

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI CYNIPIDAE GAL EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

ÖZGE KILINÇARSLAN AKSOY

DENİZLİ, ARALIK 2020

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**BAZI CYNIPIDAE GAL EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

ÖZGE KILINÇARSLAN AKSOY

DENİZLİ, ARALIK 2020

Bu tez alışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi tarafından 2018FEBE062 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.



Özge KILINÇARSLAN AKSOY

ÖZET

**BAZI CYNIPIDAE GAL EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR
DOKTORA TEZİ
ÖZGE KILINÇARSLAN AKSOY
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)**

DENİZLİ, ARALIK 2020

Quercus türleri (Fagaceae) içerdikleri polifenoller ve tanenlerden dolayı geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Tarihsel olarak bakıldığında, *Quercus* gallerinin de Batı ve Doğu kültürlerinde geleneksel tıpta çeşitli hastalıklar için kullanıldığı görülmektedir. Meşe gal arıları olarak bilinen Cynipini tribusuna (Cynipidae) ait 1000’i aşkın tür meşeler ve meşelerle akraba türler üzerinde gal oluşturmaktadır. Bunlardan *Andricus infectorius* (Hartig, 1843), *A. quercustozae* (Bosc, 1792) ve *A. sternlichti* Bellido, Pujade-Villar & Melika, 2003 aseksüel dişilerinin oluşturduğu galler farklı ülkelerde tıbbi kaynak olarak oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Galler ayrıca, Doğuda yiyecek olarak tüketimi dahil olmak üzere birçok amaçla kullanılmaktadır. Deri endüstrisinde ve bazı ticari mürekkeplerin üretiminde hala kullanılmaktadır. Meşe galleri büyük miktarda tanen içerirken az miktarda gallik asit ve elajik asit içermektedir. Galler antioksidan etkilere, topikal anestezi, antipiretik, anti-Parkinson gibi tıbbi değere sahiplerdir.

Bu çalışmada, çeşitli sinipid (Cynipidae) gallerinin farklı çözücülerde ekstraktları çıkarılmıştır. Gal ekstraktlarının olası antioksidan etkileri, birbirini desteklemesi amacıyla yedi farklı metot kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktların toplam fenolik, flavonoid ve tanen miktarları kullanılan standart eğrilerle hesaplanmıştır. Ayrıca fenolik bileşen karakterizasyonu yapılmak üzere Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) metodu kullanılmıştır. Gallerin sahip olduğu olası sitotoksik aktivitelerini ortaya çıkarmak amacıyla MIA PaCa-2 hücre hattı kullanılmıştır. Apoptozu indüklemeye aktivitesini belirlemek üzere apoptoz yolağındaki bazı genlerin ekspresyonu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, çalıştığımız gal türlerinin zengin sekonder metabolit ve fenolik asit içeriğine sahip olduğunu göstermiştir. Fenolik bileşen, flavonoid ve tanen içeriğinin antioksidan kapasiteleri ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, gal ekstraktlarının bazı apoptotik genlerin regülasyonuna etki ettiği gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler, yüksek antioksidan kapasite ve zengin biyolojik bileşen içeriğinden dolayı gallerin farmakolojik alanda olası ilaç ve antikanser ajan potansiyelini ortaya çıkarmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: *Andricus* sp., antioksidan, Mia-Paca2, HPLC, XTT

ABSTRACT

INVESTIGATIONS ON BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME CYNIPIDAE GALL EXTRACTS

PHD THESIS

ÖZGE KILINÇARSLAN AKSOY

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF.DR. RAMAZAN MAMMADOV)

DENİZLİ, DECEMBER 2020

Quercus species (Fagaceae) are widely used in traditional medicine because of the polyphenols and tannins they contain. Historically, *Quercus* galls have been used in Western and Eastern cultures for various diseases in traditional medicine. More than 1000 species belonging to the Cynipini tribus (Cynipidae), known as oak gall wasps, induce galls on oaks and species related to oaks. Asexual galls of *Andricus infectorius* (Hartig, 1843), *A. quercustozae* (Bosc, 1792) and *A. sternlichti* Bellido, Pujade-Villar & Melika, 2003 are widely used as medical resources in different countries. Galls are also used in the East for many purposes, including consumption as food. It is still used in the leather industry and in the production of some commercial inks. Oak galls contain large amounts of tannins and small amounts of gallic acid and elagic acid. Galls have antioxidant effects and medicinal value such as topical anesthesia, antipyretic and anti-Parkinson's.

In this study, some cynipid (Cynipidae) galls were extracted in different solvents. The possible antioxidant effects of gall extracts was determined using seven different methods (β -carotene-linoleic acid assay, Phosphomolybdenum assay, DPPH and ABTS radical scavenging activity, CUPRAC and FRAP assay, Metal Chelating activity) to support each other. Total phenolic, flavonoid and tannin amounts of extracts are calculated by using standard curves. In addition, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method used to characterize the phenolic component with 15 different standards. The MIA PaCa-2 cell line was preferred to identify possible cytotoxic activities of galls. Expression of some genes in the apoptosis pathway was determined to investigate apoptosis inducing activity. The results showed that the gall species have rich secondary metabolites and phenolic acid content. It was determined that the phenolic component, flavonoid and tannin content correlated with their antioxidant capacity. It has also been observed that gall extracts affect the regulation of some apoptotic genes. The data obtained revealed the possible drug capacity and anticancer agent potential of galls in the pharmacological field due to their high antioxidant capacity and rich biological component content.

KEYWORDS: *Andricus* sp., antioxidant, Mia-Paca2, HPLC, XTT

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması	2
1.1.1 Terpenler	2
1.1.2 Fenolik Bileşenler	5
1.1.3 Alkaloidler	11
1.2 Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	15
1.2.1 Reaktif Oksijen Türleri	16
1.2.2 Oksidatif Stres ve Moleküler Hasar	19
1.2.2.1 Nükleik Asit Hasarı	19
1.2.2.2 Protein Hasarı	20
1.2.2.3 Lipit Hasarı	21
1.3 Antioksidan Savunma	21
1.4 Antioksidan Kapasite Belirleme Metotları	27
1.4.1 Spektrofotometrik Teknikler	27
1.4.1.1 DPPH Metodu	27
1.4.1.2 ABTS Metodu	28
1.4.1.3 FRAP Metodu (Demir İndirgeme Antioksidan Gücü)	28
1.4.1.4 ORAC Metodu (Oksijen Radikali Absorblama Kapasitesi)....	28
1.4.1.5 HORAC Metodu (Hidroksil Radikal Giderim Kapasitesi).....	28
1.4.1.6 TRAP Metodu (Total Peroksil Radikali Yakalama Antioksidan Parametresi)	29
1.4.1.7 Lipit Peroksidasyonu İnhibisyon Metodu	29
1.4.1.8 PFRAP Metodu (Potasyum Ferrisiyanit İndirgeme Gücü).....	29
1.4.1.9 CUPRAC Metodu (Bakır İndirgeme Antioksidan Gücü)	30
1.4.2 Florimetrik Yöntemler	30
1.4.3 Elektrokimyasal Teknikler	31
1.4.3.1 Dönüşümlü voltametri metodu	31
1.4.3.2 Amperometrik metot	31
1.4.3.3 Biamperometrik metot	32
1.4.3.4 Biyosensör Metodu	32
1.4.4 Kromatografik Yöntemler	33
1.4.4.1 Gaz Kromatografisi	33
1.4.4.2 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi).....	33
1.5 Kanser	34
1.5.1 Kanserin Moleküler Biyolojisi	35
1.6 Apoptoz	39
1.7 Apoptotik Yolak	40
1.7.1 Kaspaz Ailesi	43
1.7.2 Bcl-2 Ailesi	45

1.7.3	TNF Ailesi	45
1.7.4	Fas Hücre Zarı Ölüm Reseptörü	46
1.8	Bitkilerin Tıbbi Kullanımı	47
1.8.1	Antikanser Ajanı Olarak Bitkiler	51
1.9	Bitki Galleri ve Gal Oluşumu	51
1.9.1	Böcekler sınıfı altında gal üreten başlıca gruplar	54
1.9.2	Gallerin Fitokimyasalları ve Kullanım Alanları	55
1.9.3	<i>Quercus infectoria</i> Oliv. Galleri	56
1.10	Amaç	58
2.	MATERYAL ve METOT	60
2.1	Arazi Çalışmaları ve Gal Örneklerinin Toplanması	60
2.1.1	<i>Andricus anatolicus</i> Melika, Mutun & Dinç, 2014	60
2.1.2	<i>Andricus ceconii</i> Kieffer, 1901	61
2.1.3	<i>Andricus curtisii</i> (Müller, 1870)	62
2.1.4	<i>Andricus sternlichti</i> Bellido, Pujade-Villar & Melika, 2003	63
2.1.5	<i>Andricus tomentosus</i> (Trotter, 1901)	64
2.2	Hücre Hattı ve Özellikleri	65
2.3	Ekstraksiyon Aşaması ve Ekstrakt Verimliliğinin Hesaplanması	66
2.4	Toplam Antioksidan Aktivite Yöntemleri	68
2.4.1	β -Karoten/Linoleik Asit Yöntemi	68
2.4.2	Fosfomolibdenyum Antioksidan Aktivite Yöntemi	68
2.5	Radikal Giderim Aktivite Belirleme Yöntemleri	69
2.5.1	DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi	69
2.5.2	ABTS Radikal Giderim Kapasitesi	69
2.6	İndirgeme Gücü Deneyleri	70
2.6.1	Bakır İndirgeme Gücü Kapasitesi (CUPRAC)	70
2.6.2	FRAP/TPTZ testi	70
2.7	Metal Şelatlama Kapasitesinin Ölçülmesi	70
2.8	Toplam Sekonder Metabolit Madde Miktarlarının Belirlenmesi	71
2.8.1	Folin Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Miktarı	71
2.8.2	Toplam Flavonoid Madde Miktarı	71
2.8.3	Toplam Tanen Madde Miktarı	71
2.9	HPLC Metodu ile Fenolik Bileşenlerin Karakterizasyonu	72
2.10	Sitotoksosite ve Gen Ekspresyon Deneyleri	73
2.10.1	Hücre Kültürü	73
2.10.2	XTT Hücre Canlılığı Testi	75
2.10.3	Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu	76
2.10.4	cDNA Sentezi	77
2.10.5	Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)	78
3.	BULGULAR	81
3.1	Ekstrakt Verimliliğinin Hesaplanması	81
3.2	Toplam Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	82
3.2.1	β -karoten/Linoleik Asit Yöntemi	82
3.2.2	Fosfomolibdenyum Yöntemi	83
3.3	Toplam Radikal Süpürme Kapasitelerinin Belirlenmesi	83
3.3.1	DPPH Radikal Süpürme Kapasitesi	83
3.3.2	ABTS Radikal Süpürme Kapasitesi	84
3.4	İndirgeme Gücü Kapasitelerinin Belirlenmesi	85
3.4.1	Bakır İndirgeme Gücünün Belirlenmesi (CUPRAC)	85
3.4.2	Demir İndirgeme Gücü Kapasitesinin Belirlenmesi (FRAP)	86

3.5	Demir Metali Şelatlama Kapasitesi.....	86
3.6	Toplam Sekonder Metabolit Madde Miktarının Belirlenmesi.....	87
3.6.1	Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi.....	87
3.6.2	Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi.....	88
3.6.3	Toplam Tanen Madde Miktarının Belirlenmesi.....	88
3.7	Fenolik Bileşen Karakterizasyonu.....	89
3.8	Sitotoksisite ve Gen Ekspresyon Çalışmaları.....	90
3.8.1	XTT Hücre Canlılığı Sonuçları.....	90
3.8.2	Gerçek-Zamanlı PZR (Real-Time PCR) Sonuçları.....	90
4.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	96
5.	KAYNAKLAR.....	103
6.	ÖZGEÇMİŞ.....	141

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1: Sekonder Metabolitlerin sentez yolları (Taiz ve Zeiger 2010).....	2
Şekil 1. 2: İzopren birimi	2
Şekil 1. 3: Karotenoidlerin biyolojik etkileri (Rao ve Rao 2007'den uyarlanmıştır).....	5
Şekil 1. 4: Fenolik bileşenlerin sentez yolları	7
Şekil 1. 5: Flavonoidin genel yapısı	8
Şekil 1. 6: Hanahan ve Weinberg'e göre kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)	36
Şekil 1. 7: Apoptozun iç ve dış yolları (Zhou ve Li 2015'den uyarlanmıştır).....	41
Şekil 1. 8: Apoptoz mekanizmaları (Tomatır 2003).....	43
Şekil 1. 9: Moleküler farmakognozi için açıklayıcı model (Bruhn ve Bohlin 1997)	48
Şekil 1. 10: Antikanser fitokimyasallarının sentezi, optimizasyonu, karakterizasyonu ve kanser terapötik ajanı olarak ileriye dönük kullanımının ayrıntılı şeması (Iqbal ve diğ. 2017'den uyarlanmıştır).....	50
Şekil 2. 1: <i>A. anatolicus</i> aseksüel galeri	61
Şekil 2. 2: <i>A. ceconii</i> aseksüel galeri.....	62
Şekil 2. 3: <i>A. curtisii</i> aseksüel galeri.....	63
Şekil 2. 4: <i>A. sternlichti</i> aseksüel galeri.....	64
Şekil 2. 5: <i>A. tomentosus</i> aseksüel galeri.....	65
Şekil 2. 6: Çalışmamızda kullanılan MiaPaca-2 hücrelerinin 10X mikroskop görüntüsü	66
Şekil 2. 7: Gal örneklerinin ekstraksiyon aşaması.....	67
Şekil 2. 8: Elde edilen kuru gal ekstraktlarının tartılması.....	67
Şekil 2. 9: Hücre kültürü çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvar	73

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. 1: Fenolik Bileşenlerin Sınıflandırılması	6
Tablo 1. 2: Antioksidanların sınıflandırılması (Çaylak 2011).....	22
Tablo 2. 1: cDNA sentez kiti karışımı	77
Tablo 2. 2: Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımı	79
Tablo 2. 3: Çalışmamızda kullanılan genler ve tanımları	80
Tablo 3. 1: Gal örneklerinin % ekstrakt verimlilikleri.....	81
Tablo 3. 2: Gal ekstraktlarının β -karoten/linoleik asit toplam antioksidan aktivite-leri	82
Tablo 3. 3: Gal ekstraktlarının fosfomolibdenyum antioksidan aktivite-leri	83
Tablo 3. 4: Gal ekstraktlarının DPPH radikali giderim aktivitesi.....	84
Tablo 3. 5: Gal ekstraktlarının ABTS radikali giderim aktivitesi.....	84
Tablo 3. 6: Gal ekstraktlarının CUPRAC aktivitesi	85
Tablo 3. 7: Gal ekstraktlarının FRAP aktivite-leri.....	86
Tablo 3. 8: Gal ekstraktlarının metal şelatlama kapasite-leri.....	86
Tablo 3. 9: Gal ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları	87
Tablo 3. 10: Gal ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları	88
Tablo 3. 11: Gal ekstraktlarının toplam tanen miktarları.....	88
Tablo 3. 12: Gallerin metanol ekstraktlarının fenolik bileşen karakterizasyonu	89
Tablo 3. 13: Gal ekstraktlarının MiaPaCa-2 hücre hattı üzerinde sitotoksosite değ-erleri	90
Tablo 3. 14: Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre <i>A. sternlichti</i> gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarına değ-işim tespit edilen genler	91
Tablo 3. 15: Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre <i>A. tomentosus</i> gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarında değ-işim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler	92
Tablo 3. 16: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre <i>A. curtisii</i> gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarında değ-işim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler	93
Tablo 3. 17: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre <i>A. cecconii</i> için kontrol ve doz gruplarında değ-işim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler	94
Tablo 3. 18: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre <i>A. anatolicus</i> gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarında değ-işim tespit edilen genler	95

SEMBOL LİSTESİ

Fe²⁺	:	Demir (II)
Da	:	Dalton
CN	:	Karbon-Azot
OH·	:	Hidroksil radikali
O₂^{·-}	:	Süperoksit radikali
NO·	:	Nitrik oksit radikali
RO₂·	:	Peroksil radikali
ONOO⁻	:	Peroksinitrit radikali
HOCl	:	Hipokloröz asit
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
¹O₂	:	Tekli oksijen
O₃	:	Ozon
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Se	:	Selenyum
Mn	:	Mangan
Cu	:	Bakır
Fe³⁺	:	Demir (III)
CYP2E1	:	Sitokrom P450 2E1
α	:	Alfa
β	:	Beta
γ	:	Gama
δ	:	Delta
nm	:	nanometre
°C	:	Santigrat
Co (II)	:	Kobalt (II)
mL	:	Mililitre
CuSO₄	:	Bakır sülfat
mg	:	Miligram
Ca⁺⁺	:	Kalsiyum
µg	:	Mikrogram
mm	:	Milimetre
gr	:	Gram
rpm	:	1 dakikadaki devir sayısı
µL	:	Mikrolitre
Mo	:	Molibden
mM	:	Milimolar
M	:	Molar
w/v	:	Ağırlık/Hacim
FCR	:	Folin Ciocalteu Ayırıcı
AlCl₃	:	Alüminyum klorid
IC₅₀	:	Maksimum inhibisyon konsantrasyonu
FCR	:	Folin Ciocalteu Ayırıcı

ÖNSÖZ

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitim-öğretim hayatım boyunca üzerimde sayısız emeği olan, sadece akademik alanda paylaştığı tecrübelerle değil aynı zamanda hayatımın tüm alanında erdemli ve ahlaklı bir yaşam sürmem için beni donanımlı hale getiren, doktora tez sürecimde yaşamış olduğumuz tüm zorluklara rağmen beni ve arkadaşlarımı çalışmalarımıza odaklanıp bitirmemiz konusunda sürekli teşvik eden, danışman hocam sayın Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV'a gözlerim dolarak, minnetle teşekkürlerimi sunarım. Çalışma materyali olarak beni gallerle tanıştıran, tezimin dışında TÜBİTAK projesine dahil eden, bilgi ve tecrübelerine her zaman danışmamda kolaylık sağlayan kıymetli hocam Prof. Dr. Yusuf KATILMIŞ'a ve gerek arazi çalışmalarında gerek laboratuvar çalışmalarında her zaman yardımcım ve destekçim olan hemşehrim ve değerli arkadaşım Öğr. Gör. Musa AZMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Antikanser çalışmalarına olan merakımı dikkate alıp bu alana yönelmemde bana yardımcı olan danışmanıma ve bu alandaki tüm çalışmalarda hoşgörü ve nezaketle tüm tecrübesini paylaşan kıymetli arkadaşım Dr. Mücahit SEÇME'ye, tez izleme toplantılarında çalışmaları kontrol eden ve düzeltme yapan, geliştiren değerli hocam Prof. Dr. Vildan CANER'e teşekkürlerimi sunarım. Lisansüstü eğitimim için danışmanım Prof. Dr. Ramazan MAMMADOV'a beni yönlendiren ve bana referans olan, hayatımın dönüm noktası dediğim yerde önemli katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Olcay DÜŞEN ve Prof. Dr. Serdar DÜŞEN'e teşekkürlerimi sunarım. Denizli'deki ailem olan, çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan kıymetli laboratuvar arkadaşlarım Dr. Çiğdem AYDIN, Nahide DENİZ, Dr. Murat TURAN, Şerife DEMİRBAŞ, Melika VAEZİ, Rusif YUSİFLİ ve Dr. Akgül RAKHIMZHANOVA'ya teşekkür ederim.

Bu yaşıma ve eğitim seviyeme ulaşmamda en büyük paya sahip olan, her türlü maddi ve manevi desteği üzerimden eksik etmeyen babam Şükrü KILINÇARSLAN, annem Yazgülü KILINÇARSLAN, kardeşim Emre KILINÇARSLAN ve eşim Burak AKSOY başta olmak üzere tüm aileme minnetle ve sevgiyle teşekkürlerimi sunarım.

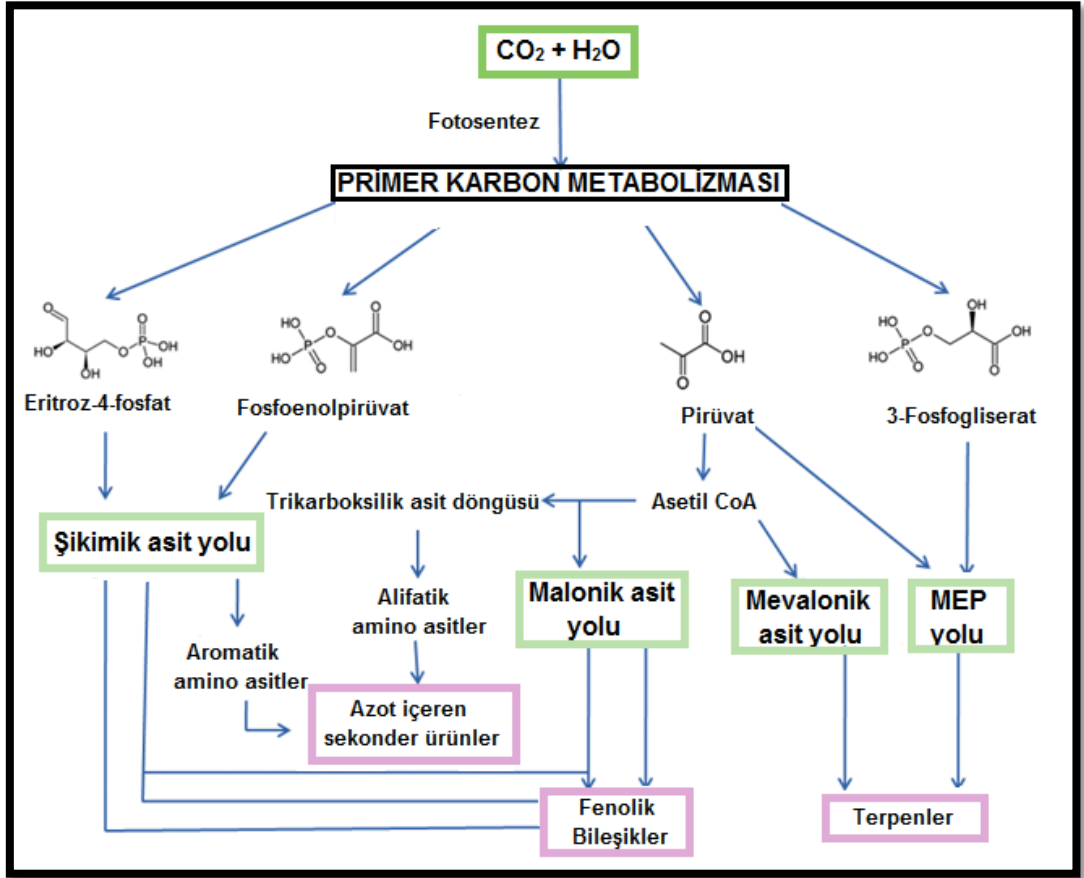
Özge KILINÇARSLAN AKSOY

1. GİRİŞ

Metabolizma canlı organizmalarda iki ana kategoriye ayrılmaktadır: Primer ve Sekonder metabolizma. Primer metabolizma; nükleik asitler, yağlar, karbonhidratlar ve proteinler gibi yaşamsal faaliyetlere sahip olan biyolojik molekülleri kapsamaktadır. Sekonder metabolizma ise sekonder metabolitlerin biyosentezini içermektedir. Bu bileşenler bir organizmaya özel olarak üretilmektedir ve organizmada birçok önemli fonksiyonlarda rol oynamaktadırlar (Dias ve diğ. 2012). Tahminlere göre, doğada 300.000'den fazla sekonder metabolitin var olduğu düşünülmektedir (Gurnai ve diğ. 2014). Bitkiler, çok sayıda ve çeşitlilikte sekonder metabolitler içermektedirler. Genellikle bitkiler aleminde sınırlı taksonomik gruplar arasında farklı bir şekilde yayılmış olan büyüme ve gelişmede direkt katkı sağlamayan bileşenlerdir (Croteau ve diğ. 2000).

Sekonder metabolitlerin fonksiyonları şu şekilde gruplandırılabilir; çevresel stres (kuraklık, tuzluluk, ultraviyole ışınları vb.) faktörlerine karşı koruma, predatör (böcek, sürüngen vb.) ve mikroorganizmaların (bakteri, virüs, mantar) saldırılarına karşı savunma, cezbedici kokuları ile bazı taşıyıcıları çekerek tozlaşmaya katkı sağlamak (Mammadov 2014).

Sekonder metabolitler; terpenler, fenolik bileşenler ve alkaloidler olarak üç ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bütün terpenoidler, beş karbonlu izopentenil difosfat (IPP) ana iskeletinden elde edilmektedir. Bir ya da daha fazla nitrojen içeren alkaloidler, temel olarak aminoasitlerden üretilmektedirler. Fenolik bileşenler ise şikimik asit veya malonat/asetat yolağı ile oluşturulmaktadır (Şekil 1.1).

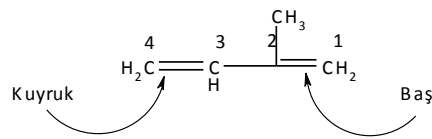


Şekil 1. 1: Sekonder Metabolitlerin sentez yolları (Taiz ve Zeiger 2010)

1.1 Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması

1.1.1 Terpenler

Terpenler beş karbonlu izopren birimlerinin (Şekil 1.2) baş-kuyruk şeklinde bağlanmasıyla oluşmaktadır. Yapıların belirlenmesinde kullanışlı bir rehber olan izopren kuralı, 1921 yılında Leopold Ruzicka tarafından geliştirilmiştir (Mammadov 2014).



Şekil 1. 2: İzopren birimi

Terpenler içerdikleri C₅ izopren birimlerinin sayısı ile sınıflandırılmaktadır. Terpen sınıfları (Mammadov 2014):

- Hemiterpenler, C₅
- Monoterpenler, C₁₀
- Seskiterpenler, C₁₅
- Diterpenler, C₂₀
- Sesterpenler, C₂₅
- Triterpenler, C₃₀
- Tetraterpenler, C₄₀
- Meroterpenler, C_{>40}
- Politerpenler, (C₅H₈)_n

Hemiterpenler tek bir izopren birimden oluşur ve izoprenin kendisi tek hemiterpen olarak kabul edilir. Bilinen 50 çeşit hemiterpen mevcuttur. prenol, izovalerik asit, gibi bileşikler hemiterpenlere örnek olarak verilebilir (Mammadov 2014).

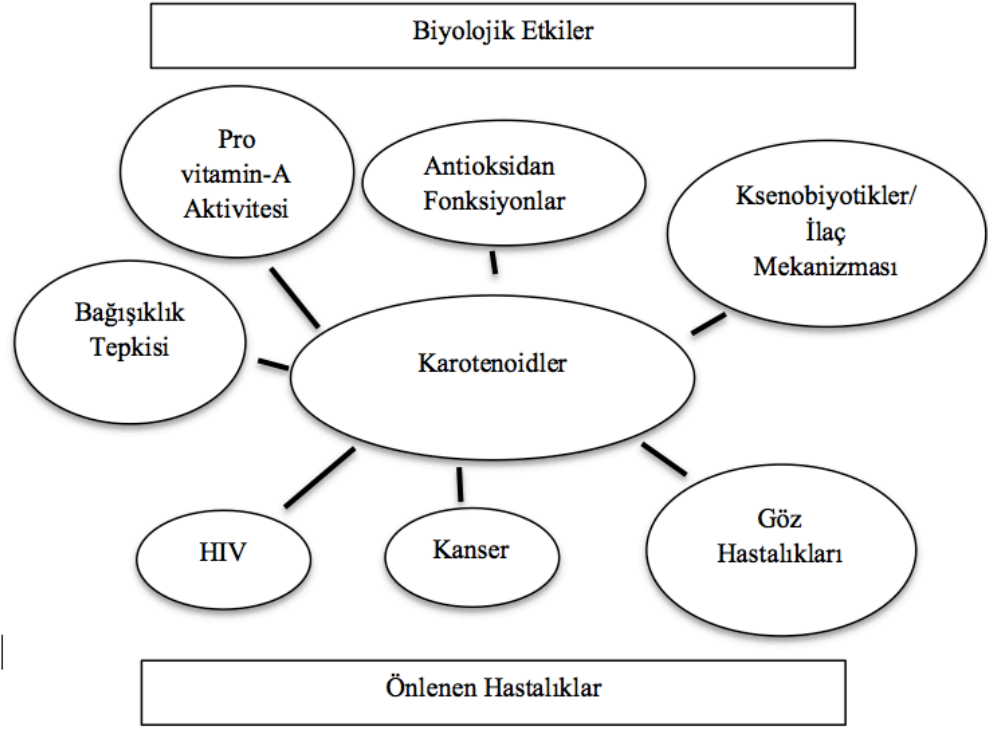
Monoterpenler genellikle bitkilerin aromatik bileşenlerini oluştururlar. Bu uçucu doğal bileşenler, esansiyel yağlar olarak bilinmektedir ve parfüm endüstrisinin temelini oluşturmaktadırlar. Bu yağların modern gaz kromatografi analizleri terpenoidlerin oldukça karmaşık karışımlar olduğunu gösterse de, genellikle bir veya iki monoterpen baskındır. Örneğin; geraniol, geranium yağının (*Pelargonium graveolens* L'Her.) ana bileşenidir ve izomeri olan linalol bahçe bitkilerinin, adaçayının yağlarında bulunmaktadır. Sitral ise limon yağının ana bileşenidir, ticari olarak limon otu yağından (*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Will. Watson) elde edilmektedir. Nane, adaçayı ve biberiyeyi içeren bitkiler birçok terpen çeşidinin kaynağıdır. Şekerleme, tütün ve diş tozu ürünlerinde kullanılan mentol, yabani nanelerin (*Mentha arvensis* L.) esansiyel yağında bulunmakta olup lokal anestezi gibi önemli fizyolojik özelliklere sahiptir (Ludwiczuk ve diğ. 2017; Hanson 2003).

Seskiterpenler, esansiyel yağların daha yüksek kaynama kısımlarında bulunmaktadır. Karyofilen karanfil yağında, humulin şerbetçiotu yağından, sedren sedir ağacı yağında bulunmaktadır. *Artemisia maritima* L.'dan elde edilen santonin tıpta bağırsak kurtlarının yok edilmesinde kullanılmaktadır. *Artemisia annua* L.' dan üretilen artemisin Dünya Sağlık Örgütü tarafından malaryanın tedavisinde önerilmektedir (Hanson 2003).

Diterpenlerin çoğu odun reçine ürünleridir. Vernik ve reçine sabunlarının yapımında kullanılan abiyetik asit, *Pinus* L. ve *Abies* Mill. cinslerine ait türlerden elde edilen çamsakızı reçinesinin ana bileşenidir. Asitler ve fenoller, ağacı mantar ve böcek saldırılarına karşı korumaktadır. En iyi bilinen bitki hormonlarından, giberellik asit *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenw. mantarı tarafından fitotoksin olarak üretilmektedir. Bazı diterpen çeşitleri antitümör aktivitelere sahiptir. Bunlardan birisi olan taksol, orijinal olarak *Taxus brevifolia* Nutt. kabuklarından elde edilir, ancak daha kolay bir şekilde yarı-sentetik olarak üretilmektedir (Hanson 2003).

En basit triterpen olan sukualin, ilk kez balık karaciğeri yağından izole edilmiştir. Daha sonra bitkisel ve hayvansal yağlarda da tespit edilmiştir. En yaygın triterpenlerden tetrasiklik triterpen yün yağının içeriğinin çoğunluğunu oluşturur. α - ve β -amirinler gibi diğer triterpenler, ağaç reçinelerinde ve çoğu ağacın gövdesinde bulunmaktadır. Glisiretinik asit triterpeni meyan kökünde bulunur ve mide ülseri tedavisinde iyileştirici özelliklere sahiptir (Hanson 2003).

Karotenoidler, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen pigmentli bileşenlerdir. Bitkilerde fotosentetik mekanizmaya katkı sağlamaktadırlar ve onları ışın hasarlarına karşı korumaktadırlar. Meyve ve sebzeler insanların diyetindeki birçok karotenoidin ana kaynağını oluşturmaktadır (Mangels ve diğ. 1993; Agarwal ve Rao 2000; Johnson 2002). Ayrıca meyve ve sebzelerde sarı, turuncu ve kırmızı renklerinin oluşumundan sorumludurlar. Karotenoidlerin, meyve ve sebzelerin kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diğer kronik hastalıklar dahil olmak üzere insan hastalıklarını önlemedeki yararlı özelliklerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Astrog ve diğ. 1997; Paiva ve Russell 1999).



Şekil 1. 3: Karotenoidlerin biyolojik etkileri (Rao ve Rao 2007'den uyarlanmıştır)

1.1.2 Fenolik Bileşenler

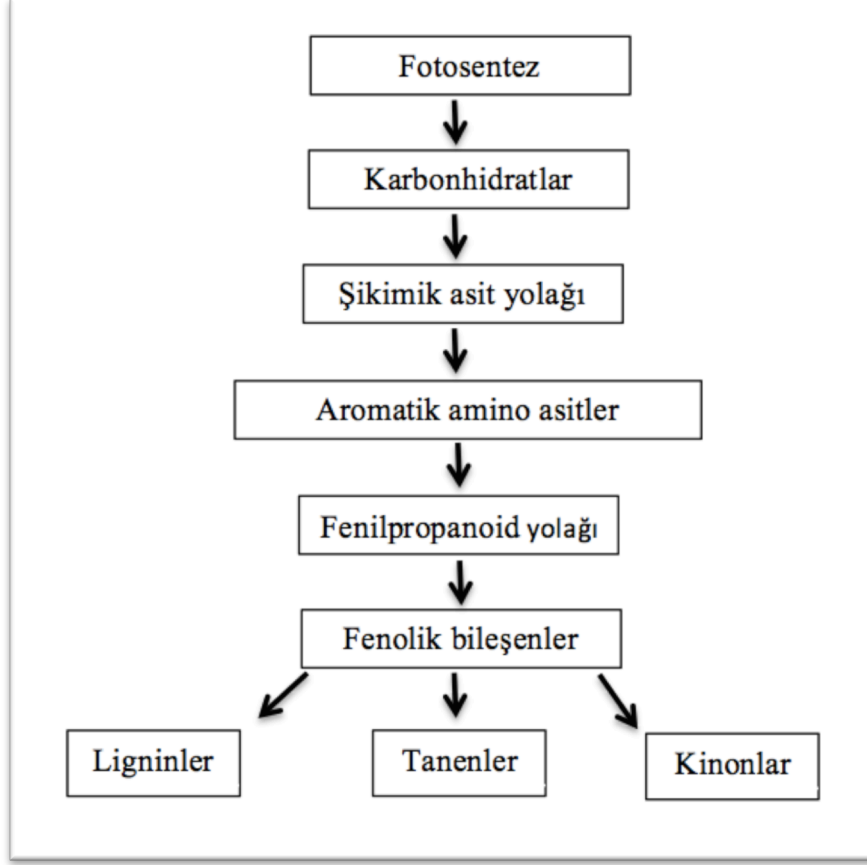
Sekonder metabolitlerin geniş gruplarından birini oluşturan fenolik bileşenler, bitkilerde pentoz fosfat, şikimat ve fenilpropanoid yollarıyla üretilmektedir. Bu bileşenler bitkinin büyümesi ve üremesinde patojenlere ve predatörlere karşı koruma sağlayarak önemli bir rol sergilemektedirler. Dahası, meyve ve sebzelerin renk ve duyuşal özelliklerine katkı sağlamaktadırlar (Chikezie ve diğ. 2015).

Fenolik bileşenlerin yapısı, bir ya da daha fazla hidroksil grubu bağı olan aromatik halka içermektedir. Basit fenolik moleküllerden, oldukça polimerize olmuş bileşenlere kadar zengin fenolik bileşen çeşitleri bulunmaktadır. Fenolik bileşenlerin çoğu mono- ve polisakkaritlerin bir ya da daha fazla fenolik gruplarıyla birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Ayrıca, fenolik bileşenler ester ve metil esterlere de bağlanabilmektedir. Günümüzde, 8.000'den fazla fenolik bileşen yapısı bilinmektedir. Tablo 1.1'de gösterildiği gibi birkaç grupta kategorize edilebilmektedir (Del Rio ve diğ. 2013).

Tablo 1. 1: Fenolik Bileşenlerin Sınıflandırılması

Sınıf	Yapı
Basit fenolikler, benzokinonlar	C6
Hidroksibenzoik asitler	C6-C1
Hidroksisinnamik asitler, fenilpropanoidler	C6-C3
Asetofenonlar, fenilasetik asitler	C6-C2
Ksantonlar	C6-C1-C6
Stilbenler, Antrakınonlar	C6-C2-C6
Flavonoidler, İzoflavonoidler	C6-C3-C6
Lignanlar, neolignanlar	(C6-C3) ₂
Ligninler	(C6-C3) _n
Kondanse tanenler (proantosiyanidinler veya flavolanlar)	(C6-C3-C6) _n

İnsanların diyetinde yer alan en önemli fenolik bileşenler; fenolik asitler, flavonoidler ve tanenlerdir. Kimyasal olarak, fenolik asitler en az bir hidroksil grubun bağlı olduğu en az bir aromatik halkaya sahip olan yapılardır (Heleno ve diğ. 2015). Fenolik asitler iki gruba ayrılırlar: hidroksibenzoik asitler (HBA) ve hidroksisinnamik asitler (HCA), sırasıyla fenolik bileşen olmayan benzoik asit ve sinnamik asitten türemişlerdir. L-fenilalanin ve L-tirozinin öncül maddeleri olduğu şikimat yolağı ile sentezlenirler (Williamson 2017).



Şekil 1. 4: Fenolik bileşenlerin sentez yolakları

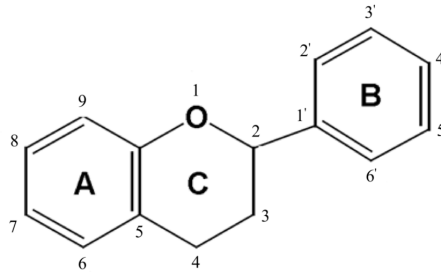
L-fenilalanin ve L-tirozinden fenolik asitlerin sentezinden sorumlu ana reaksiyonlar deaminasyon, hidroksilleme ve metilasyondur. İlk olarak, fenilalanin ve/veya tirozin deaminasyona neden olarak sırasıyla sinamik asit ve/veya *p*-kumarik asite dönüşür. Sinamik asit ve/veya *p*-kumarik asitin aromatik halkaları hidroksillenir ve metillenir ve sonucunda ferulik asit ve kafeik asit oluşur. Sinamik asit yan zincir bozunması, hidroksilasyon ve metilasyona uğrayabilen, protokatekuik ve *p*-hidroksibenzoik asit üreten benzoik asite dönüşmektedir (Rice-Evans ve diğ. 1996).

Hidroksibenzoik asitlerin (HBA) genel yapısı C₆-C₁, aromatik halkaların hidroksillenmesi ve metilasyonu gibi ana yapılarında bazı varyasyonlara sahiptir. HBA'lara salisilik asit, 4-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, gentisik asit, vanilik asit, sirinjik asit, gallik asit, ellajik asit ve heksahidroksidifenik asit örnek verilebilir. Bazı meyvelerde serbest halde bulunabilirken (örneğin hurmada gallik asit) bitki gıdalarında konjugat olarak bulunmaktadır (Tomas-Barberan ve Clifford 2000). Konjuge olan HBA'lara bir örnek olarak dimer, trimer ya da tetramer halde bulunabilen (ellajik asit, tergallik asit ve gallajik asit) gallik asit verilebilir (Clifford

ve Scalbert 2000). Elajik asit böğürtlen ve çilekte; salisilik asit kayısıda, yabanmersininde ve siyah çayda; gentisik asit turunçgillerde ve üzümde ve ayrıca domates, biber gibi bazı Solanaceae familyası meyvelerinde, kavun ve salatalık gibi Cucurbitaceae familyası üyelerinde; gallik asit Japon ve Çin yeşil ve siyah çaylarında bulunmaktadır (Clifford ve Scalbert 2000).

Hidroksisinamik asitler (HCA) cis veya trans konfigürasyonuna sahip olabilen yan zincirde bir çift bağ bulunduran C6-C3 basit yapıları, gıdalarda genellikle monomerler, dimerler veya polimerler olarak bulunurlar; alkoller, hidroksi asitler veya ester üreten mono/disakkaritler ile kondansatlar olarak bulunabilirler veya aminlerle kondansasyon yoluyla amidler olabilirler. HCA'lar nadiren serbest halde bulunmaktadırlar ancak, işlenmiş gıdalarda sterilizasyon, fermantasyon süreçlerinde serbest şekilleri oluşabilmektedir (Rommel ve Wrolstad 1993). HCA'ların ana besin kaynakları elma, kiraz, şeftali, erik ve bazı turunçgiller gibi meyvelerdir. Kafeik asit, kahve, yabanmersini, üzüm, armut, elma ve portakalda bulunmaktadır (Naczki ve Shahidi 2006). Kumarik asidin ana besin kaynakları ise üzüm, kiraz ve çilek gibi meyvelerdir (Matilla ve diğ. 2005).

Flavonoidler, fenolik bileşenlerin en geniş grubunu oluşturmaktadır. Bitkisel gıdalarda 8.000'den fazla çeşidi bulunan fenolik bileşenler, 6.000'den fazla flavonoid içermektedir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olan flavonoidler, C6-C3-C6 şeklinde düzenlenen 15 karbon iskeleti ile karakterize edilmiştir. Flavonoidlerin temel yapıları iki aromatik halkanın, A ve B, genellikle heterosiklik bir C halkasının, üç karbonlu bir köprü ile birleştirilmesiyle oluşmaktadır (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5: Flavonoidin genel yapısı

Flavonoid moleküllerinin kökenleri olan A halkası asetat/malonat yolağında ve B halkası fenilalaninden türetilen şikimat yolağında üretilmiştir (Birt ve Jeffery 2013). Ek olarak, C halkası flavonoid sınıflarının çeşitliliğinden sorumludur; yer

değiştirme şekillerindeki varyasyonlar flavonollar, flavonlar, flavanonlar, flavanoller (kateşin), izoflavonlar, flavononollar ve antosiyanidinler gibi çoğu flavonoid sınıfının oluşmasını sağlar (Birt ve Jeffery 2013).

Flavonoidler genellikle bitkilerde glikozit adı verilen şekerlere bağlı olarak depolanırlar. Bağlı flavonoidleri, *O*-glikozitler için glikoz, galaktoz, ramnoz, apioz vb. olabilen *O*- veya *C*-glikozitler ile konjuge edilir, şeker kalıntıları genellikle 3-, 7- veya 4-hidroksil gruplarına bağlanır, *C*-glikozitler için şeker kalıntıları doğrudan C-6 veya C-8'e bağlanır (Cook ve Samman 1996).

Flavonoidlerin büyük bir kısmı sarıdan kırmızıya doğru renge sahiptir. Bu durum moleküllerin içinde bulunan çiçek, tohum ve meyvelerin renk oluşumundan sorumlu olan konjuge kromoforlardan kaynaklanır (Erlund 2004). Antosiyanidinlere örnek olarak, Cyanidin kırmızıdan magentaya; Perlargodin turuncudan kırmızıya; Delfinidin magentadan mora renk çeşitliliği göstermektedir (Navarre ve diğ. 2013). Flavonlar ve flavonollar genellikle kırmızı renkteyken flavanonlar renksiz, beyaz veya kahverengimsidir. Suda düşük çözünürlüğe sahiptirler ve gıda rengine katkıları antosiyanidinler, flavanoller ve proantosiyanidinlere kıyasla azalmıştır (Birt ve Jeffery 2013).

Flavonoid biyosentezi fenilpropanoid yolağında gerçekleşir ve birinci basamakta fenilalaninden 4-kumaril-CoA üretilir ki bu, kalkon sentaz enziminin etkisiyle, flavonoid biyosentezine giden merkezi bir yol olan, tüm flavonoidlerin üretimi için flavonoid bir omurga olan kalkon iskeletlerini üretir. Farklı flavonoid alt sınıfları redüktaz, izomeraz, hidroksilaz ve birkaç $Fe^{2+}/2$ -okzaglutrat bağlı dioksijenazlar gibi bir takım enzim grubunun etkisiyle temel bir flavonoid iskeletinden sentezlenmektedir (Martens ve diğ. 2010). Bazı enzimler şeker, metil grupları ve/veya açıl gruplar ekleyerek basit flavonoid iskeletlerini modifiye etmektedirler; bu modifikasyonlar onların etkileşimlerini, çözünürlüklerini ve hücrelerle reaktivitelerini, çeşitli fizyolojik aktiviteleri yöneterek, değiştirebilmektedirler (Ferrer ve diğ. 2008).

Meyve ve sebzelerdeki flavonoidlerin sayısı; tür çeşitliliğine, edafoklimatik koşullara, bitkinin kısımlarına, ekime ve olgunluk derecesine bağlı olarak değişebilir. Flavonoidler sadece renkten sorumlu değildir aynı zamanda tada, lipid

peroksidasyonunun korunmasına, enzimlere ve vitamin bileşiklerine de katkı sağlarlar. Pişirme işlemi flavonoidlerin içeriğini değiştirebilir, ayrıca gıdanın saklama koşulları da flavonoid miktarını değiştirebilmektedir (Ferrer ve diğ. 2008).

