



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUŞ YÖRESİNDE YETİŞEN *Ranunculus
cornutus* (EVLİMEMEDOTU) BİTKİSİNİN
FENOLİK MADDE İÇERİĞİ ve BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ

Serap DİCLE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Ana Bilim Dalı

Ekim-2022
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır



T.C.
MUŞ ALPARSLAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUŞ YÖRESİNDE YETİŞEN *Ranunculus
cornutus* (EVLİMEMEDOTU) BİTKİSİNİN
FENOLİK MADDE İÇERİĞİ ve BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ

Serap DİCLE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SAVCI

Ekim -2022
MUŞ
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL ve ONAYI

SERAP DİCLE tarafından hazırlanan “Muş Yöresinde Yetişen *Ranunculus cornutus* (Evlimemedotu) Bitkisinin Fenolik Madde İçeriği ve Biyolojik Aktiviteleri” adlı yüksek lisans tez çalışması 06/10/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Ebru AKKEMİK
Siirt Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SAVCI
Muş Alparslan Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR
Muş Alparslan Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Sedat BOZARI
FBE Müdür

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Proje Komisyonu (BAP) tarafından BAP-22-FEF-4902-04 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Serap DİCLE

Tarih: 10/10/2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUŞ YÖRESİNDE YETİŞEN *Ranunculus cornutus* (EVLİMEMEDOTU) BİTKİSİNİN FENOLİK MADDE İÇERİĞİ ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Serap DİCLE

Muş Alparslan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SAVCI

Ranunculus cornutus DC. bitkisi uzun zamandan beri kabızlık, romatizma, hemoroid (basur), ödem, apse, yaraların iyileştirilmesi ve sarılık gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda ülkemizde geleneksel tıpta kullanılan *Ranunculus cornutus* DC. (Evlimemedotu)'nin içerik analizi ve bazı biyolojik aktiviteleri araştırıldı. Bu amaçla, bitkinin metanol ve su ekstraktları alınarak, her bir ekstraktın toplam fenolik madde miktarı LC-MS-MS cihazı aracılığıyla belirlendi. Antioksidan aktivitelerini belirlemek için ise ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan yöntemi, demir iyonu indirgeme yöntemi (FRAP), bakır iyonu indirgeme yöntemi (CUPRAC), demir şelatlama yöntemi, 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) radikal süpürme yöntemi ve 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) radikali giderme yöntemi kullanıldı. Fenolik bileşik kompozisyonu olarak en yüksek ilk üç fenolik bileşik fumarik asit (3261,43 µg/L), vanilik asit (1217,70 µg/L) ile ferulik asit (769,40 µg/L) olarak tespit edildi. Bitkiden elde edilen su ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon (15 µg, 30 µg, 45 µg) ile doğru orantılı olarak arttı. FRAP indirgenme aktivitesi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA (IC₅₀:90,34 mg/mL)'nin ekstraktlara göre daha güçlü indirgen olduğu görüldü. Kuprak metodu sonuçlarına göre de BHA (IC₅₀:101,47 mg/mL)'nin ekstraktlara göre daha güçlü olduğu saptandı. Demir şelatlama aktivitesi sonuçlarına göre AA (IC₅₀:32,41 mg/mL), ekstraktlara göre daha iyi aktivite gösterdi. DPPH ve ABTS radikal süpürme sonuçlarına göre AA en iyi aktiviteyi gösterdi. Antioksidan sonuçları değerlendirildiğinde bitkinin su ve metanol ekstraktlarının standart antioksidanlara göre daha düşük aktivite sergiledikleri tespit edildi. Bunun nedeninin, içerdikleri fenolik miktarının oranıyla ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte metanol ekstraktının genel olarak su ekstraktından daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Son olarak ekstraktların DNA üzerindeki etkilerinin sonuçlarına göre, H₂O₂'nin ve H₂O₂ ile DMSO'nun birlikte DNA'nın kararlı formu olan Form I'i bozarak daha kararsız hale getirdiği anlaşıldı. Su ve metanol ekstraktlarının tek başına DNA'nın kararlı yapısı üzerinde olumsuz bir etki yapmadığı ve Form I ile Form II yapısında tuttuğu tespit edildi. Su ve metanol ekstraktlarının, peroksitin DNA üzerindeki zararlı etkilerini azaltma aktiviteleri kıyaslandığında su ekstraktının daha etkili olduğu söylenebilir. Mevcut bitki türüyle alakalı özellikle antioksidan çalışmalar bulunmadığından bu bitki türü ile yapılacak başka çalışmaların genetik hazinemiz olan bitkilerimizin korunması ve nesillere aktarılması açısından önem arz ettiği düşünülmektedir.

2022, 79 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Muş, Antioksidan, Biyolojik Aktivite, Fenolik Madde, *Ranunculus cornutus*

ABSTRACT

MS THESIS

PHENOLIC CONTENT and BIOLOGICAL ACTIVITIES of *Ranunculus cornutus* (EVLİMEMEDOTU) GROWING in MUŞ REGION

Serap DİCLE

Muş Alparslan University
Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Advisor: Asst. Prof. Ahmet SAVCI

Ranunculus cornutus DC. has long been used in the treatment of diseases such as constipation, rheumatism, hemorrhoids, edema, abscess, wound healing and jaundice. In this study, the content and biological activities of *R. cornutus* DC. (Evlimemedotu), which is used in traditional medicine, were analyzed. For this purpose, methanol and water extracts of the plant were obtained and the total phenolic content of each extract was determined by LC-MS/MS device. To determine their antioxidant activities, the total antioxidant method, iron ion reduction method (FRAP), copper ion reduction method (CUPRAC), iron chelation method, 1,1-Diphenyl 2-picryl hydrazil (DPPH) radical scavenging method and 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical removal method were used. The first three phenolic compounds with the highest phenolic compound composition were fumaric acid (3261.43 µg/L), vanillic acid (1217.70 µg/L), and ferulic acid (769.40 µg/L). The total antioxidant activity of the water extracts obtained from the plants increased in direct proportion to increasing concentrations (15, 30, and 45 µg). According to the results of the FRAP (BHA-IC₅₀:90.34 mg/mL) and CUPRAC (BHA- IC₅₀:101.47 mg/mL) methods, BHA was a stronger reducing agent than the other extracts. According to the iron chelating activity results, AA (IC₅₀:32.41 mg/mL) showed better activity than the extracts. According to DPPH and ABTS radical scavenging assays, AA showed the best activity. When the antioxidant results were evaluated, the water and methanol extracts of the plant showed lower activity than the standard antioxidants. The reason for this is related to the ratio of the phenolic content. However, the methanol extract had better antioxidant activity than the water extract. Finally, according to the results of the effects of the extracts on DNA, it was understood that H₂O₂ and H₂O₂, and DMSO together degraded the stable form of DNA, Form I, making it more unstable. It was confirmed that the water and methanol extracts alone did not have a negative effect on the stable structure of DNA and kept it in Form I and Form II structures. When the activities of the water and methanol extracts were compared to reduce the harmful effects of peroxide on DNA, the water extract was found to be more effective. Since there are no antioxidant studies on existing plant species, further studies on these plant species are thought to be important in terms of protecting our plants, which are our genetic treasure, and transferring them to generations.

2022, 79 Pages

Keywords: Muş, Antioxidant, Biological Activity, Phenolic Content, *Ranunculus cornutus*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm içtenlikleriyle, her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen aynı zamanda tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve hazırlanmasında her türlü bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren çok değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SAVCI'ya,

Kıymetli zamanını ayırarak desteğiyle ve olumlu fikirleriyle bana faydalı olabilmek için elinden geleni yapan gerektiğinde manevi desteğini de esirgemeyen Kimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nevin TURAN'a,

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübesini esirgemeyen ve tezimin analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Enver Fehim KOÇPINAR'a,

Hayatım boyunca hep yanımda olan, her koşulda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, koşulsuz sevgilerini daima hissettiren sevgili aileme,

Tez çalışmaların sırasında zamanlarından çaldığım ancak her daim motivasyon kaynaklarım olan oğlum Yağız Ali'ye ve kızım Rabia Eslem'e,

Eğitimim boyunca her an yanımda olan, sınırsız desteğini esirgemeyen ve akademik tecrübelerinden de istifade ettiğim kıymetli eşim Dr. Öğr. Üyesi Yalçın DİCLE'ye,

Son olarak da bu çalışmanın gerçekleşmesinde maddi imkan sağlayan Muş Alparslan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine katkılarından dolayı; sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Serap DİCLE

