, 19-30.

Wilson, E.O. (1986) "Biodiversty", ***National Academic Press,*** Washington.

Van-Der Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J., Faulkner, J.A. (1997) "The rol of vitamin E", ***Journal Applied Physiology,*** 83, 817-823.

Vining, L.C. (1990) "Functions of secondary metabolites", ***Annual Review of Microbiology,*** 44, 395-427.

Yıldız, E. (2008) "Kanser ve Beslenme", Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi ve Diyeyetik Bölümü**,** Sağlık Bakanlığı Yayın No: 728, ***Klasmat Matbaacılık***, 978-975.

Yıldız, L. (2007) "Bazı bitki örneklerinde antioksidan kapasitenin spektrofotometrik ve kromatografik tayini", Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul.

Yılmaz, S. (2013) "Antioxidant and cytotoxic properties of *salvia absconditiflora* and effects on CYP1A1, CYP1B1 gene expressions in breast cancer cell lines", Master Thesis, ***Middle East Technical University,*** Ankara.

Yucayurt, G. (2008) "*Laurocerasus officinalis roem.* bitkisinin çeşitli kısımlarından elde edilen süperkritik akışkan ekstraktlarının fenolik bileşikler açısından

analizi ve antioksidan aktivitelerinin tayini", Yüksek Lisans Tezi, ***Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Kars, 58-85.

Yumrutaş, Ö., Öztuzcu, S., Pehlivan, M., Öztürk, N., Poyraz, I.E., İğci, Y.Z., Çevik M.O., Bozgeyik, I., Aksoy, A.F., Bağış, H., Arslan, A. (2015) "Cell viability, anti-proliferation and antioxidant activities of *Sideritis syriaca, tanacetum argenteum subsp. srgenteum* and *achillea aleppica subsp. zederbaueri* on human breast cancer cell line (MCF-7)", ***Journal of Applied Pharmaceutical Science,*** 5(3), 1-5.

Yur, S. (2016) "*Tanacetum haussknechtii* (bornm.) grierson uçucu yağının kimyasal, enantiomerik ve biyolojik aktivite açısından araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,*** Eskişehir, 44-55.

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

Zor, M. (2007) "Depolamanın ayva reçelinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi", Yüksek Lisans Tezi, ***Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Erzurum.

EKLER

EK-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışma

Altay, A., Köksal, E., Öztürk Sarıkaya, B., Yapıcı, İ. (2017) "DETERMINATION OF THE PHENOLIC PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE PLANT TANACETUM ERZINCANENSE", ***International Conference on Applications in Chemistry and Chemical Engineering (ICACCHE), 11-15 Ekim 2017, Sarajevo,*** Bosna-Hersek, 13.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Artvin-Yusufeli-Boyalı Köyü'nde dünyaya geldi. İlkokulu aynı köyde, ortaokul ve liseyi Yusufeli İmam-Hatip Lisesi'nde okudu. 1995 yılında kayıt yaptırdığı Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden 1999 yılında mezun oldu. Bir süre özel bir dershanede Kimya Öğretmenliği yaptıktan sonra 2010 yılında memuriyete atandı. 2014 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen yüksek lisansa ve memurluğa devam etmektedir. Evli ve üç çocuk babasıdır.