Flavonoidlerin başlıca diyet kaynakları aşağıdaki gıdalardır; baharat ve otlarda flavonlar (apigenin, luteonin), katı ve sıvı yağlar meyveler, sebzeler ve sebze ürünleri, tahıl taneleri ve makarnada; flavonoller (kaempferol, myricetin, quercetin, isorhemitin ve rutin) süt ürünlerinde, baharatlarda ve otlarda, sebzelerde ve sebze ürünlerinde, kuruyemişlerde ve tohumlarda, içeceklerde; flavanonlar (eriodictyol, hesperidin, naringenin) baharat ve bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde ve sebze ürünlerinde, kuruyemişlerde ve tohumlarda, içeceklerde, tahıllarda ve makarnalarda; antosiyanidinler (cyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin) meyvelerde, sebzelerde ve sebze ürünlerinde, kuruyemişlerde ve tohumlarda, içeceklerde, baklagillerde, tahıllarda ve makarnalarda bulunmaktadır (Faggio ve diğ. 2017).

Tanenler genellikle tannik asit olarak bilinmektedirler bitkiler ve ekosistemleri arasındaki ilişkide önemli değere sahiptirler, örneğin otçullara karşı hareket edebilirler veya antimikrobiyal maddeler olarak rol oynayabilirler. Suda çözünürler ve moleküler ağırlıkları 500 ila 3.000 Da arasındadır, ayrıca su ve proteinler, jelatin ve alkaloidlerle çözünmez bir kompleks oluşturabilirler. Bu bileşikler çok sayıda hidroksil veya diğer fonksiyonel grupları içerir ve bu nedenle esterler veya heteroz formunda bulunurlar (Ferrer ve diğ. 2008). Böyle bileşikler kimyasal olarak çok reaktiflerdir ve moleküller arası hidrojen köprüleri oluşturabilirler. Ek olarak proteinleri çöktürme yeteneğine sahiptirler. Tükürük glikoproteinlerini çökeltmek birçok meyve ve bitki ürününün burukluğundan sorumlu olan yağlama kapasitesi kaybına yol açabilirler. Proteinler ve tanenler arasındaki bağ, bölgeye özgü proteinler ile tanenlerden gelen fenolik grup arasındaki hidrojen köprüleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu etkileşimin stabilitesi tanenlerin moleküler ağırlığına bağlıdır. Düşük moleküler ağırlıkta fenolik bileşik, bu kombinasyona stabilize vermek için etkileşimler kuramaz, ayrıca yüksek moleküler ağırlık, proteinlerdeki lif boşlukları arasında araya girmeyi önler (Ferrer ve diğ. 2008). Tanenler, metaller, demir klorür ve hatta belirli bitkisel enzimler tarafından kolayca oksitlenerek çözeltilerin koyulaşmasına neden olur (Chung ve diğ. 1998).

Tanenler kimyasal olarak suda çözünür ve suda çözünemez olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Suda çözünen tanenler şikimat yolağında gallik asit esterlerinin (gallotanenler) oluşmasıyla üretilirler. Bazı enzimlerle hidrolizden sonra asitler, bazlar ve gallik asit esterleri glikoz ve gallik asitleri üretir. Ellajitanninler, ellajik asit üretmek için laktonizasyona uğrar (Ferrer ve diğ. 2008; Ozawa ve diğ. 1987).

Kondanse tanenler yapısal olarak hidrolize edilebilir tanenlerden daha karmaşık ve tek tiptir. Flavan-3-ol'un ve flavan-3,4-diollerin oligomerleri ve polimerleridir, bitkisel gıdalardaki kondanse tanenlerin yapısı stereokimyada, molekül içi flavan bağlantılarının türü, polimerizasyon derecesi ve hidroksilasyonda farklılık gösterir (De Bruyne ve diğ. 1999). Procyanidinler ve prodelfinidinler en karakterize edilmiş tanenlerdir, her ikisi de flavan-3-ol monomerleri (C4-C8) ile bağlanır, ancak flavonoid B-halkasında hidroksilasyon derecesine göre farklılık gösterir. Polimerizasyon derecesi, dimerlerden polimerlere 30 veya daha fazla alt birime kadar değişebilir. Kondanse tanenler, meyveler, sebzeler, kırmızı şarap, kakao ve bazı tahıllar (sorgum ve parmak darı) ve baklagiller gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunur (Tsao 2010). Flavan-3-oiller ayrıca kateşin olarak da bilinmektedir, C-2 ve C-3 pozisyonlarında asimetric karbon atomları nedeniyle dört izomer sunarlar. Bu izomerler; (+) ve (-) - kateşinler: (-) - epikateşin, (+) - gallokateşin ve (+) – kateşin. Flavan-3,4-dioller, C-2, C-3 ve C-4'teki asimetric karbon atomlarından dolayı sekiz izomer sunar. Bu bileşiklerin bazıları arasında lökosiyanidin, lökopelargonidin, lökodelfinidin, guibourtacacidin, (+) - leucorobinetinidin, (-) - melacidin ve (-) - teracacidin bulunur (Tsao 2010).

1.1.3 Alkaloidler

İnsanlık tarihinin çoğunda, bitki ekstraktları ilaç ve zehirlerin yapımında kaynak olarak kullanılmıştır. Doğu Akdeniz'de haşhaş lateksinin (*Papaver somniferum* L.) kullanımı en azından M.Ö. 1400 ila 1200'e kadar dayanmaktadır. Eski insanlar şifalı bitki özlerini müshil, öksürük önleyici, yatıştırıcı ve yılan ısırığı, ateş ve delilik gibi çok çeşitli rahatsızlıklar için tedavi olarak kullanmışlardır. Tıbbi bitkilerin kullanımı Arabistan ve Avrupa'da batıya doğru yayılış gösterirken, yeni

demleme ve kaynatma yöntemleriyle yapılan içecekler tarihteki ünlü olaylarda rol oynamışlardır. Filozof Sokrates'e M.Ö. 399'daki idamı sırasında zehirli bir madde olan konin alkalodi içeren baldıran otu (*Conium maculatum* L.) özü içirilmiştir. Bir başka örnekte ise; M.Ö. geçen yüzyılda Kraliçe Kleopatra, göz bebeklerini genişletmek ve erkek siyasi rakiplerine daha çekici görünmek için atropin içeren banotu (*Hyoscyamus* L.) özütlerini kullanmıştır. Yüzyıllar boyunca, tüm tıbbi ilaçların kralı afyon olmuştur ve çoğunluğu afyon, kurutulmuş yılan eti ve şaraptan oluşan bir karışım olan Theriak şeklinde tüketilmiştir. Afyonun bileşenlerinin analizi, adını Yunan mitolojisinde rüyalar tanrısı Morpheus'tan alan morfinin tanımlanmasına yol açmıştır. 1806'da Alman eczacı Friedrich Sertürner (1783-1841) tarafından morfinin izolasyonu, alkaloidlerin araştırılmasına yol açmıştır. Alkaloid terimi, 1819'da Almanya'nın Halle şehrinde başka bir eczacı olan Carl Meissner tarafından verilmiştir, kökenini sodanın ilk izole edildiği bitki olan Arapça "al-qali" isminden almıştır. Alkaloidler başlangıçta farmakolojik olarak aktif, nitrojen içeren bitki kökenli temel bileşikler olarak tanımlanmışlardır. Alkaloidler bitkilere özgü bileşenler değildir. Sayısız hayvansal kaynaktan da izole edilmişlerdir, ancak her organizmada olup olmadığı hala belirlenmemiştir. Keşfedilen alkaloidlerin çoğu memelilerde farmakolojik olarak aktif değildir ve molekülde bulunan nitrojen atomuna rağmen bazıları karakter olarak bazik değil nötrdür (Croteau ve diğ. 2000).

Alkaloid içeren bitkiler, insanlığın orijinal tıbbi materyalidir. Birçoğu bugün hala reçeteli ilaçlar olarak kullanılmaktadır. En iyi bilinen reçeteli alkaloidlerinden birisi afyon çiçeğinden elde edilen öksürük önleyici ve analjezik etkileri olan kodeindir. Bitkisel alkaloidler, modern sentetik ilaçlar için model görevi de görmektedir. Örneğin; atropin göz muayenelerinde gözbebeğini genişletme için kullanılan tropikamid için, kinin ise klorokin için antimalaryal özelliği ile model olarak kullanılmıştır. Alkaloidler modern tıp üzerinde büyük bir etkiye sahip olmanın yanı sıra dünya jeopolitiğini de etkilemiştir. Ünlü örnekler arasında Çin ile İngiltere arasındaki Afyon Savaşları (1839-1859) ve koka bitkisinin doğal alkaloidi olan morfinin ve kokainin asetilasyonu ile elde edilen yarı sentetik bir bileşik olan eroinin yasadışı üretimini ortadan kaldırmak için çeşitli ülkelerde halihazırda sürmekte olan çalışmalar devam etmektedir (Croteau ve diğ. 2000).

Şu anda, Alkaloidler Sözlüğü 40.000'den fazla bileşen bildirilmiştir (Buckingham ve diğ. 2010) ve bunların birçoğu kökenlerine ve izole edildikleri bitki ve botanik familyasına göre (Tablo 1.2) adlandırılmıştır (Talapatra ve Talapatra 2015). Dahası, bitkilerde bulunan geniş alkaloid çeşitliliği ve bunları tutarlı bir şekilde tanımlayacak taksonomik bir temelin bulunmaması nedeniyle, sınıflandırmaları doğal veya biyokimyasal kökenlerine veya kimyasal yapılarına da dayanabilir, ikincisi en çok kullanılanıdır ve ana yapısına, yani bir C-N iskeletine dayanmaktadır. Bu bakımdan moleküler yapılarına göre ve biyosentetik yollarına göre, alkaloidler üç farklı türe ayrılabilir:

- gerçek alkaloidler (heterosiklikler),
- protoalkaloidler (heterosiklik olmayanlar) ve
- psödoalkaloidler (Ranjitha and Sudha 2015).

Gerçek Alkaloidler kimyasal olarak kompleks ve fizyolojik olarak aktif bileşenlerdir, siklik amino asit türevleridir. İntrasiklik bir nitrojene sahiptirler ve doğada oksalik, laktik, malik, tartarik, asetik ve sitrik asit gibi bazı organik asitlerle tuzlar oluştururken bulunabilirler (Talapatra ve Talapatra 2015; Henning 2013). Bu grubun alkaloidleri, L-ornitin, L-tirozin, L-fenilalanin, L-lisin, L-histidin, L-triptofan, L-arginin ve glisin/aspartik asit amino asitlerinin türevleridir (Kukula-Koch ve Widelski 2017); bu amino asitler, belirli bir alkaloid grubunun temelidir, örneğin, triptofan, indol, kinolin ve piroloindol alkaloidlerinin tabanıdır; tirozin amino asidi, izokinolin alkaloidlerinin temelidir; ornitin amino asidi tropan, pirolizidin ve pirolidin alkaloidleri için; lizin quinolizidin ve piperidin alkaloidleri için; aspartat piridin alkaloidinin temelidir; antranilik asit quinazolin, quinolin ve akridon alkaloidlerinin öncüsüdür; ve imidazol alkaloidleri histidin türevleridir (Aniszewski 2015; Böttger ve diğ. 2018; Kaur ve diğ. 2019). Heterosiklik alkaloidler, pirol, aporfin, quinolizidin, indol, indolizidin ve imidazol olarak ayrılmaktadır. Bu gruplarda, berberin, salsolin, geissopermin, piperin, nikotin, lobelin, nantenin, kokain, kunin, dopamin ve morfin alkaloidlerine rastlayabiliriz (Hussain ve diğ. 2018).

Kimyasal olarak protoalkaloidler nitrojen atomunu halkanın dışında bulundurulur, heterosiklik sistemin bir parçası olarak değil, bir yan zincirin parçası olarak içerirler; amino asitlerden veya biyojenik aminlerden türetilebilir. Bazı

protoalkaloidler meskalin, efedrin, kolşisin, katinon vs.'dir; ancak, doğada çok yaygın değildirler (Wansi ve diğ. 2013; Talapatra ve Talapatra 2015; Jayakumar ve Murugan 2016; Kukula-Koch ve Widelski 2017). Protoalkaloidler, sırasıyla feniletülamın ve terpenoid indolünden türetilen L-tirozin ve L-triptofandan türetilir. Meskalinen yaygın bulunan feniletülamın alkaloididir ve peyote kaktüsü olarak bilinen *Lophophora williamsii* J.M.Coult.'den elde edilebilmektedir (Beyer ve diğ. 2009). Monoterpenoid indol alkaloidleri Apocynaceae, Loganiaceae ve Rubiaceae familyalarında tespit edilen yaklaşık 3.000 çeşidi ile oldukça büyük bir gruptur (Pan ve diğ. 2016).

Psödoalkaloidler nitrojen içeren heterosiklik yapılara sahiptir ancak amino asitlerden türetilmezler, genellikle asetat, pirüvik asit, adenine/guanine veya geraniolden türetilmektedirler (Aniszewski 2015). Bu gruba bir örnek olarak, *Aconitum* L., *Consolida* Gray ve *Delphinium* L. cinsleri gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen diterpenoid alkaloidlerini (18, 19 ve 20 karbonlu) verebiliriz.

1.2 Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

İnsanlar ve diğer aerob canlılar oksijeni (O_2) tolere etme yeteneğine sahiptirler, çünkü bu organizmaların sahip oldukları elektron taşıma zincirleri ve geliştirdikleri diğer enzim sistemleri O_2 'nin toksik etkilerine karşı koruma sağlamaktadır. Bugün var olan anaerobik bakterilerin öncülleri ise, kendilerini O_2 'nin nüfuz etmediği ortamlarla sınırlayan "kör" evrimsel yolu izlemişlerdir. Bu nedenle, çok hücreli aerobların evrimi ve antioksidan savunma mekanizmaları yakın bir ilişki içermektedir. Serbest radikallere olan ilgi 1990 yılında trifenilmetil radikalinin ($Ph_3C\cdot$) varlığını tespit eden Moses Gomberg'in çalışmaları ile başlamıştır. Serbest radikal, bir yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan kimyasal maddelerdir (Gomberg 1900). Radikaller, reaktiviteleri değişiklik gösterse de, genellikle radikal olmayanlara göre daha az kararlı bileşenlerdir. En basit serbest radikal, hidrojen elementinin bir atomudur. Hidrojen atomu, bir proton ve onu bir serbest radikal olarak nitelendiren tek bir eşleşmemiş elektron içerir - genellikle bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronun mevcut olduğunu belirtmek için radikale noktanın (\cdot) eklenmesiyle gösterilir (Aruoma 1998).

Radikaller oluştuktan sonra ya başka bir radikalle ya da başka bir molekülle çeşitli etkileşimlerle reaksiyona girebilirler. Bu tür reaksiyonların hızı ve seçiciliği, radikallerin yüksek konsantrasyonlarına, radikalın tek elektronunun yer değiştirmesine (dolayısıyla ömrünün uzamasına) ve radikalın birlikte bulunduğu diğer moleküllerde zayıf bağların bulunmamasına bağlıdır. Çoğu biyolojik moleküller sadece çiftleşmiş elektronlar içeren radikal olmayan bileşenlerdir (Weiss 1935; Hey 1937; Waters 1943; Cadogan 1973; Moad ve Solomon 1995; Perkins 1996). Gerschman ve diğ. (1954) oksijen zehirlenmesi ve radyasyon hasarının, muhtemelen oksitleyici serbest radikallerin oluşumu ile olduğunu öne sürmüştür. Bu öncü görüş bilim insanlarının çalışmalarına ışık tutmuştur. 1960'ların başlarında, süperoksidin, ksantin oksidaz da dahil olmak üzere bir dizi enzimle ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak bu serbest radikalın enzime "bağlandığına" inanılıyordu. 1968'de süperoksidin hücrel toksisiteye yol açtığı keşfedilmiştir (McCord ve diğ. 1969; Aruoma 1993; Michelson 1997).

Serbest radikal reaksiyonlarının insan hastalıklarında, biyolojisinde, toksikolojisinde ve gıdanın bozulmasındaki rolü yoğun bir ilgi alanı haline gelmiştir. Lipit peroksidasyonunun serbest radikal reaksiyonu gıda endüstrisinde önemli bir konudur; üreticiler antioksidanları kullanarak lipit içeren gıdalarda oksidasyonu en aza indirip, raf ömrü boyunca besin kalitesini korumayı amaçlamaktadırlar. Tam aksine, biyomedikal araştırmacıları ve klinikçiler, reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı vücudu korumak amacıyla antioksidanları kullanırlar (Frankel 1980; Diplock 1991; Löligler 1991; Block 1992; Papas 1993; Porter 1993; Aruoma 1996; Duthie ve diğ. 1996; Pezzuto 1997; Hudson 2012).

1.2.1 Reaktif Oksijen Türleri

Canlı organizmalarda önemli serbest radikallerin arasında hidroksil (OH·), süperoksit (O₂^{·-}) nitrik oksit (NO·) ve peroksil (RO₂·) bulunur. Peroksinitrit (ONOO⁻), hipokloröz asit (HOCl), hidrojen peroksit (H₂O₂), tekli oksijen (¹O₂) ve ozon (O₃) serbest radikal değildir ancak canlı organizmalarda serbest radikal zincirinin oluşumuna kolayca sebep olabilirler. “Reaktif oksijen türleri” (ROT) terimi sadece OH·, RO₂·, NO· ve O₂^{·-} gibi radikalleri kapsamaz aynı zamanda HOCl, ¹O₂, ONOO⁻, O₃, and H₂O₂ gibi radikal olmayan türleri de içerir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumu hızlı oksijen alımı, NADPH oksidaz aktivasyonu ve süperoksit anyon radikalinin üretimi ile başlar.



O₂^{·-} daha sonra hızlı bir şekilde SOD tarafından H₂O₂'ye dönüştürülür.

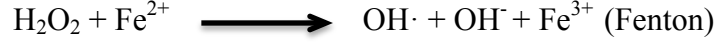


Reaktif oksijen türleri, mikroorganizmanın veya diğer yabancı maddelerin yok edilmesiyle sonuçlanan iki oksijene bağımlı mekanizmadan biri tarafından hareket edebilir. Reaktif türler ayrıca miyeloperoksidaz-halojenür-H₂O₂ sistemi tarafından da oluşturulabilir. Miyeloperoksidaz enzimi (MPO) nötrofil sitoplazmik

granüllerde mevcuttur. Klorür iyonunun varlığında, H₂O₂ güçlü bir oksidan ve antimikrobiyal ajan olan hipokloröz (HOCl) dönüştürülür (Babior 1999).



ROT, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları tarafından solunum patlaması yoluyla O₂ ve H₂O₂'den de üretilmektedir (Knight 1999).



Nitrik oksid sentez enzimi, arjininden nitrik oksit (NO·) gibi reaktif nitrojen türlerinin üretilmesine yol açmaktadır.



İndüklenebilir bir nitrik oksit sentaz (iNOS), bir O₂ söndürücü olarak işlev gören büyük miktarda NO·'yi sürekli olarak üretebilir. NO· ve O₂^{·-}, çok güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOO⁻) üretmek için birlikte reaksiyona girerler, dolayısıyla her biri diğerinin etkilerini modüle edebilir. Ne NO· ne de O₂^{·-} güçlü bir oksidan olmasa da, peroksinitrit çok çeşitli biyolojik hedeflere saldırabilen güçlü ve çok yönlü bir oksidandır (Zhu ve diğ. 1992).



Peroksinitrit, enzimdeki aromatik amino asit kalıntıları ile reaksiyona girerek aromatik amino asitlerin nitrasyonuna neden olur. Aminoasit kalıntısında oluşan böyle bir değişiklik enzim inaktivasyonuna neden olabilmektedir. Ancak nitrik oksit, tümör hücrelerine, çeşitli protozoalara, mantarlara, helmintlere ve mikobakterilere karşı savunmada önemli bir sitotoksik efektör moleküldür (Moncada ve Palmer 1991; Nathan ve Hibbs 1991). Diğer serbest radikal reaksiyon kaynakları, siklooksijenasyon, lipooksijenasyon, lipid peroksidasyonu, ksenobiyotik metabolizması ve ultraviyole radyasyonlardır (Shahidi ve Zhong 2010).

Serbest radikallerin oluşumu, ilgili biyolojik işlevleri yerine getiren sürekli bir fizyolojik süreçtir. Serbest radikal oluşum mekanizmaları çoğunlukla mitokondri,

hücre zarları ve sitoplazmada meydana gelir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), metabolizmanın kaçınılmaz yan ürünleri olarak oluşur. Metabolik süreçler sırasında, bu radikaller, çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda elektronların transferi için araçlar olarak hareket ederler. Metabolik süreçler sırasında sürekli serbest radikal üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının (enzimler ve glutatyon, metalotiyonin, A vitamini, C vitamini ve E vitamini gibi maddeler) gelişmesiyle sonuçlanmıştır. Antioksidanların, bu reaktif türlerin hücre içi seviyelerini sınırlandırması ve bunların neden olduğu hasarın oluşumunu kontrol etmesi amaçlanmıştır.

Oksidatif stres terimi, serbest radikal oluşumu ve antioksidan savunmalar arasındaki kritik denge elverişsiz olduğunda ortaya çıkan oksidatif hasarın durumunu tanımlamak için kullanılır (Rock ve diğ. 1996). Serbest radikal üretimi ve antioksidan savunmalar arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkan oksidatif stres, lipidler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türlere verilen hasarla ilişkilidir (Mc Cord 2000). Kısa süreli oksidatif stres, travma, enfeksiyon, ısı yaralanması, hipertoksi, toksinler ve aşırı egzersiz sonucu yaralanan dokularda meydana gelebilir. Bu yaralı dokularda, artan radikal üreten enzimler (örneğin, ksantin oksidaz, lipojenaz, siklooksijenaz) fagositlerin aktivasyonu, serbest demir salınımı, bakır iyonları veya oksidatif fosforilasyonun elektron taşıma zincirlerinin bozulması ile aşırı ROS üretimine neden olur.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve/veya reaktif nitrojen türlerinin (RNS) artan konsantrasyonunun neden olduğu nükleik asit, protein ve lipid moleküllerinde yapısal değişiklikler, nörolojik hastalıkların, kardiyovasküler hastalıklar, kanserin ortaya çıkmasına katkıda bulunabilecek çeşitli metabolik değişikliklere yol açar (Rahman 2007).

1.2.2 Oksidatif Stres ve Moleküler Hasar

Oksidatif stresin oluşma süreci, aşırı serbest radikal oluşumu veya bunların uzaklaştırılma hızı ile alakalı oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır. Bu süreç, biyomoleküllerin oksidasyonuna ve biyolojik işlevlerinin kaybına ve/veya homeostatik dengesizliklere yol açar ve bunların sonucunda, hücrelere ve dokulara yönelik potansiyel oksidatif hasarlar oluşur. ROS/RNS birikimi, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi bir dizi zararlı etkiye neden olabilir (Lushchak 2014).

1.2.2.1 Nükleik Asit Hasarı

DNA ve RNA kimyasal olarak kararsızdır. Endojen ve eksojen hasara duyarlılığı nedeniyle hidrolize, enzimatik olmayan metilasyona ve oksidasyona eğilimlidirler. Endojenik genotoksikler çoğunlukla hücrel metabolizma ile, ROS ve RNS oluşumuyla, lipid peroksidasyonu ile üretilen östrojen metabolitler ve aldehitlerle üretilmektedirler (Marengo ve diğ. 2016; Ranchoux ve diğ. 2016).

Nükleik asit hasarına sebep olan iki ana endojenik oksidan bulunmaktadır: hidroksil radikalleri ($\text{OH}\cdot$) ve peroksinitrit (ONO_2^-). Oksijenin %5'ine kadar tek elektron transferine uğradığı için ve süpekoksit anyon radikali (O_2^-) oluşturduğu için ROS ana kaynağı mitokondriyal solunumdur. Süperoksit dismutaz (SOD), O_2^- 'ni katalaz (CAT) veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından indirgenmesi gereken hidrojen peroksite dönüştürür, ancak geçiş metalleri mevcut olduğunda hidroksil radikallerine ($\text{OH}\cdot$) indirgenir. Bu radikaller yüksek reaktiviteye sahiptir, bu nedenle DNA ve RNA'yı oksitlemek için onlara yakın üretilmelidir. Peroksinitrit (ONO_2^-) oluşumu, her ikisi de makrofajlarda aynı anda üretilen nitrik oksit (NO) ve süperoksitin reaksiyonu ile meydana gelir. Bu örnekler nükleik asitleri doğrudan oksitleyebilmesine rağmen, oksidatif dengeyi bozmak için ikincil bir sinerjik mekanizması olan RNS, oksidasyona karşı bir DNA onarım mekanizması olan FAPY glikozilaz enzimini inhibe edebilir (De Bont ve van Larebeke 2004).

Oksidatif stres, nükleotid bazlarının doğrudan modifikasyonu, apuridik/apirimidinik bölgeleri, tek iplik kopması ve çok daha az sıklıkla çift iplik

kırılması dahil olmak üzere DNA'da farklı lezyonlara yol açabilir. Nükleotidlerin tüm bazıları düşünüldüğünde; daha düşük indirgeme potansiyeline sahip olduğu ve hidroksil radikalleri C4, C5 ve C8 pozisyonlarında bu azotlu bazın imidazol halkası ile etkileşime girdiği için en çok guanin oksidatif değişikliklere duyarlıdır (Smith ve diğ. 2013).

RNA oksidasyonu için en ilgili markır homolog 8-hidroksiguanozindir. ROS ve RNS oluşumuna daha yakın hücrel konumu nedeniyle RNA'nın DNA'dan daha sık oksitlendiği açıklığa kavuşturulmuştur. RNA oksidasyonunun başlıca sonuçları, doğru protein üretimini engelleyen zincir kırılmaları ve ribozomal fonksiyon bozukluklarıdır (Pisoschi ve Pop 2015).

1.2.2.2 Protein Hasarı

Oksidasyonun proteinlerdeki etkileri, bozulmuş protein katlanması, yan zincir oksidasyonu ve omurga parçalanmasında gözlemlenebilir, bu da fonksiyon kaybına ve çeşitli biyokimyasal süreçlerin durdurulmasına neden olur. Amino asitler arasında sisteinler ve metiyoninler daha kolay oksitlenebilir ancak bu reaksiyon disülfid redüktaz aktivitesi ile tersine çevrilebilir. Lizin, prolin, arjinin ve treonin amino asitleri oksitlendiğinde, oksidatif stres için belirteç olarak kullanılan karbonil türevlerinin üretimi meydana gelir. Tirozin gibi aromatik amino asitlerin oksidasyonunda, ROS-dityrosin veya RNS –3-nitrotirozin ile etkileşimi nedeniyle farklı ürünler oluşur (Pisoschi ve Pop 2015).

Bu oksitlenmiş-modifiye olmuş proteinler genellikle hücrelerde tanınır ve bozulurlar, ancak bazıları zamanla birikebilir ve hücrel işlev bozukluğuna yol açabilir. Fizyolojik bir örnek, proteinlerin ve lipidlerin demir ile katalize edilmiş oksidasyonunun (polimerizasyon) bir ürünü olan kahverengi-sarı bir pigment olan lipofusin, proteolize son derece dirençli olduğu için birikir ve yaşlanma belirteci olarak kullanılır (Amir Aslani ve Ghobadi 2016).

1.2.2.3 Lipit Hasarı

Biyolojik sistemlerde, lipid peroksidasyonu, biri enzimatik olarak, siklooksijenaz ve lipoksijenazın yağ asitlerinin oksidasyonu ve geçiş metali, reaktif türler oksijen, nitrojen ve diğerlerini içeren enzim olmayan ortamların katılımıyla iki biçimde meydana gelir (Ayala ve diğ. 2014). Araşidonik asitten prostaglandin oluşumuna kademeli reaksiyondaki önemi nedeniyle aşırı peroksidasyon sonuçları, inflamatuvar yanıtta katkıda bulunmasına rağmen hücreye çok zarar verir. Serbest radikallerin lipitler üzerindeki etkisi, artan hücresel toksisiteye katkıda bulunan ve oksidatif stresi ölçmek için biyolojik numunelerde tespit edilebilen malondialdehit, 4-hidroksinonenal ve izoprostanlar gibi lipid hidroperoksitler ve aldehitlerin oluşumuna yol açar. Lipit peroksidasyonu, hem hücrenin kendisini çevreleyen hem de organellerin zarlarında bulunan lipid çift katmanlarının normal yapısını ve işlevini bozar. Özellikle lipit peroksidasyonu, zar geçirgenliğini, geçişini ve akışkanlığını değiştirmektedir (Morita ve diğ. 2016). Söz konusu sürecin kronikliği, ateroskleroz, diyabet, obezite, nörodejeneratif bozukluklar ve kanser dahil olmak üzere birçok kronik hastalığın etiyolojik süreci için önemli etkilere sahiptir (Lovel 1995).

1.3 Antioksidan Savunma

Antioksidanlar veya oksidasyon inhibitörleri, oksidasyonu geciktiren veya önleyen ve genel olarak oksitlenebilir maddenin ömrünü uzatan bileşiklerdir (Kokate, 2004). Antioksidan savunmanın varlığı evrensel olsa da türden türe farklılık gösterebilir (Nimse ve Pal 2015). Panchawat ve diğ. (2010) antioksidanları çözünürlüklerine ve savunma hattına göre iki grupta incelemişlerdir. Çözünürlüklerine göre antioksidanları hidrofilik ve hidrofobik antioksidanlar olarak gruplandırmışlardır. Hidrofilik antioksidanlar, suda çözünebilen antioksidanlardır ve hücre sitoplazmasında ve kan plazmasındaki oksidanlarla reaksiyona girerler. Hidrofobik antioksidanlar yağda çözünmektedirler ve hücre membranını lipit peroksidasyonundan korurlar. Savunma hattına göre göre antioksidanları üç grupta toplamışlardır. Birincil savunma hattı (koruyucu antioksidanlar) süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GTx), glutatyon redüktaz benzeri

enzimleri ve Se, Mn, Cu gibi bazı mineralleri kapsamaktadır. İkincil savunma hattı (radikal giderici antioksidanlar), glutatyon, Vitamin C, ürik asit, albümin, bilirubin, vitamin E, karetonoidler, flavonoidler v.b. antioksidanlardan oluşmaktadır. Üçüncü savunma hattı (onarıcı ve yenileyici enzimler) ise DNA, protein, okside olmuş lipit ve peroksitleri onaran kompleks enzimleri içermektedir. Bu enzimler, biyomoleküllere verilen zararı onarır ve hasarlı hücre zarını yeniden oluşturur (Gupta ve diğ. 2006; Panchawat ve diğ. 2010).

Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalar serbest radikallerin etkilerini önlemek amacıyla endojen antioksidan sisteme sahiptirler. Bu sistemler enzimatik olan ve olmayan diye iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 1.2).

Tablo 1. 2: Antioksidanların sınıflandırılması (Çaylak 2011)

Antioksidan Enzimler	Rolü	Özellikleri
Superoksit dizmutaz (SOD)	$O_2^{\cdot -}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürür.	Manganez içerir (Mn-SOD) Bakır ve çinko içerir (CuZn-SOD) Mn ve Fe içerir (Fe-SOD) Ni içerir (Ni-SOD) Bakır içerir (Cu-SOD)
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Peroksizomlerde yer alan tetramerik bir proteindir.
Glutatyon peroksidaz (GPx)	H_2O_2 ve lipit peroksitlerini etkisizleştirir.	Selenoprotein (Se^{2+} içerir), daha çok sitozolde, az olarak mitokondride bulunur ve GSH kullanır.
Antioksidan Vitaminler	Rolü	Özellikleri
Alfa tokoferol	Lipit peoksidasyonunu kırar. Lipit peroksitlerini $O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} 'yi temizler.	Yağda çözünür.
Beta karoten	Peroksi radikalleri ile $O_2^{\cdot -}$ ve OH^{\cdot} 'yi temizler. Vitamin A'nın oksidasyonunu önler. Geçiş metallerini bağlar.	Yağda çözünür.
Askorbik asit	Direk olarak $O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} ve H_2O_2 'yu temizler. Nötrofiller tarafından uyarılan antioksidanları nötralize eder. Vitamin E'nin rejenerasyonunu sağlar.	Suda çözünür.

Antioksidan savunma sisteminin birincil amacı, oksidatif süreci fizyolojik sınırlar içinde tutmak ve oksidatif hasarın yayılmasını ve sistemik onarılamaz hataların oluşmasını önlemektir. Enzimatik savunma sistemi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri içermektedir. Bu enzimler, serbest radikal ve radikal olmayan türlerin oluşumunu önleme veya kontrol altına alma mekanizmaları aracılığıyla hareket eder. CAT ve GPx enzimleri hidrojen

peroksit birikimini engellemek amacıyla hareket eder. Bu tür entegre eylemler büyük önem taşımaktadır, çünkü Fenton ve Haber-Weiss'in reaksiyonları demir ve bakır metallere katılımıyla reaktif türler, enzim sistemi savunması olmayan OH• radikalinin oluşmasıyla sonuçlanır (Schneider ve Oliveira 2004; Uhl ve diğ. 2015).

SOD endojen olarak üretilen metalloenzim grubu olan her hücrede bulunan esansiyel bir enzimdir. SOD beş farklı şekilde bulunur: vücutta en fazla rastlanan türü CuZn-SOD sitoplazmada bulunur. Mn-SOD mitokondrilerde; Fe-SOD *Bacteroides fragilis* ve *Propionibacterium shermanii* bakterilerinde anaerobik ortamlarda, aerobik ortamlarda Mn içeren SOD enzimi kullanılır. Ni-SOD, *Streptomyces griseus* bakterilerinde bulunan bir izoenzimdir (Baskin 1997). Marklund tarafından 1982'de tanımlanan Ekstraselüler SOD (EC-SOD), bakır ve çinko taşıyan fibroblast ve endotel hücrelerden salgılanan hücre yüzeyinden eksprese edilen bir SOD türüdür. SOD ROS'lardan süperoksit bir elektron transfer ederek H₂O₂'ye indirgenir. H₂O₂ ise CAT ve GPx ile suya indirgenir. SOD'un antioksidan etkisi süperoksit ile Fe³⁺'ün Fe²⁺'ye indirgenmesiyle hidroksil radikalinin oluşmasını engelleyerek ortaya çıkar (Baskin 1997). SOD maksimum aktivite için bakır, çinko ve manganez; GPx selenyum; CAT ise demir gibi geçiş metallere kofaktörlüğüne gereksinim duymaktadır (Garewal 1997).

İnsan organizması, sürekli olarak, ilaçlar ve alkol gibi oksidatif strese neden olabilecek çok sayıda moleküle maruz kalır. Bununla birlikte, detoksifikasyon ve antioksidan protein üretiminden sorumlu 100'den fazla gen tarafından oluşturulan oksidatif stres tepkisine karşı korunmuş bir hücresel bileşen bulunmaktadır. Eksojen toksinlere karşı antioksidan savunmanın ilk kısmında, faz I ve II metabolizmasında yer alan enzimleri içerir. Faz I metabolizması oksidasyon, indirgeme veya hidroliz reaksiyonları yoluyla artan bileşik polaritesinden sorumludur. Diğer yandan faz II metabolizması, bu bileşiklerin hücresel dışa aktarımını kolaylaştırmaktan sorumludur; reaksiyonları esas olarak glukuronidasyon, asetilasyon ve sülfatlamadır (Jacob ve Winyard 2009). Sitokrom P450'yi oluşturan enzimler, ilaçların, kimyasalların ve kolesterol, D3 vitamini ve araziidonik asit gibi çeşitli endojen substratların oksidasyonundan en çok sorumlu olanlardır (Bhattacharyya ve diğ. 2014). P450, 2000'den fazla üyesi olan hem-tiyol enzimlerinin süper ailesidir (Lewis 2003). İnsanlarda, 57 fonksiyonel gen ve 58 psödogen, 18 aile ve 44 alt ailedeki

sekans benzerliğine göre gruplandırılır. 1, 2 ve 3 ailelerine ait olan CYP enzimleri ilaçların yaklaşık %90'ını metabolize edilmesinden sorumludur, bu faz I ilaç oksidasyon sistemi sıklıkla gereğinden fazladır, ancak birçok ilaç bir veya birkaç CYP tarafından klinik bir konsantrasyona metabolize edilir (Zanger ve Schwab 2013). Steroidojenik dokularda (kolesterolü P450 yan zincir bölünme enzimi yoluyla pregnenolona dönüştürür) mitokondride bulunan CYP450 enzimlerine oldukça fazla bulunur ve elektron taşıma sistemi oksidatif strese çok duyarlıdır. Elektron taşınması sırasında, nihai alıcıya bir elektron sızıntısı, bunların oksijene bağlanmasına yol açar, bu da birincil bir ROS kaynağı olarak kabul edilir, bu durum mitokondride ROS üretiminin hızlanmasına neden olabilir. Bu bağlamda, NADPH'den CYP enzimlerine elektron transferinin bir ROS kaynağı olarak substratların monooksijenasyonu için etkinliği olarak kabul edilir; çünkü ayrılma reaksiyonu sırasında, herhangi bir substrat olmaksızın elektron transfer zinciri NADPH'yi okside eder ve ROS üretir. CYP2E1 metabolizması sırasında sıklıkla bu tür ayrılma reaksiyonları gözlenir, bu nedenle bu enzim ROS üretimi ve oksidatif stres ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Bhattacharyya ve diğ. 2014). CYP2E1 enzimi, küçük moleküllerin metabolizmasıyla ilişkilidir ve etanol, obezite, diyabet ve çoklu doymamış yağ asitleri ile indüklenebilir; bu indüksiyon toksisite ve oksidatif stres ile ilgilidir. CYP2E1 aktivasyonunun bir başka mekanizması, örneğin asetaminofen uygulaması üzerine glutatyon seviyelerinin azalmasıdır. Ayrıca, bu ilaç lipid peroksidasyonunu ve protein karbonilasyonunu artırarak, CYP2E1'in daha yüksek aktivitesi nedeniyle ROS üretimini artırır ve MAP kinaz yolağının aracılık ettiği hepatotoksisiteyle ilişkilendirilir (Bhattacharyya ve diğ. 2014; Tanaviyutpakdee ve diğ. 2015).

Glutatyon S-transferaz (GST), endojen ve eksojen toksinlerin hücreler üzerindeki etkisini önleyen bir hücre içi enzim ailesidir. GST'ler, ksenobiyotik metabolizmanın faz II'sine katılan ve indirgenmiş glutatyon formunun (GSH) potansiyel olarak tehlikeli bileşiklere nükleofilik saldırısını katalize eden çok işlevli enzimlerdir. İzoenzimlerin eksikliğinin bir organizmanın karsinojenlere toleransı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu varsayılır (Zheng ve diğ. 2002). İnsan GST'leri sitozolik/nükleer, mitokondriyal ve mikrozomal olarak kategorize edilir. Amino asit dizilerine ve/veya nükleotid substrat özgüllüğüne ve immünolojik özelliklerine bağlı olarak, yedi sitosolik GST sınıfı açıklanmaktadır: Alfa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega ve Zeta. GST enzimleri, örneğin polisiklik aromatik

hidrokarbonlar, fenilalanin ve tirozin amino asitler, testosteron ve progesteron gibi endojen ve eksojen bileşiklerin metabolizmasına katılır. Bu enzimler, hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonundan ve reaktif oksijen türlerinin aktivitesinden türetilen endojen bileşikleri hedefler (Sheehan ve diğ. 2001; Lo ve Ali-Osman 2007; Huber ve diğ. 2008).

Enzimatik olmayan antioksidanlardan en çok bilinenlere alfa tokoferol (vitamin E), beta-karoten (vitamin A), askorbik asit (vitamin C) örnek verilebilir. Vitamin E hücrelerde esansiyel olarak bulunması gereken yağda çözünen ve 8 farklı tipi (α , β , γ ve δ -tokoferol ile α , β , γ ve δ -tokotrienol) olan bir antioksidandır. Diğer vitaminler gibi enzimatik reaksiyonlarda kofaktör görevi olmadığı için bir enzimden daha çok antioksidan olarak tanımlanmıştır (Baskin 1997). Asıl görevi hücre membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu ve hasar görmesini engellemektir. Tokoferol-OH serbest radikale elektron transfer ederek, hücre membran proteinleri ve lipitlerinin peroksidasyonunu engeller ve tokoferol-O• radikali meydana gelir. Ortamda yeterli askorbik asit bulunması durumunda tokoferol-O• askorbat ile etkileşime girerek etkisiz hale getirilir (Carr ve diğ. 2000).

Karotenoidler meyve ve sebzelere renk veren antioksidan maddelerdir. α -karoten, β -karoten, likopen, krosetin, kantaksantin ve fukoksantin gibi bilinen çeşitleri vardır. İki molekül vitamin A'nın birleşmesiyle oluşan β -karoten, singlet oksijeni yakalayarak, serbest radikalleri temizler ve hücre membranını lipit peroksidasyonundan koruyarak antioksidan etki gösterir (Everett ve diğ. 1996).

Suda çözünebilen Vitamin C, turuncgiller, patates, domates ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunan antioksidandır. Redükte edici özelliği ile serbest radikal ve ROSları etkisiz hale getirebilirler ve bu özellikleriyle bakır ve demir tuzlarını indirgeyebilirler. Askorbik asit tarafından Fe^{2+} ye indirgenen Fe^{3+} sayesinde hidrojen peroksit hidroksil radikallerine dönüşür (Proteggente ve diğ. 2000).

Glutatyon (GSH), vücutta sistein, glisin ve glutamattan sentezlenen, hidroksil radikalleri ve singlet oksijenin temizlenmesinde rol alan bir diğer antioksidandır. Ksenobiyotiklere karşı da vücudu koruyarak lipit peroksidasyonunu engeller (Maher ve diğ. 2008). Tüm canlı hücrelerde bulunan Koenzim Q10, mitokondrilerde enerji üretimi için gereklidir ve serbest radikallere karşı vücudu korur (Sumien ve diğ.

2009). Antioksidan olarak görev alan ürik asit de güçlü bir singlet oksijen, peroksil radikali (ROO•) ve OH• temizleyicisidir (Sinha 2009). Ekstraselüler antioksidan savunma sisteminin ana bileşeni olan albümin bakır ve demiri kendine bağlayarak Haber-Weiss reaksiyonlarına katılır oluşan, OH• albümin tarafından etkisiz hale getirilir. Diğer plazma proteinleri serüplazmin ve transferrin de antioksidan aktivite göstermektedir (Soriani 1994).

Endojen antioksidanlar, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler veya ürik asit, bilirubin, albümin, metalotiyoninler gibi enzimatik olmayan bileşiklerdir. Endojen faktörler, reaktif oksijen türlerine karşı organizmanın sıkı bir kontrolünü ve tam bir korumasını sağlayamadığında, eksojen antioksidanlara, aktif madde olarak bir antioksidan bileşik içeren besin takviyeleri veya farmasötik ürünler olarak ihtiyaç doğar. En önemli eksojen antioksidanlar arasında E vitamini, C vitamini, β-karoten, E vitamini, flavonoidler, Se minerali iyi bilinmektedir, aynı zamanda D vitamini ve K vitamini de iyi bilinmektedir. Eksojen antioksidanlar doğal kaynaklardan (vitaminler, flavonoidler, antosiyaninler, bazı mineral bileşikler) türetilir, ancak butilhidroksianisol, butilhidroksitoluen, galatlar vb. gibi sentetik bileşikler de olabilir (Litescu ve diğ. 2011). Özellikle insan vücudundaki serbest radikallerin zararlı etkilerinin yanı sıra yağların ve diğer gıda maddelerinin bozulmasının önlenmesi amacıyla antioksidanlara artan bir ilgi vardır (Molyneux 2004).

Son zamanlarda, antioksidanlar, radikaller ve oksidatif stres, kanser koruması ve tedavisi ve uzun ömürlülük ile ilişkili olarak büyük ilgi görmektedir (Kalcher ve diğ. 2009). Böyle durumlarda tirozinaz, fenol oksidazlar gibi enzimler ve bu enzimleri içeren bitki dokuları tarafından belirlenebilen fenoller ve polifenoller dikkat çekmektedir (Zoulis ve Efstathiou 1996; Eggins ve diğ. 1997; Cummings ve diğ. 1998; Capannesi ve diğ. 2000; Romani ve diğ. 2000; Volikakis ve Efstathiou 2000; Cummings ve diğ. 2001; Kong ve diğ. 2001; Kim ve diğ. 2002; Labuda ve diğ. 2002; Korbut ve diğ. 2003; Busch ve diğ. 2006; Mena ve diğ. 2007; Granero ve diğ. 2008; Ly 2008). Epidemiyolojik çalışmalar, meyveler, sebzeler ve daha az işlenmiş temel gıdaların, kanser, koroner kalp hastalığı, obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon ve katarakt gibi oksidatif stresin neden olduğu hastalıkların gelişimine karşı en iyi korumayı sağladığını göstermektedir (Halvorsen ve diğ. 2002). Sağlığa yararlı

etkileri meyve ve sebzelerde bulunan antioksidanlardan kaynaklanmaktadır (Halvorsen ve diğ. 2006). Diyet bitkilerinde çok sayıda antioksidan bulunmaktadır: karotenoidler, fenolik bileşenler, benzoik asit türevleri, flavonoidler, proantosiyanidinler, stilbenler, kumarinler, lignin ve ligninler (Lindsay ve Hassanien 2008).

1.4 Antioksidan Kapasite Belirleme Metotları

Antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacıyla farklı gruplarda incelenen çeşitli analitik metotlar bulunmaktadır.