MUŞ-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Ranunculales Lindley Takımı	3
2.2 Ranunculaceae A. L. de Jussieu (Düğünçiçeğigiller) Familyası.....	3
2.3 <i>Ranunculus</i> L. Cinsinin Sistematığı	4
2.4 <i>R. cornutus</i> DC. (Evlimedotu).....	6
2.5 <i>Ranunculus</i> L. Cinsinin Kullanım Alanları ve Etkileri	7
2.6 Sekonder Metabolitler (SM)	12
2.7 Antioksidanlar	14
2.7.1 Enzim yapısındaki bazı antioksidanlar.....	15
2.7.2 Enzim yapısında olmayan bazı antioksidanlar	16
2.8 Antioksidanların DNA Üzerindeki Etkisi	18
2.9 <i>İn Vitro</i> Antioksidan Tayin Yöntemleri	19
2.9.1 Total Antioksidan Aktivite Tayini	19
2.9.2 Demir (III) iyonu indirgeme yöntemi (FRAP).....	20
2.9.3 Bakır (II) iyonu indirgeme yöntemi (CUPRAC)	21
2.9.4 Metal Şelatlama Aktivitesi	21
2.9.5 DPPH radikal süpürme yöntemi.....	22
2.9.6 ABTS radikal süpürme yöntemi.....	22
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI	23
4. MATERYAL ve METOD	26
4.1 Ekstraktların Hazırlanışı.....	26
4.1.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	26
4.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler.....	27
4.1.3 Kullanılan çözeltiler	27
4.1.3.1 Ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini.....	27
4.1.3.2 Fe+3 indirgeme kuvveti tayini (FRAP)	27
4.1.3.3 Cu+2 indirgeme kuvveti tayini (CUPRAC).....	28
4.1.3.4 Fe+2 şelatlama aktivitesi	28
4.1.3.5 DPPH. radikal giderme aktivitesi tayini	28

4.1.3.6 ABTS+- radikal giderme aktivitesi.....	28
4.1.3.7 DNA koruyucu aktivite çalışmasında kullanılan çözeltiler	29
4.2 Kullanılan Metotlar	29
4.2.1 LC-MS/MS Method (Sıvı Kromatografisi - Kütle - Kütle Spektrometresi) ...	29
4.2.2 Antioksidan özelliğinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	29
4.2.2.1 Ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini.....	29
4.2.2.2 Demir iyonlarını (Fe ³⁺) indirgeme analizi (FRAP)	30
4.2.2.3 Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini	30
4.2.2.4 Demir Şelatlama Aktivitesi.....	30
4.2.2.5 DPPH radikal süpürme aktivitesi.....	31
4.2.2.6 ABTS•+ radikal süpürme aktivitesi	31
4.2.3 DNA üzerindeki etkide kullanılan yöntemler	31
4.3 İstatistiksel Analiz	32
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	34
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR

AA	:Askorbik asit
ABTS	:2,2'-Azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu
CAT	:Katalaz
BHA	:Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	:Bütillenmiş Hidroksitoluen
CUPRAC	:Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi
DPPH	:2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ET	:Tek Elektron Transferi
FCR	:Folin & Ciocalteu's Fenol Reaktifi
FRAP	:Ferrik İyonu İndirgeme Antioksidan Gücü
GAE	:Gallik Asit Eşdeğeri
PG	:Propil Gallat
GPx	:Glutasyon Peroksidaz
GST	:Glutasyon-S-Transferaz
HAT	:Hidrojen Atomu Transferi
DG	:Dodesil Gallat
NDGA	:Nordihidroguaryetik Asit
ORAC	:Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
PG	:Propil Gallat
OG	:Oktil
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
SOD	:Süperoksit Dismutaz
TAC	:Toplam Antioksidan Kapasitesi
TBHQ	:Tersiyer Bütihidrokinon
TEAC	:Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TOC	: α -Tokoferol
TR	:Troloks
TRAP	:Total Radikal Yakalama Antioksidan Kapasitesi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DHA	: Dihidroksiaseton
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik
HBV	:Hepatit B Virüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 <i>Ranunculus L.</i> cinsinin sistematığı.....	5
Şekil 2. 2 <i>R. cornutus</i> DC. dünyada ki yayılışı.....	6
Şekil 2. 3 <i>R. cornutus</i> DC.'ye ait çekilmiş bir fotoğraf.....	7
Şekil 2. 4 Sekonder metabolitlerin genel sınıflandırılması.....	14
Şekil 2. 5 Sentetik antioksidanlar	17
Şekil 2. 6 Doğal antioksidanlar.....	18
Şekil 5. 1 Ekstrakt ve standart antioksidanların lipit peroksidasyonu giderme aktiviteleri	37
Şekil 5. 2 <i>R. cornutus</i> DC. ekstraktlarının Fe ³⁺ iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (BHA, BHT ve AA) kıyaslanması.....	39
Şekil 5. 3 <i>R. cornutus</i> DC. ekstraktlarının Cu ²⁺ indirgeme aktivitesi	41
Şekil 5. 4 <i>R. cornutus</i> DC. ekstraktlarının Fe ²⁺ şelatlama aktivitesi	42
Şekil 5. 5 <i>R. cornutus</i> DC. ekstraktlarının DPPH [•] indirgeme aktivitesi.....	44
Şekil 5. 6 <i>R. cornutus</i> DC. ekstraktlarının ABTS ^{•+} süpürme aktivitesi.....	47
Şekil 5. 7 <i>R. cornutus</i> DC. ekstraktlarının DNA üzerine etkisinin karşılaştırılması	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5. 1 <i>R. cornutus</i> DC. fitokimyasal fenolik bileşik içeriğinin LC-MS/MS yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmesi	35
Çizelge 5. 2 Ekstrakt ve standartların antioksidan aktivite sonuçları.....	36



1. GİRİŞ

Yeryüzünde biyolojik çeşitlilik açısından ülkemiz en zengin ülkeler arasında yerini almaktadır. Genel olarak biyoçeşitliliğin sebepleri; iklimsel farklılıklar, jeolojik çeşitlilikler, toprak yüzey şekilleri, sulak bölgelerin varlığı, yükselti farkları, üç farklı bitki coğrafyasının birleştiği bir bölgede bulunması şeklinde sıralanabilmektedir (Avcı, 2005).

Murat Nehri havzası ve Vangölü havzası arasında bulunan Muş ili, Kuzey Anadolu ile Doğu Anadolu Bölgesi arasında sert karasal iklim ve ılıman karasal iklimin hakim olduğu bir geçiş bölgesinde konumlanmıştır. Mevcut konumundan dolayı jeolojik, jeomorfolojik, iklimsel ve toprak bitki örtüsü özellikleri göz önünde bulundurulduğundan oldukça çeşitli zengin bir bitki örtüsüne sahiptir (Kıranşan, 2017).

Muş ilinde bulunan çayır ve meralarda takson sayısı açısından ön sıralarda Asteraceae, Lamiaceae ve Ranunculaceae familyaları gelmektedir. Muş ili ve çevresinde kayda geçen *Ranunculus* takson sayısı 18 olarak tespit edilmiştir (Demir ve Ünal, 2022).

Dünyada Ranunculaceae familyası içerisinde yaklaşık olarak 50 cins ve 2000 tür bulunmakla birlikte, ülkemizde yine yaklaşık 85 *Ranunculus* türü bulunmaktadır. Bu türlerin 15'i endemik olarak bulunmaktadır (Davis, 1965). Ranunculaceae familyası içerisinde bulunan bu bitki türlerinin çoğu atopik dermatite sebep olmaktadır. Bir veya çok yıllık otsu, nadir oranda çalı benzeri ya da tırmanıcı bitkilerinden olan *Ranunculus* türleri "düğün çiçeği, yağ çanağı, katır nalı, basurotu ve evlimemedotu" isimleriyle de bilinmektedir (Baytop, 1977).

Ranunculus L. cinsine ait bu bitkiler ülkemizin birçok yerinde halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle kabızlık durumunda, romatizmal hastalıklarda, hemoroid (basur), ödem, apse, yaraların iyileştirilmesi ve sarılık gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999; Sezik ve ark., 2001; Gürhan ve Ezer, 2004).

Fenolik bileşikler; fenolik asitlerde (hidroksibenzoik, hidroksisinnamik asitler gibi) ve flavonoidlerde (kateşin, flavonol, flavanın, antothocyanidin ve calcones gibi) bulunan "polifenoller" olarak da adlandırılan bir gruptur (Escarpa ve Gonzalez, 1998; Chinnici ve ark., 2004; Sandhu ve ark., 2011). Fenolik madde içeren bitkilerin analizleri genellikle fenolik maddelerin karakterizasyonu ve antioksidan kapasitelerin ölçümü şeklinde gerçekleştirilmektedir. Yüksek antioksidan kapasitesine sahip olan bu moleküller, birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir (Bonilla ve ark., 1999; Maier ve

ark., 2009; Schiassi ve ark., 2018). Antioksidan bileşikler genellikle düşük konsantrasyon oranlarında bile organik bileşiklerin (serbest radikal mekanizması yoluyla) oksidasyonunu engellemek suretiyle çeşitli hastalıklara karşı vücut direncinin artırılmasında önemli rol almaktadır (Chen ve ark., 2006).