1.4.1 Spektrofotometrik Teknikler

Spektrofotometrik teknikler radikallerin reaksiyonlarına, radikal katyonu veya antioksidan molekül içeren kompleksin hidrojen atomu verme yeteğine dayanmaktadır (Brand-Williams ve diğ. 1995; Slavíková ve diğ. 1998; Arya ve diğ. 2000; Ou ve diğ. 2001, 2002; Gi ve diğ. 2002; Apak ve diğ. 2004; Cízová ve diğ. 2004; Marc ve diğ. 2004; Thaipong ve diğ. 2006; Chong ve Olsher 2007; Su ve diğ. 2007; Borowski ve diğ. 2008; Jayaprakasha ve diğ. 2008; Olsher ve Chong 2008; Pisoschi ve diğ. 2009; Denev ve diğ. 2010; Giardi ve diğ. 2010; Magalhaes ve diğ. 2011; Meng ve diğ. 2011).

1.4.1.1 DPPH Methodu

DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), tüm molekül üzerindeki yedek elektronun yer değiştirmesinden dolayı stabil bir serbest radikaldir. Bu nedenle DPPH, çoğu serbest radikalde olduğu gibi dimerize olmaz. DPPH molekülü üzerindeki delokalizasyon, maksimum 520 nm absorpsiyon bandıyla mor bir rengin oluşması ile belirlenir. DPPH• bir hidrojen vericiyle reaksiyona girdiğinde, mor rengin kaybolmasıyla birlikte indirgenmiş (moleküler) form (DPPH) oluşturulur. Bu nedenle, absorbans azalması doğrusal olarak antioksidan konsantrasyonuna bağlıdır (Thaipong ve diğ. 2006; Pisoschi ve diğ. 2009).

1.4.1.2 ABTS Metodu

743 nm'de emilen (mavimsi-yeşil bir renk veren) ABTS katyon radikali (ABTS^{•+}), ABTS'nin (2,2'-azino-bis (3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)) nitrojen atomunun elektron kaybetmesiyle oluşmaktadır. Trolox'un veya başka bir hidrojen veren antioksidanın varlığında, nitrojen atomu hidrojen atomunu söndürerek çözelti rengini giderir. ABTS potasyum persülfat veya mangan dioksit tarafından okside edilebilmektedir (Serafini ve diğ. 2002; Pellegrini ve diğ. 2003; Su ve diğ. 2007), antioksidan varlığı 743 nm'de absorbansı azalan ABTS katyon radikaline (ABTS^{•+}) yol açmaktadır.

1.4.1.3 FRAP Metodu (Demir İndirgeme Antioksidan Gücü)

FRAP metodu demir iyonu- TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin) kompleksinin antioksidan tarafından indirgenmesine dayanmaktadır. Fe²⁺'nin liganda bağlanması çok yoğun bir lacivert renk oluşturur. İndirgenen demir miktarı ile antioksidan miktarı korelasyon göstermektedir. Referans olarak trolox veya askorbik asit kullanılmaktadır (Gi ve diğ. 2002; Pellegrini ve diğ. 2003; Thaipong ve diğ. 2006).

1.4.1.4 ORAC Metodu (Oksijen Radikali Absorblama Kapasitesi)

Bu yöntem, 37°C'de 2,2'-azobis- (2-amidino-propan) dihidroklorür (AAPH) ile uyarılan peroksil radikaline karşı antioksidan giderim aktivitesini ölçer. Floresan prob olarak floresein kullanılır. Floresans kaybı, peroksil radikali ile reaksiyonundan kaynaklanan bozunmanın derecesinin bir göstergesidir (Thaipong ve diğ. 2006; Denev ve diğ. 2010).

1.4.1.5 HORAC Metodu (Hidroksil Radikal Giderim Kapasitesi)

Bu teknik, Fenton benzeri reaksiyon koşulları altında antioksidanların metal şelatlama aktivitesinin ölçülmesine dayanır. Bu yöntemde, bir Co (II) kompleksi

kullanılır ve dolayısıyla hidroksil radikali oluşumuna karşı koruma kabiliyetini değerlendirilir. Floresan analiz edilecek numune ile inkübe edilir, daha sonra Fenton karışımı (hidroksil radikalleri üreten) eklenir. Başlangıç flüoresansı ölçülür ve çalkalamadan sonra her dakika okumalar yapılır. Standart madde olarak gallik asit kullanılır (Ou ve diğ. 2002; Denev ve diğ. 2010).

1.4.1.6 TRAP Metodu (Total Peroksil Radikali Yakalama Antioksidan Parametresi)

Luminol ile güçlendirilmiş kemilüminesans (CL) (Cízová ve diğ. 2004; Denev ve diğ. 2010), peroksil radikalini içeren reaksiyonları izlemek için kullanılmıştır. CL sinyali, AAPH'nin (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) termal ayrışmasından kaynaklanan luminol türevi radikallerin üretimi tarafından yönlendirilmektedir. TRAP değeri, antioksidanların mevcudiyetine bağlı olarak numunenin kemilüminisans sinyalini söndürdüğü periyodun süresinden belirlenmektedir.

1.4.1.7 Lipit Peroksidasyonu İnhibisyon Metodu

Lipit peroksidasyon inhibisyonu tahlil yöntemi, lipit (örneğin yağ asidi) peroksidasyonunu indüklemek için Fenton benzeri bir sistem (Co (II) + H₂O₂) kullanmaktadır (Slavíková ve diğ. 1998; Denev ve diğ. 2010). Model substrat olarak α -linolenik asit seçilmektedir. Lipid peroksidasyonunu indüklemek için analiz edilen numuneyle ve Fenton benzeri bir karışımla karıştırılmaktadır. İnkübasyon sonrasında, lipid peroksidasyon indeksi olarak tiyobarbitürik asitle reaktif maddelerin (TBARS) konsantrasyonu ölçülmektedir. Lipid peroksidasyonu, 1 mL α -linolenik asit/analiz edilen numune karışımı başına nmol TBARS olarak ifade edilmektedir.

1.4.1.8 PFRAP Metodu (Potasyum Ferrisiyanit İndirgeme Gücü)

Absorbans artışı, antioksidanların/antioksidan ekstraktların indirgeme kabiliyetiyle ilişkilendirilmektedir. Antioksidan kapasiteye sahip bileşikler,

potasyum ferrosiyandır oluşturmak için potasyum ferrisiyanür ile reaksiyona girer. Daha sonra, ferrik triklorür ile reaksiyona girerek, 700 nm'de maksimum absorbans ile mavi renkli bir kompleks olan ferrik ferrosiyandır verir (Jayaprakasha ve diğ. 2008; Meng ve diğ. 2011).

1.4.1.9 CUPRAC Metodu (Bakır İndigeme Antioksidan Gücü)

Standart antioksidan veya ekstraktlar CuSO_4 ve neokuprin ile karıştırılır. 30 dakika sonra 450 nm'de absorbansları ölçülür. Bu yöntemde, antioksidanların varlığında Cu(II) Cu(I) 'e indirgenmesine dayanmaktadır. Sonuçlar trolokse eşdeğer olarak hesaplanmaktadır (Apak ve diğ. 2004).

1.4.2 Florimetrik Yöntemler

Floresan, ışığı veya farklı dalga boyundaki diğer elektromanyetik radyasyonu emen bir madde tarafından ışığın yayılmasıdır. Çoğu durumda, yayılan ışık daha uzun bir dalga boyuna ve bu nedenle emilen radyasyondan daha düşük enerjiye sahiptir. Floresans emisyonu, bir molekülün yörünge elektronu, bir tür enerji tarafından daha yüksek bir kuantum durumuna uyarıldıktan sonra bir ışık fotonu yayarak temel durumuna gevşediğinde meydana gelir. Floresans testi, antioksidan içeriğinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Arya ve diğ. 2000; Chong ve Olsher 2007; Borowski ve diğ. 2008; Olsher ve Chong 2008; Mangalhaes ve diğ. 2011). Yağlarda fenolik bileşiklerin belirlenmesi için floresans spektroskopisi uygulanmıştır. Ayçiçeği ve soya fasulyesinden üretilen biyodizeldeki butilhidroksianisol (BHA) ve tert-butilhidrokinon (TBHQ) antioksidanlarının konsantrasyonunu ölçmek amacıyla flüoresansa dayalı yöntem önerilmektedir. Çözeltilerin floresansı ve uyarılma spektrumları, bir spektrofluorimetre kullanılarak oda sıcaklığında kaydedilmektedir.

1.4.3 Elektrokimyasal Teknikler

Elektrokimyasal teknikler antioksidan içeriği ve antioksidan kapasiteyi belirlemek için uygulanmaktadır. Dönüşümlü voltametri ve biyamperometri en yaygın olarak kullanılanlardır.

1.4.3.1 Dönüşümlü voltametri metodu

Döngüsel voltametri, bir çalışma elektrodunun potansiyeli, ilgili akım yoğunluğu kaydedilirken bir başlangıç değerinden son değere ve geriye doğru doğrusal olarak taranır. Döngüsel voltametri (CV), kan plazmasının, doku homojenatlarının ve bitki özütlerinin Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidan kapasitesinin kantitasyonu için uygun bir metodoloji olduğu onaylanmıştır. Kuru bitki özlerinin (Campanella ve diğ. 2006) antioksidan kapasitesi (mg askorbik asit eşdeğeri olarak ifade edilir) camısı karbon çalışma elektrotunda gerçekleştirilen döngüsel voltametri ile belirlendi. Karabuğday ürünlerinde antioksidan kapasite tayininin döngüsel voltametri sonuçları, spektrofotometri ile elde edilen verilerle iyi bir korelasyon göstermiştir (Zielinska ve diğ. 2007).

1.4.3.2 Amperometrik metot

Amperometrik yöntem, sabit (uygulanan) bir potansiyel değerinde çalışan bir elektrot ile bir referans elektrot arasında akan akımın yoğunluğunun ölçülmesini içerir. Oluşan akım, elektroaktif bir analitin oksidasyonu/indirgenmesi ile üretilir. Potansiyelin değeri, bir referans elektrota (Blum ve Coulet 1991; Scheller ve Schubert 1992; Kellner ve diğ. 1998) göre ayarlanmış bir değerde tutulur. Antioksidan aktivitenin (Milardovic ve diğ. 2006) amperometrik tayini, camısı karbon elektrotta 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilin (DPPH •) indirgenmesine dayanmaktadır.

1.4.3.3 Biamperometrik metot

Biamperometrik yöntem, küçük bir potansiyel farkında polarize edilmiş ve tersine çevrilebilir bir redoks çifti içeren bir solüsyona daldırılmış iki özdeş çalışan elektrot arasında akan akımın ölçülmesine dayanır. Dolaylı biyamperometrik ölçüm, analitin gösteren redoks çifti ile reaksiyonuna, seçiciliğine redoks çiftinin oksitlenmiş veya indirgenmiş formunu ve analiti içeren reaksiyonun özgülüne bağlıdır. Fe^{3+}/Fe^{2+} , I_2/I^- , $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ biyamperometrik ölçümlerde yaygın olarak kullanılan redoks çiftleridir (Tougas ve diğ. 1985). DPPH•/DPPH biyamperometrik çalışmalarda seçilen yaygın bir redoks çiftidir. Antioksidanlar, DPPH• (indirgenmiş form) üreten DPPH• ile reaksiyona girer (radikal form), ortaya çıkan akımın yoğunluğu, analit (antioksidan) ile reaksiyonundan sonra DPPH'nin kalan konsantrasyonuyla orantılıdır (Milardovic ve diğ. 2005; Pisoschi ve diğ. 2009).

1.4.3.4 Biyosensör Metodu

Oksidoredüktazlar, kataliz sırasında elektron transfer özelliklerinden dolayı biyosensör uygulamalarında en sık kullanılanlardır. Bu enzimler, kararlı olma avantajlarını sunar ve bazı durumlarda koenzimler veya kofaktörler gerektirmez. Biyosensörler tarafından antioksidan ve antioksidan kapasite tayinine atıfta bulunan birkaç inceleme ve kitap bulunmaktadır (Mello ve Kubota 2007; Prieto-Simon ve diğ. 2008; Cortina-Puig ve diğ. 2010; Giardi ve diğ. 2010; Barroso ve diğ. 2011). Biyosensörlerin antioksidan durumunun değerlendirilmesi için potansiyel uygulamaları arasında süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet-}$) izlenmesi, nitrik oksitin (NO) izlenmesi, glutatyonun izlenmesi, ürik asit, askorbik asit veya fenolik bileşiklerin izlenmesi yer alır (Mello ve Kubota 2007). Sıklıkla polifenoller, onları içeren birkaç bitkinin antioksidan kapasitesine ana katkı sağlar. Tirozinaz, lakkaz veya peroksidaz gibi enzimler temelinde fenolik bileşiklerin tespiti için birkaç amperometrik biyosensör geliştirilmiştir (Gomes ve Rebelo 2003; Büyükbayram ve diğ. 2006; Bonanni ve diğ. 2007; Gil ve Rebelo 2010).

1.4.4 Kromatografik Yöntemler

Kromatografik yöntemler genellikle antioksidanların ayrıştırılması ve belirlenmesinde kullanılmaktadır ve toplam antioksidan kapasitenin spektrofotometrik ve elektrokimyasal olarak değerlendirilmesinden önce tercih edilmektedir.

1.4.4.1 Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC), ayrışma olmaksızın buharlaştırılabilen bileşikleri ayırmak ve analiz etmek için kullanılan yaygın bir kromatografi türüdür. Bir karışımdaki bileşikleri ayırma işlemi, bir sıvı sabit faz ve bir gaz mobil faz arasında gerçekleştirilir. Mobil faz genellikle helyum gibi bir inert gaz veya nitrojen gibi reaktif olmayan bir gazdır. Sabit faz, inert bir katı destek üzerinde mikroskobik bir sıvı veya polimer tabakasıdır. Alıkonma sürelerinin karşılaştırılması, GC'ye analitik kullanışlılığı veren şeydir. En yaygın detektörler, alev iyonizasyon detektörü ve termal iletkenlik detektörüdür (Pisoschi ve Negulescu 2011).

1.4.4.2 HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) tipik olarak farklı tipte sabit fazlar, hareketli fazları ve analiti kolon boyunca hareket ettiren bir pompa ve analit için karakteristik bir alıkonma süresi sağlamak için bir detektör kullanır. Detektör (genellikle bir diyot detektörü) analit ile ilgili ek bilgiler de sağlayabilir (yani eğer varsa analit için UV/Vis spektroskopik veriler). Bir pompa, mobil fazı ve analiti yoğun şekilde paketlenmiş kolon boyunca hareket ettirmek için gereken daha yüksek basıncı sağlar. Artan yoğunluk, daha küçük partikül boyutlarından kaynaklanır. Bu, daha kısa uzunluktaki kolonlarda daha iyi bir ayırım ve daha yüksek hız sağlar. Normal faz HPLC, polar bir sabit faz ve polar olmayan, susuz bir mobil faz kullanır ve polar olmayan çözücüler içinde kolayca çözünebilen analitleri ayırmak için etkili bir şekilde çalışır. Ters fazlı HPLC, polar olmayan bir sabit faza ve sulu, orta derecede polar bir mobil faza sahiptir. Yaygın bir sabit faz, RMe₂SiCl ile muamele edilmiş silikadır, burada R, C₁₈H₃₇ veya C₈H₁₇ gibi düz zincirli bir alkil grubudur.

Bu sabit fazlarla, daha az polar olan moleküller için alıkonma süresi daha uzarken, polar moleküller daha kolay ayrışır (Pisoschi ve Negulescu 2011).

HPLC sistemi kullanılarak ABTS radikalini temizleme aktivitesine dayalı olarak kahvenin antioksidan aktivite belirlenmiştir (Stalmach ve diğ. 2006). Yenilebilir yağlarda ve gıdalarda propil gallat, nordihidroguaiaretik asit, bütillenmiş hidroksianisol, tert-butilhidrokinon ve oktil gallatın belirlenmesi için floresan saptamalı bir HPLC yöntemi (Oishi ve diğ. 2002) geliştirilmiştir.

1.5 Kanser

Kanser, hücresel homeostazda geri dönüşü olmayan bir bozukluk olarak tanımlanır. Çok faktörlü, heterojen metabolik bir hastalıktır. Bu bozukluk, hücresel işlevlerin kaybı/azalması, apoptoz, oksidatif stres, mutasyonlar ve hipoksi gibi içsel kaynaklarla ilişkilendirilebilir; veya sigara ve strese ek olarak radyasyona, ultraviyole ışınlarına, kirliliğe uzun süre maruz kalma olarak listelenen dış kökenlerden kaynaklanabilir. Kanseri altı ana özellik ile dikkat çekmektedir: (1) kontrolsüz hücre büyümesi ve farklılaşma, (2) replikatif ölümsüzlük, (3) anjiyogenez teşviki, (4) proliferatif sinyalin artması, (5) hücre ölümünde direnç ve son olarak (6) metastatik istila (Hanahan ve Weinberg 2011).

Kanser, tüm dünyada ölüm ve morbiditenin başlıca nedenlerinden biridir ve vaka sayısının sürekli artarak 2030 yılına kadar 21 milyon olacağı tahmin edilmektedir (American Cancer Society 2016; Siegel ve diğ. 2016). Sayısız fizyolojik ve biyokimyasal kanserojenler bulunmaktadır, örneğin, ultraviyole ve iyonize ışınlar; asbestoz ve sigara dumanı (Raposo ve diğ. 2007); virüs enfeksiyonu (karaciğer kanserine sebep olan hepatit B, rahim ağzı kanserine neden olan insan papilloma virüsü gibi) (Lee ve diğ. 2007; Tabor 2007); bakteri (mide kanserine neden olan *Helicobacter pylori*) (Shiotani ve diğ. 2005) ve parazitler (mesane kanserine neden olan şistozomiyaz) (Vauhkonen ve diğ. 2007); gıdalara mitotoksin kontaminasyonu (karaciğer kanserine neden olan aflatoksin) (Groopman ve diğ. 1996). Bazı kanser türleri, oksijen merkezli serbest radikallerden ve diğer reaktif oksijen türlerinden kaynaklanmaktadır çünkü bu tür serbest radikallerin aşırı üretimi,

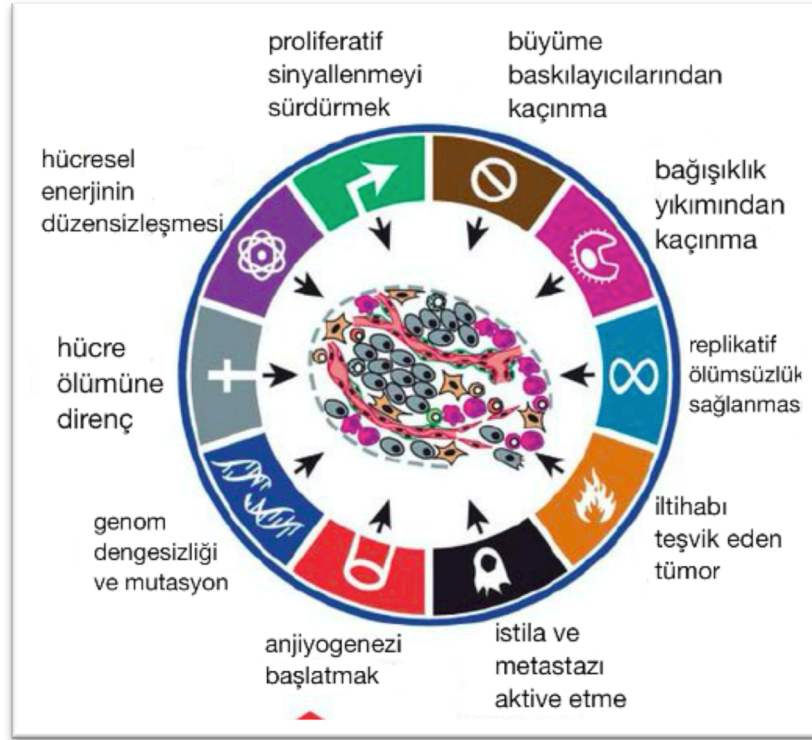
biyomoleküllerde (örneğin, lipidler, proteinler, DNA) oksidatif hasara neden olabilmektedir (Poulson ve diğ. 1998).

Kanser, 200'den fazla kanser türü olan ve her biri birbirinden oldukça farklı (örneğin, farklı proteinlerin salgılanması, ekspresyonu ve veya mutasyonu) bir grup ölümcül hastalıktır; bunlardan en yaygın olanları meme, kolorektal, akciğer, prostat ve mide kanseridir. Bununla birlikte, ölüm oranlarının en yüksek insidansı akciğer, meme, mide, karaciğer ve kolorektal kanserlerde görülür (Galati ve O'brien 2004; Russo 2007; Chu 2014; Pecorino 2016). 2011'de Dünya Sağlık Örgütü, kanserin 2008'de dünya genelinde yaklaşık 7,6 milyon (%13) ölüme neden olduğunu ortaya koyan bir Küresel Durum Raporu yayınlamıştır (Jemal ve diğ. 2011; Chu 2014).

1.5.1 Kanser Moleküler Biyolojisi

Kanser kavramsal olarak dört adıma bölünebilir: tümör başlangıcı, tümör gelişimi, kötü huylu dönüşüm ve tümör ilerlemesi (Kufe ve diğ. 2003). Herhangi bir organın belirli bir dokusunda düzensiz büyüme gösteren hücreler, zamanla, daha fazla mutasyon biriktirebilmektedir. Sonuç olarak, tümör anjiyogenezinin oluşturduğu damarları ele geçirerek çevredeki alanları istila etme ve uzak bölgelere metastaz yapma yeteneği elde edilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000; Weinberg 2013). Bu süreç, farklı aşamalarda müdahale etmek için çeşitli fırsatlar sunmaktadır (Ramos 2007; Pecorino 2008). Epitel hücrelerinden (karsinom) kaynaklanan kanserler, mezoderm tabakasından (sarkom) veya glandüler dokudan (adenokarsinomlar) gelenlere kıyasla en yaygın olanıdır (%85) (Pecorino 2008). Tedavi sırasında tümör hücreleri daha agresif bir fenotipe ilerleyebilir ve geleneksel antikanser ilaçlara dirençli hale gelebilir, bu nedenle orijinal etki modlarına sahip antikanser ilaçları örn. moleküler hedefli, arzu edilir ve bu nedenle yeni ajanları keşfetmek için sürekli çabalara ihtiyaç vardır. Kanser biyolojisi çok karmaşıktır ve çevreleyen mikro çevre, tümör oluşumunda eşit derecede önemlidir. Farklı kanser türleri, farklı genetik mutasyonlar ve fenotipler kazanır, ancak hepsi olmasa da çoğu kanser tarafından paylaşılan, neoplastik hücrelerin çok aşamalı karsinogenezde ilerlemesini sağlayan birkaç temel yetenek vardır (Hanahan ve Weinberg 2011). Hanahan ve Weinberg (2000, 2011) tarafından tanımlanan kanserin ayırt edici

özellikleri, terapötik anti-kanser müdahalesi için hedefler olarak umut verici yolları ortaya koymaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000, 2011). Bu ayırt edici özellikler, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyüme önleyici sinyallere duyarsızlık, apoptozdan kaçınma, sürekli anjiyogenez, doku istilası ve metastaz, sınırsız replikatif potansiyel, bağışıklık yıkımından kaçınma ve enerji metabolizmasının yeniden programlanmasını içermektedir (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 1. 6: Hanahan ve Weinberg'e göre kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011)

Büyüme Sinyallerinde Kendi Kendine Yeterlilik: Normal hücrelerin aksine dönüştürülmüş hücreler, sürekli hücre proliferasyonunu sürdüren mitojenik büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlidir. Kanser hücreleri kendi reseptörleri üzerinde bağımsız olarak hareket eden veya hücre zarı üzerindeki protein reseptörlerinin seviyesini arttırarak büyüme faktörlerinin dakikadaki normal seviyelerini yakalamalarını sağlayan büyüme faktörü ligandlarını üretebilmektedirler (Adjei 2001).

Büyüme önleyici sinyallere duyarsızlık: Dönüştürülmüş hücreler, anti-büyüme sinyallerine yani komşu hücrelerin yüzeyinde bulunan çözümlü büyüme inhibitörlerine ve hareketsizleştirilmiş inhibitörlere karşı tepkisidirler, bu nedenle bu

tür anti büyüme sinyallerini göz ardı ederek, dönüştürülmüş hücreleri kalıcı olarak aktif bir durumda tutmaktadırlar (Hanahan ve Weinberg 2000).

Apoptozdan kaçınma: Homeostaz, dengeli bir hücre proliferasyonu ve hücre hasarı seviyesi (örneğin apoptoz) ile sağlanmaktadır. Kanser hücreleri, tümör baskılayıcı proteinlerin (TSP'ler) kaybı ve hayatta kalma proteinlerinin aşırı ekspresyonu gibi hücre ölümünün üstesinden gelen çeşitli mekanizmalar kazanmaktadır. Örneğin, doğal tip p53 proteini, bir DNA hasar sensörüdür ve apoptotik sinyal yolunun bir bileşenidir. P53 proteini kaybının (p53 genindeki nokta mutasyonunun bir sonucu) insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında meydana geldiği ve kolon karsinomlarının %75-80'inde her iki p53 alleli bulunmadığı bulunmuştur (Levine ve diğ. 1991). P53'ün rollerinden biri de, G1/S fazında gerekli hücre döngüsü kontrol noktalarında durdurarak ve herhangi bir hasarlı DNA'ya bağlanarak hücre döngüsünün bir düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır, onarım, R noktasını (G1/S) geçtikten sonra tüm döngüye bağlanmadan önce başlatılabilir. Hasar onarılamazsa, p53 apoptozu başlatabilir (Levine 1997). Bazı anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinin aşırı ifadeleri, örn. Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1, apoptozu inhibe etmek için gereklidir, dolayısıyla düzensiz onkojen ekspresyonlarını destekler.

Sürekli anjiyogenez: Kanser hücreleri, anjiyogenezi başlatabilir ve mevcut kılcal ağdan kan damarları oluşturabilir; bu "anjiyojenik anahtar" tümör büyümesi ve metastaz için hayati önem taşımaktadır. Tümör, aktivatörler (örn. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve anjiyojenin) ve inhibitörler (örn., Trombospondin ve anjiyostatin) olarak sınıflandırılan kendi anjiyojenik faktör tedarikini modüle edebilir; üretim seviyeleri sırasıyla tümör hücreleri tarafından artırılır ve azaltılır (Folkman 1995). Bununla birlikte, VEGF'nin etkisi altında oluşan tümör vaskülatürü kalitesizdir ve oldukça dağınıktır ve hipoksiye ve ek VEGF üretimine yol açarak daha agresif bir fenotipe yol açmaktadır (Liao ve Johnson 2007).

Doku istilası ve metastaz: Dönüştürülmüş epitel hücreleri, 'epitelyal mesenkimal geçiş'(EMT) süreci gibi çeşitli süreçlerle yerel dokuları işgal edebilir ve metastaz yapabilir. Metastatik hücrelerin %0,01'den daha azı uzak bölgede kolonizasyonda başarılı olmasına rağmen, kanser ölümlerinin %90'ından fazlasından sorumludur (Liotta ve Stetler-Stevenson 1991). Bir tümör hücresi, konakçı doku hücre dışı

matrisini (ECM) yeniden şekillendirme ve matris metaloproteinazlar (MMP'ler) gibi proteazlar salgılama kabiliyetine sahip olabilmektedir. Yüksek MMP seviyeleri, örn. MMP-2, MMP-9 ve MMP-13, kanser hücrelerinde tümör hücrelerinin birincil bölgeden ayrılmasını, lenf ve kan damarlarına doğru hücre göçünü, vasküler temel membranın bozulmasını ve vasküler lümenin uzak bir bölgeyi işgal etmesini kolaylaştırabilmektedir (Stamenkovic 2000).

Sınırsız çoğaltma potansiyeli (ölümsüzleştirme): Normal hücreler, sınırlı sayıda replikasyona (Hayflick sayısı) uğrayacak ve kromozom kollarının ucunda bulunan DNA'nın koruyucu başlığı olan telomerlerin (tekrar eden bir DNA dizisi TTAGGG) bozulması nedeniyle yaşlanmaya girecek şekilde kısıtlandırılmıştır. Sonunda, kısaltılmış kromozom uçları açığa çıkacak ve kromozomal füzyon ve apoptoz ile sonuçlanacaktır (Hayflick 1965). Kanserli hücrelerin yaklaşık %85-90'ı, kromozomlar üzerindeki telomerleri yenilemek için telomerazların (DNA polimeraz) arttırılmasıyla ölümsüzleşir, böylece hücreler sınırsız replikasyon döngüleri yapabilirler (Hanahan ve Weinberg 2000).

Bağışıklık yıkımından kaçınma: Bağışıklık sistemi, tümör kitlelerini süzerek tümör hücrelerini önleyen veya saptayan ve ortadan kaldıran çeşitli mekanizmalar sunmaktadır, örneğin tümörlerin %20'sini oluşturan virüs kaynaklı tümörleri ortadan kaldırmak. İkinci olarak, enflamasyon sırasında EMT ve ROS'u kolaylaştıran birçok büyüme faktörü, hayatta kalma faktörü, pro-anjiyojenik faktör ve enzimler, tümör mikroçevresine salınır ve tümör oluşumuna ve ilerlemeye katkıda bulunmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2011). Ayrıca, tümöre özgü antijenleri veya stresle indüklenen antijenleri eksprese eden tümör hücrelerinin saptanması ve ortadan kaldırılması kavramına dayanan ve tümör hücreleri ile immün sistem arasındaki ilişkiyi tanımlayan 'immün immüno düzenleme', üç aşamadan oluşur: belirlenen eliminasyon, denge ve kaçış. İlk olarak bağışıklık sistemi, saptanan tümör hücrelerini ortadan kaldıracaktır, ancak eliminasyon sadece kısmi olabilir, bu nedenle geri kalan tümör hücreleri bir denge durumunda tutulabilir. Bununla birlikte bağışıklık sistemi, büyümeye devam eden ve antijen ekspresyonuna dönüşen başka değişiklikler biriktiren tüm tümör klonlarını ortadan kaldırmaya devam edecektir. Eliminasyondan kaçan tüm tümör klonları daha dirençlidir ve bağışıklık gözetimine baskın gelir (Swann ve Smyth 2007).

Enerji metabolizmasının yeniden programlanması: Kanser hücresi metabolizması oranı, ek kanser özelliklerine dönüşebilen genetik değişikliklerin ve kararsızlığın daha fazla birikmesiyle sonuçlanan hızlı neoplastik hücre çoğalması oranını desteklemelidir. Kanser hücrelerinin bir altpopulasyonu, oksijen varlığında bile “değiştirilebilir” metabolizmaları glikolize yeniden programlayabilir ve aktive edilmiş onkogenler Ras, Myc, P13K (fosfotidilinositol-3-kinaz) ve mutasyona uğramış TSP’ler, p53, PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu) ve NF-1 (nörofibromatozis tip 1) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Warburg 1956; Kroemer ve Pouyssegur 2008). Çeşitli biyosentetik yollar için sağlanan glikolitik ara maddelerin yanında glikoz taşıyıcıların ve glikolitik yolların artışı bir sonucu olarak; glikolizin kabul edilmesi, yeni hücre oluşumu için makromolekül ve organel sağlamak gibi kanser hücreleri için çeşitli avantajlar sunabilmektedir (Hsu ve Sabatini 2008; Hanahan ve Weinberg 2011).

1.6 Apoptoz

Apoptoz başlangıçta hücre küçülmesi, zar kabarcıklaşması, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma gibi morfolojik özellikleriyle tanımlanmıştır (Kerr ve diğ. 1972; Wyllie ve diğ. 1980; Kerr ve diğ. 1994). Apoptozun gen yönlendirmeli bir program olduğunun farkına varılması, gelişimsel biyoloji ve doku homeostazını anlamamız için derin etkilere sahiptir, çünkü bu, hücre sayılarının hücre hayatta kalmasını etkileyen faktörlerin yanı sıra çoğalmayı ve farklılaşmayı kontrol eden faktörler tarafından düzenlenebileceğini de ima eder. Dahası, apoptozun genetik temeli, diğer herhangi bir metabolik veya gelişimsel program gibi hücre ölümünün mutasyonla bozulabileceğini ima eder. Aslında, apoptotik yollardaki kusurların artık nörodejeneratif bozukluklardan maligniteye kadar bir dizi insan hastalığına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Thompson 1995). Apoptozun kötü huylu fenotipi etkileyebileceği fikri 1970’lerin başına kadar uzanmaktadır.

Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başlamaktadır (Hampton 1998). Ayrıca apoptoz mekanizması, uyarana ve hücre

tipine göre farklılıklar göstermektedir. Apoptozu etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak: büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir (Hızel 1997). Apoptozu etkileyen uyaranların bazıları şu şekilde sıralanabilir: büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, tümör nekroz faktör (TNF), TGF (Transforming Growth Factor), Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler gibi (Hızel 1997; King ve Cidlowski 1998; Israels ve Israels 1999; Büyükgebiz ve Caferler 2001).

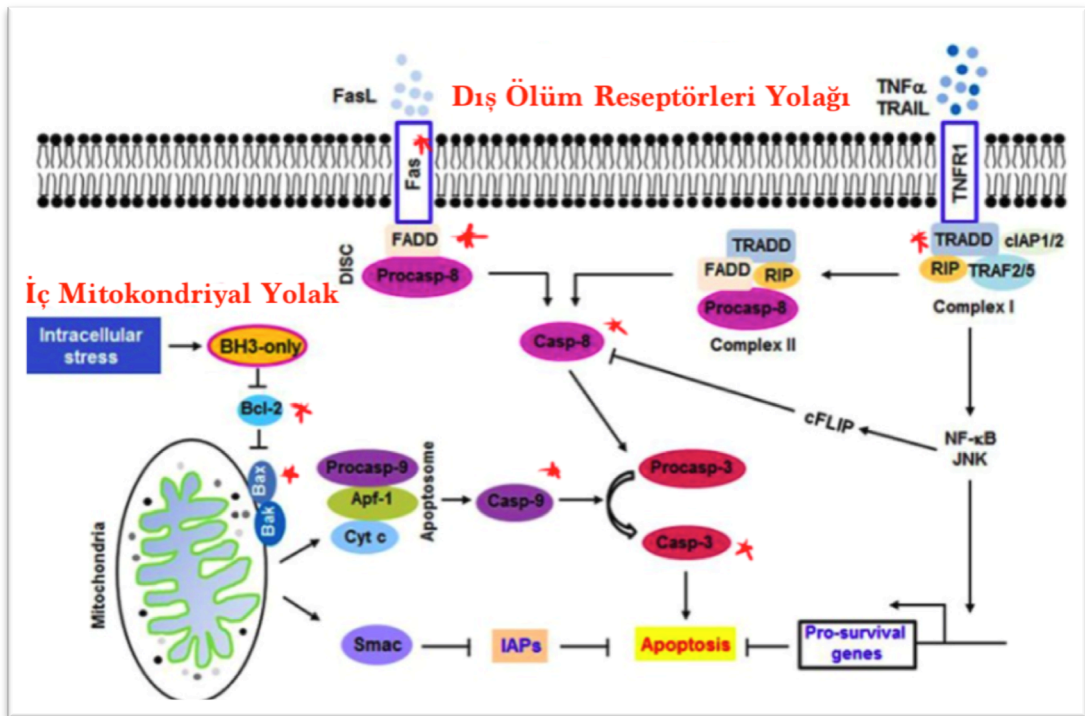
1.7 Apoptotik Yolak

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, embriyonik gelişim, bağışıklık sistemi işlevi ve çok hücreli organizmalarda doku homeostazının sürdürülebilmesi için gereklidir (Kerr ve diğ. 1972; Ellis ve diğ. 1991; Jacobson ve diğ. 1997). Apoptozun düzensizliği, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmünite ve kanser dahil olmak üzere çok sayıda patolojik durumları kapsamaktadır. Memeli hücrelerindeki apoptoz, kaspazlar olarak bilinen bir sistemin proteaz ailesi tarafından yönetilmektedir (Alnemri ve diğ. 1996). Apoptotik programı kontrol altında tutmak için kaspazlar başlangıçta hücrelerde inaktif prokaspaz öncülleri olarak eksprese edilir. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 gibi başlatıcı kaspazları oligomerizasyon ile aktive edildiğinde, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazların öncül formlarını aktive etmektedir (Salvesen ve Dixit 1997; Cryns ve Yuan 1998; Thornberry ve Lazebnik 1998). Aktive edilmiş efektör kaspazları sırayla spesifik bir hücrel substrat grubunu ayırarak apoptotik fenotip ile ilişkili iyi bilinen biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere yol açmaktadırlar (Thornberry ve Lazebnik 1998). Kaspaz aktivasyonunun tetiklendiği iki yolak vardır - dışsal ve içsel apoptotik yollar. Dışsal yolak, ölüm reseptörlerinin hücre yüzeyine bağlanmasıyla aktive edilmektedir. FASL ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi ligandların sırasıyla FAS ve TNF reseptörüne (TNFR) bağlanmasıyla, ölümle indüklenen sinyalleşme kompleksinin (DISC) oluşumunu indüklemektedir. DISC oluşumu, prokaspazı aktive ederek kaspaz-8'in oluşmasını sağlamaktadır (Budihardjo ve diğ. 1999; Coşkun ve Özgür 2011). Prokaspaz-8, kaspaz-8'in aktive olmasına ve bunun sonucunda kaspaz 3'ün

dolaylı ve direkt olarak aktive olmasına sebep olmaktadır. Aktifleşen kaspaz-8 kaspaz-3'ü direkt aktive edebildiği gibi, Bid aktivasyonunu engelleyerek de kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktifleşmesine sonuç olarak CAD aktivasyonu ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (Adams ve Cory 2001; Curtin ve Cotter 2003; Spierings ve diğ. 2004).

Dışsal yollardan bir diğeri ise radyasyon gibi bir uyarı sonucu sfingomyelinazın artışının sfingomyelin seramide dönüştürmesi ile başlamaktadır. Biriken seramidler seramidaz ile sfingozini oluşturmaktadır. Bu durum Bid'i indükleyerek apoptoza yol açmaktadır (Ross ve Pawlina 2011).

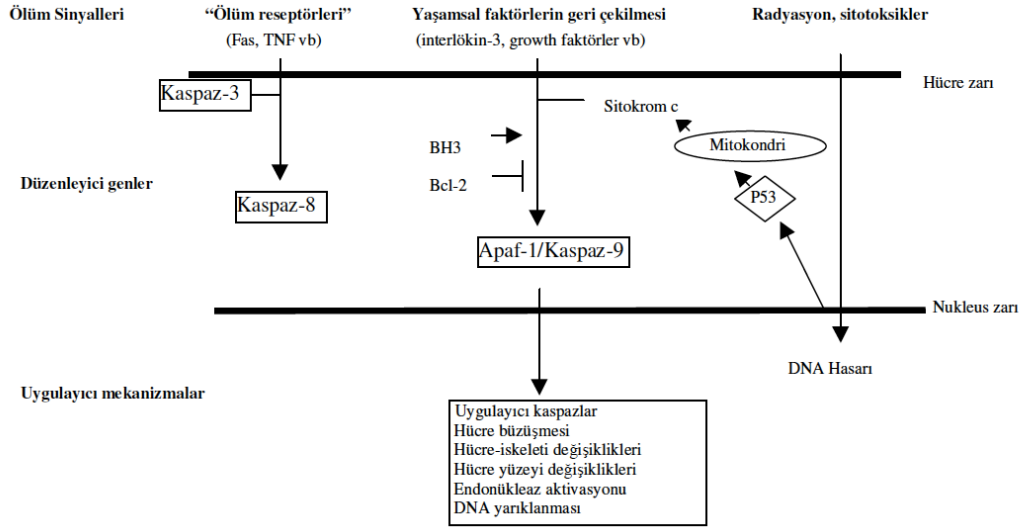
Sitotoksik T lenfositleri patojen enfeksiyonunda hedef hücreler ile birleşerek perforinlerin salınmasına neden olur bu da hücre zarında por oluşumuna sebep olmaktadır. Por oluşumu hücre içine Ca^{++} girişine ve kaspaz aktivasyonunu sağlayan Granzim B'nin veziküllerden salınımına yol açmaktadır. DNA hasarı ve apoptozla sonuçlanan bu sistem Granzim-Perforin sistemi olarak bilinir (Ross ve Pawlina 2011).



Şekil 1. 7: Apoptozun iç ve dış yolları (Zhou ve Li 2015'den uyarlanmıştır)

İçsel yolak, büyüme faktörlerinin yetersizliği, hipoksi, DNA hasarı ve onkogen indüksiyonu gibi çeşitli hücre dışı ve hücre içi streslerle tetiklenir. Bu streslere yanıt olarak iletilen sinyaller esas olarak mitokondri üzerinde birleşmektedir. Dış mitokondriyal zarın geçirgenleşmesine (Kluck ve diğ. 1999), sitokrom c ve diğer proapoptotik moleküllerin salınmasına, apoptozomun oluşumuna neden olan bir dizi biyokimyasal olay indüklenir - sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) içeren büyük bir protein kompleksi) ve ATP kaspaz-9 - ve kaspaz aktivasyonu (Vousden ve Lu 2002). Bu süreçler arasında, Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyelerinin apoptotik ölüme doğru yürüyüşünü durdurabileceği için yalnızca geçirgenleştirme aşaması düzenlenir (Cory ve Adams 2002). Bununla birlikte, sitokrom c salındığında, kaspaz aktivasyonunun aşağı akış dizisi geri döndürülemez (Liu ve diğ. 1996; Goldstein ve diğ. 2000).

Apoptoz mekanizması iki yolakla gerçekleşmektedir; iç yolak ve dış yolak. İç yolak, DNA fragmantasyonu, Ca^{++} artışı, hücre döngüsü aksaklıkları hipoksi gibi hücre içi sinyallerle uyarılmaktadır. İç yolağın uyarılması Bid; antiapoptotik Bcl-2'yi inaktive eder ve Bax ve Bak genlerini aktifleştirir. Bu genlerin aktifleşmesi mitokondri zarında por oluşumuna neden olmaktadır. Por oluşumu ise sitokrom c salınımını arttırmaktadır. Sitokrom c, Apaf1 ve ATP birleşerek apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Apoptozom oluşumu kaspaz 9'u aktifleştirirken, kaspaz 3'ün aktivasyonunu artırır ve bunun sonucunda DNA fragmantasyonu gerçekleşir (Palmer ve diğ. 2000; Smaili ve diğ. 2000; Adams ve Cory 2001).



Şekil 1. 8: Apoptoz mekanizmaları (Tomatır 2003)

1.7.1 Kaspaz Ailesi

Kaspaz ailesi, korunmuş sistein aspartik spesifik proteazları içerir ve kaspaz ailesinin üyeleri, apoptozun düzenlenmesinde önemli ölçüde önemlidir (Kuranaga 2012). Memelilerde 14 farklı kaspaz vardır ve bunlar temelde şu şekilde gruplandırılabilir;

- *Başlatıcı kaspazlar*: kaspaz-2, -8, -9 ve -10
- *Efektör kaspazlar*: kaspaz-3, -6, -7 ve -14
- *Sitokin Aktivatörleri*: kaspaz-1, -4, -5, -11, -12 ve -13 (Shi 2002; Chowdhury ve diğ. 2008).

Yapısal olarak, başlatıcı kaspazlar, 90'dan fazla amino asit içeren kaspaz alım alanları (CARD'lar) olarak bilinen uzun N-terminal ön alanlara sahipken, efektör kaspazlar, 20-30 amino asit dahil olmak üzere ölüm efektör alanı (DED) olarak bilinen daha kısa dizilere sahiptir. Kaspazlar ilk önce zimojenler olarak sentezlendiklerinden, daha sonra apoptotik süreç sırasında aktive edilirler. Başlatıcı kaspazları kendiliğinden aktive olurken, efektör kaspazları, iç bölünmeler yoluyla başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir (Yan ve Shi 2005). Apoptozdan ziyade, kaspaz aile üyelerinin çoğu hücre proliferasyonda, hayatta kalmada ve inflamasyonda işlevsel role sahiptir, ancak bazıları apoptoz için gereklidir (Los ve diğ. 2001; Martinon ve Tschopp 2004).

İlk tanımlanan kaspaz olan kaspaz-1, interlökin-1b işleme enzimidir (ICE) ve Ced-3 homologu olarak bilinir (Los ve diğ. 1995). Kaspaz-1, kaspaz ailesinin sitokin aktivatör grubunda yer alır çünkü; enflamatuar sitokinler, pro-IL-1b ve pro-IL-18, kaspaz-1 için ana substratlardır (Martinon ve Tschopp 2004). Kaspaz-1 apoptotik sinyalleme için gerekli olmasa da, iltihaplanma sürecinde önemlidir (Fantuzzi ve diğ. 1998).

İkinci belirlenen ve CARD içeren kaspaz-2, DNA hasarında, metabolik bozukluklarda ve ER stesine bağlı apoptozda önemli role sahiptir (Vakifahmetoglu ve diğ. 2010). Kaspaz-2, hem kaspaz-3 hem de kaspaz-8'in bir substratı olarak bilinir (Van de Craen ve diğ. 1999; Paroni ve diğ. 2001). Kaspaz-2'nin fonksiyonel özellikleri hala tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (Kiraz ve diğ. 2016).

Kaspaz-3, -6 ve -7, efektör kaspaz grubunda yer alır ve apoptotik süreçte benzer şekilde hareket ederler (Degterev ve diğ. 2003). Kaspaz-3, hem dışsal hem de içsel apoptotik yollarla aktive edilir (Porter ve Janicke 1999). Kaspaz-3'ten ziyade kaspaz-6 ve -7 hakkında sınırlı bilgi olmasına rağmen, kaspaz-3 baskılaması apoptozun engellenmesine neden olurken, kaspaz-6 ve -7'nin baskılanmasının apoptotik süreci önemli ölçüde etkilemediği bilinmektedir (Slee ve diğ. 2001). Dahası, kaspaz-3'ün PARP bölünmesi ve apoptozun ayırt edici özellikleri olan DNA fragmentasyonu için çok önemli olduğu bildirilmiştir (Lakhani 2006).