Bu tez çalışmasında, ülkemizde geleneksel tıpta kullanılan *Ranunculus cornutus* De Candolle (DC.) (Evlimemedotu)' un içerik analizi ve bazı biyolojik aktiviteleri araştırıldı. Bu amaçla, bitkinin metanol ve su ekstrakt çözeltileri hazırlanarak, ekstraktların her biri için ayrı ayrı toplam fenolik madde miktarı LC-MS-MS cihazı kullanılarak belirlendi. Antioksidan aktivitelerini belirlemek için ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan yöntemi, Fe^{+3} iyonu indirgeme yöntemi (FRAP), Cu^{+2} iyonu indirgeme yöntemi (CUPRAC), Fe^{+2} şelatlama yöntemi, 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH·) radikal süpürme yöntemi ve 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS⁺) radikali giderme yöntemi kullanıldı. Ekstraktların aktiviteleri, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve askorbik asit (AA) standart antioksidanlarının sonuçları ile kıyaslandı. Son olarak ekstraktların DNA üzerindeki etkisi incelendi. Bunun için primer DNA olarak pBR322 plazmit DNA kullanıldı. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların, literatüre önemli katkılar sağlayacağını ve bu bitkiyle çalışan araştırmacılar için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ranunculales Lindley Takımı

Ranunculales takımı 7 familya (Berberidaceae, Circaeasteraceae, Eupteleaceae, Lardizabalaceae, Menispermaceae, Papaveraceae ve Ranunculaceae) ve 3200 kadar tür içerir (Simpson, 2010; Yıldız ve Aktoklu, 2012). Menispermaceae familyasına ait *Chondrodendron tomentosum* bitkisinden amazon yerlileri kuare maddesini elde etmek suretiyle ok uçlarına sürerek ok zehri amacıyla kullanmışlardır. Ayrıca kuare maddesinin bir başka türevi olan tuokurarın maddesi de hasta tedavilerinde ve ameliyat öncesinde kasları gevşetmek için kullanmıştır (Simpson 2010).

Karasal ve sucul habitatlarda yaşayan, çoğunlukla otsu ve çok azı da odunsu bitkilerdir. Yapraklar almaşlı, nadiren karşılıklı, basit, parçalı veya birleşik yapıdadır. Stipul çoğunlukla yoktur. Stomalar genellikle anomosi-tipidir. Çiçekler çok çeşitli çiçek durumu gösterir, tam ya da bir eşeyli, çiçek epigin olup (altdurumlu), genellikle aktinomorf, bir kısmı zigomorftur. Çiçek tablası konkav veya yassılaştırmış ya da çukurlaştırmış çiçek tablası vardır. Çoğunlukla entomofilik (entomogam: böcekler ile tozlaşma), bazen ornitofolik (ornithogam: kuşlar aracılığıyla tozlaşma)'tir. Kaliks ve korolla iyi farklılaşmış, bazılarında az ya da hiç farklılaşmamıştır. Stamen (1-6) çok sayıda, serbest ve spiral dizilişlidir. Dişi organda bulunan çok sayıdaki karpeller serbest haldedir. Meyve, folikül, aken veya bakka şeklindedir. Tohumlarda endosperm sık görülür, otsu ve odunsu bitkiler ise çeşitli yağlara sahiptir. Kimyasal savunma maddeleri benzil-izokinolin ve aporfin alkaloidleridir (Hickey ve King, 1997; Ekmekçigil, 2006; Seçmen ve ark., 2008; Yıldız ve Aktoklu, 2012).

2.2 Ranunculaceae A. L. de Jussieu (Düğünçiçeğigiller) Familyası

Bu familyanın adı amfibik özelliğinden dolayı latince 'küçük kurbağa' anlamına gelen 'rana' sözcüğünden türemiştir. Bu familyaya ait dünyada toplam 62 cins ve bununla beraber yaklaşık 2500 tür mevcuttur (Simpson, 2012). Bu büyük bitki ailesi neredeyse tüm dünyada yayılış göstermektedir. Kuzey yarım kürenin daha ılıman bölgelerinde büyük bir çeşitlilik gösteren bu familya aslında her iki yarım kürenin ılıman ve serin bölgelerini tercih etmektedir (Yıldırım ve Gül, 2018). Ranunculaceae familyasının önemli ekonomik özellikleri olmasa da kültüre edilmiş bu familyaya ait başta süs bitkileri [(*Clematis* (Akasma), *Aquilegia* (Haseki küpesi), *Eranthis* (Sarıkokulu), *Anemone* (Dağ lâlesi), *Delphinium* (Hezaren), *Consolida* (Mahmuzotu), *Adonis* (Kan damlası),

Helleborus (Çöpleme), *Ranunculus* (Düğünçiçeği)], tıbbi bitkiler (*Hydrastis canadensis*) olmak üzere zehirli bitkiler ve zararlı otlar (*Aconitum* cinsine ait *A. anthora* L., *A. cochlare* Woroschin, *A. nasutum* Fisch., *A. orientale* Miller; *Delphinium* cinsine ait iki tür: *D. staphisagria* L. ve *D. linearilobum* N. Busch; *Helleborus* cinsine ait iki tür: *H. orientalis* Lam. ve *H. vesicarius* Aucher) da dahil düğünçiçeğigiller familyasının ekonomik değerini oluşturmaktadır (Yıldız ve Aktoklu, 2012; Simpson, 2019).

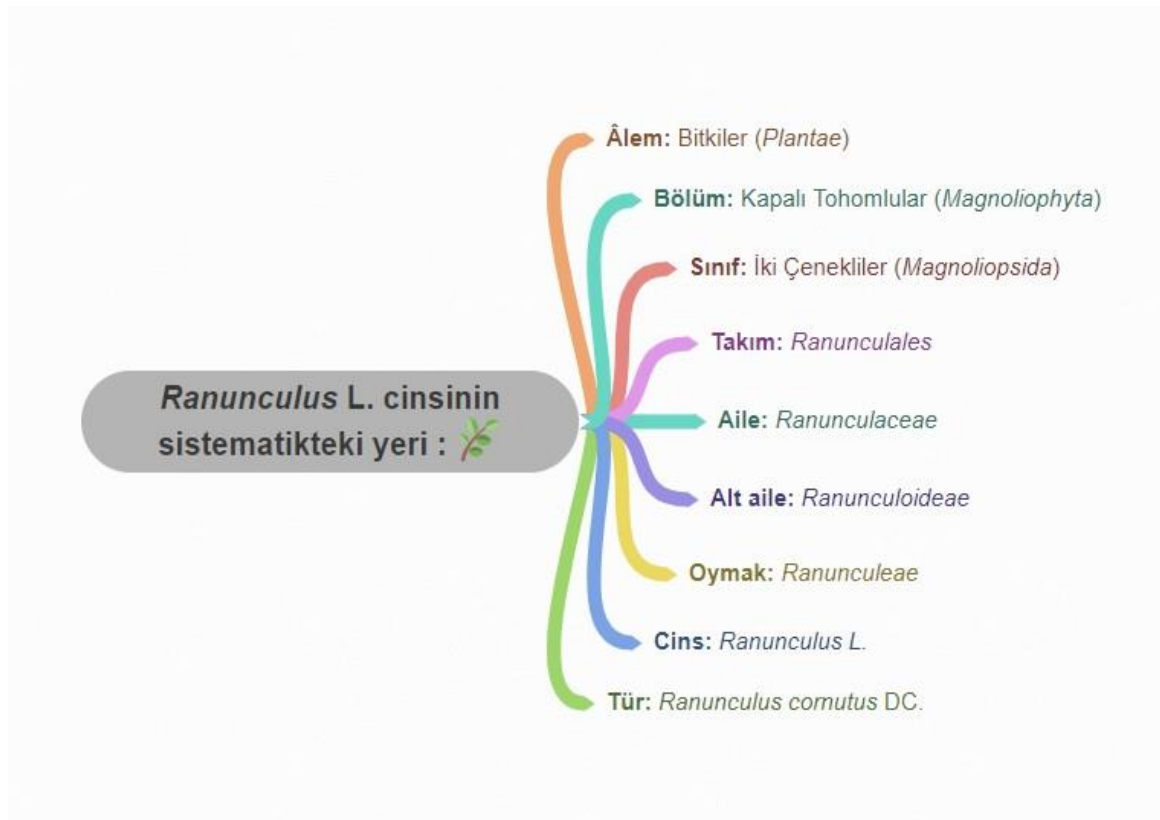
Bu familyanın Türkçe adı “düğünçiçeğigiller” olarak bilinmektedir. Türkiye’de 20 cins, 204 tür ve alt tür toplamda ise 234 taksonla temsil edilmektedir, bunlardan endemik olan 62 taksonun endemizm oranı % 26,5 olarak bildirilmektedir (Ekmekçigil, 2006; Seçmen ve ark., 2008; Yıldız ve Aktoklu, 2012). Düğünçiçeğigiller familyasının Türkiye Florası’ndaki morfolojik özellikleri şöyledir:

Karasal veya sucul, tek ya da çok yıllık otsu, nadiren tırmanıcı odunsu bitkilerdir. Yapraklar aşırı çeşitlilik gösterir; genellikle almaşık, bazen karşılıklı, genellikle palmat ya da pinnat birleşik, bazen basittir. Genellikle stipul yoktur, nadiren stipullu türler mevcuttur. Sucul türlerinde heterofili görülür. Çiçekler tek, rasem, panikula ya da kimöz durumlu, iki eşeyli, ovaryum üst durumlu ve ışınsal veya zigomorf simetridir. Reseptakulum biraz uzamıştır. Çiçek örtüsü, tek sıra üzerinde dizili ya da iki sıralıdır. Periant parçaları serbest (bazen perigon şeklinde), çoğunlukla hepsinin iç halkası nektaryum içerir. Nektaryum çoğunlukla perigonaldır. Sepal 3-5-8 veya çok, genellikle petaloiddir. Petal genellikle 5 veya daha çok sayıdadır. Stamenler, genellikle sayı olarak fazla ve çevrelerden merkeze doğru dizilim göstermektedir (Ekmekçigil, 2006; Seçmen ve ark., 2008; Simpson, 2010; Yıldız ve Aktoklu, 2012).

2.3 *Ranunculus* L. Cinsinin Sistematığı

Ranunculus cinsi 1753 yılında ilk olarak Carl Linnaeus tarafından tanımlaması yapılmıştır (Şekil 2.1). Bu cins 1824 yılında Candolle tarafından 159 türe dayanan dünyadaki ilk sınıflandırılması yapıldığından beri birkaç kez daha revizyona uğramıştır, ancak etraflıca yapılmış bir sınıflandırma henüz mevcut değildir. *Ranunculus* cinsi; *Myosurus*, *Ceratocephala* ve *Ficaria* hariç Ranunculeae kabilesi içinde sınıflandırılmış ve akenler, kökler ve çiçeklerin özelliklerini kullanarak *Batrachium*, *Ranunculastrum*, *Thora*, *Hecatonia* ve *Echinella* bölümlerine ayrılmıştır. Daha sonra dünya çapında yapılan diğer sınıflandırmalar yazarlar arasında önemli ölçüde farklılık göstermektedir; örneğin, Prantl (1887) yaptığı çalışmada, esas olarak meyve anatomisine dayanarak, *Oxygraphis*'i hariç tutmuş ve *Ranunculus*'u *Ceratocephala*, *Ficaria*, *Marsypadenium*,

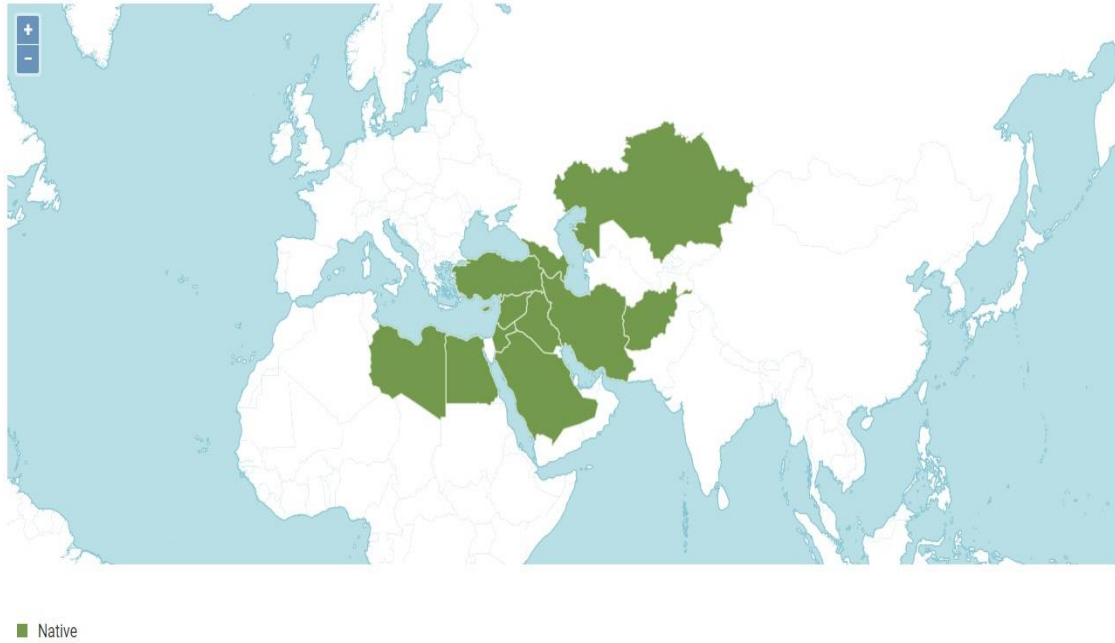
Hypolepium, *Thora*, *Physophyllum* ve *Butyranthus* bölümlerine ayırmıştır. Tamura'nın araştırması (1995), bu konuda dünya çapındaki tek modern sınıflandırmadır ve esas olarak aken karakterlerine dayanmaktadır. Sistematik çalışmaların tam olarak yapılamamasının sebepleri arasında; *Ranunculus* cinsine ait çok fazla türün mevcut olması, bölgesel floralardan alınmış örnek yetersizliği, bazı morfolojik karakterlerin evrimsel olarak benzerlik göstermeleri gibi nedenler sayılabilmektedir. Moleküler teknolojinin gelişmesi ve etkin kullanımı sayesinde günümüzde filogenetik ve evrimsel çalışmalara hız verilmiş ve eksik tarafları tamamlanmaya çalışılmaktadır (Lehnebach 2008). Tamura (1995) daha önce *Ranunculus* altında tanımlanan birkaç küçük "uydu" cinsi bu yeni sınıflandırmasında hariç tutmuştur.



Şekil 2.1 *Ranunculus L.* cinsinin sistematığı

Ranunculus cinsi tüm kıtalarda yayılış gösterir ve tropiklerden arktika ve subantarktika bölgelere kadar dünya çapında büyük bir dağılıma sahiptir. Özellikle *R. cornutus* DC. Afganistan, Kıbrıs, Mısır, İran, Irak, Kazakistan, Lübnan-Suriye, Libya, Filistin, Suudi Arabistan, Transkafkasya, Türkiye’de yayılış göstermektedir (Şekil 2.2). Bu cins, ılıman ila meridyonel bölgeler arasında özellikle tür bakımından oldukça zengindir (Whittemore, 1997). *Ranunculus* türleri, ovalardan yüksek alpin bölgelere kadar çeşitli ıslak ve kuru habitatlarda yerleşiktir ve farklı habitatlara çeşitli morfolojik

adaptasyonlar gösterir (Paun ve ark., 2005). Dağlık alanlarda, endemizm önemli türlere katkıda bulunur. Çeşitlilik, ancak daha düşük irtifalarda yaygın türler de oldukça yaygındır.



Şekil 2. 2 *R. cornutus* DC. dünyada ki yayılışı

Ranunculus, bazen apomiksis ile bağlantılı olan farklı seviyelerde poliploidi gösterir (Hörandl ve ark., 2005). Çeşitli morfolojik adaptasyonlar ve vejetatif üreme (stolons, bulbils), kendi kendine uyumluluk ve agamospermi gibi farklı üreme stratejileri, habitatları daha yüksek rakımlarda ve enlemlerde kolonize edebilmeleri için önemli faktörler olabilir. Bazı dağlık alanlarda yüksek tür çeşitliliği gözlenmektedir (Eichler, 1958).

2.4 *R. cornutus* DC. (Evlimemedotu)

R. cornutus DC. (1817:300) çevreleyen kompleks, refleksi sepals ile sarı çiçekler taşıyan hafif tüylü yıllık bitkilerden oluşur. Bu kompleksin üyeleri, meyveli kafadan 4-8 kat daha uzun, uzun saplar üzerine yerleştirilmiş küresel, küçük meyveli başları (0,5-1,5 cm çapında) ile tanınabilir. Akenler düzdür, gagalıdır ve yüzeyleri değişken tüberkülattan pürüzsüze doğru değişir (Şekil 2.3). Bu türün doğal aralığı Türkiye'den Orta Asya'ya ve Arap Yarımadası'dır. Yıllıktır ve öncelikle ılıman biyom(lar)da yetişir.



Şekil 2. 3 *R. cornutus* DC.'ye ait çekilmiş bir fotoğraf (Türkiye'nin Bitkileri, 2022)

Tür kompleksi, güneybatı Asya, Kuzey Afrika ve güney Avrupa'da yaygın olarak dağılmıştır (Davis 1959). *Ranunculus*'un iki kapsamlı taksonomik çalışması bu kompleksi farklı şekilde yorumlamaktadır. Davis (1965) 'Flora of Turkey' de tanısal karakter olarak hem vejetatif özellikleri hem de aken morfolojisini kullanırken, Zohary (1966) 'Flora Palaestina' da sadece aken morfolojisini kullanır. Bu çelişkili taksonomik yorum, floristik listelerde ve floralarda tutarsızlığa yol açmıştır. Taksonomik karışıklığın başka bir nedeni, bazı taksonlar için tip materyalinin olmaması ve belirsiz morfolojik tanımlamalardır. Ek olarak, taksonlardaki fenotipik plastisiteyi anlamak için gerekli olan çalışmalar arasında kritik bir karşılaştırmanın olmaması, bu taksonomik karmaşaya katkıda bulunmuştur.

2.5 *Ranunculus* L. Cinsinin Kullanım Alanları ve Etkileri

Bitki Mart-Nisan ayları arasında çiçeklenir ve geleneksel olarak bütün halde gut, artrit ve nevralji ağrılarında kullanılır. Bitki buruk tatlıdır ve ağrı kesici, antispazmodik, diaforetik ve rubefasiyan olarak kullanılır (Aslam ve ark., 2012).

R. sceleratus Linn'in tüm parçaları tazeyken zehirlidir; bununla birlikte bitki halk hekimliğinde ısıtma veya kurutma işleminden sonra çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Prieto ve ark., 2003).