Kaspaz ailesinin işlevsel olarak iyi bilinen üyesi kaspaz-8, TNF ile indüklenen ekstrinsik apoptotik yol için çok önemli bir faktördür (Ghavami ve diğ. 2009). Pro-kaspaz-8, DISC'ye FADD tarafından alınır ve dimerizasyon veya trimerizasyon, karşılıklı bölünme yoluyla pro-kaspaz-8 aktivasyonunu tetikler. Kaspaz-8 ise kaspaz-3, -7, Bid ve ayrıca Nükleer Faktör Kabba B (NF-kB)'yi ayırır ve etkinleştirir (Carrington ve diğ. 2006; Ghavami ve diğ. 2009).

Başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9, mitokondriyal yolda apoptozom kompleksinin oluşumu için önemli bir faktördür. Sitokrom c, mitokondriden salındığında, sitoplazmadaki sitokrom c için reseptör olan Apaf1'e bağlanır (Rodriguez ve Lazebnik 1999). Sitokrom-c ve Apaf-1 apoptozom oluşturur ve ardından pro-kaspaz-9, Apaf-1'e bağlanır. Daha sonra pro-kaspaz-9, karşılıklı bölünme yoluyla aktive edilir ve bu şekilde apoptozom kompleksi de aktive olur. Daha sonra kaspaz-3, aktif

apoptozom kompleksinde bulunan kaspaz-9 aracılığıyla bölünür ve aktive edilir (Qin ve diğ. 1999).

1.7.2 Bcl-2 Ailesi

Apoptotik sinyallemenin düzenlenmesinde önemli roller oynayan Bcl-2 aile üyeleri üç alt aileye ayrılmıştır; (i) hayatta kalma yanlısı alt aile üyeleri (Bcl-2, BclXL, BclW, MCL1 ve BFL1/A1), (ii) BH3-yalnızca apoptotik alt aile üyeleri (Bad, Bim, Noxa ve Puma9) ve (iii) pro-apoptotik aracı alt aile üyeleri (Bax ve Bak) (Gross ve diğ. 1999; Czabotar ve diğ. 2014). Yalnızca BH3 alt aile üyelerinin üyeleri, büyüme faktörü yoksunluğu ve DNA hasarı gibi stres koşulları altında aktive olur. Yalnızca aktif BH3 proteinleri, pro-apoptotik alt aile üyelerinin üyelerinin aktivasyonunu teşvik eden bağlanma yoluyla hayatta kalma yanlısı alt familyanın üyelerini inaktive eder (Green ve Kroemer 2004).

Mitokondri dış zarında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında bulunan antiapoptotik aile üyeleri por oluşumunu denetleyerek iyon geçişini düzenlemektedirler. Ayrıca AIF ve sitokrom-c salınımını engelleyerek apoptozu inhibe ederler. Apoptotik ve pro apoptotik üyeler ise sitokrom-c ve AIF salınımını arttırarak apoptozu indüklemektedirler (Adams ve Cory 2001, Adrain ve Martin 2001, Spierings ve diğ. 2004).

1.7.3 TNF Ailesi

Apoptozu tetiklemenin en önemli yollarından biri, TNF süper ailesinde sınıflandırılan ve ayrıca TNF, TRAIL ve Fas ligandı (FasL) gibi ligandlar da dahil olmak üzere ölüm reseptörleri (DR'ler) aracılığıyla gerçekleşir (Bhardwaj ve Aggarwal 2003; Mahmood ve Shukla 2010). Apoptozun bu ligandlar tarafından indüksiyonu, spesifik membran reseptörlerine bağlanarak başlatılır (Ashkenazi ve Divit 1998). TNF süper ailesinin, vücutta iltihaplanma, apoptoz, proliferasyon ve istila dahil olmak üzere oldukça farklı süreçlerde işlev gören 19 ligand ve 29 reseptör içerdiği bilinmektedir (Aggarwal ve diğ. 2012). TNFR süper ailesinin tüm üyeleri genel olarak trimerik tip I trans-membran proteinleri olmasına ve sistein açısından

zengin hücre dışı alt alanlara sahip olmasına rağmen, aslında birincil yapılarında farklıdır, bu da onları ligandlarını spesifik ve ayrıcalıklı bir şekilde tanımak için benzersiz kılar (Naismith ve Sprang 1998). Bu DR'ler ayrıca apoptotik sinyallerin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yollarına iletilmesinden sorumlu olan homolog bir sitoplazmik sistein açısından zengin "DD" içerir (Fulda ve Debatin 2004). Çünkü, FADD ve TRADD gibi adaptör moleküller, DR'lerle etkileşime girmek için bu ölüm alanlarına sahiptir. TNF süper ailesine dahil edilen ligandlar, kovalent olmayan bağlanma yoluyla homotrimerlerin oluşumunda rol oynayan ortak bir hücre dışı TNF homoloji alanını (THD) paylaşır. Çoğu TNF ligandının hücre dışı alanı, tip II trans-membran proteinleri olarak sentezlenmiş olsalar bile, çözünür bir ligand yapmak için proteolitik bölünmeye uğrar (Bremer 2013).

1.7.4 Fas Hücre Zarı Ölüm Reseptörü

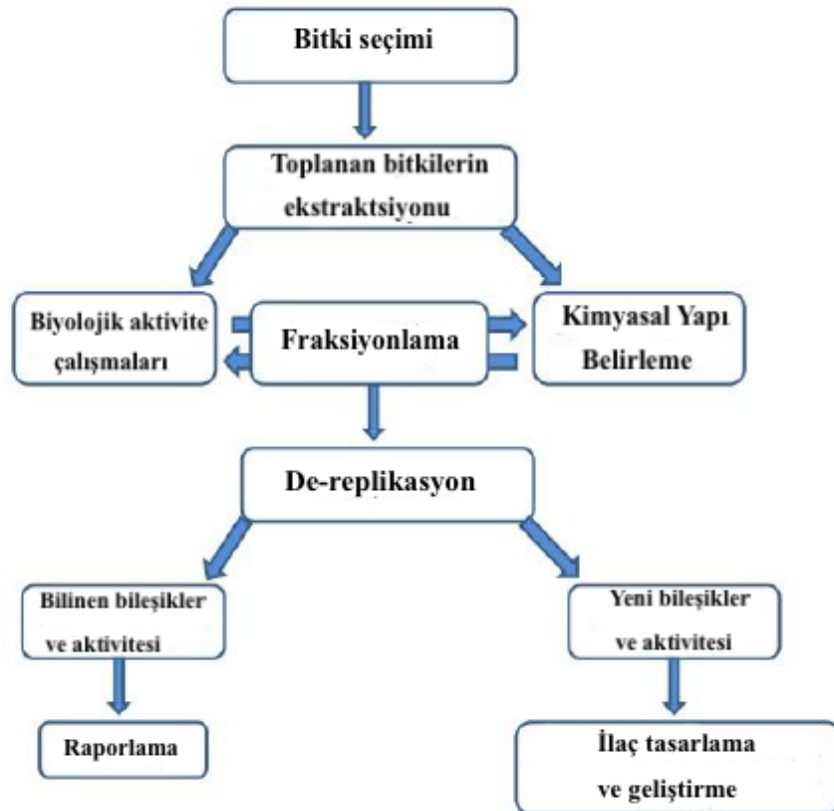
Fas hücre yüzey ölüm reseptörü (FAS) ve Fas ligandı (FASLG) genleri tarafından kodlanan proteinler, TNF süper ailesinin üyeleridir. CD95/APO-1/DR2 olarak da bilinen Fas, 48 kDa'lık moleküler ağırlığa sahip en iyi çalışılmış DR'lerden biridir. Fas geni, ekson 6'nın trans membran alanını kodladığı dokuz eksonlu insan kromozomu 10 üzerinde yaklaşık 25 kb kaplar (Behrmann ve diğ. 1994). Bir DD içeren bu reseptör, programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve kanser gibi çeşitli malignitelerin patogenezinde rol oynar. Öte yandan, FasLG geni, T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler gibi aktive edilmiş bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunan FasL (CD95L) adı verilen bir tip II trans membran proteinini kodlayan insan kromozomu 1 üzerinde bulunur (Bremer 2013). Bu nedenle Fas/FasL etkileşimi, genellikle bağışıklık hücreleri tarafından kanser gelişimini önlemek için kullanılan, enfekte olmuş ve dönüştürülmüş hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanır. Ana yapısal değişiklikler, DD aracılığıyla FADD'yi bağlayan DD reseptöründe gerçekleşir. Daha sonra FADD, pro-kaspaz-8 ve -10 ile etkileşime girer. Bu kaspazların otomatik bölünme yoluyla aktivasyonundan sonra, bunlar sitozolde aktif kaspazlar olarak salınırlar ve apoptotik hücre ölümüne neden olurlar. CD95/FADD/kaspaz-8/-10 kompleksi, DISC olarak adlandırılır ve "ölümüne neden olan sinyalleşme kompleksi" anlamına gelir (Tauszin ve diğ. 2012).

1.8 Bitkilerin Tıbbi Kullanımı

Tarih öncesi kanıtlar, insanlığın çeşitli semptomların yanı sıra iyi huylu ve kötü huylu hastalıkları tedavi etmek için doğal ürünler kullandığını ortaya koymuştur (Samuelsson ve Bohlin 2001; Cragg ve Newman 2005; Sneader 2005). Sümerler ve Akkadlardan gelen yaklaşık M.Ö. 2600 tarihli eski kayıtlar, yaklaşık 1000 bitkinin ve yağ, reçine ve meyve suyu gibi türetilmiş maddelerin kullanımlarını anlatmaktadır (Samuelsson ve Bohlin 2001; Ji ve diğ. 2009). Atalarımız ağrıyı hafifletmek için belirli bitkileri çiğnemekteydiler, bitkileri yaraları iyileştirmek için tentür veya pansuman olarak ayrıca zehir olarak da kullanmaktaydılar (Samuelsson ve Bohlin 2001; Harvey 2007). Bitkiler, hayvan organları ve bazı minerallerden oluşan 700'den fazla ilaç ve 800'den fazla formül içeren ve M.Ö. 1550-2900 yıllarına dayanan Mısır Ebers Papirüsü gibi hayatta kalan birkaç eski reçete, hala hastalıkların bitki temelli tedavisi için kullanılmaktadır. Yaklaşık M.Ö. 1100 tarihli *Çin Materia Medica*, hastalıkların tedavisinde 600'den fazla bitkinin kullanıldığını anlatmaktadır (Newman ve diğ. 2000; Karou ve diğ. 2007). Dünya Sağlık Örgütü (WHO), geleneksel tıbbi (TM) "*bitki, hayvan ve/veya mineral bazlı ilaçları, ruhsal terapileri, manuel teknikleri ve refahı sürdürmek için, hastalığı tedavi etmek, teşhis etmek veya önlemek amacıyla tek başına veya kombinasyon halinde uygulanan egzersizleri içeren yerel uygulama*" olarak tanımlamaktadır (Zhang 2002). Geleneksel tıp bazı ülkelerde "Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp" olarak da bilinmektedir (Balunas ve Kinghorn 2005; Lamari ve Cordopatis 2008). Şu anda başta gelişmemiş ülkelerde olmak üzere, dünya nüfusunun tahminen %80'inin, geleneksel tıbbi birincil sağlık bakımı olarak kullandığı rapor edilmektedir (Zhang 2002). Oysa dünya nüfusunun geri kalan %20'si, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere, doğrudan doğal ürünlerden elde edilen veya yarı sentetik doğal ürünlerden tasarlanan reçeteli ilaçlardan oluşmaktadır (Cragg ve Newmann 2001). İnsan tüketimi ve hastalıkların tedavisi için doğal ürünlerin kullanımıyla ilgili geniş bir kayıt olduğundan, bitki materyallerinin biyolojik olarak aktif terapötik bileşikler için bir kaynak olarak araştırılması mantıklıdır (Lee ve Schneider 2001).

Bitkisel ilaç tarifleri zengin fitokimyasal kaynaklardır (*fito-* Yunanca bitki) ve bu nedenle potansiyel ilaç endüstrisi için zengin kaynak sağlamaktadır (Liu 2004). Aktif fitokimyasalları belirlemek için bitkisel reçetelerin bilimsel araştırmasıyla

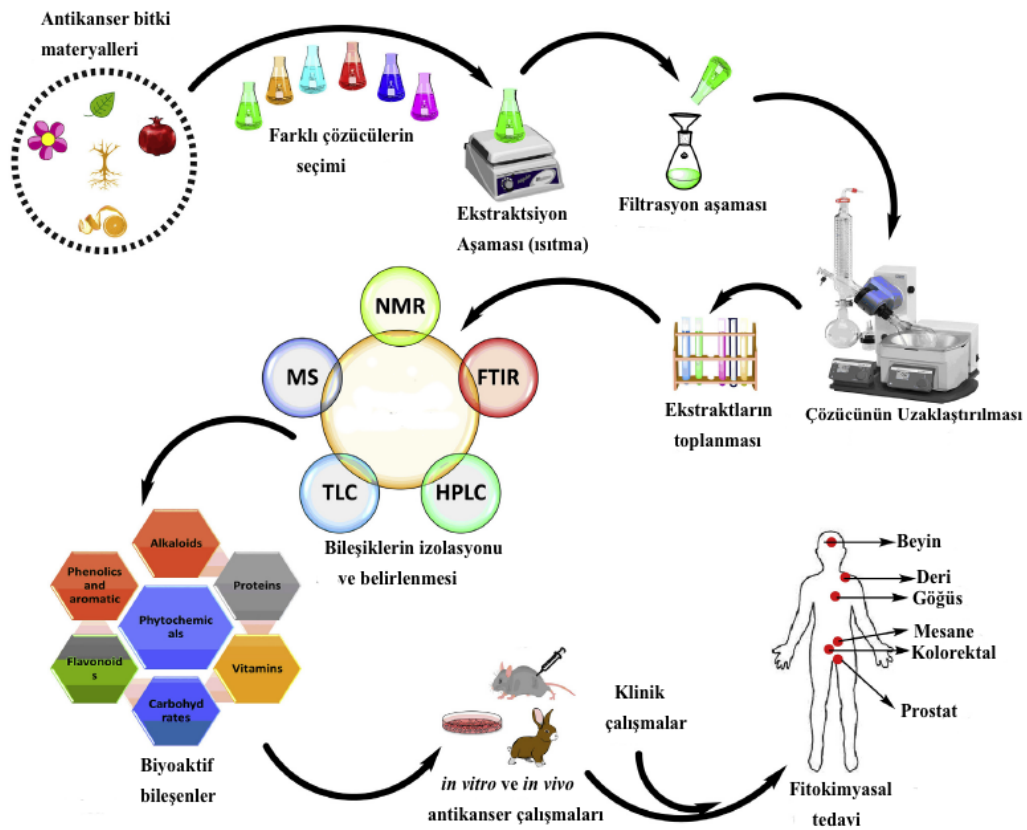
birlikte doğal ürünlerin yerli gruplar tarafından kullanımının gözlemlenmesi, etnofarmakoloji adı verilen bir alanın ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Samuelsson ve Bohlin 2001). İlaçların esas olarak doğal ürünlerle sınırlı olduğu 18. yüzyılda Johann Adam Schmidt (1759-1809), ilaç bilgisi ve “etnobotanik tıp” alanını birleştirerek “farmakognozi” terimini tanımlamıştır (Fabricant ve Farnsworth 2001; Samuelsson ve Bohlin 2001; Balunas ve Kinghorn 2005). Sonuç olarak, farmakognozi, etnobotani, fitokimya, biyokimya, organik kimya, taksonomi ve farmakoloji gibi çeşitli disiplinleri dahil etme yönünde ilerlemiştir. Her disiplin, bitki türlerinin doğru tanımlanmasına (bitki seçimi), bitki materyallerinin çıkarılmasına, biyolojik aktivitenin doğrulanmasına ve yeni aktif bileşiklerin izolasyonuna ve yapı açıklamasına veya halihazırda bilinen aktif bileşiklerin bileşik veri tabanları üzerinde doğrulanarak (dereplikasyon); bu “moleküler farmakognozi” olarak adlandırılır, katkıda bulunur. Moleküler farmakognozi; yeni yapılar, biyolojik aktivite ve hedefler bulma şansını artırmak için doğal olarak oluşan yapı-aktivite ilişkilerini (SAR) bir ilaç potansiyeli ile araştıran disiplin olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.9) (Bruhn ve Bohlin 1997).



Şekil 1. 9: Moleküler farmakognozi için açıklayıcı model (Bruhn ve Bohlin 1997)

19. yüzyılın başında, tüm ilaçların yaklaşık %80'i kök, yaprak ve/veya ağaç kabuğu gibi farklı bitki bölümlerinden elde edilmiştir (McChesney 2007). Örneğin, *Solanum dulcamara* L. kabuğu özütü, Çin'de geleneksel tıpta ağrıyı hafifletmek için analjezik özellikleri nedeniyle kullanılmıştır (Yu ve diğ. 2008). 19. yüzyılın sonlarında, aspirin (veya asetilsalisilik asit), *Salix alba* L. kabuğundan geliştirilmiştir. Aspirin, doğanın ilaç geliştirmedeki önemini vurgulayan küçük ağrıların giderilmesi için üretilen ilk sentetik farmasötik ilaçtır (Mehlman ve diğ. 1971; Harvey 2007; Lamari ve Cordopatis 2008). Doğal ürünlere dayalı onaylı ilaçlar arasında artemether (Çin'de geleneksel tıpta kullanılan *Artemisia annua* L.'den (Asteraceae) izole edilmiştir), galantamin (*Galanthus woronowii* Losinsk. (Amaryllidaceae)'den izole edilmiştir), kalolid A (*Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum* (Whitmore) P.F.Stevens'dan (Clusiaceae) izole edilmiştir), Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) bulunan nitisinon (*Callistemon citrinus* Stapf. (Myrtaceae)'den izole edilen mesotriondan modifiye edilmiştir); sıtma, Alzheimer, HIV/AIDS ve tirozinemi gibi hastalıklar için kullanılmıştır (Balunas ve Kinghorn 2005). Ülkemizde de son yıllarda tıbbi amaçlı kullanılan bitkilere verilen önem ve ilgili çalışmaların sayısı artmıştır (Başer ve diğ. 1986; Malyer ve diğ. 2004; Çömlekçioğlu ve Karaman 2008; Monteiro ve diğ. 2010; Polat ve diğ. 2011; Tulukçu ve Sağdıç 2011; Selvi ve diğ. 2012; Canli ve diğ. 2016; 2017^{a,b,c,d}, 2019; Bozyel ve Merdamert 2018; Bozyel ve diğ. 2019). Tıbbi bitkilerin terapötik ajanlar olarak potansiyeli, türlerden türe enlem, boylam, yükseklik, yaş, iklim ve mevsime göre değişen, içlerindeki aktif fitokimyasalların kalitesine ve miktarına bağlıdır. Farmakolojik fonksiyonlar ve seviyeleri bitki parçalarına göre değişmektedir. Bu biyoaktif fitomoleküller, antikanser terapötiklerinde de kullanılabilir, ancak yine de daha fazla araştırma gerektirmektedirler. Aktif fitomoleküllerin saflaştırılması, kombinatoriyal analizler, izolasyon deneyleri ve biyoanaliz kılavuzluğunda fraksiyonlama gibi çeşitli stratejiler içerebilmektedir. Çeşitli analitik tekniklerle biyoanaliz rehberliğinde fraksiyonlama, biyoaktif bileşikleri bileşiklerin karışımından ayırmak için kullanılmaktadır. Doğruluğu kanıtlanmış biyolojik aktivitelerle doğal ekstraktların test süreci başlamaktadır. Daha sonra TLC, HPLC, FTIR, Kütle spektroskopisi ve NMR gibi analitik tekniklerle ekstraktların aktif bileşenleri tespiti ve izolasyonu yapılır. Ayırıştırmada polarite özelliğini kullanmak için farklı çözücülerin kullanılması gerekmektedir. Fraksiyonlama için Superdex, Sephadex, Silica veya başka uygun matris kullanılmaktadır. Tıbbi bitkilerde bulunan doğal bileşiklerin

tespiti için kullanılan, vanillinesülfürik asit gibi pek çok boyama maddesi vardır. Bu prosedürler değişebilir ancak biyoaktif bileşiklerin saflığı, kalitesi ve miktarı olabildiğince yüksek olmalıdır ve bu, yüksek kaliteli çözücüler, matrisler ve dikkatli kullanımla sağlanabilmektedir. Bu fitomoleküllerin saflaştırılmasından sonra, *in vitro* veya *in vivo* antikanser etkileri açısından incelenmelidir. Molekül tarafından daha iyi bir antikanser özelliği elde edilirse, diğer farmakokinetik, farmakodinamik, immünojenite, metabolik kader, biyogüvenlik ve yan etkiler, ilaç etkileşimleri, doz konsantrasyonu vb. gibi hususlar, gelecekteki ilaç tasarımı için araştırılmalıdır. Biyoaktif bileşik sentezi, optimizasyonu, karakterizasyonu, testi ve bir kanser terapötik ajanı olarak potansiyel uygulamanın ayrıntılı şeması Şekil 1.10'da gösterilmektedir (Iqbal 2019).



Şekil 1. 10: Antikanser fitokimyasallarının sentezi, optimizasyonu, karakterizasyonu ve kanser terapötik ajanı olarak ileriye dönük kullanımının ayrıntılı şeması (Iqbal ve diğ. 2017'den uyarlanmıştır)

1.8.1 Antikanser Ajamı Olarak Bitkiler

Son zamanlarda, bitkisel kaynakların kullanıldığı alternatif tıp, modern insanlar tarafından kabul edilmiştir. Bitki sadece sağlık bakım rejimlerinin bir parçası olarak kullanılmamakta, aynı zamanda diyabet, hipertansiyon ve kanser gibi kronik hastalıkları olan hastalar için doğal temelli tedavi görevi de görmektedir. Örneğin, kanser hastalarının %60'ından fazlası alternatif bir tedavi olarak vitamin veya bitki tüketmektedir (Sivalokanathan ve diğ. 2005; Madhuri ve Pandey 2008). Özellikle kanser tedavisinde bitkilerle ilişkili terapötik etkilerin olduğunu bildiren pek çok bilimsel makale bulunmaktadır. Örneğin, *Eurycoma longifolia* Jack'dan izole edilen bir bitki bileşiği olan eurycomanone, apoptoz yoluyla hepatoselüler karsinom (HepG-2) hücre hattının proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Zakaria ve diğ. 2009). Iqbal ve diğ. (2017) yaptıkları derleme çalışmada, tıbbi bitkiler, familyası, kullanılan kısmı ve spesifik antikanser fitokimyasal türü ve *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile belirlenen bazı kanser türlerine karşı etki mekanizmaları hakkında ayrıntılı bilgiler toplanmış ve tablo olarak verilmiştir.

Alkaloidler, flavonoidler, lignanlar, saponinler, terpenler, taksanlar, vitaminler, mineraller, glikozitler, zamklar, yağlar, biyomoleküller ve diğer birincil ve ikincil metabolitler gibi çeşitli bitki ürünleri, kanser hücrelerini aktive eden proteinleri, enzimleri ve sinyal yollarını inhibe etmede ya da DNA onarım mekanizmasını, Bax, Bid, Bak proteinlerini aktive etmede, koruyucu enzimlerin oluşumunu uyarmada (Caspase-3, 7, 8, 9, 10, 12) ve antioksidan enzimleri (GSH, GST) uyarmada önemli roller oynamaktadır. Yukarıda bahsedilen proteinler, enzimler ve sinyal yolları üzerindeki etkinlikleri açısından bitkisel bileşenler güçlü antikanser etkiler göstermektedirler (Thakore ve diğ. 2012; Tariq ve diğ. 2017).

1.9 Bitki Galleri ve Gal Oluşumu

Birçok böcek türü, bitki gelişimini, bu böceklere benzersiz, gelişmiş yiyecek ve düşmanlardan ve elementlerden korunma sağlayan gal adı verilen benzersiz organlar oluşturacak şekilde yeniden yönlendirme yeteneğini elde etmiştir. Bitki galleri, bir virüs, mantar, bakteri, nematod veya eklembacaklı olabilen bir parazite tepki olarak oluşan benzersiz organlardır (Redfern 2011). Böcekler arasında, gal

oluşturma yeteneği, bağımsız olarak birçok kez altı şube halinde gelişmiştir (Dreger-Jauffret ve Rohfritsch 1992; Redfern 2011). Galler, hücre hipertrofisi (hücrelerin hacim olarak artması) ve tek bir dokunun hiperplazisinden (hücrelerin sayıca artması), özel işlevlere sahip birkaç doku tipini içeren oldukça organize ve karmaşık organların gelişimine kadar değişen fenotipik olarak son derece çeşitlidir (Stone 1998; Nyman 2000; Harper ve diğ. 2004). Galler, herhangi bir bitki dokusunda gelişebilir, ancak büyük çoğunluğu yapraklarda görülmektedir (Dreger-Jauffret ve Rohfritsch 1992). Yaprak galleri, doku farklılaşması olmayan basit kıvrımlar ve kalınlaşmalardan buklelere, keselere ve böceği farklılaşmış bir organ içinde tamamen saran örtülü gallere kadar bir karmaşıklık gradyanı boyunca sınıflandırılmıştır. Daha karmaşık galler, geliştikleri bitki dokularından oldukça farklıdır ve böceğin beslendiği özel bir besleyici dokuya dönüşürler (Redfern 2011). Normal bitki organları kadar yüksek düzeyde organize ve karmaşık olabilirler. Bunun nasıl gerçekleştirildiği tam olarak anlaşılmamış olsa da, tüm böcek galleri kimyasal sinyallerle ortaya çıkmaktadır (Redfern 2011). Darwin, böceklerin oluşturduğu bu galleri, kozalaklı bitkileri ve şeftalileri de kapsayan çiçek ve meyvelere benzetmiştir (Darwin 1868). Nitekim, pek çok böcek ailesinin oluşturduğu gallerde ve birçok bitki türünün şubelerinde çiçek ve meyve benzeri pek çok özellik görülmektedir. Darwin ayrıca iç dokuların sayısı, karmaşıklığı ve dizilişi açısından bazı meyveler ve meyveler arasındaki benzerliğe dikkat çekmiştir. Bu dokular, bitki embriyolarına besin sağlayan çekirdek veya endosperm kadar, böcek için karbonhidratlar ve proteinler açısından zengin bir besleyici katman içermektedir. Sklerotize bir kapsül genellikle böcek veya bitki embriyosunu korur ve çevreleyen korteks ve epidermis savunmayı sağlayan kimyasallar içermektedir. (Nyman 2000; Allison ve Schultz 2005). Gal ve meyve büyümesi, gelişimi ve işlevleri, kimyasal sinyallerin yönlendirmesi altındadır ve bir dizi transkripsiyonel olarak bir dizi gen tarafından kodlanır (Gillaspy ve diğ. 1993; Nabity ve diğ. 2013).

Bitki üzerinde gal oluşturma birçok böcek ailesinde yaygındır, ancak türlerin çoğu sadece iki ana taksona aittir: gal arıları (Cynipidae) ve gal sinekleri (Cecidomyiidae) (Cook ve Gullan 2004). Böcek, bitki morfogenezini kontrol ederek gal oluşumunu uyarır (Harper ve diğ. 2004). Gal oluşturan böcekler hem beslenme hem de barınma sağlayan bir yapı oluşturmak için konakçı bitkiyi mekanik ve/veya kimyasal uyarıcılar yoluyla aktif olarak yönlendirmektedirler (Stone ve Schönrogge

2003). Gal oluşumunun üç aşaması vardır: başlama, büyüme ve olgunlaşma (Rohfritsch ve Shorthouse 1982; Rey 1992). Dişi arı veya sinek tarafından meristematik doku üzerine ovipozisyonu, başlangıç aşamasını başlatır. Konakçı genellikle yumurtanın altındaki hücrelerin nekrozu ile reaksiyona girer; komşu hücreler bölünür ve sonunda yumurtayı çevreler (Rey 1992; Brooks ve Shorthouse 1998; Pilichowski ve Giertych 2017). Gal odası, hücre farklılaşması ile oluşturulur ve iç gal dokusu ile kaplanır ve dış gal kortikal parankima dokusu ile yapılır. Büyüme aşaması öncelikle hücre genişlemesinden oluşur ve bu da gal genişlemesine yol açar. İç gal dokusunun hücre katmanları, larvalar onlarla beslendiği için gelişim sırasında azalmaktadır. Parankim hücreleri, larvalar beslenirken besleyici hücrelere dönüşür ve nişasta ayrışmasında rol oynayan amilazların yanı sıra lipit ve proteinleri üretmektedirler (Bronner 1992; Rey 1992; Brooks ve Shorthouse 1998). Olgunlaşma sırasında hücre bölünmesi durur, galler odunsu yapı kazanır, larvalar olgunlaşır ve pupa olur ve son olarak gal dokusu kurur (Harper ve diğ. 2004).

Gallerin sistematik araştırması, 17. yüzyılda büyük İtalyan biyolog Marcello Malpighi'nin araştırmasıyla başlamıştır. Dünyada bilinen yaklaşık 13.000 gal ve galleri oluşturan böcek türü vardır (Dreger-Jauffret ve Shorthouse 1992; Raman ve diğ. 2005). Gal oluşturan böcekler, en belirgin olarak yaprak bitlerinde (Aphididae, Homoptera), tatarcıklarda (Cecidomyiidae, Diptera), testere sineklerinde (Tenthredinidae, Hymenoptera) ve sinipidlerde (Cynipidae, Hymenoptera) (Shorthouse ve Wool 2005) görülen yedi böcek takımında bağımsız olarak evrimleşmiştir. Bitkilerde gal oluşumunun biyolojik tetikleyicileri olarak hareket ettiği bildirilen çeşitli ajanlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (Sahu ve diğ. 2020):

Virüs: Virüslerin neden olduğu anormal bitki büyümeleri. Tatlı yonca kökü gali iyi araştırılmış bir örnektir.

Bakteri: Bakteriler bitki tümörlerini indükler ve en yaygın örnek, *Rhizobium radiobacter* tarafından indüklenen karga gali tümörüdür. Bitki tümör fizyolojisi alanındaki deneysel modellerden biridir.

Mantar: Mantarlar ayrıca çeşitli bitki organlarında gal oluşumuna neden olur. *Brassica campestris* L.'de görülen kök galleri bir örnektir.

Nematod: Birçok yuvarlak solucan aynı zamanda gal indükleyicileri, özellikle de kök gali olarak rapor edilmiştir. *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. üzerindeki kök galleri iyi bir örnektir.

Akar: Gal oluşturan akarlar çoğunlukla Eriophyidae familyasına ve daha az ölçüde Tenuipalpidae familyasına aittir. Akçağaç iğne galleri yaygın bir örnektir.

Böcek: Thysanoptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera ve Coleoptera gibi çeşitli böcek takımlarında gal indükleme kapasitesi mevcuttur.

1.9.1 Böcekler sınıfı altında gal üreten başlıca gruplar

- a. **Thysanoptera:** Tripsler çoğunlukla fitofaj (bitkilerle beslenir) veya mikofajdır (mantar miselleri veya sporları ile beslenirler). Trips ile indüklenen galler, bitki dokularının düzensiz proliferasyonundan oldukça organize yapılara kadar değişmektedir (Ananthkrishnan ve Raman 1989). *Gynaikothrips uzeli* (Zimmermann 1900) incir yaprak gallerine neden olan standart bir örnektir.
- b. **Diptera:** Cecidomyiidae (gal sinekleri) familyası, Diptera'nın tür açısından en zengin ailelerinden birisidir ve aynı zamanda dünyadaki en büyük gal indükleyen böcek grubunu içerir. Küresel ölçekte Cecidomyiidae ailesine ek olarak, Tephritidae ve Chloropidae familyasından da birkaç gal indükleyicisi bildirilmiştir (Dregger-Jauffret ve Shorthouse 1992).
- c. **Hemiptera:** Hemiptera'daki gal indükleme özelliği yaprak bitlerinde ve pisillerde görülebilir. Psylloidea'da gal indükleyen taksonlar Triozidae, Phacopteronidae ve Calophyidae dahil tüm ailelerde görülür (Burckhardt 2005). Gal indükleyen koksit ailesi Beesonidae, Dipterothripidae familyasından konakçı bitkiler ile ilişkilidir. Yaprak bitleri küresel olarak çok daha az sayıda gal oluşumuna neden olur; 4.401 türün %10'undan fazlası doğrulanmamış gal indükleyicilerdir (Wool 2004).
- d. **Hymenoptera:** Gal oluşturan Hymenoptera'lar (gal arıları) arasında sinipid arıları (Cynipidae), incir tozlaşma arısı (Agaonidae), testere sinekleri (Tenthredinidae) ve Chalcidoidea'dan birkaç üye bulunur (Raman 2007). Cynipoidea süper ailesine ait olan gal arıları (Cynipidae), dünya çapında

1500'ü aşkın tür ile gal indükleyicilerin en özel grubudur (Buffington ve diğ. 2020). Konukçu bitkiler üzerinde oluşan sinipid galleri, yapı ve şekil bakımından türe özgün olarak muazzam bir farklılık göstermektedir. Cynipini tribusu (meşe gal arıları) türlerinin büyük çoğunluğu (>%70), Fagaceae familyasına (çoğunlukla *Quercus*, *Castanea*, *Castanopsis*, *Chrysolepis*, *Lithocarpus*, *Notholithocarpus*) ait bitkiler üzerinde gal oluşturur (Ronquist ve diğ. 2015; Buffington ve diğ. 2020). Ülkemizde Cynipidae faunası toplam 153 türden oluşmaktadır (Azamaz ve Katılmış 2017, 2020^{a,b}; Bayrak ve Avcı 2019; Mutun ve diğ. 2020).

- e. **Lepidoptera:** Nispeten az sayıda Lepidoptera, gal oluşumuna neden olur. Küresel olarak 20 familyaya ait toplam 179 Lepidoptera gal indükleyicisi tanımlanmıştır (Mani 2000).
- f. **Coleoptera:** Bu takımın altındaki böceklerin çok azı gal indükleme kapasitesine sahiptir. Coleoptera'nın gal oluşumunu tetikleyen türler olarak tanınan tek taksonu, Curculionidae'nin Ceutorhynchinae alt ailesidir.

1.9.2 Gallerin Fitokimyasalları ve Kullanım Alanları

Gal dokularının gal bulundurmeyen bitki dokularına göre besinler açısından daha zengin olduğu düşünülmektedir (Price ve diğ. 1986, 1987). Bununla birlikte, birkaç çalışmada gal dokusunun besin maddelerince yüksek ve sekonder bileşiklerce düşük olduğunun bulunmasına rağmen (Abrahamson ve Weis 1986; Bronner 1992), bir dizi çalışma bunun her zaman böyle olmadığını göstermektedir (Paclt ve Hassler 1967; Anderson ve Mizell 1987; Brewer ve diğ. 1987; Hartley 1990; Hartley ve Lawton 1992). Gal oluşturucular bitki dokularının fizyolojik durumunu değiştirmektedirler. Özellikle larvanın beslendiği kısımlardaki hücreleri, ki bu hücrelerin olduğu kısma gal oluşturucunun metabolik olarak aktivitesini sürdürdüğü besleyici doku denmektedir (Bronner 1977, 1992; Shorthouse 1986).

Gallerin fitokimyasalları normal bitki kısımlarına göre daha farklıdır. Aslında, gallerde toplanan bu bileşikler, çağlardan beri insanların ilgisini çekmiş ve insanlar tarafından çeşitli amaçlarla kullanılmıştır. Diğer kültürlerin yanı sıra Çin, Yunan ve Hint halk ilaçlarında gallerin kullanımlarına tanıklık edilmektedir. Bitki

galleri, ev malzemeleri ve ilaç olarak da kullanılmaktadır. Örneğin eski zamanlardan beri meşe gallerinin boya olarak kullanıldığı bilinmektedir (Guarrera 2006). Ayrıca deri tabaklanması ve mürekkep yapımı da gallerin kullanım alanlarındandır. Çok sayıda etnobotanik çalışma, çeşitli hastalıkların hafifletilmesi için gallerin kullanıldığını bildirmiştir. Daha önce belirtildiği gibi gallerin biyokimyasal profilleri, normal bitki dokularından tamamen farklıdır. Gal özütleri üzerine yapılan bilimsel araştırmalar, biyolojik mekanizmaları açıklayan biyoaktif bileşenleri belirlemiştir. Gallerde bulunan fitokimyasallar, triterpen, gallik asit, etil galat, kateşin, epikateşin, tanik asit, reçineyi içermektedir. Gal dokuları normal bitki dokularından daha yüksek oksidatif stresle karşılaşır. Gallerin yüksek polifenollerin, antosiyaninlerin, flavonoidlerin ve tanenlerin içermesi, oksidatif stresle mücadele etme çabası olarak kabul edilmektedir (Huang ve diğ. 2015).

1.9.3 *Quercus infectoria* Oliv. Galleri

Kuzey ılıman bölgesinin deniz kıyısı, dağ yamaçları ve sulak ovaları gibi çeşitli habitatlara dağılmış, Fagaceae familyasına üye olan, yaklaşık 600 meşe ağacı türü bulunmaktadır (Khouzami ve diğ. 2009). Anadolu’da, 8 tür, 8 alttür ve 22 varyete ile toplam 18 taksona sahiptir. *Quercus* türleri yarı yaprak dökmeyen küçük ağaçlar veya çalılar endüstriyel kullanımlarının yanı sıra ekonomik değere de sahiptirler (Saltan ve diğ. 2019). *Quercus infectoria* Oliv. (QI) meşesi Yunanistan, Anadolu, Suriye ve İran’a özgü küçük bir ağaçtır (4 ila 6 metre boyunda) (Basri ve Fan 2005; Olfat ve Pourtahmasi 2010). *Q. infectoria*’nın da dahil olduğu *Quercus* türlerinin tannik asitin kan büzücü, antioksidan, antidiyabetik, hepato koruyucu, antiviral, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antikanser, antifungal ve analjezik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Chung ve diğ. 1998; Karakurt ve Adalı 2011; Genç ve diğ. 2012; de Sousa Leal ve diğ. 2015; Ghosh 2015; Liu ve diğ. 2015; Yıldırım ve Kutlu 2015; Naim ve diğ. 2017; Vanga ve diğ. 2017).

Meşeler (*Quercus* spp.) arılar tarafından gal oluşumuna oldukça eğilimlidir. Meşe gal arıları (Cynipini), Hymenoptera takımına ait olan 1.500’i aşkın tür ile temsil edilen Cynipidae familyasının bir grubudur (Buffington ve diğ. 2020). *Quercus infectoria* gallerinin kullanımı, insanların onları doğal çevrelerinde

kalıcı resimler sağlamak için boyama ajanları olarak kullandıkları eski zamanlara dayanmaktadır. Gal, kök boyası (*Rubia tinctorum* L.) özütleri, kan ve ayı yağının bir kombinasyonu kullanılarak boyanmış bazı eski çizimler taşların üzerinde kalmıştır (Lotfi 2016). Dahası, *Q. infectoria* üzerindeki *Andricus infectorius* (Hartig, 1843) galleri, halı ipliklerinin kalitesini ve dayanıklılığını artırmak için doğal boyaların vazgeçilmez bileşenlerinden biri olmuştur (Onal ve diğ. 2005; Shadid ve diğ. 2012). Geleneksel İran tıbbında, gallerin yoğun büzücü etki gösterdiği bilinmektedir (Al-Ishbili 1990). Etnik gal uygulamaları pişik gibi döküntüleri yumuşatmada, sünnet sonrası anti-enfektif olarak, diş ağrısı için ağrı kesici olarak ve nazardan korunmada kullanılmaktadır (Hooper 2003). *Q. infectoria* galleri şişlik, iltihaplanma, diş enfeksiyonu, akut ishal ve kanama gibi çok çeşitli hastalıkları tedavi etmek için halk tıbbı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Galla 1911; Kaur ve diğ. 2008). *Q. infectoria* gallerinin alkol özütü, oral veya topikal uygulamadan sonra *in vivo* anti inflamatuvar etki göstermiştir (Kaur ve diğ. 2004). *Q. infectoria* gallerinin etanol ekstraktlarının NO ve O₂⁻ giderimini sağlayarak antioksidan aktivite sahip oldukları MTT analizi ile ortaya çıkarılmıştır (Kaur ve diğ. 2008). Yapılan çalışmalar gal ekstraktlarının antioksidan enzim konsantrasyonunu arttırdığını da göstermiştir (Kaur ve diğ. 2008; Umachigi ve diğ. 2008; Ahmad ve diğ. 2011; Fathabada ve diğ. 2015). Gallerin kimyasal içeriğinde bulunan fenolik bileşenler ve flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri ile bir korelasyon göstermiştir (Ikram ve Nowshad 1977; Wiart ve Kumar 2001). Ayrıca gallerin antioksidan aktivitesi hem kimyasal hem de biyolojik modellerle test edilmiştir (Imtiaz ve diğ. 2013). Gal ekstraktlarının yara iyileştirme ile ilişkisi olan bazı enzimlerin aktivitesini arttırdığını gösteren hayvan çalışmaları bulunmaktadır (Zhang ve diğ. 2014). *Q. infectoria* gallerinin metanol özütleri, deney hayvanlarında önemli analjezik aktiviteler göstermiştir (Rastogi ve Mehrotra 1999). Antidiyabetik etkiler de test edilmiş ve 500 mg/kg konsantrasyondaki metanol ve su ekstraktın, glikoz tolerans testi ile ölçüldüğünde kan şekerinde sırasıyla %18,5 ve %2,5 azalma sergilediği görülmüştür (Gamboa-Gómez ve diğ. 2017). Tirozinazı inhibe etme kabiliyetlerinden dolayı *Q. infectoria* ekstraktlarının anti-pigmentasyon etkisi de gösterilmiştir (Ansari ve diğ. 2011). Bu antioksidatif etki gallerin içerdiği tannik asit ve gallik asit gibi polifenollere atfedilmiştir (Kaur ve diğ. 2008). Meşe gallerinin tanenleri halk tıbbında kadın sağlığı sorunları için kullanılmaktadır. *Q. infectoria* galinin metanol özütü, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan bir patojen olan *Enterococcus faecalis*'e karşı antibakteriyel etki gösterdiği disk difüzyon

yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada ekstrenin patojene karşı MIC (minimum inhibitör konsantrasyonu) değerleri 16,6 µl/mL olarak belirlenmiştir (Nagesh ve diğ. 2012). *Q. infectoria* galleri doğum, diş ağrısı ve diş eti iltihabını takiben enfeksiyonların tedavisinde kullanılır (Chopra ve diğ. 1956). *Q. infectoria* gallerinin metanol ve etanol ekstraktlarının *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 13419, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 ve *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 gibi ağız patojenlerine karşı aktivite göstermiştir. MIC değerleri 0,16 mg/mL ile 0,63 mg/mL arasında değişiklik göstermiştir (Basri ve diğ. 2012). Bulgular, meşe ekstresinin diş çürüklerine ve periodontitis etyolojik ajanlarına karşı kullanılabileceğini öne sürmüştür. Daha önceki çalışmalar fenolik asitlerin antibakteriyal (Rahman ve diğ. 2015), anti-enflamtuvar (Chokpaisarn ve diğ. 2017) ve antioksidan aktiviteler (Lehman ve diğ. 2017; Li ve diğ. 2018) gibi farmakolojik aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. *Q. infectoria* gal ekstresinde fenoller, flavonoidler, steroidler, triterpenler, tanenler, saponinler ve alkaloidler bulunur (Shrestha ve diğ. 2014). Başka bir çalışmada, *Q. infectoria* gal özütünün proliferasyon, alkalik fosfataz (ALP), osteokalsin ve insan fetal osteoblast hücre hattının (hFOB 1.19) morfolojisi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Periyodik olarak ve ekstrakt ile (0.1 ila 99.0 µg/mL) inkübasyondan iki hafta sonra, takip edilen parametreler kaydedilmiştir, bu da tedavi sonrasında hücre proliferasyonu, ALP ve osteokalsin seviyelerinin arttığını göstermiştir (Hapidin ve diğ. 2015).

1.10 Amaç

Bitkisel tedavi, insanoğlunun bildiği en eski sağlık hizmetidir (Al-Snafi 2018). Ancak şimdiye kadar, dünyadaki 250.000 ila 500.000 bitki türü arasından yalnızca %1-10'unun potansiyel antikanser bileşiklerinin olası terapötik değerleri kimyasal ve farmakolojik olarak incelenmiştir (Verpoorte 2000). Kanser tedavisinde etkili ilaçları keşfetme olasılığını en üst düzeye çıkarmak için, bitkilerin ve bitkisel ürünlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda bazı meşe gallerinin olası antioksidan ve antikanser etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı çözücülerle hazırlanan gal ekstraktları kullanılmıştır. Ayrıca antioksidan kapasiteyi oluşturan çeşitli sekonder metabolit miktarlarının belirlenmesi ve fenolik bileşenlerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Literatürde,

Özellikle galler üzerinde yapılan fitokimyasal ve biyolojik aktivite araştırmaları ile ilgili daha az referansa rastlanmasından dolayı, çalışmamızın kapsamlı ve güncel bir kaynak oluşturması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Arazi Çalışmaları ve Gal Örneklerinin Toplanması

2.1.1 *Andricus anatolicus* Melika, Mutun & Dinç, 2014

İncelenen Materyal: BAYBURT, Gençosman, 40°09' K, 40°20' D, 1900 m, 18.IX.2018; Kop, 40°03' K, 40°25' D, 2000-2050 m, GÜMÜŞHANE, Kelkit, Bindal, 39°54' K, 39°28' D, 1950-1980 m, 12.VI.2019; Kelkit, Çağlar, 40°05' K, 39°17' D, 1500-1740 m.