Son yıllarda etnofarmakolojik etkiler çeşitli çalışmalarla deneysel olarak kanıtlanmıştır. İki ranunculin, protoanemonin ve anemonin, mantar öldürücü, antimikrobiyal, antimitojenik ve ateş düşürücü özellikler göstermektedir (Martin ve ark., 1990; Minakata ve ark., 1983; Misra ve Dixit, 1980). Şerif ve ark. sulu fraksiyonun en ilginç etkileri ürettiği normotansif ve fruktoz ile indüklenen hipertansif sıçanları kullanarak hipertansiyon tedavisinin etkilerini değerlendirmek için bir *in vivo* çalışma gerçekleştirmişlerdir. *R. sceleratus* L.'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen %70 etanolik ekstraktlar, ekstrakttaki bol miktarda miristik asidin LPS ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücre hattında nitrit konsantrasyonunu inhibe ettiğini ortaya çıkarmışlardır (Marelli ve ark., 2021). Ayrıca, *R. sceleratus* türevli bileşikler, apigenin 4'-O-alfa-rhamnopyranoside, apigenin 7-O-beta-glucopyranosyl-4'-O-alpha-rhamnopyranoside, tricetin 7-O-beta-glucopyranoside, tirisin ve izoskopoletin, hepatit B virüsüne karşı inhibitör aktivite göstermiştir (Li ve ark., 2005). *R. sceleratus* özütünün tedavi etkisine ek olarak, Tian Jiu tedavisi için, belirlenmiş akupunktur noktalarına Çin şifalı bitkisel macun eklenmesini içeren taze *R. sceleratus* L.'nin taze formu tahriş edici olmasına rağmen, sıçanlarda intrahepatik kolestaz üzerinde iyi terapötik etki göstermiştir (Zhang ve ark., 2020). Ekstraktın tahriş edici veya tahriş edici olmayan tepkileri indüklediği spesifik mekanizmalar açıklanmamıştır. Bu fenomeni açıklamak için, topikal iltihaplanmada özüt tarafından indüklenen hem tahriş edici, hem de tahriş edici olmayan özelliklerin mekanizmasını göstermek için *R. sceleratus* L.'nin metanolik bir özütü kullanılmıştır. Araşidonik asit inflamatuvar süreci ortaya çıkardığında, özütün etkisi genellikle pro-inflamatuvar veya nötr olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, tepkiye etradekanoilforbol asetat gibi tahriş edici bir maddenin uygulanması neden olduysa, özüt esas olarak anti-inflamatuvar etkilere neden olmaktadır. Bu etki bir tahriş önleyici olarak belirtilmiştir ve özütün kendisi fizyolojik koşullarda tahriş edici olabilir, ancak daha önce uygulanan tahriş edici maddelerin etkisini de ortadan kaldırmaktadır (Prieto ve ark., 2003).

R. sceleratus L.'un en önemli sekonder metabolitleri flavonoidler, β -sitosterol ve lakton glikozitleri (ranunculin) gibi steroidleri içerir. Haricen kızartıcı ve kan toplayıcı olarak romatizmalara karşı kullanılır (Wink ve ark., 2004). *R. sceleratus* L.'un yapısında

bulunan anemonin antipiretik olarak bilinir ve protoanemoninle birlikte bu türde sedatif etkiye sahiptir (Prieto ve ark.,2003).

R. laetus Wall türü Afganistan, Pakistan, Hindistan ve Himalayalar 'da çok yaygın şeklide bulunur ve halk arasında yaprakları ve çiçekleri, konjonktivit gibi göz hastalıklarına karşı kullanılır (Nazır ve ark., 2013; Aslam ve ark., 2012; Nazır ve ark., 2014). *Ranunculus* türleri polifenoller, flavonoidler, alkaloidler, triterpenoidler, fitosteroller, kumarin türevleri ve saponinler gibi farklı biyoaktif bileşik sınıflarına ek olarak esansiyel yağ asitleri (EFA) (linoleik ve a-linolenik asitler) ve mineraller (K, Na, Fe ve Zn) içerir (Aslam ve ark., 2012; Da-Cheng, 2018). *R. bulbosus* L. (yumrulu düğünçiçeği) Karadeniz bölgesi çayırlarına yayılmış olan bir türdür ve Ankara civarından alınan örneklerde %0.55 anemonin içerdiği belirlenmiştir (Baytop, 1963). Yapraklar kersetin, kemferol flavonoidleri içerir (Webster, 1991). Çiçekler ise gossipetin 8-metileter içerir ve sarı renklidir. *In-vitro* olarak tüm bitkinin antifungal aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Aslam ve ark., 2012). Ayrıca bitki protoanemonin gibi laktonlarca zengindir ve antimikrobiyal özellikleri bilinir (Gürhan ve Ezer, 2004). İçerdiği anemonin sebebiyle seçilmiş dermofitler ve mayalara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Karagöz ve ark., 2002). Geleneksel olarak bütün halde gut, artrit ve nevralsi ağrılarında kullanılır. Tüm bitki ve özellikle bitki özü buruk tatlıdır ve ağrı kesici, antispazmodik, diyaforetik ve rubefasiyan olarak kullanılır (Aslam ve ark., 2012).

Ranunculus türleri geleneksel tıpta anti-romatizma, sıtma ve cilt kızarıklıkları için kullanılır. *R. repens* L. birkaç yıllık otsu bir bitkidir ve genellikle sürünücüdür. *R. repens* % 0.80 alkaloid, % 0.39 flavonoid, %0.5 saponin, %0.01 tanen ve %0.004 fenolik bileşik içerir (Töngel ve Ayhan, 2005). *R. repens* L. birkaç yıllık otsu bir bitkidir ve genellikle sürünücüdür. *R. repens* % 0.80 alkaloid, % 0.39 flavonoid, %0.5 saponin, %0.01 tanen ve %0.004 fenolik bileşik içerir (Mantle ve ark., 2001). Flavon glikozitleri, p-hidroksi sinamik asit, β -sitosterol, anemonin, karotenler içerdiği rapor edilmiştir (Aslam ve ark., 2012; Mantle ve ark., 2001). Yapraklar, kersetin ve kemferol flavonoidleri, viteksin ve izoviteksin flavonları içerir. Petaller ise, kersetin ve gossipetin-8 metil eter adlı flavonoidleri içerir ve çiçeğe sarı rengini verir (Webster, 1991). Asya geleneksel tıbbında örneğin, *Ranunculus* taksonları protoanemonin ve anemonin gibi maddeler ihtiva ettiklerinden dolayı romatizma, sıtma ve cilt kızarıklıkları için kullanılır (Aslam ve ark., 2012).

R. Chinensis var. *chinensis* flavonoidler (kersetin ve kemferol), alkaloidler, triterpen saponinler, protoanemonin ve ranunkulin gibi laktonlar önceden yapılan

çalışmalarda belirlenmiştir. Bitki geleneksel olarak bütün halde diyare ve parazitlere karşı kullanılır (Aslam ve ark., 2012). Çin halk tıbbında ise akut ve kronik hepatit ve peritonal ödem tedavisinde kullanılır (Zou ve ark., 2010).

R.serbicus içerdiği alkaloidlerden dolayı farklı ülkelerde halk tıbbında kullanılır. *R.serbicus*'un köklerinden kuaterner alkaloidlerinden berberin, palmitin, kolumbamin ve aporfın tip alkaloidlerden magnoflorin izole edilmiştir (Bonora ve ark., 1990).

R.hirtellus Boyle. Afganistan, Pakistan, Kuzey Hindistan ve Himalayalar'da yaygındır. Kökleri geleneksel olarak ateş düşürücü, soğutucu ve antihelmantik olarak kullanılır (Nazır ve ark., 2013; Nazır ve ark., 2014).

R. japonicus Thunb. türü skoporon, trisin, protokateşik asit, luteolin, anemonin, skopoletin, 5-hidroksi-6,7-dimetil flavon, ternatozit, 5-hidroksi-7,8-dimetil flavon içerir. *İn-vitro* olarak farelerde analjezik ve antienflamatuvar aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Aslam ve ark., 2012).

R. macrophyllus Desf. daha az çalışılan *Ranunculus* türlerinden biridir. Bu bitkinin kökleri zengin bir biyoaktif polifenol kaynağı olan yabancı bir sebzedir (Deghima ve ark., 2020).

R. arvensis (tarla düğün çiçeği) Avrupa'dan Sibirya'ya, Kuzey Batı Asya'dan Hindistan ve Himalayalara kadar geniş şekilde yaygınlık gösterir ve Mart-Nisan aylarında çiçeklenir. Flavonoid, fenol, alkaloid ve saponin yönünden zengindir (Aslam ve ark., 2012) ve ranunkulin glikozidi içerir. Geleneksel olarak yaprakları kesintili ateş, astım ve gut ağrılarında kullanılır (Töngel ve Ayhan, 2005; Aslam ve ark., 2012).

Ranunculus (buttercup) türlerinin tamamı taze yenildiğinde zehirlidir. Onların acı, keskin tatları vardır ve ihtiva ettikleri zehirli bileşiklerden dolayı ağzın kabarmasına neden olurlar; bu nedenle yenilmezler (Anonim, 2013).