Yaşam Döngüsü: Bu türün aseksüel nesli bilinmektedir (Mutun ve diğ. 2014).

Konukçu: *Q. infectoria*, *Q. macranthera* (Mutun ve diğ. 2014). Bu çalışmada *Q. macranthera* üzerinden toplandı.

Gal Yapısı: Tek odacıklıdır. Bitkinin terminal ve lateral tomurcuklarında gelişir. Gal gelişirken yeşilimsi, olgunlaştığı zaman kahverengiye dönüşür. Aşağı yukarı küresel yapılı olan gal 6-11 mm çapındadır. Galin tabanı daha genişken tepe doğru çap daralır. Bu şekli ile kubbeyi andırır (Şekil 2.1) (Mutun ve diğ. 2014).

Fenoloji: Gal yaz aylarında gelişir ve ekim ayında olgunlaşır (Mutun ve diğ. 2014).

Türkiye Yayılışı: Bitlis, Gümüşhane, Muş (Mutun ve diğ. 2014).



Şekil 2. 1: *A. anatolicus* aseksüel galleri

2.1.2 *Andricus cecconii* Kieffer, 1901

İncelenen Materyal: DENİZLİ, Serinhisar, Yatağan, Kefe Yaylası.

Yaşam Döngüsü: Bu türün seksüel ve aseksüel nesli bilinmektedir (Shachar ve diğ. 2018). Bu çalışmada aseksüel nesli toplandı.

Konukçu:

Seksüel nesil: *Q. brantii*, *Q. cerris*, *Q. coccifera*, *Q. ithaburensis*, *Q. libani*, *Q. pubescens*, *Q. trojana* (Kieffer 1910; Sternlicht 1968; Shachar ve diğ. 2018).

Aseksüel nesil: *Q. boissieri*, *Q. frainetto*, *Q. infectoria*, *Q. pedunculiflora*, *Q. pubescens* (Azmaç ve Katılmış 2017; Shachar ve diğ. 2018). Bu çalışmada *Q. infectoria* üzerinden toplandı.

Gal Yapısı: Çok odacıklıdır. Olgunlaştığı zaman Batı Palearktık’de ki en büyük gallerden biridir. Üzeri kıvrımlı ve yoğun dikenlerle kaplıdır. Küresel şekilli olup 50 mm çapa ulaşır. Diken uzunluğu 10 mm kadardır ve uçları spatül şeklindedir. Genç evrede parlak yeşil renklidir. Olgun galler birkaç yıl ağaçların üzerinde kalabilir (Şekil 2.2).

Fenoloji: Gal sonbaharda olgunlaşır (Melika ve diğ. 2004).

Türkiye Yayılışı: Afyonkarahisar, Antalya, Bitlis, Burdur, Denizli, Erzincan, Isparta, İstanbul, Kütahya, Malatya, Uşak, Van (Azmaz ve Katılmış 2017).



Şekil 2. 2: *A. cecconii* aseksüel galleri

2.1.3 *Andricus curtisii* (Müller, 1870)

İncelenen Materyal: MUĞLA, Fethiye, Seydikemer.

Yaşam Döngüsü: Bu türün sadece aseksüel nesli bilinmektedir .

Konukçu: *Q. infectoria*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. robur* üzerinde tespit edilmiştir (Azmaz ve Katılmış 2017; Bayrak ve Avcı 2019). Bu çalışmada *Q. infectoria* üzerinden toplandı.

Gal yapısı: Tek odacıklıdır ve küreseldir. Üzerinde piramidial çıkıntılar bulunur üzeri şişkin ve mantarimsıdır. İçsel hava deliği bulunmaz. Larva odası galin merkezinde konukçu bitkiye yakın kısımda bulunur ve etrafı odunsu bir duvarla çevrilidir. Genç evrede gal kırmızı, turuncu ve maviden ibarettir. Daha sonra soluk sarı ve kırmızıya döner. Olgunlaşınca parlak rengini kaybeder. Erginler çıktıktan sonra gal ağaçta kalır (Şekil 2.3).

Fenoloji: Gal yaz aylarında gelişir ve eylül sonu ve ekim başında olgunlaşır.

Türkiye Yayılışı: Afyonkarahisar, Ankara, Antalya, Aydın, Burdur, Bursa, Denizli, Erzincan, Gümüşhane, Isparta, Kütahya, Malatya, Uşak (Azmaz ve Katılmış 2017).



Şekil 2. 3: *A. curtisii* aseksüel galleri

2.1.4 *Andricus sternlichti* Bellido, Pujade-Villar & Melika, 2003

İncelenen Materyal: MUĞLA, Fethiye, Seydikemer.

Yaşam Döngüsü: Bu türün sadece aseksüel nesli bilinmektedir (Melika 2006).

Konukçu: *Q. infectoria*, *Q. lusitanica*, *Q. pubescens* (Chodjai 1980; Dalla-Torre ve Kieffer 1910; Azmaz ve Katılmış 2017). Bu çalışmada *Q. infectoria* üzerinden toplandı.

Gal Yapısı: Tek odacıklıdır. Aşağı yukarı küresel yapılı tutunma noktası hafif uzamıştır. Olgunlaştığında 10-15 mm çapındadır. Uzunluğu 2-3 mm olan ve bazen birleşen uzantılarla kaplıdır. Genç evrede yeşil-sarı renkte iken olgunlaştığı zaman kum rengindedir. Olgun galin dış yüzeyi oldukça sert ve odunsudur (Şekil 2.4).

Fenoloji: Gal mayıs sonunda gelişmeye başlar ve sonbaharda olgunlaşır (Melika 2006).

Türkiye Yayılışı: Afyonkarahisar, Denizli, Isparta, İstanbul, Erzincan, Kütahya, Manisa, Uşak, Van (Azmaz ve Katılmış 2017; Bayrak ve Avcı 2019).



Şekil 2. 4: *A. sternlichti* aseksüel galleri

2.1.5 *Andricus tomentosus* (Trotter, 1901)

İncelenen Materyal: MUĞLA, Fethiye, Seydikemer.

Yaşam Döngüsü: Bu türün sadece aseksüel nesli bilinmektedir (Melika 2006).

Konukçu: *Q. cerris*, *Q. frainetto*, *Q. infectoria*, *Q. lusitanica*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, *Q. robur* (Ionescu 1973; Azmaz ve Katılmış 2017). Bu çalışmada *Q. infectoria* üzerinden toplandı.

Gal Yapısı: Tek odacıklıdır. En iyi ayırt edici özelliği üzerinin kadifemsi bir örtü ile kaplı olmasıdır. Genellikle koni biçimindedir. Olgun gal 12-18 mm boyunda, taban kısmı ise 10-15 mm çapındadır. Gal dokusu odunsudur (Şekil 2.5).

Fenoloji: Gal yaz sonunda gelişir ve sonbaharda olgunlaşır (Melika 2006).

Türkiye Yayılışı: Afyonkarahisar, Ankara, Antalya, Balıkesir, Bursa, Denizli, Erzincan, Isparta, İstanbul, Kütahya, Malatya, Manisa, Muğla, Samsun, Uşak (Azmaz ve Katılmış 2017).

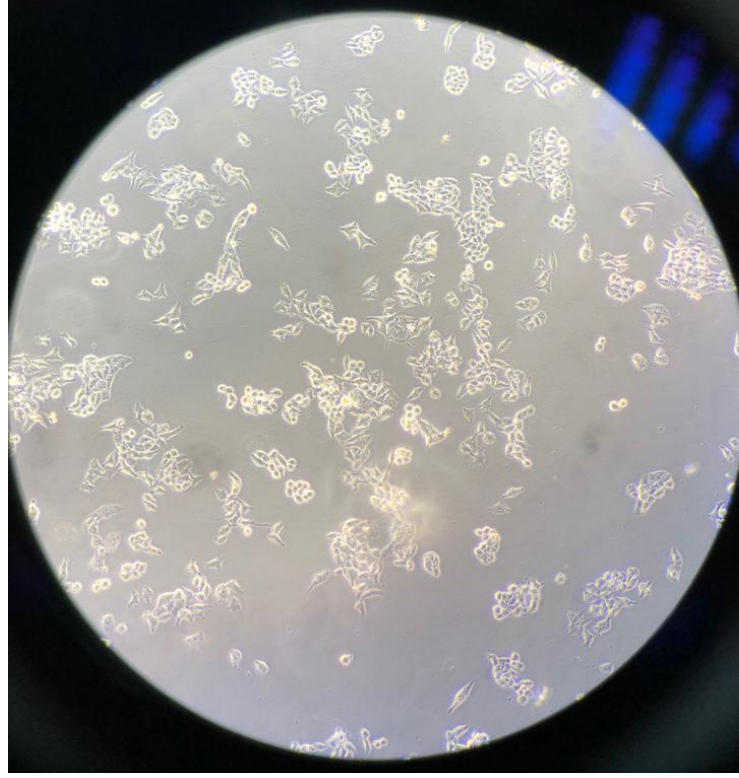


Şekil 2. 5: *A. tomentosus* aseksüel galleri

2.2 Hücre Hattı ve Özellikleri

Gal ekstraktlarının sitotoksik etkilerini incelediğimiz deneyler, hücre kültürü kullanılarak in vitro koşullarda kendi stoklarımızdan kullandığımız MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) Şekil 2.6) pankreas hücre hattı ile, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji AD. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

- Organizma: İnsan (*Homo sapiens*)
- Tipi: Pankreas
- Cinsiyet-Yaş: Erkek-65 yaş
- Büyüme Özelliği: Yapışarak (adherent)
- Hücreye ait diğer özellikler: epiyetal morfoloji

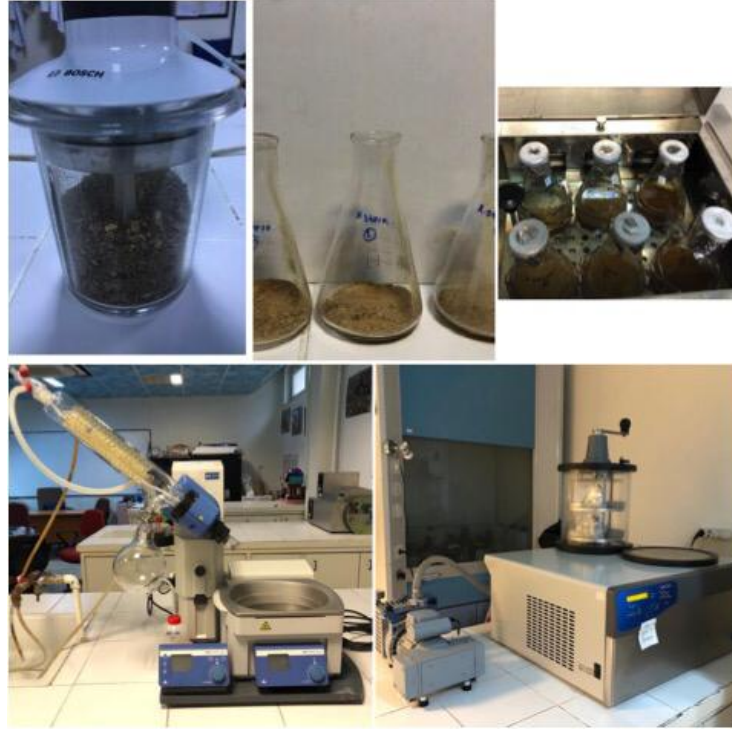


Şekil 2. 6: Çalışmamızda kullanılan MiaPaca-2 hücrelerinin 10X mikroskop görüntüsü

2.3 Ekstraksiyon Aşaması ve Ekstrakt Verimliliğinin Hesaplanması

Fenolojisine uygun zamanda toplanan gal örnekleri teşhis edildikten sonra gölgede kurutulmuştur. Kurutulan gal örnekleri blender yardımı ile parçalanıp, 15 gr tartılarak erlenlere aktarılmıştır ve üzerlerine 150 mL çözücü (aseton, etanol, metanol ve su) eklenerek çalkalamalı su banyosuna koyulmuştur (6 saat, 55 °C). Süre bitiminde su banyosundan çıkarılan örnekler Whatman no.1 filtre kağıdı kullanılarak amber şişelere süzülmüştür. Bu işlem, aynı prosedür izlenerek 2 kez tekrar edilmiştir.

Süzülen çözeltilerden çözücüyü (aseton, etanol ve metanol) uzaklaştırmak üzere rotary evaporator (IKA 48°C, 70 rpm) kullanılmıştır. Farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktların bünyesinde kalan su, liyofilizatör cihazı (Labconco Freeze Dryer, FreeZone) yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Kılınçarslan ve Mammadov 2018).



Şekil 2. 7: Gal örneklerinin ekstraksiyon aşaması

30 gram gal örneklerinden elde edilen kuru ekstraktlar her bir tür ve çözücü için ayrı ayrı hassas terazide tartılarak yüzde (%) ekstrakt verimliliği hesaplanmıştır.



Şekil 2. 8: Elde edilen kuru gal ekstraktlarının tartılması

Gal örneklerinin ekstrakt verimliliği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Ekstrakt Verimliliği (\%)} = \frac{W_1}{W_0} \times 100$$

W_1 ekstraktın son ağırlığı, W_0 gal örneğinin başlangıç ağırlığını ifade etmektedir.

2.4 Toplam Antioksidan Aktivite Yöntemleri

2.4.1 β -Karoten/Linoleik Asit Yöntemi

Bu metot linoleik asidin ısı ve hava oksidasyonu ile serbest radikal zincir reaksiyonu sonucu oluşan alkil peroksitler tarafından β -karotenin renk açılımının izlenmesi temeline dayanır. Reaksiyon mekanizması; β -karoten stok çözeltisi, 2 mg β -karotenin 1 mL kloroformda çözülmesiyle hazırlanmıştır. 1 mL β -karoten stok çözeltisine, linoleik asit (20 μ L) ve Tween 20 (200 μ L) ilave edilmiştir. Kloroform rotary evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra 100 mL dH₂O ile karıştırılmıştır. 1 mg/mL hazırlanan ekstrakt çözeltilerine 24 mL β -karoten emülsiyonu eklenmiştir. Emülsiyon test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japon) kullanılarak başlangıç absorbansları 470 nm'de ölçülmüştür. Tüpler 50°C'de inkübasyona (120 dakika) bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası örneklerin 120. dakikadaki absorbansı 470 nm'de ölçülmüştür. Bu test sisteminde BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Amin ve diğ. 2002). Hesaplamalar aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır:

$$[1-(A_0-A_t)/(A_0^\circ-A_t^\circ)] \times 100$$

A_0 ve A_0° : örneğin; A_t ve A_t° : kontrolün 0. ve 120. dakikadaki absorbanslarını ifade etmektedir.

2.4.2 Fosfomolibdenyum Antioksidan Aktivite Yöntemi

Metodun esası Mo(VI)'nın Mo(V)'e indirgenmesi ve asidik ortamda yeşil renkli fosfat/Mo(V) kompleksinin oluşumuna dayanır. Metotta öncelikle bitki ekstraktın konsantrasyonları 50 μ g/mL olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Standart olarak ise askorbik asit kullanıldı. 0,6 M H₂SO₄, 28 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 4 mM Amonyum molibdat karıştırılarak reaktif çözeltisi hazırlanır. 50 μ g/mL konsantrasyonunda bitkisel çözeltilerden 0,3 mL bir tüpe alındı ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden 3 mL eklendi. Tüpler kuvvetlice karıştırılıp 95°C'de 90 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda çözeltilerin absorbansı 695 nm'de okundu. Aynı işlemler standart antioksidan olarak kullanılan askorbik asit için de yapıldı.

Antioksidan aktivite askorbik asit eşdeğeri (mgAE/g) olarak hesaplandı (Prieto ve diğ. 1999).

2.5 Radikal Giderim Aktivite Belirleme Yöntemleri

2.5.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi

Ekstraktların serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir (Wu ve diğ. 2006). Farklı konsantrasyonlarda (0.005-0.025 mg) hazırlanan ekstrakt çözeltilerinin üzerine 4 mL DPPH çözeltisi (%0,004 w/v) eklenmiştir. Oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübasyona (30 dk) bırakılmıştır. Bu süre sonunda örneklerin absorbansı 517 nm’de ölçülmüştür. Bu test sisteminde BHT ve BHA standart olarak kullanılmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır:

$$[A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Formül kullanılarak ekstraktların % inhibisyon değerleri belirlendikten sonra IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

2.5.2 ABTS Radikal Giderim Kapasitesi

ABTS radikali giderim aktivitesi deneyleri Re ve diğ. (1999) geliştirdiği metoda göre yürütülmüştür. Bu metotta, ABTS stok solüsyonu 12-16 saat öncesinde, 7mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfat karıştırılarak karanlıkta bekletilerek hazırlanır. ABTS•+ solüsyonu 734 nm’de absorbans 0,70 (±0,02) olana kadar etanol ile seyreltilir. 0,005-0,025 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan bitki özütlerinden test tüplerine 500 µL alınır ve üzerlerine 4,5 mL etanol ile seyreltilen ABTS solüsyonundan eklenir. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 734 nm’de absorbanslar okunur. Standart olarak BHA kullanılmıştır. Hesaplamalar aşağıdaki formül kullanılarak yapılmıştır:

$$[A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Formül kullanılarak ekstraktların % inhibisyon değerleri belirlendikten sonra sonuçlar IC₅₀ değerleri hesaplanarak verilmiştir.

2.6 İndirgeme Gücü Deneyleri

2.6.1 Bakır İndirgeme Gücü Kapasitesi (CUPRAC)

Bitki ekstraktlarının 100 µg/mL konsantrasyonu kullanılmıştır. Metotta öncelikle her bir deney tüpüne 1 mL CuCl₂.2H₂O (10⁻² M), 1 mL amonyum asetat (1 M pH:7), 1 mL neokuproin (7,5x10⁻³ M) çözeltileri ile 0.6 mL saf su eklenmiştir. Daha sonra her bir tüpe bitkisel çözeltilerden 0.5 mL eklenip iyice karıştırılmıştır. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda absorbansları 450 nm'de okunmuştur (Apak ve diğ. 2006). Sonuçlar troloksa eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

2.6.2 FRAP/TPTZ testi

Frap metodu bitkisel ekstraktların Fe(III)/TPTZ kompleksini Fe(II)/TPTZ kompleksine indirgemesi prensipine dayanır. Bu amaçla 50 µg/mL'lik özütler kullanıldı. Bu özütlerden 0,1 mL alınıp üzerine 2 mL FRAP reaktif karışımı eklendi. Reaktif karışımı 10:1:1 oranında asetat tamponu (0,3 M pH:3.6), 40 mM HCl içinde 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl₃ içerir. Bu şekilde hazırlanan tüpler 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve absorbansları 593 nm'de okundu. FRAP metodun sonuçları standart troloks kullanılarak değerlendirildi (Apak ve diğ. 2016).

2.7 Metal Şelatlama Kapasitesinin Ölçülmesi

Ekstraktların metal şelatlama kapasitesinin Dinis ve diğ. (1999)'nin yöntemi izlenerek belirlenmiştir. Bu yöntemeye göre, 2 mL örnek solüsyonu üzerine 0,05 mL

FeCl₂ (2mM) ve 0,2 mL ferrozin (5 mM) solüsyonları eklenir. Kör, 2 mL örnek solüsyonu , FeCl₂ (0,05 mL) ve su (0,2 mL) eklenerek oluşturuldu. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra absorbanlar 562 nm’de ölçülür ve sonuçlar EDTA standardı ile kıyaslanarak verilmiştir.

2.8 Toplam Sekonder Metabolit Madde Miktarlarının Belirlenmesi

2.8.1 Folin Ciocalteu Ayıracı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu Reaktifini kullanarak gallik aside eşdeğer olarak belirlenmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977). 1 mg/mL ekstrakt çözeltisi, dH₂O (46 mL) ve FCR (1 mL) ile karıştırıldıktan 3 dakika sonra %2 Na₂CO₃ (3 mL) çözeltisi eklenmiştir. Karışım 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılıp, periyodik aralıklarla çalkalanmıştır. Süre sonunda absorbansları 760 nm’de okunmuştur.

2.8.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid madde miktarları, kuersetine eşdeğer olarak alüminyum klorid spektrofotometrik metodu kullanılarak belirlenmiştir (Arvouet- Grand ve diğ. 1994). Bu metoda göre %2’lik AlCl₃ (1 mL) ile 2 mg/mL konsantrasyondaki bitki ekstraktı (1 mL) karıştırıldıktan sonra, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde 415 nm’de karışımın köre karşı absorbansı belirlenmiştir. Aynı işlemler standart flavonoid olan kuersetin için de yapılarak, ekstraktların toplam flavonoid madde içerikleri quercetine eşdeğer (mgQE/g) olarak verilmiştir.

2.8.3 Toplam Tanen Madde Miktarı

Ekstraktların tanen madde miktarları Bekir ve diğ. (2013)’nın geliştirdiği vanillin metodu ile belirlenmiştir. Buz banyosu içerisindeki test tüplerine, ekstrakt

çözeltisi (0.5 mL) ve 7M H₂SO₄ ile hazırlanmış %1 vanilin reaktifi eklenmiştir. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra absorbans değerleri 500 nm’de ölçülür. Sonuçlar kateşin denklemine eşdeğer olarak hesaplanır.

2.9 HPLC Metodu ile Fenolik Bileşenlerin Karakterizasyonu

Fenolik bileşenlerin HPLC-DAD analizi Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü’nde yürütülmüştür. Ekstraksiyon aşamasında elde edilen 0,2 gr gal ekstraktları 0,45 µm’lik membran filtreden geçirilerek HPLC viallerine aktarılmış ve yüksek performanslı likid kromatografisine (HPLC) enjekte edilmiştir (20 µL). Araştırmada kullanılan HPLC (Shimadzu Prominence) C18 ters faz kolon, kolon fırını (CTO-10ASVp), analitik pompa (LC20 AT), diod dizi dedektörü (DAD) ekipmanlardan oluşmaktadır.

Fenolik bileşiklerin HPLC ile belirlenmesinde Caponio ve diğ. (1999)’nun metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. %3 Formik asit (A) Metanol (B) çözeltileri mobil faz olarak kullanılmıştır. Gal örneklerindeki fenolik bileşiklerin tanımlanması, bileşiklerin kolondaki alıkonma süresi ve spektrumlarının ilgili standart maddelere ait süre ve spektrumlarla karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Fenolik bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve konsantrasyonlarının hesaplanması bileşiklerin maksimum absorbans değeri verdiği dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin miktarlarının tespit edilmesinde bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş entegre alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır. Gallik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, kafeik asit, narinjin, sinamik asit için 280 nm; 2,5-dihidroksi benzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, p-kumarik asit, ferulik asit için 320 nm; epikateşin için 260 nm; rutin ve kuersetin için 360 nm, elajik asit için 240 nm fenolik bileşiklerin analizinde kullanılan dalgaboylarıdır.

2.10 Sitotoksosite ve Gen Ekspresyon Deneylei

Gal ekstraktlarının sitotoksosite ve Gen Ekspresyonu üzerine etkilerinin incelendiği alışmalar Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji AD. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.



şekil 2. 9: Hücre kültürü çalışmalarının yürütüldüğü laboratuvar

2.10.1 Hücre Kültürü

Gal ekstraktlarının, Mia-Paca2 hücre hattındaki sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla çalışmamızda kullandığımız Mia-Paca2 hücrelerinin rutin kültür basamakları;

- Hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması ve pasajlanması
- Ekim için hücrelerin sayılması ve kullanılacak kültür plakalarına ekilmesi
- Dondurulması ve çözülmesini kapsamaktadır.

Hücrelerin *in vitro* koşullarda yaşayabilmesi, büyüme ve bölünmelerini sağlayabilmesi amacıyla hücrelerin ihtiyaç duyduğu elzem maddeler ile uygun besiyeri hazırlanmıştır. Hazırladığımız besiyeri; %10 ftal sığır serumu (FBS, 04-121-1B, Biological Industries), %1 L-glutamin, 1mM Sodyum piruvat (03-042-1B, Biological Industries), 0.1mM Aminoasit solusyonu (01-340-1B, Biological

Industries) 100IU/mL penisilin ve 10 mg/mL streptomisin (03-031-1C, Biological Industries) içeren DMEM (Sigma) besiyeridir.

Mia-Paca2 hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması işleminde; hücreler DMEM besi yeri ile petri kaplarına ekilmiş ve 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde iki günde bir besi ortamları tazelenerek inkübe edilmiştir. Hücreler tutunarak üremektedir. Bu hücrelerin pasajlanması için ilk olarak yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları gerekir. Önce petrilere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilip ölü hücrelerden ve hücre atıklarından iyice arındırılıp aspire edildikten sonra tripsin ilave edilerek hücrelerin petri yüzeyinden kalkması sağlanmıştır. Petri içerisindeki hücre-ortam karışımı 15 ml'lik falkonlara alınıp 1500 g'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak çöken hücreler besi yerinde homojenize edilerek uygun oranda petrilere ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yeniden petriye yapışarak çoğalmalarının sağlanması için inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin sayılması işleminde tripan mavisi boyasından yararlanılmıştır. Tripan Mavisi sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Ölü hücreler mavi (boya almış) ve canlı hücreler boya almamış olarak görülür. Deneylerin standardizasyonunu sağlayabilmek amacıyla tüm deney basamaklarında hücre sayımları yapılarak ekim işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda hücreler Neubauer Lamı ile mikroskop yardımıyla sayılmıştır. Hücreler petri kabından tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra üzerine besi yeri eklenmiştir. Ependorfta 50 µl hücre süspansiyonunun içine 50 µl tripan mavisi eklenerek bu karışımdan 20 µl alınarak neubauer lamına eklenmiştir. Böylece canlı ve ölü hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu aşama hücre ekimi yapılacak her bir deney testi için ayrı ayrı yapılmış ve çalışmaya göre çeşitli sayılarda ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin dondurularak saklanması işlemi kriyotüpler içerisinde DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin dondurulması, tripsinizasyon ve santrifüj basamaklarından sonra 1,5 ml hacimli kriyotüplere, 9:1 oranında besi yeri ve DMSO (%10 DMSO) olacak oranda hücre süspansiyonu koyulmuştur. Resüspanse edilerek kriyotüplere konulan hücreler daha sonraki çalışmalar için -80 derecede muhafaza edilmiştir.

Dondurulmuş hücrelerin yeniden çözülüp ekilmesi işlemleri; dondurulan kriyotüpteki hücrelerin hızlı bir şekilde 37°C de su banyosunda çözülüp biraz da taze

besi yeri eklenerek önce falkona alınıp santrifüj işlemi ile DMSO içeren besi yeri uzaklaştırılıp yeni besi yeri eklenmesinden sonra kültür kaplarına ekilmesi ve uygun kültür şartlarında inkübe edilmesi şeklinde yapılmıştır.

2.10.2 XTT Hücre Canlılığı Testi

Gal ekstraktlarının zamana ve doza bağımlı hücre canlılığı testi ve hücrelerin yüzde ellisinin yaşadığı dozu bulmak için XTT ile, hücre proliferasyon testi kullanılmıştır. Bu test suda eriyebilen bir bileşik olan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'yi canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre işlemektedir.

Suda eriyebilir özellikte olan boyanın yoğunluğu bir spektrometre ile verilen dalga boylarında okutulmakta ve metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılı olan formazon oluşumu sayesinde hızlı bir şekilde hücre canlılığı testi sonuçlarının değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Gal ekstraktlarının sitotoksitesi ve doz ve zamana bağlı etkisi “Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)” ile yapılmıştır. Toz halinde bulunan gal ekstraktları çeşitli dozlarda %10 serumlu tam besi ortamında binde bir oranında DMSO içinde çözülmüş ve konsantrasyonları ayarlanarak (5 µM ve 500 µM arası) etkisi araştırılmıştır. Seçilen konsantrasyon aralığı literatür bilgileri dikkate alınarak belirlenmiştir. Test kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

Mia-Paca2 pankreas hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında 1×10^4 /kuyucuk miktarında ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye yapışması için 24 saat beklenmiştir. 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 60 µM, 75 µM, 100 µM, 250 µM, 350 µM, 500 µM çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Kontrol kuyucukları dışında örnek gruplarına 100 µl içindeki son konsantrasyonları yukarıdaki dozlarda gal ekstraktları ilave edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonda gal ekstraktlarının uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu “Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Cat # 20-300-1000-Biological Industries)” ile saptanmıştır. Aynı zamanda zamana bağımlı etkinin

araştırılması amacıyla test işlemi 24, 48 ve 72. saatlerde çalışılmıştır. Bu saatler sonunda her bir kuyucuğa 100 µL ortam koyulduktan sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu (49 µL XTT Reagent Solüsyonu ve 1 µL Aktivatör Solüsyonu) eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılmasıyla belirlenmiştir.

Ölçülen optik dansite değeri:

% Hücre Canlılığı = Ölçülen optik dansite değeri/Kontrol optik dansite değeri x100

2.10.3 Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu

Gen düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirilmiştir.

- 3×10^4 hücre olacak şekilde 6'lık well plakalara hücre ekimi,
- Kontrol grubu ve gal ekstraktlarının herbirinin XTT ile tespit edilen IC50 dozu ve zamanı kadar madde uygulaması ve inkübasyon,
- Hücreler 6'lık kültür kaplarından bir plaka başına 500 µl olacak şekilde Trizol ve scraper kazıyıcı ile hücreler tamamen kaldırılıp, ependorf tüplere (1 ml'lik) transferi (dondurulmuş ise yaklaşık 10 dk çözülmesi için inkübasyon),
- Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübasyon,
- Soğutmalı santrifüj ile +4°C'de 15.000 g'de 20 dk santrifüj ve renksiz olan üst fazın toplanıp, ayrı ependorf tüplere alınması,
- Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip, pipetlenmesi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon,
- +4°C'de 15.000 g'de 30 dk santrifüj
- Peletin üzerine %70'lik etanol konulması ve +4°C'de 12.000 g'de 10 dk santrifüj,
- Süpernatant atılıp, pelet kısa bir süre hava ile kurutulması,

- Pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözünmesi basamaklarını içerir.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Termo) yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 48 ng/µl'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1 µl RNase free su ile Nanodrop cihaz kadesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1 µl olacak şekilde pipetlenip 230, 260, 280 nm'de okunmuştur.

2.10.4 cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'lardan RT-PCR öncesi, cDNA sentezi Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABD, Cat.no: 4368814) ile üretici firmanın belirtmiş olduğu prosedür doğrultusunda mikrosantrifüj tüplerinde Termal cycle (qPCR, Techne,UK) cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA sentez karışımı prosedürü total RNA son konsantrasyon 2 µg olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentez karışımı Tablo 2.1'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra kit protokolü doğrultusunda, cDNA sentezi için 25°C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, hücrelerde gruplar arasındaki mRNA ekspresyon değişimini tespit etmek amacıyla Real-Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 2. 1: cDNA sentez kiti karışımı

	Hacim
Total RNA	Değişken
10X Random Primers	2 µl
25X dNTP karışımı	0,8 µl
10X RT tamponu	2 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken
MultiScribe™ Reverse Transcritase	1 µl
Son hacim	20 µl

2.10.5 Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)

Gerçek zamanlı PZR, gen ekspresyon ürününün kantitasyonu amacıyla kullanılan hassas moleküler bir metottur. Bu yöntem sayesinde, RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı PZR/RT-PZR'da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, PZR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Bu çalışmada da 96 kuyucuklu mikropłaka okuyabilen Gerçek Zamanlı PZR sistemi kullanılmıştır.

Gal ekstraktlarının muamelesi sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, hücre döngüsünde rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları "Real Time Custom Panel" kullanılarak belirlenmiştir. İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA'lardan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili panel hücre döngüsünde ve apoptozda rol alan genleri içerecek şekilde custom olarak belirlenmiştir. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak Gerçek-Zamanlı PZR ile analiz yapılabilmektedir. Ayrıca, her panelde referans-housekeeping genler PZR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değışikliği analiz etme imkânı sağlamaktadır. PZR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan LightCycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmiştir. Bunun için önce konsantrasyonları bilinen Beta actin geninin standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuştur. Çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA'nın rölatif miktarı kantitasyon software tarafından belirlenmiştir. İlk olarak, hedef miktarı; hedef (T) gen kopyalarının housekeeping (H) gen kopyalarına oranı şeklinde ölçülmüştür. İkinci basamakta, örnekteki hedefin housekeeping gen kopyalarına oranı (T/H), her reaksiyonda koşulan kontrol RNA'nın T/H oranına bölünmesi ile elde edilmiştir. Sonuçlar, örnekteki T/H oranını ifade etmektedir.

Step One Plus Real-time PCR System, gerçek zamanlı bir PCR cihaz olup, amplifikasyon ürünlerinin artışı eş zamanlı olarak takip edilebilmektedir. Oldukça hızlı ısıtma ve soğutma kapasitesi sayesinde, tek bir grup için aynı anda 96 gen

ekspresyonuna 30–45 PCR döngüsü, yaklaşık olarak bir buçuk saat içinde yapılabilmektedir. Sistemde, SYBR Green metodu kullanılmıştır. SYBR Green boyası çift sarmal DNA'nın küçük girintisine bağlanan ve oldukça uzun süre dayanıklılığını kaybetmeyen bir boyadır (30 amplifikasyon döngüsü sonrası aktivitesinin yalnızca %6'sını kaybeder). Ancak bu çalışmada kullandığımız modifiye edilmiş SYBR Green boyası DNA'nın hem büyük hem de küçük girintisine bağlanmaktadır. Uyarılma ve ışık saçma dalga boyları light cycler'ın optik filtre setine uymaktadır. Amplifikasyon öncesi reaksiyon karışımı denatüre edilmiş DNA'yı, primerleri ve boyayı içerir. Bağlanmamış olan boya az miktarda floresan yayarak, daha sonraki bilgisayar analizlerinden çıkartılan, minimum arka fon floresan sinyali oluşturur. Primerlerin bağlanması ile az sayıdaki boya molekülü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanması, SYBR Green moleküllerinin uyarılma sonucu ışık saçmalarını etkili şekilde artmasına neden olur. Uzama aşaması esnasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Reaksiyon devamlı denetlenerek, floresandaki artış eş zamanlı olarak bilgisayar ekranından izlenir. Diğer döngünün ısıtma basamağında DNA denatüre edildiğinde boya molekülleri serbest kalır ve floresan sinyali düşmektedir. Gerçek zamanlı RT-PZR ile kontrol grubu ve gal ekstraktı uygulanmış doz grubu arasındaki hücre döngüsünde rol alan genlerin ekspresyonlarının nasıl değiştiği custom olarak dizayn edilen plaka ile belirlenmiştir (Qiagen Sciences, RT2 Profiler™ PCR Array Human Cell Cycle, PAHS-020ZC) Primerlerin gömülü olduğu plakalar için Real-Time PZR'da reaksiyon karışımı oranı, her 96 kuyucuklu plaka için 750µl Sybr Green Master Mix, 60 µl cDNA ve 680 µl de RNase free su şeklinde hazırlanıp her bir kuyucuğa 15 µl olacak şekilde çoklu mikropipet yardımıyla plakalara yüklenmiştir.

Gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlendi. Grupların karşılaştırılması “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” programında bulunan “Student t-testi” analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Tablo 2. 2: Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon karışımı

Gerçek Zamanlı PZR Reaksiyon Karışımı (96 kuyucuklu plaka için;bir reaksiyon)	Hacim
Sybr Green Master Mix	5 µL

cDNA	1 µL
RNase Free Su	5,5 µL
Primer	2 µL
Son Hacim	13,5 µL

Tablo 2. 3: Çalışmamızda kullanılan genler ve tanımları

Sembol	Tanım
Beta-aktin	house keeping
Bax	BAX BCL2-ilişkili X protein
Bcl-2	B-hücre KLL/lenfoma 2
FAS	Fas (INF reseptör suprailesi, üye 6)
Bid	BH3 etkileşim domain ölüm agonist
Caspase-3	Caspase 3, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
Caspase-8	Caspase 8, apoptozs-ilişkili sistein peptidaz
Caspase-9	Caspase 9, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
Caspase-10	Caspase 10, apoptoz-ilişkili sistein peptidaz
FADD	Fas (INFRSF6)-ilişkili ölüm domaini
TRADD	INFRSF1A-ilişkili ölüm domain

3. BULGULAR

3.1 Ekstrakt Verimliliğinin Hesaplanması

30 gram kuru gal örneklerinden ekstraksiyon aşaması sonrası elde edilen ekstraktlar tartılarak yüzde (%) ekstrakt verimliliği hesaplanmıştır. Örneklerin % ekstrakt verimlilikleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3. 1: Gal örneklerinin % ekstrakt verimlilikleri

	% Ekstrakt Verimliliği			
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galleri	9,341	12,408	17,535	20,384
<i>A. cecconii</i> galleri	4,555	5,961	7,333	5,112
<i>A. curtisii</i> galleri	16,43	21,43	31,93	24,86
<i>A. sternlichti</i> galleri	50,902	40,835	57,022	43,877
<i>A. tomentosus</i> galleri	8,547	9,0856	17,867	24,138

Tablo 3.1’den de anlaşılacağı gibi kuru gal örneklerinin ekstrakt verimliliği çözücülere ve türlere göre farklılık göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek ekstrakt verimliliği *A. sternlichti* metanol ekstraktında (%57,022) tespit edilmiştir. En düşük ekstrakt verimliliğine ise *A. cecconii* aseton ekstraktında (% 4,555) rastlanmıştır. Gal örneklerinin ekstrakt verimlilikleri şu şekilde sıralanabilir: *A. sternlichti* (metanol)>*A. curtisii* (metanol)>*A. tomentosus* (su)>*A. anatolicus* (su)>*A. cecconii* (metanol).

3.2 Toplam Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstraktların toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amacıyla iki farklı metot (β -karoten/Linoleik Asit ve Fosfomolibdenyum Metodu) kullanılmıştır.

3.2.1 β -karoten/Linoleik Asit Yöntemi

Bu metot, karotenoidlerin otooksidasyon yoluyla renklerinin açılması esasına dayanmaktadır. Oksidasyon ışık veya ısı yoluyla veya peroksil radikalleri ile başlatılmaktadır. Bu renk açılması radikallere hidrojen atomu veren antioksidanlar tarafından önlenabilir veya azaltılabilir. 470 nm'de gal ekstraktlarının β -karoten-linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonunu inhibe etme yeteneği belirlenmiştir. Sonuçlar, Tablo 3.2'de ekstrelerin β -karoten-linoleik asit emülsiyonunun oksidasyonunun % inhibisyonu olarak verilmiştir.

Tablo 3. 2: Gal ekstraktlarının β -karoten/linoleik asit toplam antioksidan aktiviteleri

	β -karoten/linoleik asit yöntemi % İnhibisyon Değerleri			
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galeri	81,57±1,54	61,53±3,54	90,27±3,26	57,14±1,15
<i>A. cecconii</i> galeri	93,44±6,077	78,68±4,19	100±8,51	77,33±2,02
<i>A. curtisii</i> galeri	93,80± 1,480	90,38±8,985	80,43±7,08	71,92±8,75
<i>A. sternlichti</i> galeri	80,64±1,55	97,05±0,87	88,059±6,01	95,31±2,73
<i>A. tomentosus</i> galeri	74,35±2,52	90±5,04	91,66±5,28	91,42±0,27
BHT	-	-	91,59±1,40	-

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir

Bu metoda göre, 5 gal türü arasında en yüksek antioksidan aktivite *A. cecconii* metanol ekstraktında (%100±8,51) gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler ticari olarak satın alınan sentetik bir antioksidan olan BHT standardı (%91,59±1,40) ile kıyaslanmıştır. Bazı gal ekstraktlarının BHT standartından daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu metoda göre antioksidan kapasiteler kıyaslandığında; *A. cecconii* (metanol)>*A. sternlichti* (metanol)>*A. curtisii* (aseton)>*A. tomentosus* (metanol)>BHT>*A. anatolicus* (metanol) şeklinde sıralanmıştır.

3.2.2 Fosfomolibdenyum Yöntemi

Ekstraktların toplam antioksidan aktiviteleri diğer bir metot olan Fosfomolibdenyum metodu ile de hesaplanmıştır. Bu yöntem ortamda bulunan Mo (VI)'ün ortama konan indirgeyici ajan tarafından Mo (V)'e indirgenmesi sonucu oluşan yeşil rengin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Sonuçlar askorbik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3. 3: Gal ekstraktlarının fosfomolibdenyum antioksidan aktiviteleri

Fosfomolibdenyum Antioksidan Aktivite Yöntemi (mgAE/g)				
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galleri	78±2,12	104,23±0,52	58±0,41	48,85±2,61
<i>A. ceconii</i> galleri	50,39±4,36	68,94±5,25	47,57±1,88	26,29±0,31
<i>A. curtisii</i> galleri	79,62± 0,84	92,10±1,91	68,68±1,26	53,55±2,63
<i>A. sternlichti</i> galleri	37,05±3,74	76,03±2,55	44,92±3,36	38,34±1,94
<i>A. tomentosus</i> galleri	67,99±7,043	104,32±7,04	84,75±5,30	59,79±3,78

*değerler ortalama±std sapma olarak ve askorbik aside eşdeğer verilmiştir

Elde edilen veriler, en yüksek fosfomolibdenyum antioksidan aktiviteye *A. tomentosus* etanol ekstraktlarının (104,32±7,04 mgAE/g) sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. En düşük aktiviteye ise *A. ceconii* su ekstraktının (26,29±0,31 mgAE/g) sahip olduğu Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

3.3 Toplam Radikal Süpürme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Ekstraktların radikal süpürme kapasiteleri DPPH ve ABTS çözeltilerinin renk açılımının spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanmıştır.

3.3.1 DPPH Radikal Süpürme Kapasitesi

Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların muamalesi ile metanolik DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki azalma UV-GB spektrofotometresiyle ölçülebilmektedir. Artan ekstrakt konsantrasyonlarında DPPH radikal giderim aktiviteleri belirlenmiştir ve sonuçlar IC₅₀ değeri olarak Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3. 4: Gal ekstraktlarının DPPH radikali giderim aktivitesi

DPPH Radikal Giderim Aktivitesi IC₅₀ Değerleri				
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus galleri</i>	5,40±0,11	1,40±0,55	3,96±0,17	14,58±1,32
<i>A. ceconii galleri</i>	54,81±0,35	23,47±1,46	8,89±0,46	4,32±0,24
<i>A. curtisii galleri</i>	8,40±0,24	13,52±4,20	12,11±0,12	22,40±0,79
<i>A. sternlichti galleri</i>	13,15±0,53	14,83±4,24	8,94±0,31	12,1±0,86
<i>A. tomentosus galleri</i>	18,17±1,50	12,99±1,05	14,05±1,39	15,15±0,79
BHT	-	-	24,65±1,19	-
BHA	-	-	8,69±0,49	-

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir. IC₅₀ değeri GraphPad Prism programı ile hesaplanmıştır.

Tablo 3.4'e göre gal türlerimiz arasında *A. anatolicus* etanol ekstraktı (IC₅₀: 1,40±0,55) sentetik antioksidanlar olan BHT ve BHA standartlarıyla da kıyas edildiğinde en yüksek DPPH radikali giderim aktivitesini gösterdiği belirlenmiştir. En düşük DPPH radikali giderim aktivitesine *A. ceconii* (54,81±0,35) gallerinin aseton ekstraktlarının sahip olduğu gözlemlenmiştir.

3.3.2 ABTS Radikal Süpürme Kapasitesi

Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme kabiliyeti sentetik antioksidanlarla kıyaslanarak belirlenir. Artan ekstrakt konsantrasyonlarının radikali giderim kapasiteleri IC₅₀ değeri olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3. 5: Gal ekstraktlarının ABTS radikali giderim aktivitesi

ABTS Radikal Giderim Aktivitesi IC₅₀ Değeri				
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus galleri</i>	15,97±0,11	12,76±2,97	14,79±0,48	17,73±0,77
<i>A. ceconii galleri</i>	50,91±0,28	34,53±0,17	20,24±0,70	17,08±1,84
<i>A. curtisii galleri</i>	18,16±1,42	14,71±0,67	16,98±0,35	16,44±1,57
<i>A. sternlichti galleri</i>	15,273±1,64	12,50±0,33	5,04±0,41	11,70±0,01
<i>A. tomentosus galleri</i>	32,17±0,31	48,68±0,28	19,60±1,08	18,52±0,21
BHT	-	-	17,03±0,35	-

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir. IC₅₀ değeri GraphPad Prism programı ile hesaplanmıştır.

Yukarıdaki tabloda gal ekstraktlarının ABTS radikali giderim aktivitelerinin IC₅₀ değerleri verilmiştir. En yüksek ABTS radikali giderim aktivitesi *A. sternlichti* metanol ekstraktında (IC₅₀: 5,04±0,41) gözlemlenmiştir. En düşük ABTS radikali

giderim aktivitesini ise *A. cecconii* aseton ekstraktları (IC₅₀: 50,91±0,28) göstermiştir. Tablo 3.5'te verilen bilgilere göre bazı gal ekstraktlarının BHT (IC₅₀: 17,03±0,35) standardından daha iyi ABTS radikal giderim aktivitesi gösterdiği görülmektedir.