Ranunculus (Düğünçiçekleri) taksonları çayırılık alanlarda çok bol miktarda bulunur ve çok az miktarda yenilebilir bitkilerin büyümesine müsaade ederler. Bu alanlarda otlayan hayvanlar çaresizlikten yerler ve bu da hayvan zehirlenmelerine neden olabilir. Hayvanlarda zehirlenmenin belirtileri kanlı ishal, aşırı tükürük salgısı, kolik ve ağızda şiddetli kabarcıklanma şeklindedir. *Ranunculus* bitkileri insanlar tarafından yenildiklerinde, ranunkulin maddesi oluşturmak için parçalanır. Protoanemoni maddesinin insanlarda da kontakt dermatite neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle *Ranunculus* bitkilerine karşı dikkatli olunmalıdır. Fakat toksinler kurutulmuş *Ranunculus* taksonlarını içeren saman güvenlidir (Anonim, 2013).

Waldst ve Kitt'in *R. pedatus* yara iyileştirme aktivitesi, metanolik özü kullanılarak değerlendirilmiş ve hem insizyon hem de eksizyon yarası hayvan modellerinde güçlü anti-inflamatuar aktivite ile yara iyileşmesi üzerinde önemli etkiler gösterdiği bulunmuştur (Akkol ve ark., 2012).

Genellikle *Ranunculus* cinsinin çoğu taksonu "küçük kurbağa" olarak bilinir. Bu isim muhtemelen *Ranunculus* türlerinin kurbağalar gibi suyun yakınında bulunmasından kaynaklanır. *Ranunculus* taksonlarının tereyağına karakteristik sarı tonunu verdiği için dair yanlış bir inanç vardır (hâlbuki inekler ve diğer hayvanlar için zehirli olduklarından tüketmezler; doğal olarak tereyağına sarı tanunu veren yedikleri *Ranunculus* bitkisi değildir) (Edsall, 1985).

Türkiye'de geleneksel tıpta, *Ranunculus* türlerinin bitkilerinin kök, ot ve çiçekleri içeren çeşitli kısımları, kabızlık, romatizma, hemoroidler, ödem, apse ve sarılık benzeri türlü hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Baytop 1999, Sezik ve ark., 2001, Ezer ve Avcı 2004, Gurhan ve Ezer 2004, Kaya ve ark., 2010).

Bu cinse ait bitkilerden bazıları halk tıbbında da tahriş edici, yara iyileştirici, adet akışını uyaran ve anne sütünü artıran özellikleri nedeniyle kullanılmıştır (Baytop 1999, Kaya vd. 2010). Ülkemizin karadeniz bölgesinin kuzeybatı kesiminde, *R. ficaria* L. subsp. *bulbifera*'nın yoğurtla karıştırıldıktan sonra salata olarak tüketildiği bildirilmiştir (Sadıkoğlu ve ark., 2000; Kaya ark., 2010).

R. constantinopolitanus DC. ülkemizde romatizmal eklem ağrılarını rahatlatmak ve anti-inflamatuar etkisi nedeniyle kullanılır (Köse ve ark., 2008; Fostok ve ark., 2009). *R. constantipolitanus* DC., Ankara'da 'evlimemed otu' adıyla bilinir ve yaprakları ağrı dindirici ve iltihap akıtıcı olarak kullanılır. Bu amaçla yaprak kısımları suyu çıkarılana kadar dövülerek, fındık kabuğu içerisinde ağrının olduğu alana iki saat boyunca konularak iltihaplı bölgenin drene olması sağlanmaktadır (Köse ve ark., 2008). *R. constantinopolitanus* DC. toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstre GC- MS ile incelendiğinde palmitik asit başta olmak üzere, oleik asit, stearik asit ve linoleik asit içerdiği saptanmıştır (Fostok ve ark., 2009).

R. ternatus kökleri Çin tıbbında tüberküloz tedavisinde kullanılır (Zhang ve ark., 2007). *R. ternatus*'un farmakolojik ve kimyasal yapısına bakıldığında, tüberküloz bakterisi üzerinde doz-etki ilişkisi olduğu belirlenmiş ve GC-MS ile incelendiğinde çoklu organik asitlerinin varlığı gösterilmiş ve bu organik asitlerin droğun antitüberküloz etkisinden sorumlu olduğu bulunmuştur (Chi ve ark., 2007).

2.6 Sekonder Metabolitler (SM)

Sekonder metabolitler, bir organizmanın normal büyüme ve gelişmesinde yer almayan organik moleküllerdir. Birincil metabolitler türün hayatta kalmasında kilit bir role sahipken, fotosentez ve solunumda aktif bir işlev görürken, ikincil metabolitlerin yokluğu ani ölümle sonuçlanmaz, daha ziyade organizmanın hayatta kalmasında genellikle önemli bir rol oynar. Bitki savunmasında rol oynar. Bu bileşikler, bitkiler, mantarlar, bakteriler, algler ve hayvanlar tarafından sentezlenen son derece çeşitli doğal ürünler grubudur. Terpenler, fenolik bileşikler ve alkaloidler gibi ikincil metabolitlerin çoğu, biyosentetik kökenlerine göre sınıflandırılır. Bu bileşiklerin farklı sınıfları genellikle bir filogenetik grup içindeki dar bir tür kümesiyle ilişkilendirilir ve çeşitli tıbbi, aromatik, renklendirici ve baharat bitkilerinde ve/veya fonksiyonel gıdalarda biyoaktif bileşiği oluşturur (Costa ve ark., 2012).

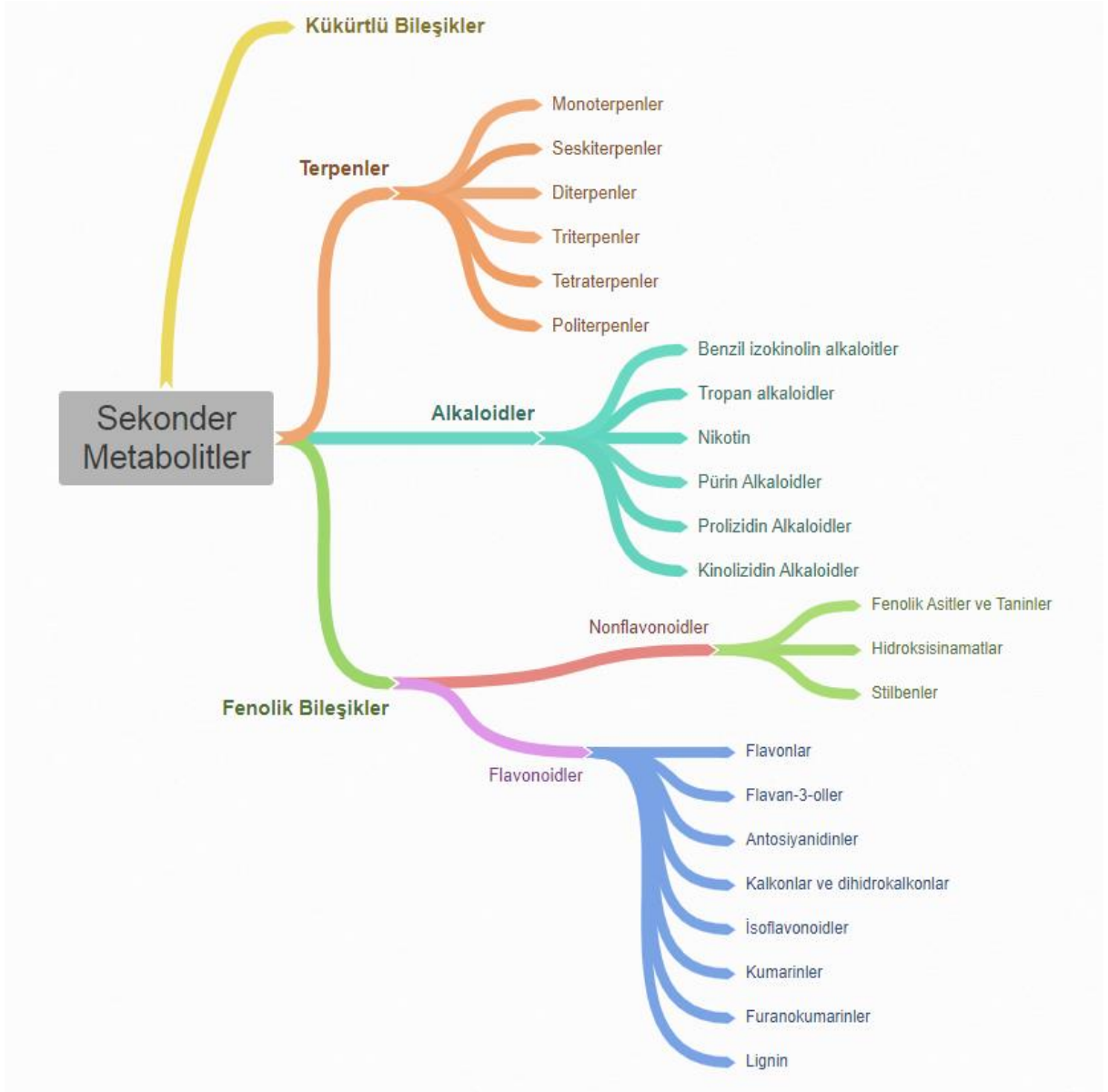
Yaklaşık 20.000'den fazla sekonder metabolit tanımlanmıştır ve bunların izolasyonu ve karakterizasyonu azalmayan bir hızla devam etmektedir. Çoğu ikincil metabolitin üretimi genetik kontrol altında olmasına rağmen, nispeten az sayıda vakada, birincil metabolik işlevler açısından oluşumlarını rasyonalize etmek için ikna edici argümanlar ileri sürülmüştür. İkincil metabolitler, üretimleri için enerji, fotosentat ve besin harcamalarının “uygun maliyet” gösterilebildiği ölçüde, bitkiler tarafından hayatta kalmak ve çoğalmak için savaşta kullanılan silahlanmanın önemli bir parçasıdır. Rollerini, üreticinin avcılara (otçullara), patojenlere veya rakiplere karşı savunması, tozlaşmaya veya tohum dağılımına yardım veya dışsal abiyotik faktörlere karşı koruma veya bunlara adaptasyon veya bu işlevlerin kombinasyonları üzerinde odaklanmasıdır (Waterman, 2007).

Genellikle bitkilerde bulunan kimyasallar birincil ve ikincil metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Birincil metabolitler; proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve vitaminler olmak üzere canlının büyümesi, metabolit fonksiyonları ve üremesi gibi hayatsal olaylarda görev alırken, ikincil metabolitler; fenolik bileşikler, terpen-steroidler, kükürt bileşikleri ve alkaloidler olmak üzere dört grupta sınıflandırılan birkaç sekonder bileşik sınıfı, anti-inflamatuar, hipoglisemik, hiponatremik ve antioksidan etkilere sahiptir. Kardiyovasküler hastalıklara ve kansere karşı korur ve birçok olumlu etkiye sahiptir. Efektif sağlık etkilerinden dolayı tıp ve eczacılık için büyük önem taşımaktadır. Birincil metabolitlerden biyosentez yoluyla üretilirler ve canlı organizmaların temel yaşamsal işlevleriyle doğrudan ilgili olmayan biyolojik süreçlerde yer alırlar. Sekonder

metabolitler hayati vücut fonksiyonlarında doğrudan bir role sahip olmasalar da sağlığın korunması ve sürdürülmesinde önemli rol oynarlar ve günümüzde birçok alanda ham madde olarak kullanılmaktadırlar (Babaoğlu ve ark., 2001).

Bazı fenolik bileşiklerin lipoprotein oksidasyonunu bloke ederek kardiyoprotektif etkileri vardır, kolesterol düşürücü etkileri vardır, ateroskleroz riskini azaltır, trombosit kümelenmesini engeller, damarsal hastalıkları iyileştirir, enflamasyon ve oksidatif stres açısından da korucudur. Lipit profili ve dolayısıyla diyabetik nöropati, diyabetik nefropati ve diyabetik retinopatiye karşı koruma sağlayabilir. Birtakım fenoliklerin, alkaloidlerin ve kanserojenlerin hasarlı hücre sinyal değişimini normalleştirerek, kanser hücresinin büyümesini ve metastatik yeteneği inhibe ederek malign transformasyonun inhibisyonuna yol açarak anti-tümör etkileri gösterilmiştir. Biyoreaktör teknolojisinin gelişmesiyle birlikte daha fazla sekonder metabolit keşfedilmiş ve bunun sonucunda bitki sekonder metabolitleri ilaç üretiminde daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Ülger ve Ayhan, 2020).

İlk olarak 1891'de tanımlanan sekonder bileşikler, kimyasal yapılarına, bileşimlerine ve belirli çözücülerdeki çözünürlüklerine göre çeşitli guruplara ayrılırsa da "British Nutrition Foundation" tarafından dört önemli grup tarafından temsil edilmektedir (Ülger ve Ayhan, 2020) (Şekil 2. 4).



Şekil 2. 4 Sekonder metabolitlerin genel sınıflandırılması

İlaç üretiminde özellikle önemli hale gelen belirli sekonder bileşik sınıfları anti-inflamatuar, hipoglisemik, hiponatremik ve antioksidan etkileri vardır. Birkaç sekonder bileşiğin de tromboz ve kansere karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir. Mevcut özellikler sebebiyle ikincil metabolitler diyabet, obezite, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik ve önemli hastalıklara karşı koruma etkisinin olduğu tahmin edilmektedir (Ülger ve Ayhan, 2020).

2.7 Antioksidanlar

Antioksidanlar, elektronlarını Reaktif oksijen türleri (ROS) gibi diğer moleküllere bağışlayabilen ve böylece proteinler veya DNA gibi biyolojik olarak önemli diğer

moleküllerden elektron almalarını engelleyen kimyasal bileşiklerdir (Dunnill ve ark., 2017). Etki mekanizmasına göre iki tip antioksidan bileşik vardır: enzimatik olmayan ve enzimatik. Enzimatik olmayan antioksidanlar, E vitamini, C vitamini, glutatyon ve flavonoidler gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Enzimatik antioksidanlar, diğerleri arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidazlar ve tioredoksin-1 ve -2'yi içerir (Rahal ve ark., 2014; Dunnill ve ark., 2017). Antioksidanlar, ROS'u H₂O ve O₂ gibi daha kararlı moleküllere dönüştürmek için karmaşık bir reaksiyon zincirini katalize eder, bu nedenle ROS temizleyicileri olarak adlandırılırlar. ROS ve antioksidan seviyelerinin modülasyonu yoluyla redoks dengesinin düzenlenmesi yeni tedaviler için bir hedeftir. Yara dokularında toksik olmayan ROS seviyelerini koruyan antioksidan maddeler iyileşmeyi hızlandırabilir (Dunnill ve ark., 2017). Bu nedenle, yara tedavisi için antioksidan bileşiklerin kullanımına olan ilgi artmaktadır ve çeşitli biyomalzemeler geliştirilmiş ve test edilmiştir (Fitzmaurice ve ark., 2011). Bununla birlikte, bu yeni bileşiklerin çoğu klinisyenler tarafından iyi bilinmemektedir ve özellikleri, iyileşme üzerindeki gerçek etkileri belirsizliğini korumaktadır.

2.7.1 Enzim yapısındaki bazı antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme sistemini tamamlamak için aerobik organizmalar enzimatik antioksidanlarla zenginleştirilirler. CAT/GPx/SOD katalitik üçlüsü olarak adlandırılan CAT, GPx ve SOD'dan oluşurlar (Drevet, 2006). Bu antioksidanlar, serbest radikal seviyelerini azaltmak için birlikte çalışırlar (Drevet, 2006; Silva, 2006).

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit dismutaz; aşağıda görülen reaksiyonunu katalize eden çeşitli metalloproteinlerdir.



Tüm organizmalarda neredeyse her yerde bulunan süperoksit dismutazlar (SOD), doğada en çok çalışılan enzim gruplarından biridir ve bakterilerden insanlara kadar çeşitli türlerde incelenmiştir. Bu enzimin, en ilkel prokaryotlar için bile savunma işlevlerine sahip olduğu ve aynı zamanda doğadaki en karmaşık organ olan insan beyninin bozulmasına kadar rol oynadığı bilinmektedir. Diğer moleküllerde olduğu gibi, enzimin yapısı ve işlevi hakkında bilgi, enzimin hem işlevini hem de işlev bozukluğunu anlamak için ipuçları sağlamaktadır (Lynch ve Kuramitsu, 2000).

Katalaz (CAT): Katalaz (CAT), 240 kilodalton (kDa) tetramerik bir proteindir. Dört benzer alt birimden oluşur ve *ctl1* gen eşlemesi ile kromozom 11.33 ile kodlanır.