3.4 İndirgeme Gücü Kapasitelerinin Belirlenmesi

Gal ekstraktlarının indirgeme gücü kapasiteleri CUPRAC ve FRAP metotları ile belirlenmiştir.

3.4.1 Bakır İndirgeme Gücünün Belirlenmesi (CUPRAC)

CUPRAC test sistemi bitkisel ekstraktların veya antioksidanların Cu(II)-neocuproine kompleksini Cu(I)-neocuproine indirgemesine oluşan renkli kompleksin absorbansının 450 nm'de ölçülmesine dayanır. Gal ekstraktlarının Bakır İndirgeme Gücü aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki tabloda troloksa eşdeğer olarak verilmiştir.

Tablo 3. 6: Gal ekstraktlarının CUPRAC aktivitesi

	CUPRAC Yöntemi (mgTE/g)			
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus galleri</i>	72,84±0,12	72,54±0,12	74,51±1,23	69,21±0,61
<i>A. cecconii galleri</i>	82,24±9,03	68,60±1,36	89,66±1,48	62,84±0,37
<i>A. curtisii galleri</i>	86,03± 0,74	88,60±1,36	86,18±0,12	83,90±0,24
<i>A. sternlichti galleri</i>	89,96±0,49	90,57±0	88,15±0,24	90,27±1,23
<i>A. tomentosus galleri</i>	84,81±0,74	88,45±0,74	89,81±1,36	85,12±0,24

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir.

Tablo 3.6'da verilen bilgilere göre ekstraktlar arasında en yüksek bakır indirgeme gücüne *A. sternlichti* etanol ekstraktının (90,57±0 mgTE/g) sahip olduğu görülmektedir. En düşük bakır indirgeme gücünü *A. cecconii* su ekstraktı (62,84±0,37 mgTE/g) göstermiştir.

3.4.2 Demir İndirgeme Gücü Kapasitesinin Belirlenmesi (FRAP)

Ekstraktların Demir(III)-TPTZ kompleksini Demir(II)-TPTZ kompleksine indirgeme gücünün belirlendiği bu çalışmada sonuçlar troloks standardına eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3. 7: Gal ekstraktlarının FRAP aktiviteleri

FRAP Yöntemi (mgTE/g)				
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galeri	105,28±2,33	157,42±4,55	145,28±0,58	131,95±3,21
<i>A. ceconii</i> galeri	16,23±0,89	18,61±0,33	29,09±3,21	24,80±2,42
<i>A. curtisii</i> galeri	131,95± 1,87	160,04±4,13	141,23±3,79	120,04±1,21
<i>A. sternlichti</i> galeri	62,19±2,42	126,23±2,62	118,85±1,16	87,90±4,21
<i>A. tomentosus</i> galeri	132,42±1,74	182,19±5,41	107,66±3,21	155,28±1,16

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir.

Tablo 3.7’de gösterildiği gibi en yüksek FRAP aktivitesine *A. tomentosus* etanol ekstraktlarının (182,19±5,41 mgTE/g) sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük FRAP aktivitesini ise *A. ceconii* aseton ekstraktı (16,23±0,89 mgTE/g) göstermiştir.

3.5 Demir Metali Şelatlama Kapasitesi

Ekstraktların metal şelatlama aktivitesi, bitki ekstraktlarının çözeltideki Fe⁺² iyonunun ferrozin ile birleşmesini engelleyebilme kapasitesi ile belirlenir. Sonuçlar çok iyi bir metal şelatlama kapasitesine sahip olan EDTA standardı ile kıyaslanmıştır.

Tablo 3. 8: Gal ekstraktlarının metal şelatlama kapasiteleri

% Metal Şelatlama Kapasitesi				
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galeri	35,74±3,13	39,45±3,03	39,54±4,46	33,31±3,29
<i>A. ceconii</i> galeri	14,64±9,19	28,33±3,33	35,74±3,13	27,14±1,33
<i>A. curtisii</i> galeri	57,20± 4,00	54,26±1,30	58,04±2,72	56,16±2,03
<i>A. sternlichti</i> galeri	53,22±5,71	49,52±0,82	44,70±6,60	49,49±2,22
<i>A. tomentosus</i> galeri	40,07±4,00	35,01±11,86	28,42±7,76	35,25±3,48
EDTA	-	-	-	96,18±1,65

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir.

Tablo 3.8'e göre en yüksek metal şelatlama kapasitesine *A. curtisii* (%58,04±2,72) metanol ekstraktında rastlanmıştır. EDTA (%96,18±1,65) ise ekstraktlarımıza göre güçlü bir metal şelatlama kapasitesi göstermiştir.

3.6 Toplam Sekonder Metabolit Madde Miktarının Belirlenmesi

Gal ekstraktlarında sekonder metabolit olarak toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve toplam tanen madde miktarları belirlenmiştir.

3.6.1 Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Gal ekstraktlarının, Folin-Ciocalteu yöntemiyle belirlenen toplam fenolik madde miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3. 9: Gal ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları

	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mgGAEs/g)			
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galeri	264,44±2,33	243,33±1,65	234,81±1,92	170±1,58
<i>A. ceconii</i> galeri	34,07±1,52	27,77±0,82	47,40±1,11	49,25±0,76
<i>A. curtisii</i> galeri	269,25±1,55	238,14±1,05	171,48±1,27	190±1,94
<i>A. sternlichti</i> galeri	305,18±1,13	274,56±1,77	322,06±0,97	262,68±1,47
<i>A. tomentosus</i> galeri	285,18±1,38	298,93±2,52	278,93±1,18	290,18±0,64

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir.

Elde ettiğimiz verilere göre (Tablo 3.9) gal ekstraktları arasında en yüksek fenolik madde miktarına *A. sternlichti* metanol ekstraktının (322,06±0,97 mgGAE/g) sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarımız *A. ceconii* ekstraktlarının diğer türlere göre daha az miktarda fenolik madde içerdiğini göstermiştir. Bu doğrultuda, en düşük toplam fenolik madde miktarı *A. ceconii* etanol ekstraktında (27,77±0,82 mgGAE/g) gözlemlenmiştir.

3.6.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi

Alüminyum klorid metodu ile hesaplanan toplam flavonoid madde miktarı kuersetin standardına eşdeğer hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3. 10: Gal ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları

	Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mgQEs/g)			
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus galleri</i>	33,14±2,60	17,10±1,90	13,56±0,62	17,10±1,30
<i>A. ceconii galleri</i>	70,02±1,52	36,47±3,60	6,47±0,36	24,81±0,22
<i>A. curtisii galleri</i>	24,60±3,44	21,06±4,09	22,10±0,36	6,47±0,36
<i>A. sternlichti galleri</i>	5,28±0,95	3,16±0,21	7,4±0,08	11,24±0,98
<i>A. tomentosus galleri</i>	31,63±0,98	29,67±0,85	30,42±0,66	47,09±2,53

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir

Kuersetine eşdeğer olarak hesaplanan en yüksek toplam flavonoid madde miktarına *A. ceconii* aseton ekstraktının (70,02±1,52 mgQEs/g) sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük flavonoid miktarına ise *A. sternlichti* (3,16±0,21 mgQE/g) gallerinin etanol ekstraktlarında rastlanmıştır.

3.6.3 Toplam Tanen Madde Miktarının Belirlenmesi

Gal ekstraktlarının toplam tanen madde miktarları vanilin/sülfürik asid metoduna göre belirlenmiş ve sonuçlar kateşin standardına eşdeğer olarak Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3. 11: Gal ekstraktlarının toplam tanen miktarları

	Toplam Tanen Madde Miktarı (mgCEs/g)			
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus galleri</i>	76,16±9,24	65,33±8,16	66,16±3,07	51,16±5,54
<i>A. ceconii galleri</i>	329,5±1,54	288,66±1,84	224,5±8,89	65,33±9,18
<i>A. curtisii galleri</i>	77,83±041	42,83±7,79	51,16±7,07	82±7,18
<i>A. sternlichti galleri</i>	46,4±2,99	0,22±0,07	0,14±0,04	37,17±0,70
<i>A. tomentosus galleri</i>	47,17±1,63	22,89±0,22	14,69±0,20	6,52±0,22

*değerler ortalama±std sapma olarak verilmiştir

Kateşine eşdeğer olarak hesaplanan en yüksek toplam tanen madde miktarına *A. cecconii* aseton ekstraktının (329,5±1,54 mgCEs/g) sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük toplam tanen miktarı *A. sternlichti* metanol ekstraktında (0,14±0,04 mgCEs/g) görülmüştür.

3.7 Fenolik Bileşen Karakterizasyonu

HPLC metodu ile gal ekstraktlarının fenolik bileşen karakterizasyonu 15 farklı standart kullanılarak belirlenmiştir. Aşağıdaki tabloda gal ekstraktlarının fenolik bileşen miktarları verilmiştir (Tablo 3.12).

Tablo 3. 12: Gallerin metanol ekstraktlarının fenolik bileşen karakterizasyonu

Standartlar	Fenolik Bileşen Miktarları (µg/g)				
	<i>A. anatolicus</i> galleri	<i>A. cecconii</i> galleri	<i>A. curtisii</i> galleri	<i>A. sternlichti</i> galleri	<i>A. tomentosus</i> galleri
gallik asit	8629,433	5369,74	8188,767	7181,536	7218,09
3,4-dihidroksi benzoik asit	1849,503	168,416	1232,039	234,502	3109,659
klorojenik asit	2185,044	311,167	3454,414	2375,615	1013,789
4-hidroksibenzoik	1866,57	20,059	2097,673	1223,13	3859,173
2,5-dihidroksi benzoik asit	63515,408	7266,972	139223,547	18147,653	69399,147
vanilik asit	410,06	894,785	4451,887	16466,952	6572,271
kafeik asit	575307,286	49318,714	497172,152	589041,723	424068,479
epikateşin	563399,103	10174,354	870810,906	171497,57	53430,17
<i>p</i> -kumarik asit	17,469	8,868	109,309	635,284	151,081
ferulik asit	3,248	8,274	52,151	1070,68	100,731
narinjin	85209,748	2816,338	7169,844	19097,058	315,325
rutin	10997,741	345,723	282,487	8156,209	337,586
elajik asit	160125,753	8942,935	215868,076	261997,718	187696,132
sinamik asit	1230,747	496,073	2361,778	747,044	423,675
kuersetin	789,788	5185,824	5,291	1,929	1141,256

HPLC metodundan elde ettiğimiz verilere göre kafeik asit *A. sternlichti* (589041,723 µg/g), *A. tomentosus* ekstraktlarında (424068,479 µg/g), *A. cecconii* ekstraktlarının (49318,714 µg/g), *A. anatolicus* ekstraktlarında (575307,286 µg/g) en fazla miktarda tespit edilen fenolik bileşenlerdir. *A. curtisii* ekstraktlarında ise en yüksek miktarda epikateşine (870810,906 µg/g) rastlanmıştır.

3.8 Sitotoksosite ve Gen Ekspresyon Çalışmaları

3.8.1 XTT Hücre Canlılığı Sonuçları

96 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki hücrelerin gal ekstraktlarının 5 µM ile 500 µM arasında farklı doz konsantrasyonunda 24, 48 ve 72. saatlerdeki etkinliği araştırılmıştır. Deney sonucunda oluşan renk reaksiyonuna göre kontrol ve doz gruplarının absorbans değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Gal ekstraktlarının MIA PaCa-2 hücre hattı kullanılarak sitotoksik aktivitesi XTT analizi ile belirlenmiştir. Tüm türlerin XTT sitotoksosite analizi yapılarak IC₅₀ değerleri hesaplanarak verilmiştir (Tablo 3.13).

Tablo 3. 13: Gal ekstraktlarının MiaPaCa-2 hücre hattı üzerinde sitotoksosite değerleri

XTT Analizi IC ₅₀ Değerleri				
	Aseton	Etanol	Metanol	Su
<i>A. anatolicus</i> galleri	222 (24h)	248.8 (24h)	436 (24h)	183.1 (24h)
<i>A. ceconii</i> galleri	192 (24h)	189.3 (24h)	111.8 (24h)	61 (24h)
<i>A. curtisii</i> galleri	147.4 (24h)	235.2 (24h)	209.3 (24h)	126.1 (24h)
<i>A. sternlichti</i> galleri	85,85 (48h)	0,04 (72h)	47,86 (48h)	16,69 (48h)
<i>A. tomentosus</i> galleri	124.7 (24h)	158.3 (24h)	187.4 (24h)	169.8 (24h)

*IC₅₀ değerleri GraphPad Prism programı ile hesaplanmıştır.

XTT analizinden elde ettiğimiz verilere göre (Tablo 3.13) MIA PaCa-2 hücre hattı üzerinde en yüksek sitotoksik etkiyi *A. sternlichti* etanol ekstraktı 72. saatte göstermiştir (IC₅₀: 0,04 µg/ml). En düşük sitotoksik etkiyi ise *A. anatolicus* gal ekstraktlarının metanol ekstraktlarının 24. saatte (IC₅₀: 436 µg/ml) sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

3.8.2 Gerçek-Zamanlı PZR (Real-Time PCR) Sonuçları

Farklı dozlarda gal ekstraktı uygulanan Mia-Paca2 hücrelerinden uygun yoğunluklarda elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra gal ekstraktlarının mRNA seviyelerindeki ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlerin ifadelerinin nasıl değiştiği ve istatistiksel olarak

anlamlılık değerleri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak panalde yer alan hücre döngüsü ve apoptozla ilişkili genlere uygun gömülü primerler için cihazda yapışma sıcaklıkları ve döngü sayısı optimizasyonları yapılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen ct değerleri dikkate alınarak kontrol ve doz gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim hesaplanmıştır.

İstatistiksel olarak anlamlı bulunan ve bulunmayan hücre döngüsü ve apoptoz ilişkili genlerin kontrol ve doz gruplarındaki ekspresyon dzeyelerindeki kat değişimleri Tablo 3.14-18’de verilmiştir.

Tablo 3. 14: Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre *A. sternlichti* gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarına değişim tespit edilen genler

Gen Adı	Aseton		Etanol		Metanol		Su	
	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri
Beta-aktin	1	nan	1	nan	1	nan	1	nan
Bax	-1	0,999973	-1,84*	0,000218	-1,31	0,131067	-1,87*	0,001727
Bcl-2	-8,59*	0,010082	-3,91	0,918122	-14,26*	0,008655	-79,26*	0,006838
FAS	-3,29	0,225719	-14,96	0,121712	-9,65	0,142091	-40,68	0,113001
Bid	17,01*	0,000001	8513,93	0,372843	19,73*	0,01433	13,77*	0,000012
Caspase-3	1,85	0,353992	52,15	0,095381	-1,86*	0,005878	-1,02	0,614135
Caspase-8	1,72	0,306007	-1,36*	0,015254	5,31	0,271883	-4,8*	0,000025
Caspase-9	1,3	0,803175	-4,43	0,113363	-3,81	0,138498	1,21	0,547652
Caspase-10	1,32*	0,005948	-1,09	0,57064	1,03	0,592168	-1,06	0,6654
FADD	4,92	0,088419	3,99	0,092292	4,3	0,080313	4,31	0,073273
TRADD	-1,58*	0,020648	-1,26	0,163771	-1,59*	0,012739	-1,44*	0,007751

Yukarıdaki tabloda görüldüğü üzere *A. sternlichti* ekstraktlarının gen ekspresyonu üzerine etkileri ct değeri olarak verilmiştir. Aseton ekstraktlarının genler üzerinde etki ettiği anlamlı değişimlere bakıldığında; anti-apoptotik etkiye sahip olan Bcl-2 ve TNF gen ailesinden olan apoptotik TRADD genlerinin ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Bid ve Caspase 10 genlerinin ifadesinde ise artış gözlemlenmiştir. Bu durumların hepsi, apoptozun indüklenmesine sebep olabilmektedir. Etanol ekstraktları incelendiğinde; pro-apoptotik Bax ve apoptotik caspase-8 genlerinin ifadelerinde azalma görülmektedir, bu durum etanol ekstraktlarının apoptozu anlamlı bir şekilde indkleyemediği şeklinde

yorumlanabilir. Metanol ekstraktlarında; Bcl-2, caspase-3, TRADD genlerinin ifadesinde bir azalma tespit edilirken Bid geninde bir artış görülmektedir. Su ekstraktlarında ise Bax, Bcl-2, Caspase-8, TRADD genlerinde azalma; Bid geninde bir artış gözlemlenmiştir; burada Bax genindeki azalış apoptozun ilerleyişini kesintiye uğratabilir.

Tablo 3. 15: Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre *A. tomentosus* gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarında değişim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler

Gen Adı	Aseton		Etanol		Metanol		Su	
	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri
Beta-aktin	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
Bax	25.05*	0.001058	26.08*	0.000016	8.13	0.150856	6.93*	0.000001
Bcl-2	-2.60*	0.030786	-1.44	0.820964	1.01	0.869223	-12.75*	0.008912
FAS	-11.96	0.109300	1.03	0.687722	-1.07	0.674186	-3.07	0.272017
Bid	10.00*	0.009956	6.40*	0.011776	4.05*	0.003156	1.42	0.127859
Caspase-3	-5.67	0.085642	5.54*	0.040855	3.32*	0.000100	-1.79*	0.023235
Caspase-8	-1.80*	0.000584	1.78*	0.007222	3.17	0.179143	-2.74*	0.010501
Caspase-9	-4.32	0.116836	-1.82	0.250015	-1.16	0.535897	-1.85	0.276760
Caspase-10	1.17*	0.016329	-1.27	0.662722	-1.71*	0.007510	-5.44*	0.000378
FADD	5.73*	0.026770	5.46	0.058487	2.65	0.402193	-3.17	0.270822
TRADD	3.91*	0.000003	1.56*	0.020745	-1.11	0.255985	-9.83*	0.000138

Tablo 3.15’de *A. tomentosus* ekstraktlarının genler üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Etanol ekstraktları incelendiğinde; apoptotik etkiye sebep olabilecek Bax, Bid, Cas-10, FAD, TRADD genlerinin ifadesinde artış, Bcl-2 geninde bir azalma görülmektedir. Ancak kaspaz 8’de görülen azalma apoptotik süreci olumsuz yönde etkileyebilir. Etanol ekstraktlarında; anlamlı değişimlerin hepsinde apoptotik genlerin ifadesinde artış gözlemlenmiştir. Metanol ekstraktlarında Bid ve kaspaz 3’ün ifadesinde artış gözlenirken, kaspaz-10’da bir azalma tespit edilmiştir. Su ekstraktlarında Bax’da artış, Bcl-2’de azalma görülmesi apoptozu indükleyebilirken; kaspaz-3,8,10’da ve TRADD’da görülen azalma apoptozu kesintiye uğratabilir.

Tablo 3. 16: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre *A. curtisii* gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarında değişim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler

Gen Adı	Aseton		Etanol		Metanol		Su	
	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri
Beta-aktin	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
Bax	-18.20*	0.000001	-9.58	0.291765	-7.97*	0.000001	-12.61*	0.0001111
Bcl-2	-21.82*	0.008428	-36.35*	0.007936	-1.34	0.876486	-6.26*	0.011810
FAS	-15.70	0.121281	-2.63	0.329323	-2.25	0.244086	-10.66	0.127285
Bid	-3.95*	0.011964	1.26	0.452370	3.69	0.113710	2.32*	0.000019
Caspase-3	1.04	0.400246	4.11	0.350593	8.17	0.175505	1.20	0.419600
Caspase-8	2.35	0.380157	36.39	0.081597	125.86	0.220902	-1.10	0.940588
Caspase-9	-2.01	0.652582	-1.34	0.661512	7.37	0.167116	3.63*	0.029368
Caspase-10	-6.36*	0.000366	-5.10*	0.002613	2.11	0.307049	-2.29*	0.000225
FADD	-1.83	0.395452	1.52	0.829902	4.16	0.213053	1.02	0.617902
TRADD	-4.31*	0.013893	-1.07	0.571756	1.99	0.260091	-1.35*	0.024557

Tablo 3.16’da *A. curtisii* ekstraktlarının gen ekspresyonu üzerine etkileri verilmiştir. Bu tabloya göre aseton ve su ekstraktlarının Bax, Bid, kaspaz-10, TRADD ve Bcl-2 genlerinin ifadesini azalttığı görülmüştür. Etanol ekstraktları Bcl-2 ve kaspaz-10 genlerinin ifadesini baskımlarken, metanol ekstraktlarının ise sadece Bax geninin ifadesini anlamlı bir değişikliğe uğratarak azalttığı gözlemlenmiştir.

Tablo 3. 17: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre *A. cecconii* için kontrol ve doz gruplarında değişim tespit edilen hücre döngüsü ile ilişkili genler

Gen Adı	Aseton		Etanol		Metanol		Su	
	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri
Beta-aktin	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
Bax	-5.93*	0.000000	-8.30*	0.000000	-3.02*	0.000000	-3.19*	0.000000
Bcl-2	-34.14*	0.007229	-23.24*	0.007590	-30.93*	0.007306	-29.18*	0.007459
FAS	-7.00	0.139602	-12.25	0.109297	-4.61	0.166638	-6.71	0.110431
Bid	5.02*	0.000014	11.76*	0.001407	8.18*	0.001217	6.97	0.000073
Caspase-3	-4.00*	0.000164	-1.54*	0.000001	1.15*	0.000025	-8.79*	0.000000
Caspase-8	-1.11	0.609400	-2.43*	0.000020	-3.64*	0.000001	-4.77*	0.000030
Caspase-9	1.06	0.821989	7.34	0.360905	-1.79	0.898213	-2.32	0.198346
Caspase-10	-1.47*	0.001877	1.72*	0.000502	-1.30	0.103988	1.21*	0.016553
FADD	3.44	0.233466	3.87	0.117712	3.74	0.131761	3.50	0.160876
TRADD	-1.58	0.104854	1.49*	0.008502	1.01	0.891327	1.48	0.103827

A. cecconii ekstraktlarının genler üzerindeki etkisinin verildiği Tablo 3.17’de aseton ekstraktlarının Bax, kaspaz-3,10, Bcl-2 genlerinin ifadesini azalttığı, Bid geninin ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir. Etanol ekstraktlarının, Bax, Kaspaz-3,8 ve Bcl-2 genlerinin ifadesini baskımlarken Bid ve TRADD ifadesini arttırmıştır. Metanol ekstraktlarında Bax, Bid, kaspaz-8 ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonu azalırken, kaspaz-3’ün aktivitesi artmıştır. Su ekstraktları incelendiğinde, Bax, kaspaz-3,8 ve Bcl-2 genlerinin ifadesinde azalma, kaspaz-10 geninin ifadesinde artış gözlemlenmiştir.

Tablo 3. 18: Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre *A. anatolicus* gal ekstraktları için kontrol ve doz gruplarında değişim tespit edilen genler

Gen Adı	Aseton		Etanol		Metanol		Su	
	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri	Değişim	p-Değeri
Beta-aktin	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan	1.00	nan
Bax	-6.29*	0.00769 2	-2.17	0.064000	-1.52*	0.016171	-1.69*	0.018799
Bcl-2	-2.14*	0.04731 4	-2.13*	0.046372	-11.92*	0.014222	-2.61*	0.086504
FAS	1.92	0.42153 6	-20.90	0.120698	-1.04	0.965396	-2.46	0.256838
Bid	4.71*	0.00000 4	4.06*	0.001662	-1.12	0.110233	3.79*	0.041614
Caspase-3	-3.48*	0.00020 9	1.51	0.256892	4.03*	0.047008	8.90	0.176891
Caspase-8	-1.10	0.87881 7	2.05*	0.002236	-1.03	0.810566	1.67	0.169560
Caspase-9	1.30	0.80573 9	-2.14	0.346331	-1.43	0.371483	1.23	0.640408
Caspase-10	2.62*	0.00412 7	1.57*	0.000811	-4.68*	0.001574	1.62	0.154284
FADD	4.56*	0.05144 7	1.89	0.838169	-1.09	0.520019	2.77	0.355669
TRADD	-1.00	0.85426 0	-2.71*	0.001104	-7.19*	0.001534	-2.69*	0.000650

Tablo 3.18’de *A. anatolicus* ekstraktlarının genler üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı ve anlamsız etkileri verilmiştir. Aseton ekstraktlarının Bax, kaspaz-3 ve Bcl-2 genlerinin ifadesini azalttığı; Bid, kaspaz-10 ve FADD genlerinin ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Etanol ekstraktlarının Bcl-2 ve TRADD aktivitesini azaltırken, Bid, kaspaz-8 ve 10’un aktivitesini arttırmıştır. Metanol ekstraktlarında Bax, Bcl-2 kaspaz-10 ve TRADD ekspresyonu azalmış, kaspaz-3 ekspresyonu artmıştır. Su ekstraktlarında Bax, Bcl-2 ve TRADD aktivitesi azalırken, Bid aktivitesi artmıştır.

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bitki galleri, parazit bir organizmadan gelen uyarana yanıt olarak anormal doku büyümesi sonucu üretilmektedir. Hemen hemen tüm bitkiler mikroplar, nematodlar ve eklembacaklılar tarafından gal oluşumuna eğilimlidirler. Bitkilerde gal oluşumunu indükleyen bir dizi virüs, bakteri, mantar ve nematod tanımlanmıştır (Bhattacharya ve diğ. 2010; Uhlíková ve diğ. 2016). Ayrıca, böcekler de (gal arıları, gal sinekleri, yaprak bitleri, akarlar vb.) yumurtalarını bitkilerin çeşitli kısımlarına bırakarak gal oluşumunu tetiklemektedir (Patel ve diğ. 2018). Galler, deri endüstrisinde ve bazı ticari mürekkeplerin yapımı gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır, hatta Doğu ülkelerinde gıda olarak bile tüketilmektedir (Sadeghi ve Asareh 2009). Gallerin kimyasal profili, koruma ve beslenme gibi birçok fonksiyonla ilgili özelleşmiş metabolitlerden oluşmaktadır (Carneiro ve diğ. 2014). Birçok gal örneğinde sekonder metabolitlerin üretildiği ve depolandığı bilinmektedir. Kimyasal bileşikler özellikle de sekonder metabolitler kantitatif metotlar kullanılarak değerlendirilmektedir (Motta ve diğ. 2005; Campos ve diğ. 2010; Agudelo ve diğ. 2018). Bununla birlikte, kalitatif bir metodoloji olan histokimyasal analizin, gal yapısının ve metabolizmasının anlaşılmasında yararlı olduğu ve ikincil metabolitlerin spesifik üretim ve depolanma bölgelerinin ortaya çıkarması için faydalı olduğu da kanıtlanmıştır (Coelho Kuster ve diğ. 2020).

Gal oluşumuna eğilimli en önemli konukçulardan birisi Fagaceae familyasına üye olan *Q. infectoria*'dır. Meşeler, özellikle de *Andricus* cinsinden olmak üzere, çok sayıda gal arısı türünü barındırmaktadır (Sadeghi ve diğerleri 2010). Kıbrıs, Suriye, Türkiye, Irak ve İran gibi Orta Doğu ülkelerinde geniş bir şekilde yayılmış gösteren *Q. infectoria*, 4-6 cm uzunluğunda yaprakları ve dar, pullu, silindirik palamudu meyveleri ile yaklaşık 2,5 m yüksekliğinde küçük bir ağaçtır (Ahmad ve diğ. 2011; Shrestha ve diğ. 2014; Ansari ve diğ. 2016). Kelt dilinden gelen “*Quercus*” kelimesi “güzel ağaç” anlamına gelirken “*infectoria*” kelimesi ise enfeksiyon olarak gal üretme sürecini ifade etmektedir (Douglas 2001; Merriam-Webster 2018; Patel ve diğ. 2018). *Q. infectoria* genellikle gal meşesi veya *Manjakani* olarak bilinir. Gallerin fitokimyasal görüntülemesi saponin, alkaloid, tanen, glikozit, triterpen, sterol, fenolik bileşen, karbonhidrat ve flavonoidlerin varlığını göstermiştir (Shrestha ve diğ. 2014;

Zachariah ve diğ. 2014). *Q. infectoria* gallerinin ana bileşenlerini tanen (%50-70), gallik asit, elajik asit oluşturmaktadır ancak şirinjik asit, β -sitosterol, amentoflavon, heksametil eter, izokriptomerin, metil betulat, metil oleanat ve heksagalloil glikoz gibi diğer bileşenleri de içerdiği bilinmektedir. *Q. infectoria* galleri bu bileşenler tarafından önemli biyolojik reaksiyonları büyük ölçüde indüklemektedir (Dar ve diğ. 1976; Ikram ve Nowshad 1977; Hwang ve diğ. 2000; Vermani 2009). Elajik asitin antikansirojenik ve antioksidan özelliklerinin olduğu, suda çözünebilen tanik asit gruplarının ise antioksidan, antimikrobiyal ve yara iyileştirici etkileri olduğu bilinmektedir (Zhang ve diğ. 2014; de Sousa Leal ve diğ. 2015). Gal özütlerinin polifenollerce yüksek içerikli olduğu için, güçlü bir indirgeme gücü oluşturabilmektedirler. Bu nedenle, kimyasal olarak test edildiğinde, gal özleri güçlü bir antioksidan aktivite sergileyebilmektedir (Kaur ve diğ. 2008). Önceki çalışmalardan birinde ayrıca *Q. infectoria* gallerinden elde edilen tanenlerin sulu, metanolik veya etanolik özütlerin art arda yüksek antioksidan aktivitelere sahip olduğunu iddia edilmiştir (Fathabada ve diğ. 2015).

Oksidatif stres çeşitli kronik hastalıklara neden olabilecek önemli bir risk faktörüdür. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerinin, iltihaplı artropatiler, astım, Parkinson ve Alzheimer hastalığı, diyabet, kanserler ve ayrıca damar tıkanıklığı gibi hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra, bu serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri de insan yaşlanmasında sorumludur (Kanwar ve diğ. 2009; Chiavaroli ve diğ. 2011). Antioksidanlar, potansiyel olarak oksidatif hasarı geciktiren veya inhibe eden maddeler olarak tanımlanmaktadır (Yamagishi ve Matsui 2011). Antikanser ajan olarak kullanılan bitkilerin antioksidan aktivitesi ve polifenol içerikleri hakkındaki son raporlar, flavonoidlerin, tanenlerin ve fenolik asitlerin antioksidan özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Kovacevic 2000; Rakic ve diğ. 2007). Kimyasal ilaçların ve sentetik antioksidanların olası yan etkilerinden dolayı yeni bitkisel ve doğal antioksidanların keşfedilmesi giderek önem kazanmaktadır.

Kaur ve diğ. (2008)'nin *Q. infectoria* gallerinin etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesini değerlendirdikleri bir çalışmada, ekstraktın $416 \pm 10,6$ mgGAE/g toplam polifenolik içerdiğini ve yüksek antioksidan aktiviteye (DPPH IC_{50} : $\sim 0,5$ μ g/ml, ABTS IC_{50} : ~ 1 μ g/ml, H_2O_2 IC_{50} : $\sim 2,6$ μ g/ml) ve $\bullet OH$ radikali

IC₅₀: ~6 µg/ml). sahip olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Aynı çalışmada gal ekstraktının metal şelatlama kapasitesi yaklaşık olarak %30 bulunmuştur. *Q. infectoria* gallerinin antioksidan aktivitesi ve tannik asit miktarlarının incelendiği başka bir çalışmada, gal ekstraktlarının DPPH radikal giderim aktivitesi yaklaşık %93,4 tannik asit miktarı ise 2233,82±1,311 mg/g olarak tespit edilmiştir (Arina ve Harisun 2019). Bizim elde ettiğimiz radikal giderim verilerine göre, en yüksek DPPH inhibisyonuna *A. anatolicus* etanol ekstraktında (IC₅₀: 1,40±0,55 µg/ml); en yüksek ABTS inhibisyonuna ise *A. sternlichti* ekstraktında (IC₅₀: 5,04±0,41 µg/ml) rastlanmıştır (Tablo 3.4 ve 3.5). Çalışmamızdaki en yüksek metal şelatlama aktivitesi *A. curtisii* metanol ekstraktında (%58,04±2,72) ve en fazla toplam fenolik madde *A. sternlichti* metanol ekstraktında (322,06±0,97 mgGAE/g) tespit edilmiştir (Tablo 3.8).

Abdioğlu (2019) çalışmasında, üç farklı gal ekstresinin (*Andricus quercusramuli*, *Andricus quercustozae* ve *Andricus ceconii*) toplam fenolik ve flavonoid miktarlarını, antioksidan aktivitelerini (DPPH, ABTS, CUPRAC) ortaya çıkarmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid miktarlarını sırasıyla *A. quercusramuli* için 51,54±0,13 µgGA/mg, 12,08±0,03 µgQE/mg; *A. quercustozae* için 438,24±0,86 µgGA/mg, 49,24±0,69 µgQE/mg; *A. ceconii* için 176,54±0,87 µgGA/mg, 22,85±0,64 µgQE/mg olarak bulmuşlardır. DPPH verileri incelendiğinde *A. quercusramuli*'nin gal ekstresi 1000 µg/ml konsantrasyonda %91,40±0,01 inhibisyon, *A. quercustozae*'nin gal ekstresi 20 µg/ml konsantrasyonda %97,03±0 inhibisyon, *A. ceconii*'nin gal ekstresi 50 µg/ml konsantrasyonda %90,23±0,08 inhibisyon değerleriyle en yüksek aktiviteyi gösterdiğini tespit etmiştir. Bulunan ABTS sonuçlarına bakıldığında *A. quercusramuli*'nin gal ekstresi 100 µg/ml konsantrasyonda %97,22±0 inhibisyon, *A. quercustozae*'nin gal ekstresi 2,5 µg/ml konsantrasyonda %98,66±0,9 inhibisyon, *A. ceconii*'nin gal ekstresi 25 µg/ml konsantrasyonda %97,75±0,04 inhibisyon değerleriyle en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Aynı çalışmada en yüksek CUPRAC absorbans değerleri *A. quercusramuli*'nin 1,22±0,07, *A. quercustozae*'nin 1,2±0,08, *A. ceconii*'nin gal ekstresi 1,84±0,19 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada gallerin ekstrakt verimlilikleri *A. quercusramuli* gal ekstresi için %5,20, *A. quercustozae* gal ekstresinin %11,56, *A. ceconii* gal ekstresinin %5,66 olarak hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda gallerin ekstrakt verimliliği incelendiğinde en yüksek *A. sternlichti* metanol ekstraktında

(%57,022) en düşük ekstrakt verimliliğine ise *A. ceconii* aseton ekstraktında (%4,555) tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Bizim çalışmamızda elde edilen CUPRAC verilerine göre ekstraktlar arasında en yüksek bakır indirgeme gücüne *A. sternlichti* etanol ekstraktının (90,57±0 mgTE/g), en düşük bakır indirgeme gücünü *A. ceconii* su ekstraktının (62,84±0,37 mgTE/g) sahip olduğu gözükmektedir (Tablo 3.6).

Paaver ve diğ. (2010), *Quercus robur* L. gallerinin toplam tanen içeriklerini belirledikleri çalışmalarında, tanen içerikleri meşe gal-elmasında %47,2; kahverengi parlak galde %4,2; üzüm galinde %3,4; Çin galinde %89,1, Türk galinde %81,4 ve fıstık galinde %52,4; meşe kabuğunda %9,1 ve ortak tormentil köklerinde %21,1 olarak bulunmuştur. Önceki çalışmamızda, *A. quercustozae* gal ekstraktlarının toplam tanen miktarı 23,10±1,22 mgCE/g tespit etmiştik (Azmaç ve diğ. 2020). Bu çalışmamızda ise, türlerin en yüksek toplam tanen madde miktarına tüm türler için aseton ekstraktlarında rastlanmıştır. *A. ceconii* gal ekstraktının 329,5±1,54 mgCEs/g, *A. curtisii* gal ekstraktının 77,83±0,41 mgCEs/g, *A. anatolicus* gal ekstraktının 76,16±9,24 mgCEs/g, *A. tomentosus* gal ekstraktının 47,17±1,63 mgCEs/g ve *A. sternlichti* gal ekstraktının 46,4±2,99 mgCEs/g olarak tespit edilmiştir.

Shahin ve Ahmad (2014), farklı bitki türlerinin antioksidan özelliklerini (DPPH, FRAP) ve toplam fenolik içeriklerini incelemişlerdir. Bu çalışmada *Q. infectoria* gallinin toplam fenolik miktarını 635,25±9,3 mgGAE/g, DPPH inhibisyonunu %89,19±2,2 ve FRAP değerini 1225±9,39 mFe²⁺/g olarak bulmuşlardır. Bizim elde ettiğimiz FRAP sonuçları, en yüksek FRAP aktivitesine *A. tomentosus* etanol ekstraktlarının (182,19±5,41 mgTE/g), en düşük FRAP aktivitesine ise *A. ceconii* aseton ekstraktının (16,23±0,89 mgTE/g) sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 3.7).

Andricus quercustozae'nin antioksidan kapasitesinin ve fenolik bileşen karakterizasyonunu belirlediğimiz daha önceki bir çalışmamızda, *A. quercustozae*'nin fosfomolibdenyum metodu ile elde ettiğimiz antioksidan kapasite sonuçları aseton ekstraktının 78,20±1,63 mgAE/g olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmamızda, etanol ekstraktının HPLC metodu ile fenolik bileşen karakterizasyonu da incelenmiştir ve en yüksek fenolik bileşenler kafeik asit (31979,335 µg/g) ve epikateşin (272286,511 µg/g) olarak belirlenmiştir. Sukkor ve diğ. (2020) yaptıkları çalışmada, meşe gallerinde tespit ettikleri en yüksek fenolik asitlerin gallik asit

(497,34 mg/g) ve tannik asit (2430,48 mg/g) olduğunu bildirmişlerdir. Biz bu çalışmamızda beş farklı gal türünün metanol ekstraktlarının fenolik bileşenlerini HPLC metodu ile belirledik (Tablo 3.12). HPLC verilerimiz, kafeik asit *A. sternlichti* (589041,723 µg/g), *A. tomentosus* ekstraktlarında (424068,479 µg/g), *A. cecconii* ekstraktlarında (49318,714 µg/g), *A. anatolicus* ekstraktlarında (575307,286 µg/g) en fazla miktarda tespit edilen fenolik bileşen olarak belirlenmiştir. *A. curtisii* ekstraktlarında ise en yüksek miktarda epikateşine (870810,906 µg/g) rastlanmıştır. Gal ekstraktlarının yüksek antioksidan kapasitesine ve yüksek fenolik, flavonoid madde miktarlarının tespit edildiği daha önce yapılmış çalışmaların sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlarla korelasyon göstermektedir.

Ekstrelerin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek için farklı antioksidan tahlilleri kullanılmıştır, çünkü birden fazla yöntemin kullanılması ekstraktların antioksidan aktivitesine daha iyi bir fikir verecektir. Genel olarak, bitki özütlerinin antioksidan potansiyeli; özütleme yöntemi, özütleme çözücüsünün polaritesi, özütün bileşimi ve test sistemlerinin koşulları ile ilişkilendirilmektedir (Marvibaigi ve diğ. 2016). Bizim çalışmamızdan elde edilen antioksidan aktivitedeki farklılıklar, çalışmada kullanılan farklı ekstraksiyon solventlerine ve gal türlerinin farklılığına atfedilebilir.

Önceki araştırmalara göre, meyve, sebze, kahve, çikolata, çilek, kırmızı şarap, kepekli tahıllar ve antioksidan bakımından zengin diğer yiyeceklerin diyetle alınmasının, özellikle sindirim sistemini etkileyenler olmak üzere, birçok yaygın kanserin olasılıklarını azaltmasıyla ilişkilendirilmiştir (Jiang ve diğ. 2010; Li ve diğ. 2014; Xu ve diğ. 2015; Chen ve diğ. 2016; Vieira ve diğ. 2016; Nakagawa-Senda ve diğ. 2017). Son zamanlarda, diyetin toplam antioksidan kapasitesinin kanser riskini etkileyebileceğini gösteren çalışmalar yürütülmüştür (Serafini ve diğ. 2002, 2012; Chang ve diğ. 2007; Mekary ve diğ. 2010; Cui ve diğ. 2011; Gifkins ve diğ. 2012^{a, b}; Holtan ve diğ. 2012; Ros ve diğ. 2013; Vecchia ve diğ. 2013; Russnes ve diğ. 2014, 2016; Karimi ve diğ. 2015; Pantavos ve diğ. 2015; Praud ve diğ. 2015; Vece ve diğ. 2015; Lucas ve diğ. 2016; Rossi ve diğ. 2016; Amiano ve diğ. 2018). Diyet antioksidanlarının, esas olarak reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin neden olduğu DNA hasarını azaltma yeteneklerinden dolayı kansere karşı koruyucu olduğu öne sürülmüştür (Seifried ve diğ. 2003).

Gal ekstraktlarının antioksidan ve antikanser etkilerini araştırdığımız bu çalışmada, 4 farklı çözücü ile hazırlanan gal türlerinin Mia-Paca hattında hücre canlılığına etkisi XTT metodu kullanılarak incelenmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) bitki tarama programına göre, 48 ila 72 saat arasındaki inkübasyonu takiben IC₅₀ değeri 20 µg/mL'den az ise, ham bir ekstraktın aktif in vitro sitotoksik aktiviteye sahip olduğu kabul edilmektedir (Kuete ve diğ. 2012; Ashraf ve diğ. 2013). Belirtilen bu eşik değere dayanarak alışmamızda *A. sternlichti* etanol (IC₅₀: 0,04 µg/mL-72h) ve su ekstraktının (IC₅₀: 16,69 µg/mL-48h) potansiyel sitotoksik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz (Tablo 3.13). Hasmah ve diğ. (2010), *Q. infectoria* gallerinin servikal kanser hücrelerine (HeLa, IC₅₀: 2,82±0,21 µg/mL) ve yumurtalık kanseri hücrelerine (Caov-3, IC₅₀: 6,50±0,24 µg/mL) karşı antiproliferatif etki gösterdiğini ve gallerin antikanser ajan olarak yorumlanabileceğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada meşe gallerinin farelerin meme karsinoma hücre hattında (2003 AMN3, IC₅₀: 0,2 mg/mL) yüksek düşüşlere sahip olduğu tespit edilmiştir (Jalil 2018). Doğal ürünler üzerine birçok araştırma yapılmasına rağmen gallerin antikanser etkileri nadiren ham özler kullanılarak incelenmiştir.

Quercus infectoria yapraklarının sulu ve hidroalkolik özütlerinin kolon kanserine hücre hattı (HT29) üzerindeki antiproliferatif etkisi ve Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonlarındaki değişim incelenmiştir. Sulu özütle işlenmiş hücrelerdeki Bax ve Bcl-2 gen ekspresyon seviyeleri, referans genle karşılaştırıldığında sırasıyla 2,8 (p<0.05) ve 2,2 kat (p<0.05) değiştirildiği gözlemlenmiştir ve kolon kanserinde apoptozu indüklemeye potansiyellerine sahip oldukları ileri sürülmüştür (Abdalan ve diğ. 2018). *Q. infectoria* gallerin sulu özütünün, HeLa hücre hattında (IC₅₀: 13,640±2,39 µg/mL) antiprolatif aktivite sergilediği ve p53 yolağı üzerinden apoptozu indüklediği gösterilmiştir. P53 yolağının yukarı regülasyonunda, Bcl-2'nin aşağı regülasyonu ve bunun sonucunda sitokrom c salınımında artış gözlenir. Böylece kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla apoptozun yürütülmesi kolaylaştırılır. (Zulkifly 2015). Bizim alışmamızda gal ekstraktlarının genel olarak Bcl-2'nin ekspresyonunu azalttığı görülmektedir (Tablo 3.14-3.18). Anti-apoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonunun azalması apoptozun indüklenmesi ile sonuçlanabilir. Gal türlerinin ekstraktlara göre genler üzerinde gösterdikleri değişiklik, ekstraksiyon çözücülerinin farklı biyolojik bileşenleri ayırmasından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, çalışma materyallerimiz olan *A. sternlichti*, *A. tomentosus*, *A. curtisii*, *A. ceconii* galleri *Q. infectoria* üzerinden; *A. anaticus* galleri ise *Q. macranthera* üzerinden toplanmıştır. Aynı konukçu üzerinden toplanan gallerin farklı antioksidan kapasite, toplam sekonder metabolit miktarı ve antikanser etki göstermeleri, bize gallerin fitokimyasal yapılarının şekillenmesinde konukçu bitki kadar indükleyicinin de etkisi olduğunu görme fırsatı sunmuştur.

Literatürde meşe galleri üzerine yapılmış olan çalışmalarda, genel olarak gal oluşumuna sebep olan arının tür tespiti yapılmadan *Q. infectoria* galleri, meşe galleri veya *mazu (mazu)* adı altında biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Morfoloji ve yapı olarak türe özgü gal oluşuma neden olan gal arılarının tür tespiti yapılarak, biyolojik aktivitelerinin belirlendiği bu çalışmamızın literatür için önemli ve özgün bir kaynak oluşturacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kullanılan farklı gal türlerinin aynı zamanda farklı ekstraksiyon çözücüleri ile çeşitlendirilmesi, gal ekstraktlarındaki çözücü farklılığının biyolojik aktiviteye etkisinin aydınlatılmasını sağlamıştır.

Gal örneklerinin sahip olduğu yüksek sekonder metabolit içeriği ve antioksidan kapasitesi sayesinde, çalıştığımız gal türlerinin doğal antioksidan kaynağı olarak çeşitli sektörlerde kullanılabileceğini önermekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- Abdalan, S., Baghbani-Arani, F., & Sadat Shandiz, S. A., "Evaluation of Anticancer Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Quercus Fectoria Leaf against Colon Cancer HT29 Cell Line", *J Arak Uni Med Sci*, 21(4), 48-57, (2018).
- Abrahamson, W. G., Weis, A. E., Nutritional ecology of arthropod gall-makers. (eds: Slansky, F., Rodriguez, G.) The nutritional ecology of insects, mites and spiders, New York: Wiley, 235-258, (1986).
- Adams, J. M., Cory, S., "Life or death decisions by the Bcl-2 family", *Trends Biochem Sci*, 26:61-6, (2001).
- Adewusi, E., Afolayan, A. J., "A review of natural products with hepatoprotective activity", *J Med Plants Res*, 4(13):1318-1334, (2010).
- Adjei, A. A. "Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy", *J Natl Cancer I*, 93(14), 1062-1074, (2001).
- Adrain, C., Martin, S. J., "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas", *Trends Biochem Sci*, 26:390-7, (2001).
- Agarwal, S., Rao, A. V., "Carotenoids and chronic diseases", *Drug Metab Drug Interact*, 17(1-4), 189-210, (2000).
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., Kim, J. H., "Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey", *Blood*, 119:651-65, (2012).
- Agudelo, I., Cogoi, L., Filip, R., Kuzmanich, N., Wagner, M. L., Ricco, R. A., "Anatomy, histochemistry, and comparative analysis of hydroxycinnamic derivatives in healthy leaves and galls induced by *Baccharopelma* spp. (Hemiptera: Psyllidae) in *Baccharis spicata* (Lam) Baill (Asteraceae)", *Biochem Syst Ecol*, 77:22-30, (2018).
- Ahmad, W., Zeenat, F., Hasan, A., Abdullah, A., Nargis, A., & Tarannum, T., "Mazu (*Quercus infectoria*, Oliv)-An Overview", *Indian Journal of Unani Medicine*, 4(1), 17-22, (2011).
- Al-Ishbili, A. K., *Umdat al-tabib fi marifat al- nabat*, Beirut: Al Gharb al Islami press, (1990).
- Allison, S. D., Schultz, J. C., "Biochemical responses of chestnut oak to a galling cynipid", *J. Chem. Ecol.* 31, 151-166, (2005).

Alnemri, E. S. et al., "Human ICE/CED-3 protease nomenclature", *Cell*, 87, 171, (1996).

Al-Snafi, A. E., "Chemical constituents, pharmacological effects and therapeutic importance of Hibiscus rosa-sinensis-A review", *Journal of Pharmacy*, 8(7), 101-119, (2018).

American Cancer Society, Cancer facts & figures, Atlanta, GA: American Cancer Society, (2016).

Amiano, P., Molina-Montes, E., Molinuevo, A., Huerta, J. M., Romaguera, D., Gracia, E., ... & Castilla, J., "Association study of dietary non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) and colorectal cancer risk in the Spanish Multicase-Control Cancer (MCC-Spain) study", *Eur J of Nutr.*, 58(6), 2229-2242, (2019).

Amin, I., Zamaliah, M. M., Chin, W. F., "Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables", *Food Chem*, 87:581-586, (2004).

Amir Aslani, B., Ghobadi, S., "Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system", *Life Sci*, 146:163-173, (2016).

Ananthkrishnan, T. N., Raman, A., Thrips and gall dynamics. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Company, 120, (1989).

Anderson, P. C., Mizell, R. F., "Physiological effects of galls induced by Phylloxera notabilis (Homoptera: Pylloxeridae) on pecan foliage", *Environ Entomol*, 16:264-268, (1987).

Aniszewski, T., (ed) Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications, , Pacific Grove, CA: Elsevier, 496, (2015).

Ansari, M., Etelaei, F., Sharififar, F., "Tyrosinase kinetic in the presence of three inhibitory medicinal plants", *Int J Green Pharm*, 5:103-5, (2011).

Ansari, S. A. H., Wasim, A., Rizwan, M. K., Azhar, H., "Ethnopharmacology of *Quercus infectoria* Olivier -galls: a review", *Hippocratic J Unani Med.*, 11(3): 105-118, (2016).

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E., Ercag, E., "The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas", *Int J Food Sci Nutr*, 57:292-304, (2006).

Apak, R., Guculu, K. G., Ozyurek, M., and Karademir, S. E., "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method" *J Agric Food Chem*, 52: 7970-7981, (2004).

- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., “Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays”, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5):997-1027, (2016).
- Arina, M. I., Harisun, Y., “Effect of extraction temperatures on tannin content and antioxidant activity of *Quercus infectoria* (Manjakani)”, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101-104, (2019).
- Aruoma, O. I., “Characterization of Drugs as Antioxidant Prophylactics”, *Free Radical Biol. Med.*, 20:675-705, (1996).
- Aruoma, O. I., “Free Radicals and Foods”, *Chem. Br.*, 29:210-214, (1993).
- Aruoma, O. I., “Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease”, *Journal of the American oil chemists' society*, 75(2), 199-212, (1998).
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., “Standardization of Propolis Extract and Identification of Principal Constituents”, *J Pharm Belg*, (49): 462- 468, (1994).
- Arya, S. P., Mahajan, M., and Jain, P., “Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C”, *Anal Chim Acta*, 417: 1-14, (2000).
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M., “Death receptors: signaling and modulation”, *Sciences*, 281:1305-8, (1998).
- Ashraf, M. F., Abd Aziz, M., Stanslas, J., Ismail, I., & Abdul Kadir, M., “Assessment of antioxidant and cytotoxicity activities of saponin and crude extracts of *Chlorophytum borivilianum*”, *The Scientific World Journal*, 2013, (2013).
- Astorg, P., Gradelet, S., Bergès, R., Suschetet, M., “Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat”, (1997).
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S., “Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014:1-31, (2014).
- Azmaz, M., Aksoy, Ö. K., Katılmış, Y., & Mammadov, R., “Investigation of the Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of *Andricus quercustozae* Gall and Host Plant (*Quercus infectoria*)”, *International Journal of Secondary Metabolite*, 7(2), 77-87, (2020).
- Azmaz, M., Katılmış Y., “A new species of herb gall wasp (Cynipidae, Aulacideini, Aulacidea) from Turkey”, *Zootaxa*, 4747, 378-390, (2020a).

Azmaz, M., Katılmış Y., “Updated species list of Cynipidae (Hymenoptera) from Turkey”, *Zootaxa*, 4303, 361-378, (2017).

Azmaz, M., Katılmış, Y., “A new species of *Cynips* (Cynipidae: Cynipini) from Turkey”, *Zoology in the Middle East*, 66(3), 232-239, (2020b).

Babior, B. M., “NADPH oxidase: an update. Blood”, *The Journal of the American Society of Hematology*, 93(5), 1464-1476, (1999).

Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D., “Drug discovery from medicinal plants”, *Life sciences*, 78(5), 431-441, (2005).

Baranska, M., Roman, M., Schulz, H., Baranski, R., “Recent advances in Raman analysis of plants: alkaloids, carotenoids, and polyacetylenes”, *Curr Anal Chem*, 9(1):108-127, (2013).

Baros, S., Karsayová, M., Jomová, K., Gáspár, A., Valko, M., “Free radical scavenging capacity of *Papaver somniferum* L. and determination of pharmacologically active alkaloids using capillary electrophoresis”, *J Microbiol Biotech Food Sci*,1:725, (2012).

Barroso, M. F., De-los-Santos-Álvarez, N., Delerue-Matos, C., Oliveira, M. B. P. P., “Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: electrochemical (bio)sensors”, *Biosens Bioelectron*, 30: 1-12, (2011).

Barroso, M. F., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castanón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J., Delerue-Matos, C., et al. “DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages”, *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 2396-2401, (2011).

Başer, K. H. C., Honda, G., Miki, W., “Herb Drugs and Herbalists in Turkey”, Institute for the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, *Studia Culturae Islamicae*, 27, Tokyo, (1986).

Baskin, S. I., Salem, H., *Oxidants, antioxidants, and free radicals*, Washington DC: Taylor and Francis, 26-35, (1997).

Basri, D. F., & Fan, S. H., “The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents”, *Indian journal of Pharmacology*, 37(1), 26, (2005).

Basri, D. F., Tan, L. S., Shafiei, Z., Zin, N. M., “In vitro antibacterial activity of galls of *quercus infectoria* olivier against oral pathogens”, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 632-796, (2012).

Bayrak, S., Avcı, M., “Gall forming Cynipini (Hymenoptera: Cynipidae) species in Isparta oak forests”, *Munis Entomology & Zoology*, 14, 552-564, (2019).

- Behrmann, I., Walczak, H., Krammer, P. H., "Structure of the human APO-1 gene", *Eur J Immunol.*, 24:3057-62, (1994).
- Bekir, J., Mars, M., Souchar, J. P., Bouajila, J., "Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves", *Food Chem Toxicol*, (55):470-475, (2013).
- Beyer, J., Drummer, O. H., Maurer, H. H., "Analysis of toxic alkaloids in body samples", *Forensic Sci Int*, 185(1-3):1-9, (2009).
- Bhardwaj, A., Aggarwal, B. B., "Receptor-mediated choreography of life and death", *J Clin Immunol.*, 23:317-32, (2003).
- Bhattacharya, A., Sood, P., & Citovsky, V., "The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection", *Molecular plant pathology*, 11(5), 705-719, (2010).
- Bhattacharyya, S., Sinha, K., Sil, P. C., "Cytochrome P450s: mechanisms and biological implications in drug metabolism and its interaction with oxidative stress", *Current Drug Metabolism*, 15:719-742, (2014).
- Birt, D. F., Jeffery, E., "Flavonoids", *Advances in Nutrition*, 4, 576-577, (2013).
- Block, G., Patterson, B. and Subar, A., "Fruit, Vegetables and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiological Evidence", *Nutr. Cancer*, 18:1-29, (1992).
- Blum, L., and Coulet, P., *Biosensor principles and application*, New York: Marcel Dekker Inc, (1991).
- Bonanni, A., Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E., Tomassetti, M., "Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods", *Food Chem*, 102: 751-758, (2007).
- Borowski, J., Szajdek, A., Borowska, E. J., Ciska, E. and Zielinski, H., "Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.)", *Eur Food Res Technol*, 226: 459-465, (2008).
- Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C., *Alkaloids WA, Lessons on Caffeine, Cannabis & Co.* Springer: Berlin, Heidelberg, 179-203, (2018).
- Boulaaba, M., Medini, F., Hajlaoui, H., Mkadmini, K., Falleh, H., Ksouri, R., Isoda, H., Smaoui, A., Abdelly, C., "Biological activities and phytochemical analysis of phenolic extracts from *Salsola*", *South African Journal of Botany*, 123, 193-199, (2019).
- Böyükbayram, A., Kıralp, S., Toppare, L., Yağci, Y., "Preparation of biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine", *Bioelectrochemistry*, 69: 164-171, (2006).

- Bozkurt, B., Ahmet, E., Gi, K., Ma, Ö., Berkov, S., Bastida, J., Nü, S., “Alkaloid profiling of *Galanthus woronowii* Losinsk. by GC-MS and evaluation of its biological activity”, *Marmara Pharm J*, 21(4):915-920, (2017).
- Bozyel, M. E., Şenturan, M., Benek, A., Merdamert Bozyel, E., Canli, K., Altuner, E. M., “In Vitro Antimicrobial Activity Screening of *Heliotropium europaeum* Against Wide Range of Microorganisms and Multi Drug Resistant (Mdr) Bacteria”, *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 6(3): 113-117, (2019).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C., “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensm-Wiss u-Technol*, 28: 25-30, (1995).
- Bremer, E., “Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy”, *ISRN Oncol.*, 2013: 371854, (2013).
- Brewer, J. W., Bishop, J. W., Skuhravy, V., “Levels of foliar chemicals in insect-induced galls (Diptera: Cecidomyiidae)”, *J Appl Entomol*, 104:504-510, (1987).
- Bronner, R., “Contribution a l'etude histochimique des tissue nourriciers des zoocecidies”, *Marcellia*, 40:1-134, (1977).
- Bronner, R., The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiids. (eds: Shorthouse, J. D., Rohfritsch, O.) *Biology of insect-induced galls*, New York: Oxford University Press, 118-140, (1992).
- Bruhn, J. G., & Bohlin, L., “Molecular pharmacognosy: an explanatory model”, *Drug discovery today*, 6(2), 243-246, (1997).
- Buckingham, J., Baggaley, K. H., Roberts, A. D., Szabo, L. F., *Dictionary of alkaloids*, Boca Raton, London, NewYork: CRC Press, (2010).
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X., “Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis”, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15, 269-290, (1999).
- Buffington, M. L., Forshage, M., Liljeblad, J., Tang, C.-T. and van Noort, S., “World Cynipoidea (Hymenoptera): A Key to Higher-Level Groups”, *Insect Systematics and Diversity*, 4 (4), 1, 1-69, (2020).
- Burckhardt, D., “Biology, ecology and evolution of gall-inducing psyllids (Hemiptera: Psylloidea)”, *Biology, ecology and evolution of gall-inducing arthropods*, 143-57, (2005).
- Busch, J. L. H. C., Hrnčirik, K., Bulukin, E., Boucon, C., Mascini, M., “Biosensor measurements of polar phenolics for the assessment of the bitterness and pungency of virgin olive oil”, *J. Agric. Food. Chem.*, 54: 4371-4377, (2006).

- Büyükgebiz, O., Caferler, J. S., “Apoptoz”, *Sendrom*, 13:102-7, (2001).
- by Merriam-Webster, D., America's Most-Trusted Online Dictionary <https://www.merriamwebster.com/dictionary/bullying>. *Erişim Tarihi*, 2, (2018).
- Cadogan, J. I. G., “Principles of Free Radical Chemistry”, *The Chemical Society*, London, 1973.
- Campanella, L., Martini, E., Rita, E., and Tomassetti, M., “Antioxidant capacity of dry vegetal extracts checked by voltammetric method”, *J Food Agric Environ*, 4: 135-144, (2006).
- Campos, P. T., Costa, M. C. D., Isaias, R. M. S., Moreira, A. S. F. P., Oliveira, D. C., Lemos-Filho, J. P., “Phenological relationships between two insect galls and their host plants: *Aspidosperma australe* and *A. spruceanum* (Apocynaceae)”, *Acta Bot Bras*, 24:727-733, (2010).
- Canli, K., Bozyel, M. E., Altuner, E. M., “In Vitro Antimicrobial Activity Screening of *Maclura pomifera* Fruits Against Wide Range of Microorganisms”, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 6(8): 19-22, (2017c).
- Canli, K., Bozyel, M. E., Altuner, E. M., “In Vitro Antimicrobial Activity Screening of *Maclura pomifera* Fruits Against Wide Range of Microorganisms”, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 6(8): 19-22, (2017c).
- Canli, K., Simsek, O., Yetgin, A., Altuner, E. M., “Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of *Frankenia hirsuta*”, *Bangladesh J Pharmacol*, 12: 463-469, (2017d).
- Canli, K., Simsek, O., Yetgin, A., Altuner, E. M., “Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of *Frankenia hirsuta*”, *Bangladesh J Pharmacol*, 12: 463-469, (2017d).
- Canli, K., Yetgin, A., Akata, I., Altuner, E. M., “Antimicrobial Activity and Chemical Composition Screening of *Epilobium montanum* Root”, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3s): 239-243, (2017a).
- Canli, K., Yetgin, A., Akata, I., Altuner, E. M., “Antimicrobial Activity and Chemical Composition Screening of *Anacyclus pyrethrum* Root”, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(3s): 244-248, (2017b).
- Canli, K., Yetgin, A., Akata, I., Altuner, E. M., “In Vitro Antimicrobial Screening of *Aquilaria agallocha* Roots”, *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 13(5): 178-181, (2016).
- Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M., and Parenti, A., “Electrochemical

sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils”, *Food Chem*, 71: 553-562, (2000).

Caponio, F., Alloggio, V., Gomesb, T., “Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil; Influence of Paste Preparation Techniques”, *Food Chem*, (64):203-209, (1999).

Carneiro, R. G. S., Castro, A. C., Isaias, R. M. S., “Unique histochemical gradients in a photosynthesis-deficient plant gall”, *S Afr J Bot*, 92:97-104, (2014).

Carr, A. C., Zhu, B. Z., Frei, B., “Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E)”, *Circ Res*, 87: 349-354, (2000).

Carvalho, J. C. B., dos Santos, A. H., Lobo, J. F. R., Ferreira, J. L. P., Oliveira, A. P., Rocha, L., “Pyrrolizidine alkaloids in two endemic capeverdian *Echium* species”, *Biochem Syst Ecol*, 50:1-6, (2013).

Çaylak, E., “Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar”, *Tip Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83, (2011).

Chang, E. T., Lee, V. S., Canchola, A. J., Clarke, C. A., Purdie, D. M., Reynolds, P., ... & Pinder, R., “Diet and risk of ovarian cancer in the California Teachers Study cohort”, *American journal of epidemiology*, 165(7), 802-813, (2007).

Chen, J. Y., Zhu, H. C., Guo, Q., Shu, Z., Bao, X. H., Sun, F., ... & Sun, X. C., “Dose-dependent associations between wine drinking and breast cancer risk-meta-analysis findings”, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(3), 1221-1233, (2016).

Chiavaroli, V., Giannini, C., De Marco, S., Chiarelli, F., & Mohn, A., “Unbalanced oxidant–antioxidant status and its effects in pediatric diseases”, *Redox Report*, 16(3), 101-107, (2011).

Chikezie, P. C., Ibegbulem, C.O., Mbagwu, F.N., “Bioactive principles from medicinal plants”, *Research Journal of Phytochemistry*, 9, 88-115, (2015).

Chokpaisarn, J., Urao, N., Voravuthikunchai, S. P., Koh, T. J., “*Quercus infectoria* inhibits Set7/NF-κB inflammatory pathway in macrophages exposed to a diabetic environment”, *Cytokine*, 94, 29, (2017).

Chong, P. L., Olsher, M., “Fluorometric assay for detection of sterol oxidation in liposomal membranes”, *Methods Mol Biol*, 400: 145-158, (2007).

Chopra, R. N., Nayar, S. I., Chopra, I. C., Glossary of Indian Medicinal Plant India. Council of Scientific and Industrial Research India, (1956).

Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G. K., “Caspases—an update”, *Comp Biochem Physiol.*, 151:10-27, (2008).

- Chu, J. H. Y., “Investigating in vitro anticancer properties of Malaysian rainforest plants: *Acalypha wilkesiana* Müll, Arg. *Archidendron ellipticum* (Blume) Hassk. *Duabanga grandiflora* Walp. *Pseuduvaria macrophylla* (Oliv.) Merr”, Ph.D Thesis, University of Nottingham, Nottingham, (2014).
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., Lin, Y., “Tannins and human health: A re- view”, *Critical Reviews Food Science and Nutrition*, 38(6), 421-464, (1998).
- Cízová, H., Lojek, A., Kubala, L., and Cíz, M., “The effect of intestinal ischemia duration on changes in plasma antioxidant defense status in rats”, *Physiol Res*, 53: 523-531, (2004).
- Clifford, M. N., Scalbert, A., “Review Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118-1125, (2000).
- Coelho Kuster, V., Costa Rezende, U., Fernandes Cardoso, J. C., dos Santos Isaias, R. M., & Coelho de Oliveira, D., “How Galling Organisms Manipulate the Secondary Metabolites in the Host Plant Tissues? A Histochemical Overview in Neotropical Gall Systems”, *Co-Evolution of Secondary Metabolites*, 823-842, (2020).
- Çömlekçioğlu, N., Karaman, Ş., “The Medicinal Plants Found in the local Herbal Markets in The City of Kahramanmaraş in Turkey”, *KSU Journal of Science and Engineering*, 11(1): 23-32, (2008).
- Cook, N. C., Samman, S., “Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources”, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76, (1996).
- Cortina-Puig, M., Noguer, T., Marty, J. L., Calas-Blanchard, C. C., “Electrochemical Biosensors as a Tool for the Determination of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Foods and Beverages in Biosensor in Food Processing, Safety and Quality Control”, *Cap 10 CRC Press* , (2010).
- Cory, S. & Adams, J. M., “The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch”, *Nature Rev. Cancer*, 2, 647-656, (2002).
- Coşkun, G., & Özgür, H., “Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158, (2011).
- Cragg, G. M., & Newman, D. J., “Drug discovery and development from natural products: the way forward”, In 11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings, 1, 56-69, (2005).

- Cragg, G. M., & Newman, D. J., “Natural product drug discovery in the next millennium”, *Pharmaceutical biology*, 39(sup1), 8-17, (2001).
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G., “Natural products (secondary metabolites)”, *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319, (2000).
- Cryns, V. & Yuan, J., “Proteases to die for”, *Genes Dev.*, 12, 1551-1570, (1998).
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L., *Natural products from plants*, CRC press, (2016) .
- Cui, X., Rosner, B., Willett, W. C., & Hankinson, S. E., “Antioxidant intake and risk of endometrial cancer: results from the Nurses' Health Study”, *International journal of cancer*, 128(5), 1169-1178, (2011).
- Cummings, E. A., Linquette-Mailley, S. C., Mailley, P., Cosnier, S., Eggins, B. R., et al. “A comparison of amperometric screen printed carbon electrodes and their application to the analysis of phenolic compounds in beers”, *Talanta*, 55: 1015-1027, (2001).
- Cummings, E. A., Mailley, P., Linquette-Mailley, S., Eggins, B. R., McAdams, E. T., et al. “Amperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavanol content in beers”, *Analyst*, 123: 1975-1980, (1998).
- Curtin, J. F., Cotter, T. G., “Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis”, *Cell Signal*, 15:983-92, (2003).
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M., “Control of apoptosis by the Bcl-2 protein family: implications for physiology and therapy”, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 5:49-63, (2014).
- Dar, M. S., Ikram, M., & Fakouhi, T., “Pharmacology of *Quercus infectoria*” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65(12), 1791-1794, (1976).
- Darwin, C., *The variation of animals and plants under domestication* (ed. Judd, O.), 2, (1868).
- De Bont, R., van Larebeke, N., “Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data”, *Mutagenesis*, 19(3):169-185, (2004).
- De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H., Vlietinck, A., “Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 445-459, (1999).
- De Sousa Leal, A., de Carvalho Leal, L. H., Da Silva, D., Nunes, L. C. C., Lopez, J. A. D., “Incorporation of tannic acid in formulations for topical use in wound

healing: A technological prospect- ing”, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(26), 662-674, (2015).

Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J., “A decade of caspases”, *Oncogene*, 22:8543-67, (2003).

Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I., et al. “Solidphase extraction of berries’ anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties”, *Food Chem*, 123: 1055-1061, (2010).

Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. A., “Historical overview of natural products in drug discovery”, *Metabolites*, 2(2), 303-336, (2012).

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M., “Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers”, *Archive of Biochemistry and Biophysics*, (315):161-169, (1994).

Diplock, A. T., “Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview”, *The American journal of clinical nutrition*, 53(1 Suppl), 189S-193S, (1991).

Doğan Abdioğlu, M., “Bazı meşe gallerinin kolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim inhibisyonu ile antioksidan aktivitesinin belirlenmesi”, Master's thesis, Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Batman, (2019).

Douglas, H., Online etymology dictionary. URL [http://www. etymonline. com/index. Php](http://www.etymonline.com/index.php), (2001).

Dreger-Jauffret F., Shorthouse, J. D., Diversity of gall-inducing insects and their galls in *Biology of insect-induced galls* (eds Shorthouse, J. D. & Rohfritsch, O.) 8–33, England: Oxford University Press, Oxford, (1992).

Dreger-Jauffret, F., Shorthouse, J. D., Diversity of gall-inducing insects and their galls. In: *Biology of Insect-Induced Galls*, (eds Shorthouse J. D. and Rohfritsch, O.), 8-33, (1992).

Duthie, S. J., Ma, A., Ross, M. A. and Collins, A. R., “Antioxidant Supplementation Decreases Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes”, *Cancer Res.*, 56:1291-1295, (1996).

Eggin, B. R., Hickey, C., Toft, S. A., and Zhou, D. M., “Determination of flavonols in beers with tissue biosensors”, *Anal Chim Acta*, 347: 281-288, (1997).

Ellis, R. E., Yuan, J. Y. & Horvitz, H. R., “Mechanisms and functions of cell death”, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 663-698, (1991).

- Erlund, I., “Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology”, *Nutrition Research*, 24, 851-874, (2004).
- Everett, S. A., Dennis, M. F., Patel, K. B., Maddix, S., Kundu, S. C., & Willson, R. L. (1996). Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant-carotene. *Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 3988-3994.
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R., “The value of plants used in traditional medicine for drug discovery”, *Environmental health perspectives*, 109(suppl 1), 69-75, (2001).
- Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., “Flavonoids and platelet aggregation: a brief review”, *European Journal of Pharmacology*, 807, 91-101, (2017).
- Fantuzzi, G., Puren, A. J., Harding, M. W., Livingston, D. J., Dinarello, C. A., “Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice”, *Blood*, 91:2118-25, (1998).
- Fathabada, A. E., Shariatifar, N., Mardania, K., & Mohammadpourfard, I., “Study on antibacterial and antioxidant activity of Oak gall (*Quercus infectoria*) extracts from Iran”, *Int J Curr Sci*, 14, E44-50, (2015).
- Ferreira, A., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., Alves, G., “Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology”, *Phytochem Rev*, 15(1):51-85, (2016).
- Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart, C., Noel, J. P., “Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 356-370, (2008).
- Folkman, J., “Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease”, *Nature medicine*, 1(1), 27-30, (1995).
- Frankel, E. N., “Lipid Oxidation”, *Prog. Lipid Res.*, 19:1-22, (1980).
- Friedman, M., “Chemistry and anticarcinogenic mechanisms of glycoalkaloids produced by eggplants, potatoes, and tomatoes”, *J Agric Food Chem*, 63(13):3323-3337, (2015) .
- Fulda, S., Debatin, K. M., “Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy”, *Biochim Biophys Acta.*, 1705, 27-41, (2004).

Galati, G., & O'brien, P. J., "Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties", *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303, (2004).

Galla, B. P., Council of the Pharmaceutical Society of Great Britain, (1911).

Gamboa-Gómez, C. I., Simental-Mendía, L. E., González- Laredo, R. F., Alcantar-Orozco, E. J., Monserrat-Juarez, V. H., Ramírez-España, J. C., *et al.*, "In vitro and in vivo assessment of anti-hyperglycemic and antioxidant effects of oak leaves (*Quercus convallata* and *Quercus arizonica*) infusions and fermented beverages", *Food Res Int*, 102:690-9, (2017).

Garewal, H. S., Antioxidants and disease prevention. Florida: CRC Press LLC, 3-19, (1997).

Genç, Y., Yüzbaşıoğlu, M., Harput Ü. Ş., Kuruüzüm-UZ A., "Antioxidant activity and total phenolic content of *Quercus coccifera* L.", *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(1),17-22, (2012).

Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P. and Fenn, W. O., "Oxygen Poisoning and X-Irradiation: A Mechanism in Common", *Science*, 119:623-626, (1954).

Ghavami, S., Eshraghi, M., Kadkhoda, K., et al. "Role of BNIP3 in TNF-induced cell death—TNF upregulates BNIP3 expression", *Biochim Biophys Acta*. 1793, 546-60, (2009).

Ghosh, D., "Tannins from foods to combat disease", *International Journal of Pharma Research & Review*, 4(5), 40-44, (2015).

Giardi, M. T., Rea, G., Berra, B., "Bio Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors", *Landes Bioscience and Springer Science+Business Media*, (2010).

Gifkins, D., Olson, S. H., Demissie, K., Lu, S. E., Kong, A. N. T., & Bandera, E. V., "Total and individual antioxidant intake and endometrial cancer risk: results from a population-based case-control study in New Jersey", *Cancer Causes & Control*, 23(6), 887-895, (2012).

Gifkins, D., Olson, S. H., Paddock, L., King, M., Demissie, K., Lu, S. E., Bandera, E. V., "Total and individual antioxidant intake and risk of epithelial ovarian cancer", *BMC cancer*, 12(1), 211, (2012).

Gil, D. M. A., Rebelo, M. J. F., "Evaluating the antioxidant capacity of wines: a laccase-based biosensor approach", *Eur Food Res Technol*, 231:303-308, (2010).

Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A., Hess-Pierce, B., and Kader, A. A., "Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids and vitamin C

contents of nectarine, peach and plum cultivars from California”, *J Agric Food Chem*, 50: 4976-4982, (2002).

Gillaspy, G., Ben-David, H., Gruissem, W., “Fruits: A developmental perspective”, *Plant Cell*, 5, 1439-1451, (1993).

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. & Green, D. R., “The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant”, *Nature Cell Biol.*, 2, 156-162, (2000).

Gomberg, M., “An Incidence of Trivalent Carbon Trimethylphenyl”, *J. Am. Chem. Soc.*, 22:757-771, (1900).

Gomes, S. A., Rebelo, M. J., “A new laccase biosensor for polyphenols determination”, *Sensors*, 3:166-175, (2003).

Granero, A. M., Fernandez, H., Agostini, E. and Zon, M. A., “An amperometric biosensor for trans-resveratrol determination in aqueous solutions by means of carbon paste electrodes modified with peroxidase basic isoenzymes from brassica napus”, *Electroanalysis*, 20: 858-864, (2008).

Green, D. R., Kroemer, G., “The pathophysiology of mitochondrial cell death”, *Science*, 305:626-9, (2004).

Groopman, J. D., Wang, J. S., and Scholl, P., “Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer”, *Can J Physiol Pharm*, 74, 203-209, (1996).

Gross, A., McDonnell, J. M., Korsmeyer, S. J., “Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis”, *Genes Dev.*, 13: 1899-911, (1999).

Guarrera, P. M., “Household dyeing plants and traditional uses in some areas of Italy”, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 2, 9, (2006).

Gupta, S., Shukla, R., Sharma, K. K., “Antidiabetic, Antihypercholesterolemic and antioxidant effect of *Ocimum sanctum* Linn. Seed oil”, *Ind. Jr. Exp. Biol.*, Apr. 44(4), 300-303, (2006).

Gurnani, N., Mehta, D., Gupta, M., & Mehta, B. K., “Natural Products: source of potential drugs”, *Afr J Basic Appl Sci*, 6, 171-186, (2014).

Hampton, M. B., Orrenius, S., “Redox regulation of apoptotic cell death”, *Biofactors*, 8:1-5, (1998).

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. “Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell*, 144(5), 646-674, (2011).

Hanahan, D., & Weinberg, R. A., “The hallmarks of cancer”, *Cell*, 100(1), 57-70, (2000).

Hanahan, D., Weinberg, R.A., “Hallmarks of cancer: The next generation”, *Cell*, 144, 646-674, (2011).

Hanson, J. R., Natural products: the secondary metabolites, Vol. 17, Royal Society of Chemistry, (2003).

Hapidin, H., Rozelan, D., Abdullah, H., Wan Hanaffi, W. N., Soelaiman, I. N., “Quercus infectoria gall extract enhanced the proliferation and activity of human fetal osteoblast cell line (hFOB 1. 19)”, *Malays. J. Med. Sci.*, 22, 12-22, (2015).

Harper, L. J., Schonrogge, K., Lim, K. Y., Francis, P. & Lichtenstein, C. P., “Cynipid galls: Insect-induced modifications of plant development create novel plant organs”, *Plant Cell Environ.* 27, 327–335, (2004).

Hartley, S. E., “What are galls for? Tests of the nutrition hypothesis”, *Symp Biol Hung*, 39:265-274, (1990).

Hartley, S. E., Lawton, J. H., “Host-plant manipulation by gall- insects: a test of the nutrition hypothesis”, *J Anim Ecol*, 61:113-119, (1992).

Harvey, A. L., “Natural products as a screening resource”, *Current opinion in chemical biology*, 11(5), 480-484, (2007).

Hasmah, A., Nurazila, Z., Chow, C. Y., Rina, R., & Rafiquzzaman, M., “Cytotoxic effects of Quercus infectoria extracts towards cervical (Hela) and Ovarian (Caov-3) cancer cell lines”, *Health and the Environment Journal*, 1(2), 17-23, (2010).

Hayflick, L., “The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains”, *Experimental cell research*, 37(3), 614-636, (1965).

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., Ferreira, I. C. F. R., “Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review”, *Food Chemistry*, 173, 501-513, (2015).

Henning, C. P., Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides. In: Ringuelet J, Viña S (eds) Productos Naturales Vegetales, Editorial de la Universidad de la Plata, La Plata : Argentina, 18, (2013).

Hey, D. H., and Waters, W. A., “Some Organic Reactions Involving the Occurrence of Free Radicals in Solution”, *Chem. Rev.*, 21:169-208, (1937).

Hızel, N., “Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü)”, *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 6:196-7, (1997).

Holtan, S. G., O'Connor, H. M., Fredericksen, Z. S., Liebow, M., Thompson, C. A., Macon, W. R., ... & Call, T. G., "Food-frequency questionnaire-based estimates of total antioxidant capacity and risk of non-Hodgkin lymphoma", *International journal of cancer*, 131(5), 1158-1168, (2012).

Hooper, D., Useful plants of Iran and Iraq, Tehran: Iran University of Medical Sciences Publication, (2003).

Hsu, P. P., & Sabatini, D. M., "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond", *Cell*, 134(5), 703-707, (2008).

Huang, M. Y., Huang, W. D., Chou, H. M., Chen, C. C., Chen, P. J., Chang, Y. T., Yang, C. M., "Structural, biochemical, and physiological characterization of photosynthesis in leaf-derived cup-shaped galls on *Litsea acuminata*", *BMC Plant Biol.*, 15, 61, (2015).

Huber, P. C., Almeida, W. P., Fátima, Â., "Gluthathione and related enzymes: the biological role and importance in pathological process", *Quimica Nova*, 31(5):1170-1179, (2008).

Hudson, B. J., Food antioxidants, Springer Science & Business Media, (2012).

Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., Ali, M., Li, J., Li, X., "Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders", *Int J Biol Sci*, 14(3):341, (2018).

Hwang, J. K., Kong, T. W., Baek, N. I., & Pyun, Y. R., "α-Glycosidase inhibitory activity of hexagalloylglucose from the galls of *Quercus infectoria*", *Planta Medica*, 66(03), 273-274, (2000).

Ikram, M., Nowshad, F., "Constituents of *Quercus infectoria*", *Planta medica*, 31(03), 286-287, (1977).

Ikram, M., Nowshad, F., "Constituents of *Quercus infectoria*", *Planta Med*, 31:286-7, (1977).

Imtiaz, S., Javed, S. A., Tariq, M., Chaudhary, S. S., Aslam, M., "Oak galls: The medicinal balls", *J Pharm Sci Innov*, 2:18-21, (2013).

Iqbal, J., Abbasi, B. A., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Shah, S. A., & Khalil, A. T., "Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1129-1150, (2017).

Iqbal, J., Abbasi, B. A., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Shah, S. A., & Khalil, A. T., "Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1129-1150, (2017).

- Israels, L. G., Israels, E. D., "Apoptosis", *The Oncologist*, 4:332-9, (1999).
- Jacob, C., Winyard, P., "Redox Signaling and Regulation in Biology and Medicine", *Wiley-VCH*, (2009).
- Jacobson, M. D., Weil, M. & Raff, M. C., "Programmed cell death in animal development", *Cell*, 88, 347-354, (1997).
- Jalill, R. D. A., "Chemical Analysis and Anticancer effects of Juniperus polycarpos and Oak Gall plants extracts", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 11(6), 2372-2387, (2018).
- Jansen, G., Jürgens, H. U., Schliephake, E., Ordon, F., "Effect of the soil pH on the alkaloid content of *Lupinus angustifolius*", *Int J Agron*, 2012, (2012).
- Jayakumar, K., Murugan, K., "Solanum alkaloids and their pharmaceutical roles: a review", *J Anal Pharm Res*, 3(6):00075, (2016).
- Jayaprakasha, G. K., Girenavar, B., and Patil, B. S., "Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems", *Bioresource Technol*, 99: 4484-4494, (2008).
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. "Global cancer statistics", *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), 69-90 (2011).
- Ji, H. F., Li, X. J., & Zhang, H. Y., "Natural products and drug discovery: can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?", *EMBO reports*, 10(3), 194-200, (2009).
- Jiang, L., Yang, K. H., Tian, J. H., Guan, Q. L., Yao, N., Cao, N., ... & Yang, S. H., "Efficacy of antioxidant vitamins and selenium supplement in prostate cancer prevention: a meta-analysis of randomized controlled trials", *Nutrition and cancer*, 62(6), 719-727, (2010).
- Jirschitzka, J., Schmidt, G. W., Reichelt, M., Schneider, B., Gershenzon, J., D'Auria, J. C., "Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae", *Proc Natl Acad Sci*, 109(26):10304, (2012).
- Johnson, E. J., "The role of carotenoids in human health", *Nutrition in clinical care*, 5(2), 56-65, (2002).
- Kalcher, K., Svancara, I., Buzuk, M., Vytras, K., Walcarius, A., Electrochemical sensors and biosensors based on heterogeneous carbon materials, *Monatsh Chem*, 140: 861-889, (2009).
- Kanwar, J. R., Kanwar, R. K., Burrow, H., & Baratchi, S., "Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders", *Current medicinal chemistry*, 16(19), 2373-2394, (2009).

Karakurt, S., Adalı, O., “Effect of tannic acid on glutathione S-transferase and NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 enzymes in rabbit liver and kidney”, *Fresenius Environmental Bulletin*, 20,1804-1811, (2011).

Karimi, Z., Bahadoran, Z., Abedini, S., Rad, A. H., & Rashidkhani, B., “Dietary total antioxidant capacity and the risk of breast cancer: A case-control study”, *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 21(8), 564-571, (2015).

Karou, D., Nadembega, W. M., Ouattara, L., Ilboudo, D. P., Canini, A., Nikiéma, J. B., ... & Traore, A. S., “African ethnopharmacology and new drug discovery”, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 61-69, (2007).

Kaur, G., Athar, M., Alam, M. S., “Quercus infectoria galls possess antioxidant activity and abrogates oxidative stress-induced functional alterations in murine macrophages”, *Chemico-Biological Interactions*, 171(3), 272-282, (2008).

Kaur, G., Hamid, H., Ali, A., Alam, M. S., Athar, M., “Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of Quercus infectoria”, *Journal of ethnopharmacology*, 90(2-3), 285-292, (2004).

Kaur, R., Matta, T., Kaur, H., “Plant derived alkaloids”, *Saudi J Life Sci*, 2(5):158-189, (2019).

Kellner, R., Mermet, J. M., Otto, M., and Widmer., *Analytical Chemistry*, Weinheim: Wiley–VCH Verlag, (1998).

Kerr, J. F. R., Winterford, C. M. and Harmon, B. V., “Apoptosis—its significance in cancer and cancer therapy”, *Cancer*, 73, 2013-2026, (1994).

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R., “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”, *Br. J. Cancer*, 26, 239-257, (1972).

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R., “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”, *Br. J. Cancer*, 26, 239-257, (1972).

Khouzami, L., Mroueh, M., & Daher, C. F., “The role of methanolic extract of Quercus infectoria bark in lipemia, glycemia, gastric ulcer and bacterial growth”, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(4), 224-230, (2009).

Kılınçarslan, O., Mammadov, R., “HPLC analysis and Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxicity Activities of Various Solvent Extracts of Erysimum kotschyianum Gay.(Brassicaceae)”, *J Chem Soc Pak*, 40(04):707, (2018).

Kim, H. J., Chang, S. C. and Shim, Y. B., “Cyclodextrin modified screen printed graphite electrodes for detection of phenols”, *Bull Korean Chem Soc*, 23: 427-

431, (2002).

King, K. L., Cidlowski, J. A., “Cell cycle regulation and apoptosis”, *Annual Review of Physiology*, 60:601-17, (1998).

Kiraz, Y., Adan, A., Yandim, M. K., & Baran, Y., “Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis” *Tumor Biology*, 37(7), 8471-8486, (2016).

Kluck, R. M. et al. “The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol” *J. Cell Biol.*, 147, 809-822, (1999).

Knight, J. A., “Free radicals, antioxidants, aging and disease”, *Amer Assn for Clinical Chemistry*, (1999).

Koetz, M., Santos, T. G., Rayane, M., Henriques, A. T., “Quantification of atropine in leaves of *Atropa belladonna*: development and validation of method by high-performance liquid chromatography (HPLC)”, *Drug Analy Res*, 1(1):44-49, (2017).

Kokate, C. K. (a), Purohit, A. P., “Text book of pharmacognosy”, 29, 542, (2004).

Kong, Y. T., Imabayashi, S. I., Kano, K., Ikeda, T., and Kakiuchi, T., “Peroxidasebased amperometric sensor for the determination of total phenols using twostage peroxidase reactions”, *Am J Enol Vitic*, 52: 381-385, (2001).

Korbut, O., Buckova, M., Labuda, J., Gruendler, P., “Voltammetric detection of antioxidative properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode”, *Sensors*, 3: 1-18, (2003).

Kovacevic, N., Basic Pharmakognosy. *Belgrade: University of Belgrade-Faculty of Pharmacy*, (2000).

Kroemer, G., & Pouyssegur, J., “Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel”, *Cancer cell*, 13(6), 472-482, (2008).

Kuete, V., Wiench, B., Hegazy, M. E. F., Mohamed, T. A., Fankam, A. G., Shahat, A. A., & Efferth, T., “Antibacterial activity and cytotoxicity of selected Egyptian medicinal plants”, *Planta Medica*, 78(02), 193-199, (2012).

Kufe, D. W., Holland, J. F., and Frei, E. *Cancer medicine* 6(Vol. 2). BC Decker, (2003).

Kukula-Koch, W. A., Widelski, J., Chapter 9 - Alkaloids. In: Badal S, Delgoda R (eds) *Pharmacognosy*. Academic Press, Boston, pp 163-198, (2017).

Kuranaga, E., “Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo”, *Genes Cells*, 17:83-97, (2012).

- La Vecchia, C., Decarli, A., Serafini, M., Parpinel, M., Bellocco, R., Galeone, C., ... & Negri, E., "Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer: A large case-control study in Italy", *International journal of cancer*, 133(6), 1447-1451, (2013).
- Labuda, J., Buckova, M., Heilerova, L., Caniova-Ziakova, A., Brandsteterova, E., et al. "Detection of Antioxidative Activity of Plant Extracts at the DNA-Modified Screen-Printed Electrode", *Sensors*, 2: 1-10, (2002).
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., et al. "Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis", *Science*, 311:847-51, (2006).
- Lamari, F. N., & Cordopatis, P., "Exploring the potential of natural products in cancer treatment", *Anticancer Therapeutics*, 1, (2008).
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D., "Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation", *Int J Biochem Cell Biol.*, 42:21-4, (2010).
- Lee, J. Y., Li, J. W., and Yeung, E. S., "Single-molecule detection of surfacehybridized human papilloma virus DNA for quantitative clinical screening", *Anal Chem*, 79, 8083-8089, (2007).
- Lee, M. L., & Schneider, G. "Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries", *Journal of combinatorial chemistry*, 3(3), 284-289, (2001).
- Lehmann, M. L., Counce, R. M., Counce, R. W., Watson, J. S., Labbé, N., Tao, J., "Recovery of Phenolic Compounds from Switchgrass Extract", *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 6(1), 374-379, (2017).
- Levine, A. J. "p53, the cellular gatekeeper for growth and division", *Cell*, 88(3), 323-331, (1997).
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A., "The p53 tumour suppressor gene", *Nature*, 351(6326), 453-456, (1991).
- Lewis, D. F., "Human cytochromes P450 associated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families", *Current Medicinal Chemistry*, 10(19):1955-1972, (2003).
- Li, D. H., Guo, J., Bin, W., Zhao, N., Wang, K. B., Li, J. Y., ... & Hua, H. M., "Two new benzylisoquinoline alkaloids from *Thalictrum foliolosum* and their antioxidant and in vitro antiproliferative properties", *Archives of pharmacal research*, 39(7), 871-877, (2016).

- Li, P., Zhang, H., Chen, J., Shi, Y., Cai, J., Yang, J., & Wu, Y., “Association between dietary antioxidant vitamins intake/blood level and risk of gastric cancer”, *International journal of cancer*, 135(6), 1444-1453, (2014).
- Li, R., Narita, R., Nishimura, H., Marumoto, S., Yamamoto, S. P., Ouda, R., ... & Watanabe, T., “Antiviral activity of phenolic derivatives in pyroligneous acid from hardwood, softwood, and bamboo”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(1), 119-126, (2018).
- Li, S., Lei, Y., Jia, Y., Li, N., Wink, M., Ma, Y., “Piperine, a piperidine alkaloid from *Piper nigrum* re-sensitizes P-gp, MRP1 and BCRP dependent multidrug resistant cancer cells”, *Phytomedicine*, 19(1):83-87, (2011).
- Liao, D., & Johnson, R. S., “Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer”, *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 281-290, (2007).
- Liotta L. A. and Stetler-Stevenson W. G, *Cancer Research* 51 (18 Supplement), 5054s-5059s, (1991).
- Litescu, S. C., Sandra, A. V., Eremia, S. A. V., Diaconu, M., Tache, A., et al., “Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants”, *Environmental Biosensors*, 95, (2011).
- Liu, R. H., “Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action”, *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479S-3485S, (2004).
- Liu, S. H., Chen, R., Hagedor, C. H., “Tannic acid inhibits Hepatitis C virus into Huh7.5 cells”, *Plos One*, 10, 1-18, (2015).
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X., “Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c”, *Cell*, 86, 147-157, (1996).
- Lo, H. W., Ali-Osman, F., “Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance”, *Current Opinion in Pharmacology*, 7(4):367-374, (2007).
- Löliger, R., “The Use of Antioxidants in Food, in Free Radicals and Food Additives”, (eds: O. I. Aruoma and B. Halliwell), London: Tayler & Francis, 121-150, (1991).
- Los, M., Stroh, C., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K., “Caspases: more than just killers?”, *Trends Immunol.*, 22:31-4, (2001).
- Los, M., van de Craen, M., Penning, C. L., et al. “Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-1 mediated apoptosis”, *Nature*, 37:81-3, (1995).

- Lotfi, S., Iranian colorful paintings (humian and mirmalas). Tehran: Pazineh, (2016).
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Buffer, B. M., Markesberry, W. R., “Elevated thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzemers disease”, *Neurology*, 45:1594-601, (1995).
- Lucas, A. L., Bosetti, C., Boffetta, P., Negri, E., Tavani, A., Serafini, M., ... & Rossi, M., “Dietary total antioxidant capacity and pancreatic cancer risk: an Italian case–control study”, *British journal of cancer*, 115(1), 102-107, (2016).
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., Georgiev, M. I., Terpenoids, In *Pharmacognosy*, Academic Press, 233-266, (2017).
- Lushchak, V. I., “Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification”, *Chemico-Biological Interactions*, 224:164-175, (2014).
- Ly, S. Y., “Voltammetric analysis of DL- α -tocopherol with a paste electrode”, *J Sci Food Agric*, 88: 1272-1276, (2008).
- Madhuri, S., Pandey, G., “Some dietary agricultural plants with anticancer properties”, *Plant Arch*, 8(1), 13-16, (2008).
- Magalhaes, K. F., Caires, A. R. L., and Oliveira, S. L. “Determination of Antioxidant Content in Biodiesel by Fluorescence Spectroscopy”, *Encontro de Fisica*, (2011).
- Maher, P., Lewerenz, J., Lozano, C., Torres, J. L., “A novel approach to enhancing cellular glutathione level”, *J Neurochem.*, 107: 690-700, (2008).
- Mahmood, Z., Shukla, Y., “Death receptors: targets for cancer therapy”, *Exp Cell Res.*, 316:887-99, (2010).
- Malyer, H., Aydın, Ö. A., Tümen, G., Er, S., “Tekirdağ ve Çevresindeki Aktarlarda Satılan Bazı Bitkiler ve Tıbbi Kullanım Özellikleri”, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, (7): 103-112, (2004).
- Mammadov, R., Tohumlu bitkilerde Sekonder metabolitler, Türkiye: Nobel yayınevi, 1: 16, (2014).
- Mangels, A. R., Holden, J. M., Beecher, G. R., Forman, M. R., & Lanza, E., “Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data”, *Journal of the American Dietetic Association*, 93(3), 284-296, (1993).
- Mani, M. S., Plant Galls of India. (Second Edition), New Hampshire, USA: Science Publishers, Inc., Enfield., 477, (2000).
- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., et al. “Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in

food”, *Med Sci*, 20: 458-463, (2004).

Marengo, B., Nitti, M., Furfaro, A. L., Colla, R., De Ciucis, C., Marinari, U. M., et al., “Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016:1-16, (2016).

Marklund, S., “Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7634-8, (1982).

Martens, S., Preu, A., Matern, U., “Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L.”, *Phytochemistry*, 71, 1040-1049, (2010).

Martinon, F., Tschopp, J., “Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases”, *Cell*, 117:561-74, (2004).

Marvibaigi, M., Amini, N., Supriyanto, E., Abdul Majid, F. A., Kumar Jaganathan, S., Jamil, S., ... & Nasiri, R., “Antioxidant activity and ROS-dependent apoptotic effect of *Scurrula ferruginea* (Jack) danser methanol extract in human breast cancer cell MDA-MB-231”, *PLoS One*, 11(7), e0158942, (2016).

Mattila, P., Pihlava, J. M., Hellström, J., “Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8290-8295, (2005).

Mazumder, P. M., Das, S., Das, M. K., “Phyto-pharmacology of *Berberis aristata* DC: a review”, *J Drug Deliv Therap*, 1(2), (2011).

Mbeunkui, F., Grace, M. H., Lategan, C., Smith, P. J., Raskin, I., Lila, M. A., “In vitro antiplasmodial activity of indole alkaloids from the stem bark of *Geissospermum vellosii*”, *J Ethnopharmacol*, 139(2):471-477, (2012).

Mc Cord, J. M., “The evolution of free radicals and oxidative stress”, *Am J Med*. 108:652-9, (2000).

McChesney, J. D., Venkataraman, S. K., & Henri, J. T., “Plant natural products: back to the future or into extinction?”, *Phytochemistry*, 68(14), 2015-2022, (2007).

McCord, J. M., and Fridovich, I., “Superoxide Dismutase. An Enzymatic Function for Erythrocyte Hemocuprein (Hemocuprein)”, *J. Biol. Chem.*, 224:6049–6055, (1969).

Mehlman, M. A., Tobin, R. B., Madappally, M. M., & Hahn, H. K., “Mode of action of aspirin effect of dietary aspirin on mitochondrial pyruvate metabolism

in normal and thiamine-deficient rats”, *Journal of Biological Chemistry*, 246(6), 1618-1622, (1971).

Mekary, R. A., Wu, K., Giovannucci, E., Sampson, L., Fuchs, C., Spiegelman, D., ... & Smith-Warner, S. A., “Total antioxidant capacity intake and colorectal cancer risk in the Health Professionals Follow-up Study”, *Cancer Causes & Control*, 21(8), 1315-1321, (2010).

Mello, L. D., Kubota, L. T., “Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation”, *Talanta*, 72: 335-348, (2007).

Mena, M. L., Carralero, V., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J. M., “Bioelectrochemical evaluation of the total phenols content in olive oil mill wastewaters using a tyrosinase–colloidal gold–graphite–Teflon biosensor”, *Int J Environ Anal Chem*, 87: 57-65, (2007).

Meng, J., Fang, Y., Zhang, A., Chen, S., Xu, T., et al. “Phenolic content and antioxidant capacity of Chinese raisins produced in Xinjiang Province”, *Food Res Int.*, 44(9), 2830-2836, (2011).

Michelson, A. M., McCord, J. M. and Fridovich, I., *Superoxide and Superoxide Dismutases*, London : Academic Press, (1977).

Milardovic, S., Ivekovic, D., and Grabaric, B. S., “A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical”, *Bioelectrochemistry*, 68: 175-180, (2006).

Milardovic, S., Ivekovic, D., Rumenjak, V., Grabaric, B. S. “Use of DPPH•/DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidant Activity”, *Electroanalysis*, 17: 1847-1853, (2005).

Milardovic, S., Kerekovic, I., Derrico, R., Rumenjak, V., “A novel method for flow injection analysis of total antioxidant capacity using enzymatically produced ABTS•+ and biamperometric detector containing interdigitated electrode”, *Talanta*, 71: 213-220, (2007).

Milardovic, S., Kerekovic, I., Rumenjak, V., “A flow injection biamperometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS•+”, *Food Chem*, 105: 1688-1694, (2007).

Moad, G., and Solomon, D. H., *The Chemistry of Free Radical Polymerization*, Oxford : Pergamon, (1995).

Molyneux, P., “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity”, *Songklanakarin J Sci Technol*, 26: 211-219, (2004).

Moncanda, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A., *Pharmacol. Rev.*, 43, 109-142, (1991).

Monteiro, J. M., Araujo, E. L., Amorim, E. L. C., Albuquerque, U. P., “Local Markets and Medicinal Plant Commerce: A Review with Emphasis on Brazil”, *Economic Botany*, 64(4): 352-366, (2010).

Morita, M., Naito, Y., Yoshikawa, T., Niki, E., “Plasma lipid oxidation induced by peroxy nitrite, hypochlorite, lipoxygenase and peroxy radicals and its inhibition by antioxidants as assessed by diphenyl-1-pyrenylphosphine”, *Redox Biology*, 8:127-135, (2016).

Motta, L. B., Kraus, J. E., Salatino, A., Salatino, M. L. F., “Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of *Tibouchina pulchra*”, *Biochem Syst Ecol*, 33:971-981, (2005).

Mutun, S., Dinç, S. and Melika, G., “Two new species of oak gall wasps from Turkey (Hymenoptera: Cynipidae, Cynipini)”, *Zootaxa*, 4890 (3), 428-438, (2020).

Nabity, P. D., Haus, M. J., Berenbaum, M. R., DeLucia, E. H., “Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology”, *PNAS*, 110, 16663-16668, (2013).

Naczki, M., Shahidi, F., “Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542, (2006).

Nagesh, L., Sivasamy, S., Muralikrishna, K., Bhat, K. G., “Antibacterial potential of gall extract of *Quercus infectoria* against *Enterococcus faecalis*-an in vitro study”, *Pharmacogn. J.*, 4, 47-50, (2012).

Naim, M., Begum, W., Shakoor, W., “*Quercus infectoria* (Maz): A review”, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6, 176-185, (2017).

Naismith, J. H., Sprang, S. R., “Modularity in the TNF receptor family”, *Trends Biochem Sci.*, 23:74-9, (1998).

Nakagawa-Senda, H., Ito, H., Hosono, S., Oze, I., Tanaka, H., & Matsuo, K., “Coffee consumption and the risk of colorectal cancer by anatomical subsite in Japan: results from the HERPACC studies”, *International Journal of Cancer*, 141(2), 298-308, (2017).

Nathan, C. F., & Hibbs Jr, J. B., “Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity”, *Current opinion in immunology*, 3(1), 65-70, (1991).

- Navarre, D. A., Payyavula, R. S., Shakya, R., Knowles, N. R., Pillai, S. S., “Changes in potato phenylpropanoid metabolism during tuber development”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 65, 89-101, (2013).
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M., “The influence of natural products upon drug discovery”, *Natural product reports*, 17(3), 215-234, (2000).
- Nimse, S. B., & Pal, D., “Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms”, *Rsc Advances*, 5(35), 27986-28006, (2015).
- Noriega, P., Sola, M., Barukcic, A., Garcia, K., Osorio, E., “Cosmetic antioxidant potential of extracts from species of the *Cinchona pubescens* (Vahl)”, *Int J Phytocosm Nat Ing*, 2(1):1-14, (2015).
- Nyman, T., Julkunen-Tiitto, R., “Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies”, *PNAS*, 97, 13184-13187, (2000).
- Oishi, M., Matsuda, T., Nojiri, S., Saito, K., “Simultaneous determination of five antioxidants in food by HPLC with fluorescence detection. Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)”, 43: 104-109, (2002).
- Olfat, A. M., Pourtahmasi, K., “Anatomical characters in three oak species (*Q. libani*, *Q. brantii* and *Q. infectoria*) from Iranian Zagros Mountains”, *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 4(8), 3230-3237, (2010).
- Olsher, M., and Chong, P. L. G., “Sterol superlattice affects antioxidant potency and can be used to assess adverse effects of antioxidants”, *Anal Biochem*, 382: 1-8, (2008).
- Onal, A., Sari, A., Soylak, M., “Ellagic acid from gallnut (*Quercus infectoria*): extraction and determination of its dyeing conditions for natural fibres”, *J Sci Ind Res.*, 64(7): 491-495, (2005).
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., and Prior, R. L., “Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescence probe”, *J Agric Food Chem*, 49(10): 4619-4626, (2001).
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., et al. “Novel fluorimetric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe”, *J Agric Food Chem*, 50(10): 2772-2777, (2002).
- Ozawa, T., Lilley, T. H., Haslam, E., “Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit”, *Phytochemistry*, 26, 2937-2942, (1987).
- Paaver, U., Matto, V., Raal, A., “Total tannin content in distinct *Quercus robur* L. galls”, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(8), 702-705, (2010).
- Paclt, J., Hassler, J., “The concentration of nitrogen in plant galls”, *Phyton Aust*,

12:173-176, (1967).

Paiva, S. A., Russell, R. M., “ β -carotene and other carotenoids as antioxidants”, *Journal of the American college of nutrition*, 18(5), 426-433, (1999).

Palmer, A. M., Greengrass, P. M., Cavalla, D., “The role of mitochondria in apoptosis”, *Drug News & Perspectives*, 13(6), 378-384, (2000).

Pan, Q., Mustafa, N. R., Tang, K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., “Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites”, *Phytochem Rev*, 15(2):221-250, (2016).

Panchawat, S., Rathore, K. S., & Sisodia, S. S., “A review on herbal antioxidants”, *International Journal of PharmTech Research*, 2(1), 232-239, (2010).

Pantavos, A., Ruiter, R., Feskens, E. F., de Keyser, C. E., Hofman, A., Stricker, B. H., ... & Kieft-de Jong, J. C., “Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: the Rotterdam study”, *International journal of cancer*, 136(9), 2178-2186, (2015).

Papas, A. M., “Oil-Soluble Antioxidants in Foods”, *Toxicol. Ind. Health*, 9:123-149, (1993).

Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., Brancolini, C., “Caspase-2- induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3”, *J Biol Chem*. 276:21907-15, (2001).

Patel, S., Rauf, A., & Khan, H., “The relevance of folkloric usage of plant galls as medicines: Finding the scientific rationale”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 240-247, (2018).

Pecorino, L. *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*, USA: Oxford University Press, (2016).

Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., et al. “Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays”, *J Nutr*, 133: 2812-2819, (2003).

Perkins, M. J., *Radical Chemistry*, London : Ellis Horwood, (1996).

Pezzuto, J. M., “Plant-Derived Anticancer Agents”, *Biochem. Pharmacol.*, 53:121-133, (1997).

- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P., “Methods for total antioxidant activity determination: a review”, *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106, (2011).
- Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C., and Danet, A. F., “Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches”, *Molecules*, 14: 480-493, (2009).
- Pisoschi, A. M., Pop, A., “The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97:55-74, (2015).
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Kaltalioglu, K., Ulsan, M. D., Turkmen, Z., “An Ethnobotanical Study on Medicinal Plants in Espiye and Its Surrounding (Giresun-Turkey)”, *Journal of Ethnopharmacology*, 163: 1-11, (2015).
- Porter, A. G., Janicke, R.U., “Emerging roles of caspase-3 in apoptosis”, *Cell Death Differ.*, 6:99-104, (1999).
- Porter, W.L., “Paradoxical Behaviour of Antioxidants in Food and Biological Systems”, *Toxicol. Ind. Health*, 9:93-122, (1993).
- Porwal, M., Kumar, A., “Neuroprotective effect of *Annona squamosa* & (-) anonaine indecreased GABA receptor of epileptic rats”, *J Appl Pharmac Sci*, 5(1):018-023, (2015).
- Poulson HE, Prieme H, and Loft S: Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 71, 9-16, (1998).
- Praud, D., Parpinel, M., Serafini, M., Bellocco, R., Tavani, A., Lagiou, P., ... & Rossi, M., “Non-enzymatic antioxidant capacity and risk of gastric cancer”, *Cancer epidemiology*, 39(3), 340-345, (2015).
- Price, P. W., Fernandes, G. W., Waring, G. L., “Adaptive nature of insect galls”, *Environ Entomol*, 16:15-24, (1987).
- Price, P. W., Waring, G. L., Fernandes, G. W., “Hypotheses on the adaptive nature of galls”, *Proc Entomol Soc Wash*, 88:361-363, (1986).
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., “Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E”, *Anal Biochem*, (29):337-41, (1999).
- Prieto-Simón, B., Cortina, M., Campàs, M., Calas-Blanchard, C., “Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment”, *Sens Actuators B: Chem*, 129: 459-466, (2008).

- Proteggente, A. R., Rehman, A., Halliwell, B., Rice-Evans, C. A., “Potential problems of ascorbate and iron supplementation: prooxidant effect in vivo?”, *Biochem Biophys Res Commun*, 277: 535-540, (2000).
- Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., Shi, Y., “Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1”, *Nature*, 399:549-57, (1999).
- Rahman, K., “Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors”, *Clinical Interventions in Aging*, 2(2):219-236, (2007).
- Rahman, N. S. Ab., Salleh, L. Md., Majid, F. A. Abd., Harisun, Y., “Quantification of gallic acid and tannic acid from quercus infectoria (Manjakani) and their effects on antioxidant and antibacterial activities”, *Pertanika J. Sci. Technol.*, 23, 351-62, (2015).
- Rakić, S., Petrović, S., Kukić, J., Jadranin, M., Tešević, V., Povrenović, D., & Šiler-Marinković, S., “Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia” *Food Chemistry*, 104(2), 830-834, (2007).
- Raman, A., “Insect-induced plant galls of India: unresolved questions”, *Current Science*, 25:748-57, (2007).
- Raman, A., Schaefer, C. W., Withers, T. M., “Biology, ecology, and evolution of gallinducing arthropods”, *New Hampshire: Science Publishers, Inc.* (2005).
- Ramos, S. “Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention”, *The Journal of nutritional biochemistry*, 18(7), 427-442, (2007).
- Ranchoux, B., Meloche, J., Paulin, R., Boucherat, O., Provencher, S., Bonnet, S., “DNA damage and pulmonary hypertension”, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6): 990, (2016).
- Ranjitha, D., Sudha, K., “Alkaloids in foods”, *Int J Pharmac Chem Biol Sci*, 5(4), (2015).
- Rao, A. V., Rao, L. G., “Carotenoids and human health”, *Pharmacological research*, 55(3), 207-216, (2007).
- Raposo, C. G., Carpeno, J. D., and Baron, M. G., “Causes of lung cancer: smoking, environmental tobacco smoke exposure, occupational and environmental exposures, and genetic predisposition”, *Med Clin*, 128, 390-396, (2007).
- Rastogi, R. P., Mehrotra, B. N., *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Lucknow: CDRI, 2, 576, (1999).

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology & Medicine*, (26) 1231-1237, (1999).

Redfern, M., *Plant Galls*, London: The new naturalist library, Harper Collins, 562, (2011).

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids”, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956, (1996).

Rock, C. L., Jacob, R. A., Bowen, P. E., “Update o biological characteristics of the antioxidant micronutrients- Vitamin C, Vitamin E and the carotenoids”, *J Am Diet Assoc.*, 96:693-702, (1996).

Rodriguez, J., Lazebnik, Y., “Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme”, *Genes Dev.*, 13:3179-84, (1999).

Romani, A., Minunni, M., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., et al. “Comparison among differential pulse voltammetry, amperometric biosensor, and HPLC/DAD analysis for polyphenol determination”, *J Agric Food Chem*, 48:1197-1203, (2000).

Rommel, A., Wrolstad, R. E., “Composition of flavonols in red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1941-1950, (1993).

Ronquist, F., Nieves-Aldrey, J. L., Buffington, M. L., Liu, Z., Liljeblad, J. & Nylander, J. A. A., “Phylogeny, Evolution and Classification of Gall Wasps: The Plot Thickens”, *PLoS ONE*, 10 (5):1-40, (2015).

Ronquist, F., Nieves-Aldrey, J. L., Buffington, M. L., Liu, Zh., Liljeblad, J. & Nylander, J. A. A., “Phylogeny, evolution and classification of gall wasps: The plot thickens”, *PLoS ONE*, 10, 1-40, (2015).

Ross, M. H., Pawlina, W., *Histology a text and atlas*. 6th edition. London: Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins, 93-97, (2011).

Rossi, M., Tavani, A., Ciociola, V., Ferraroni, M., Parpinel, M., Serafini, M., ... & Lagiou, P., “Dietary total antioxidant capacity in relation to endometrial cancer risk: a case–control study in Italy”, *Cancer Causes & Control*, 27(3), 425-431, (2016).

Russnes, K. M., Möller, E., Wilson, K. M., Carlsen, M., Blomhoff, R., Smeland, S., ... & Bälter, K., “Total antioxidant intake and prostate cancer in the Cancer of the Prostate in Sweden (CAPS) study A case control study”, *BMC cancer*, 16(1), 438, (2016).

- Russnes, K. M., Wilson, K. M., Epstein, M. M., Kasperzyk, J. L., Stampfer, M. J., Kenfield, S. A., ... & Mucci, L. A., "Total antioxidant intake in relation to prostate cancer incidence in the Health Professionals Follow-Up Study", *International journal of cancer*, 134(5), 1156-1165, (2014).
- Russo, G. L., "Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention", *Biochemical pharmacology*, 74(4), 533-544, (2007).
- Sadeghi Seyed, A., Asareh, M., Oak gall wasps, Research Institute of Forests and Rangelands, (2009).
- Sadeghi, S. E., Assareh, M. H., & Tavakoli, M., Oak gall wasps of Iran, *Published by Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran*, (2010).
- Sahu, B. K., Samal, I., Boruah, J., "Gall diversity, causal agents, their adaptive significance and gall infestation in sericultural host plant", *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(2): 1288-1292, (2020).
- Saltan, F. Z., Canbay, H. S., Üvez, A., Konak, M., Armutak, E. İ., "Quantitative Determination of Tannic Acid in Quercus Species by High Performance Liquid Chromatography", *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(3), 197-203, (2019).
- Salvesen, G. S. & Dixit, V. M., "Caspases: intracellular signaling by proteolysis", *Cell*, 91, 443-446, (1997).
- Samuelsson, G., ve Bohlin, L., *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*, Fourth Edition, Sweden: Swedish Pharmaceutical Press, (2001).
- Scheller, F., and Schubert, F., *Biosensors*, Amsterdam: Elsevier, (1992).
- Schneider, C. D., Oliveira, A. R., "Free radicals of oxygen and exercise: mechanisms of formation and adaptation to physical training", *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 10: 4, (2004).
- Seifried, H. E., McDonald, S. S., Anderson, D. E., Greenwald, P., & Milner, J. A., "The antioxidant conundrum in cancer", *Cancer research*, 63(15), 4295-4298, (2003).
- Selvi, S., Satıl, F., Polat, R., Çakılcıoğlu, U., "Kazdağlarından (Balıkesir-Edremit) Toplanan ve Bölgedeki Aktarlarda Satılan Tıbbi Bitkiler Üzerine Bir Araştırma", *Kazdağları III. Ulusal Sempozyumu*, 24-26 Mayıs, Edremit-Balıkesir, 505-513, (2012).
- Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A., & Ekström, A. M., "Total antioxidant potential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer", *Gastroenterology*, 123(4), 985-991, (2002).

- Serafini, M., Villano, D., Spera, G., & Pellegrini, N., "Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network", *Nutrition and cancer*, 56(2), 232-240, (2006).
- Shahid, M., Ahmad, A., Yusuf, M., Khan, M. I., Khan, S. A., Manzoor, N., Mohammada, F., "Dyeing, fastness and antimicrobial properties of woolen yarns dyed with gallnut (*Quercus infectoria* Oliv.) extract", *Dyes Pigm.* 95(1): 53-61, (2012).
- Shahidi, F., & Zhong, Y., "Lipid oxidation and improving the oxidative stability", *Chemical society reviews*, 39(11), 4067-4079, (2010).
- Shahin, S., Ahmad, N., "Antioxidant properties and total phenolic content of herbs used in post-partum diet therapy in patna (Bihar)", *India. J Pharm Biol Sci*, 9, 17-20, (2014).
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., Dowd, C. A., "Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily", *The Biochemical Journal*, 15;360(Pt 1):1-16, (2001).
- Shi, Y., "Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis", *Mol Cell.*, 9:459-70, (2002).
- Shiotani, A., Iishi, H., Uedo, N., Ishiguro, S., Tatsuta, M., et al., "Evidence that loss of sonic hedgehog is an indicator of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis progressing to gastric cancer", *Am J Gastroenterol*, 100, 581-587, (2005).
- Shorthouse, J. D., "Significance of nutritive cells in insect galls", *Proc Entomol Soc Wash*, 88:368-375, (1986).
- Shorthouse, J. D., Wool, D., Raman, A., "Gall inducing insects- Nature's most sophisticated herbivores", *Basic and Applied Ecology*, 6:407-411, (2005).
- Shrestha, S., Kaushik, V. S., Eshwarappa, R. S. B., Subaramaiha, S. R., Ramanna, L. M., & Lakkappa, D. B., "Pharmacognostic studies of insect gall of *Quercus infectoria* Olivier (Fagaceae)", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1), 35-39, (2014).
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., "Cancer statistics, 2016", *CA Cancer J Clin* 2016, 66(1): 7-30, (2016).
- Sinha, S., Singh, S. N., Ray, U. S., "Total antioxidant status at high altitude in lowlanders and native highlanders: role of uric acid", *High Alt Med Biol*, 10: 269-274, (2009).

- Sivalokanathan, S., Ilayaraja, M., & Balasubramanian, M. P., “Efficacy of Terminalia arjuna (Roxb.) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinoma in rats”, (2005).
- Slavíková, H., Lojek, A., Hamar, J., Dušková, M., Kubala, L., et al. “Total antioxidant capacity of serum increased in early but not in late period after intestinal ischemia in rats”, *Free Radic. Biol. Med*, 25: 9-18, (1998).
- Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J., “Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis”, *J Biol Chem.*, 276:7320-6, (2001).
- Slinkard, K., Vernon, L., Singleton, V. L., “Total Phenol Analyses: Automation and Comparison with Manual Methods”, *Am J Enol Viticult*, (28): 49-55, (1977).
- Smaili, S., Hsu, Y. et al., “Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis”, *J. Bioener and Biomem.*, 32(1):35-46, (2000).
- Smith, J. A., Park, S., Krause, J. S., Banik, N. L., “Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration”, *Neurochemistry International*, 62: 764-775, (2013).
- Sneader, W., “Drug discovery: a history”, *John Wiley & Sons*, (2005).
- Soriani, M., Pietraforte, D., Minetti, M., “Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals”, *Arch Biochem Biophys*, 312: 180-188, (1994).
- Spierings, D. C., de Vries EG, Vellenga, E., et al., “Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors”, *J Histochem Cytochem*, 52(6): 821-831, (2004).
- Stalmach, A., Mullen, W., Nagai, C., Crozier, A., “On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee”, *Braz J Plant Physiol*, 18: 253-262, (2006).
- Stamenkovic, I., “Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis”, In *Seminars in cancer biology*, Academic Press, 10: 6, 415-433, (2000).
- Stone, G. G., Cook, J. M., “The structure of cynipid oak galls: Patterns in the evolution of an extended phenotype”, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 265, 979-988, (1998).
- Stone, G. N., Schönrogge, K., “The adaptive significance of insect gall morphology”, *Trends in Ecology & Evolution*, 18(10):512-22, (2003).
- Su, L., Yin, J. J., Charles, D., Zhou, K., Moore, J., et al. “Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn,

- nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf”, *Food Chem*, 100: 990-997, (2007).
- Sukor, N. F., Jusoh, R., Kamarudin, N. S., Halim, N. A., Sulaiman, A. Z., & Abdullah, S. B., “Synergistic effect of probe sonication and ionic liquid for extraction of phenolic acids from oak galls”, *Ultrasonics sonochemistry*, 62, 104876, (2020).
- Sumien, N., Heinrich, K. R., Shetty, R. A., Sohal, R. S., Forster, M. J., “Prolonged intake of coenzyme Q10 impairs cognitive functions in mice”, *J. Nutr.*, 139: 1926-1932, (2009).
- Swann, J. B., & Smyth, M. J., “Immune surveillance of tumors”, *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1137-1146, (2007).
- Tabor, E., “Pathogenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma”, *Hepatol Res*, 37, S110-S114, (2007).
- Taiz, L., Zeiger, E., *Plant Physiology*, Fifth Edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates, (2010).
- Talapatra, S. K., Talapatra, B., *Chemistry of plant natural products*, Berlin, Germany:Springer, 855-874, (2015).
- Tallini, L., Andrade, J., Kaiser, M., Viladomat, F., Nair, J., Zuanazzi, J., Bastida, J., “Alkaloid constituents of the Amaryllidaceae plant *Amaryllis belladonna* L.”, *Molecules*, 22(9):1437, (2017).
- Tanaviyutpakdee, P., Yoovathaworn, K., Sirivarasai, J., Chanprasertyothin, S., “Role of CYP2E1 and NQO1 polymorphisms in oxidative stress derived cancer in Thais with and without dyslipidemia”, *Asian Biomedicine*, 9(5):601-611, (2015).
- Tariq, A., Sadia, S., Pan, K., Ullah, I., Mussarat, S., Sun, F., et al. “A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants”, *Phytother Res*, 31: 202-64, (2017).
- Tauzin, S., Debure, L., Moreau, J. F., Legembre, P., “CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and posttranslational modulations”, *Cell Mol Life Sci.* 69:1261-77, (2012).
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., and Byrne, D. H., “Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675, (2006).
- Thakore, P., Mani, R. K., Kavitha, S. J., “A brief review of plants having anti-cancer property”, *Int J Pharm Res Dev*, 3: 129-36, (2012).

- Thakur, B. K., Anthwal, A., Singh-Rawat, D., Rawat, B., Rawat, M., “A review on genus *Alseodaphne*: phytochemistry pharmacology”, *Mini Rev Org Chem*, 9(4):433-445, (2012).
- Thompson, C. B., “Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease”, *Science*, 267, 1456-1462, (1995).
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y., “Caspases: enemies within”, *Science*, 281, 1312-1316, (1998).
- Tomás-Barberán, F. A., Clifford, M. N., “Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024-1032, (2000).
- Tougas, T. P., Jannetti, J. M., Collier, W. G., “Theoretical and experimental response of a biamperometric detector for flow injection analysis”, *Anal Chem*, 57: 1377-1381, (1985).
- Tsao, R., “Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols”, *Nutrients*, 2, 1231-1246, (2010).
- Tulukçu, E., Sağdıç, O., “Konya’da Aktarlarda Satılan Tıbbi Bitkiler ve Kullanılan Kısımları”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(4): 304-308, (2011).
- Uhl, L., Gerstel, A., Chabalier, M., Dukan, S., “Hydrogen peroxide induced cell death: one or two modes of action?”, *Heliyon*, 1: 4, (2015).
- Uhlíková, H., Obořil, M., Klemrová, J., Šedo, O., Zdráhal, Z., Kašparovský, T., ... & Lochman, J., “Elicitin-induced distal systemic resistance in plants is mediated through the protein–protein interactions influenced by selected lysine residues”, *Frontiers in Plant Science*, 7, 59, (2016).
- Umachigi, S. P., Jayaveera, K. N., Kumar, C. K., Kumar, G. S., Swamy, B. M., Kumar, D. V., “Studies on wound healing properties of *Quercus infectoria*”, *Trop J Pharm Res*, 7:913-9, (2008).
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Zhivotovsky, B., “The unpredictable caspase-2: what can it do?”, *Trends Cell Biol.*, 20:150-9, (2010).
- Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., Vandenaabeele, P., “The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis”, *Cell Death Differ.*, 6:1117-24, (1999).
- Vanga, S., Pingili, M., Tharigoppula, S., “Phytochemical screening and evaluation of antifungal activity of gall extracts of *Quercus infectoria*”, *Inter-*

national Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 8(7), 3010-3013, (2017).

Vauhkonen, H., Bohling, T., Eissa, S., Shoman, S., and Knuutila, S., “Can bladder adenocarcinomas be distinguished from schistosomiasis-associated bladder cancers by using array comparative genomic hybridization analysis?”, *Cancer Genet Cytogen*, 177, 153-157, (2007).

Vece, M. M., Agnoli, C., Grioni, S., Sieri, S., Pala, V., Pellegrini, N., ... & Bendinelli, B., “Dietary total antioxidant capacity and colorectal cancer in the Italian EPIC cohort”, *PLoS One*, 10(11), e0142995, (2015).

Vermani, A., “Screening of *Quercus infectoria* gall extracts as anti-bacterial agents against dental pathogens”, *Indian journal of dental research*, 20(3), 337, (2009).

Verpoorte, R., Secondary metabolism. In *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, Dordrecht: Springer, 1-29, (2000).

Vieira, A. R., Abar, L., Vingeliene, S., Chan, D. S. M., Aune, D., Navarro-Rosenblatt, D., ... & Norat, T., “Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis”, *Annals of Oncology*, 27(1), 81-96, (2016).

Volikakis, G. J., and Efstathiou, C. E., “Stripping voltammetry using nujolgraphite and diphenylether-graphite paste electrodes”, *Talanta*, 51: 775-785, (2000).

Vousden, K. H., Lu, X., “Live or let die: the cells response to p53”, *Nat Rev Cancer*, 2:594- 604, (2002).

Wang, L. Y., Wei, K., Jiang, Y. W., Cheng, H., Zhou, J., He, W., Zhang, C. C., “Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.)”, *Eur Food Res Technol*, 233(6):1049-1055, (2011).

Wansi, J. D., Devkota, K. P., Tshikalange, E., Kuete, V., 14 - Alkaloids from the medicinal plants of Africa. In: Kuete V (ed) *Medicinal Plant Research in Africa*. Elsevier:Oxford, 557-605, (2013).

Warburg, O., “On the origin of cancer cells,” *Science*, 123(3191), 309-314 (1956).

Waters, W. A., “A Chemical Interpretation of the Mechanism of Oxidation by Dehydrogenase Enzymes”, *Trans. Faraday Soc.*, 39:140-151, (1943).

Weinberg, R. A., *The biology of cancer*, *Garland science*, (2013).

Weiss, J., “Investigations of the Radical HO₂ in Solution”, *Trans. Faraday Soc.*, 31:668-681, (1935).

- Wiert, C., Kumar, A., *Practical Handbook of Pharmacognosy, Malaysia: Pearson Education Malaysia Sdn Bhd, (2001).*
- Williamson, G., “The role of polyphenols in modern nutrition”, *Nutrition Bulletin*, 42, 226-235, (2017).
- Wool, D., “Galling aphids: specialization, biological complexity, and variation”, *Annual Reviews in Entomology*, 49(1):175-92, (2004).
- Wu, C., Chen, F., Wang, X., Kim, H. J., He, G. Q., Haley-Zitlin, V., Huang, G., “Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification”, *Food Chemistry*, 96(2): 220-227, (2006).
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R., “Cell death: the significance of apoptosis”, *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306, (1980).
- Xu, C., Zeng, X. T., Liu, T. Z., Zhang, C., Yang, Z. H., Li, S., & Chen, X. Y., “Fruits and vegetables intake and risk of bladder cancer: a PRISMA-compliant systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies”, *Medicine*, 94(17), (2015).
- Yamagishi, S. I., Matsui, T., “Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy—Friend or foe?”, *Pharmacological Research*, 64(3), 187-194, (2011).
- Yan, N., Shi, Y., “Mechanisms of apoptosis through structural biology”, *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 21:35-56, (2005).
- Yıldırım, I., Kutlu, T., “Anticancer agents: Saponin and tannin”, *International Journal of Biological Chemistry*, 9(6), 332-340, (2015).
- Yu, S., Xu, L., Wei, P. K., Qin, Z. F., Li, J., Peng, H. D., “Study on analgesic effect of traditional Chinese medicine”, *Chin J Integr Med*, 14, 151-156, (2008).
- Zachariah, S. M., Kumar, N. M., Darsana, K., Gopal, D., Thomas, N., Ramkumar, M., & George, N., “Phytochemical Screening, Formulation and Evaluation of Dried Galls of *Quercus Infectoria Oliv.*”, *Int J Pharm Sci Revi Res*, 26(1), (2014).
- Zakaria, Y., Rahmat, A., Pihie, A. H. L., Abdullah, N. R., & Houghton, P. J. “Eurycomanone induce apoptosis in HepG2 cells via up-regulation of p53”, *Cancer Cell International*, 9(1), 1-21, (2009).
- Zamora-Ros, R., Fedirko, V., Trichopoulou, A., González, C. A., Bamia, C., Trepo, E., ... & Overvad, K., “Dietary flavonoid, lignan and antioxidant capacity and risk of hepatocellular carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition study”, *International journal of cancer*, 133(10), 2429-2443, (2013).

Zanger, U. M., Schwab, M., “Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation”, *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1):103-141, (2013).

Zhang, H. M., Zhao, L., Li, H., Xu, H., Chen, W. W., & Tao, L., “Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid”, *Cancer biology & medicine*, 11(2), 92, (2014).

Zhang, H. M., Zhao, L., Li, H., Xu, H., Chen, W. W., Tao, L., *et al.* “Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid”, *Cancer Biol Med*, 11:92-100, (2014).

Zhang, X., & World Health Organization, “Traditional medicine strategy”, 2002-2005, (2002).

Zheng, W., Wen, W-Q., Gustafson, D. R., Gross, M., Cerhan, J. R., Folsom, A. R., “GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk”, *Breast Cancer Research and Treatment*, 74(1):9-16, (2002).

Zhou, J. X., Li, X., “Apoptosis in polycystic kidney disease: From pathogenesis to treatment”, *Exon Publications*, 197-230, (2015).

Zhu, L., Gunn, C., & Beckman, J. S. “Bactericidal activity of peroxydinitrite”, *Archives of biochemistry and biophysics*, 298(2), 452-457, (1992).

Zielinska, D., Szawara-Nowak, D, and Zielinski, H., “Comparison of spectrophotometric and electrochemical methods for the evaluation of the antioxidant capacity of buckwheat products after hydrothermal treatment”, *J Agric Food Chem*, 55: 6124-6131, (2007).

Zoulis, N. E., and Efstathiou, C. E., “Preconcentration at a carbon-paste electrode and determination by adsorptive-stripping voltammetry of rutin and other flavonoids”, *Anal Chim Acta*, 320: 255-261, (1996).

Zulkifly, N., “Antiproliferative Effects of Quercus Infectoria Galls Extract and Its Mechanism of Cell Death on Cervical Cancer (HELA) Cells”, Doctoral dissertation, Universiti Sains Malaysia, (2015).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge KILINÇARSLAN AKSOY

Doğum Yeri ve Tarihi : Yozgat - 11.04.1990

Lisans Üniversitesi : Pamukkale Üniversitesi

Y. Lisans Üniversitesi : Pamukkale Üniversitesi

Elektronik posta : oklncrsln@gmail.com

İletişim Adresi : Gerzele Mah. 553 Sok. No 4/3 Denizli

Yayın Listesi :

- Cennet, Ö. Z. A. Y., Kılınçarslan, Ö., & Mammadov, R. Interactions Between Heavy Metals and Glucosinolates as Defense Mechanisms in Brassicaceae. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 12-22.
- Palecz, B., Buczkowski, A., Piekarski, H., & Kılınçarslan, Ö. (2016). Thermodynamic interaction between PAMAM G4-NH₂, G4-OH, G3. 5-COONa dendrimers and gemcitabine in water solutions. *International Journal of Secondary Metabolite*, 3(1), 21-26.
- Mammadov, T., Deniz, N., Rakhimzhanova, A., Kılınçarslan, Ö., & Mammadov, R. (2017). Liliium türleri üzerine yapılan çalışmalar. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(1), 47-60.
- Kılınçarslan, O., & Mammadov, R. (2018). HPLC analysis and Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxicity Activities of Various Solvent Extracts of *Erysimum kotschyianum* Gay.(Brassicaceae). *J. Chem. Soc. Pak*, 40(04), 707.
- Rakhimzhanova, A., Kılınçarslan, Ö., & Mammadov, R. *Stellaria media* Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi ve Fenolik Bileşenlerinin Karakterizasyonu. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8(2), 165-173.
- Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Kılınçarslan, Ö., Mammadov, R., & Bardaweel, S. K. (2019). Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 146.
- Aydın, Ç., Rakhimzhanova, A., Kılınçarslan, Ö., & Mammadov, R. (2020). Antioxidant and Phenolic Characterization with HPLC of Various Extract of *Verbascum glomeratum* Linneus. *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 42(2), 222-227.

- Azmaz, M., Aksoy, Ö. K., Katılmış, Y., & Mammadov, R. (2020). Investigation of the Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of *Andricus quercustozae* Gall and Host Plant (*Quercus infectoria*). *International Journal of Secondary Metabolite*, 7(2), 77-87.
- Aksoy, Ö. K., Mammadov, R., & Seçme, M. (2020). Antioxidant activity, phytochemical composition of *Andricus tomentosus* and its antiproliferative effect on Mia-Paca2 cell line. *Molecular Biology Reports*, 1-9.

Konferans listesi :

- C. Özay, R. Rammadov, Ö. Kılınçarslan (2014) Interactions Between Heavy Metals and Glucosinolates as Defense Mechanisms in *Alyssum* L. (Brassicaceae), II. International Symposium “Secondary Metabolites: Chemistry, Biology and Biotechnology” ISSMET 2014, 19-23 May 2014, Moscow/RUSSIA, p. 48
- C. Özay, Ö. Kılınçarslan, R. Mammadov (2014) “Bitkilerde Savunma Mekanizmaları Olarak Ağır Metaller ve Glukozinolatlar Arasındaki İlişki”, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (Poster sunum).
- Sevim M. L., Gediz Ç., Yaka Gül H., Kılınçarslan Ö., Düşen O., Düşen S., Mammadov R. Cytotoxic Activity Of Hacihaliloglu Apricot Variety From Turkey. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*.
- Deniz N., Kocamaz E., Yaka Gül H., Kılınçarslan Ö., Mammadov R. Determination Of The Cytotoxic Activity Of *Crocus cancellatus* Spp.*mazziracus*'s Extracts. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*
- Deniz N. Aydın Ç., Kılınçarslan Ö., Mammadov R. Determination Of Some Biological Activity Of *Crocus Cancellatus* Spp.*Mazziracus* 'S Extracts. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*.
- Kılınçarslan Ö., Özay C., Deniz N., Mammadov R. Distribution Of Ni Hyperaccumulators Belonging To The Brassicaceae In Turkey. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*.
- Mammadov T., Kılınçarslan Ö., Mammadov R. *Ornithogalum* L. Species Of Northeastern Caucasus (Azerbaijan Land). *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*
- Kılınçarslan, Ö., Mammadov, R. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Erysimum kotschyianum* Extracts. Symposium on EuroAsian Biodiversty-23-27 May 2016, Antalya, Turkey.
- Kılınçarslan, Ö., Deniz, N., Rakhimzhanova, A., Mammadov, R. Determination of Some Biological Activities of Different Solvent Extracts from *Stellaria media*. . Symposium on EuroAsian Biodiversty-23-27 May 2016, Antalya, Turkey.
- Rakhimzhanova, A., Kılınçarslan, Ö., Mammadov, R. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Sternbergia candida*. The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversty (SEAB) -05-08 July 2017, Minsk-Belarus, PP127, p. 315.
- Aydın, Ç., Rakhimzhanova, A., Kılınçarslan, Ö., Mammadov, R. Determination of phenolic compounds of *verbascum glomeratum* boiss. extract. Фенольные соединения: свойства, активность, инновации. (ор). 14-19 May 2018, Moskova, P. 210-211.
- Mammadov, R., Katılmış, Y., Azmaz, M., Kılınçarslan, Ö. determination of antioxidant capacity and total flavonoid amount of acetonic and ethanolic extract of *andricus quercustozae*. Фенольные Соединения: Свойства, Активность, Инновации. (ОР), 14-19 May 2018, Moskova, P. 211-212.

- Urğun, A., Kılınçarslan, Ö., Azmaz, M., Katılmış, Y., Mammadov, R. Determination of Total Phenolic, Flavonoid Amounts and Antioxidant Capacity of *Andricus curtisii* (Müller, 1870) Gall. The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB) -03-06 July 2018, Kiev-Ukrayna, OR-199, p. 99.
- Cangöz, S., Kılınçarslan, Ö., Azmaz, M., Katılmış, Y., Mammadov, R. An Investigation on Antioxidant Activity and Total Phenolic-Flavonoid Contents of *Andricus caputmedusae* (Hartig, 1843) Gall. The 4rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB) -03-06 July 2018, Kiev-Ukrayna, PP-248, p. 277.
- Kılınçarslan, Ö., Azmaz, M., Katılmış, Y., Mammadov, R. The total Tannin Amounts of Cynipid Gall and Its Host Plant. XIII Mejdunarodnoy naučno-praktičeskoy konferensii “Aktualnie Problemi Ekologii”, 3-5 Ekim 2018, Grodno -Belarusiya, s. 5.(Sözlü Sunum).
- Kılınçarslan Ö., Rakhimzhanova A., Mammadov R., Determination of Antioxidant Capacity and Total Phenolic- Flavonoid Amount of *Sternbergia candida* extracts. 1 st International Congress on Plant Biology, 10-12 May 2018, Konya-Türkiye.
- Kılınçarslan, Ö., Azmaz, M., Katılmış, Y., Mammadov, R. Investigation of Antioxidant Properties and Total Phenolic –Flavonoid Contents of *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen, 1895) Extracts. 1 st International Congress on Plant Biology, 10-12 May 2018, Konya-Türkiye.
- Kılınçarslan Aksoy, Ö., Mammadov R. Determination of Antioxidant Capacity and Total Secondary Metabolites content of *Andricus sternlichti* Extracts. 2 nd International Congress on Plant Biology, 20-23 June 2019, Samsun- Turkey. (SÖZLÜ SUNUM)
- Azmaz, M., Kılınçarslan Aksoy, Ö., Katılmış, Y., Mammadov, R. Investigation on the Total Phenolic and Flavonoid Amounts of Oak Cynipid Galls (Cynipini). II. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi , Samsun, 20-23 Haziran 2019.
- Kılınçarslan Aksoy, Ö., Azmaz, M., Katılmış, Y., Mammadov, R. Investigation on the Total Tannin Amounts of Five Cynipid Galls (Cynipidae). «Флора и растительность в меняющемся мире: проблемы изучения, сохранения и рационального использования». 24-27 Eylül 2019. Minsk/Belarus.
- Demirbaş, Ş., Kılınçarslan Aksoy, Ö., Düşen, O., İli, P., Mammadov, R. Determination of Antioxidant Capacity and Total Secondary Metabolites of *Lilium candidum* L. Extracts. VI International Scientific and Practical Conference of “Science, Society, Education: Topical Issues Development Prospects” 10-12 May 2020, pp. 87-90, Kharkiv, Ukraine.