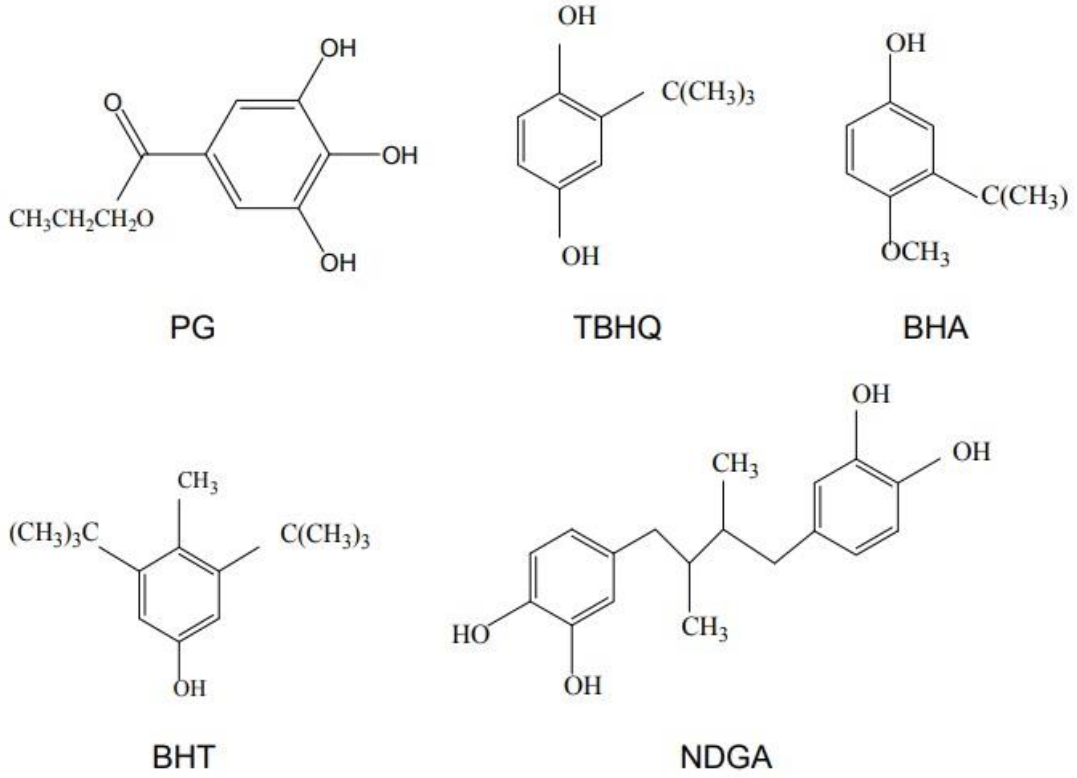
Her bir polipeptit alt biriminin ağırlığı 60 kDa'dır ve tek bir ferriprotoporfirin içermektedir (Radi ve ark., 1991). CAT, oksijeni kullanan hemen hemen tüm canlı dokularda bulunan yaygın bir antioksidan enzimdir. Enzim, bir kofaktör olarak demir veya mangan kullanır ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) su ve moleküler oksijene indirgenmesini katalize eder ve sonuç olarak SOD tarafından taklit edilen detoksifikasyon sürecini tamamlar (Chelikani ve ark., 2004). Sürekli olarak hidrojen peroksit moleküllerini araştırdığı hücrelerde bol miktarda bulunmaktadır. CAT oldukça verimlidir; bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü parçalayabilir. Enzim öncelikle peroksizomlarda bulunur, ancak memeli hücrelerinin mitokondrilerinde yoktur. Bunun tek istisnası, sıçanın kalbinde bulunan mitokondridir. Bu, hidrojen peroksitin suya ve oksijene parçalanmasının, memeli hücre mitokondrilerinde glutatyon peroksidaz olarak bilinen başka bir enzim tarafından gerçekleştirildiğini gösterir (Radi ve ark., 1991).

Glutatyon peroksidaz (GPx): Hidrojen peroksitlerini (H_2O_2) suya parçalayan önemli bir hücre içi enzimdir ve lipid peroksitleri esas olarak mitokondride ve bazen sitozolde karşılık gelen alkollerine dönüştürmektedir (Góth ve ark., 2004). Çoğu zaman aktivitesi, selenyum olarak bilinen bir mikro besin kofaktörüne bağlıdır. Bu nedenle GPX'e genellikle selenosistein peroksidaz denir. Enzim, lipid peroksidasyon sürecini inhibe etmede daha önemli bir rol oynar ve bu nedenle hücreleri oksidatif stresten korur (Gill ve Tuteja, 2010).

2.7.2 Enzim yapısında olmayan bazı antioksidanlar

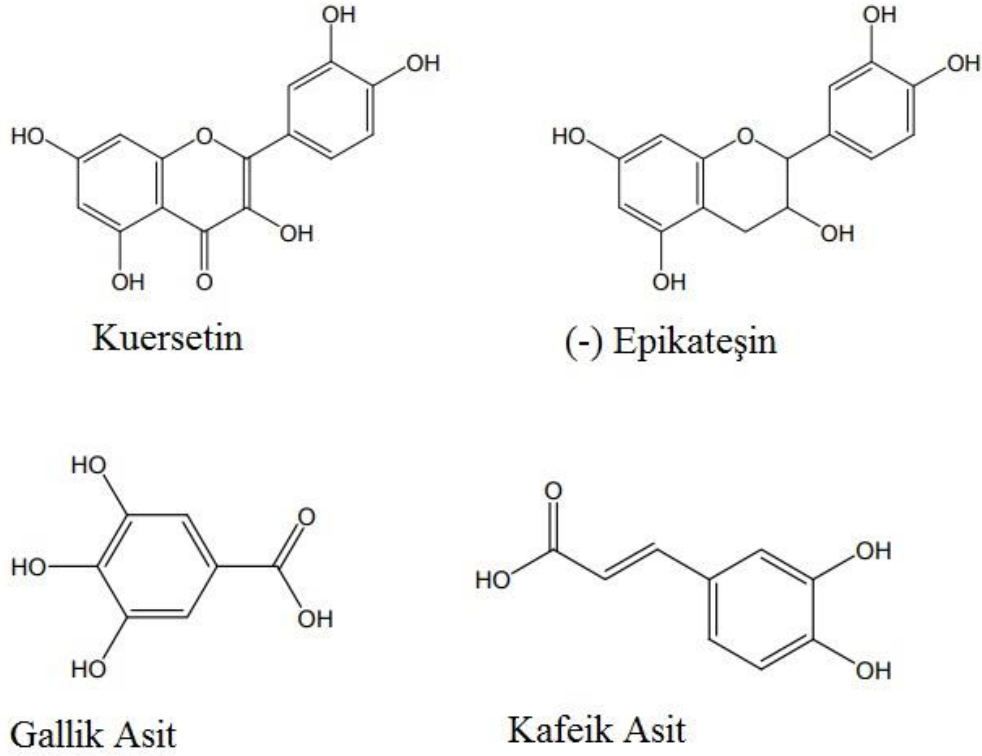
Sentetik olarak elde edilen ve doğal olan antioksidanlar olarak iki grup altında incelenen antioksidanlar, sağlıkta ve gıda sektöründe oldukça önem arz eden bileşiklerdir.

a) Sentetik Antioksidanlar: Doğal antioksidanlardan daha iyi bir antioksidan aktivite ile karakterize edilen ve daha kolay temin edilebilen birçok sentetik antioksidan, çok çeşitli gıda ürünlerinde kullanılmıştır. Bu sentetik veya kimyasal antioksidanlar arasında propil, oktil ve dodesil gallat (PG, OG ve DG), tersiyer bütill hidrokinon (TBHQ), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve nordihidroguaiaretik asit (NDGA) bulunur. Esas olarak yapıları, stabil rezonans hibritleri yoluyla düşük enerjili radikaller oluşturmalarına izin veren ve oksidasyon reaksiyonunu daha fazla ilerletmeyen fenolik bileşikler içerirler (Karovicovave Simko, 2000). Şekil 2. 5, yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanların örneklerini göstermektedir.



Şekil 2. 5 Sentetik antioksidanlar

b) Doğal Antioksidanlar: Doğal antioksidanlar, fenolik veya nitrojen türleri ve karotenoidler dahil olmak üzere çok çeşitli bileşikleri oluşturur (Hart ve Scott, 1995; Aehle ve diğerleri, 2004). Bu bileşikler, indirgeyici ajanlar, serbest radikal veya aktif oksijen tutucular (Duh, 1998) veya pro-oksidan geçiş metallerinin kompleksleştiricileri olarak işlev görebilecekleri yüksek bitkiler (sebzeler, meyveler ve çay) (Weisburger, 1999) açısından özellikle zengindir. Reaktif oksijen ara ürünlerinin seviyelerini baskırlar ve bu nedenle bitkilerin savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynarlar (Gulcin ve diğerleri, 2003; Aehle ve diğerleri, 2004). Doğal antioksidanlar ayrıca insan vücudunu serbest radikallerden koruyabilir ve gıdalardaki lipid oksidasyonunun yanı sıra birçok kronik hastalığın ilerlemesini de geciktirebilir.



Şekil 2. 6 Doğal antioksidanlar

2.8 Antioksidanların DNA Üzerindeki Etkisi

Antioksidanların vücudun biyolojik sistemindeki önemli rollerinden biri, kanser gibi bazı hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayabilen DNA dahil makromolekülleri hasardan korumaktır (Azqueta ve Collins, 2016). Önceki çalışmalar serbest radikallerin DNA'ya zarar veren çeşitli mekanizmalar olduğunu gösterse de, DNA'ya en büyük zararı veren en önemli reaksiyon fenton testidir, bu reaksiyonda üretilen hidroksil radikallerinin deoksiriboz, Pürin ve Pirimidin gibi bileşen parçalarıyla reaksiyonun neden olduğu DNA yapısında yıkıcı değişikliklere yol açar (Dizdaroğlu ve ark., 2002). Bazı çalışmaların sonuçları, polifenoller, A, C, E vitaminleri ve beta-karoten gibi antioksidan ajanların DNA hasarını azalttığını gösterse de, bunların yıkıcı etkisini ifade eden çalışmalar da bulunmaktadır (Palozza ve ark., 2001; Diao ve ark., 2006). Ayrıca, çeşitli genlerin transkripsiyonel regülasyonunda bir bozulma ile ilişkili olan DNA yıkım süreci, bazı genlerin transkripsiyonunu bloke eder ve sonuç olarak biyolojik vücut sistemdeki olağandışı değişikliklerle ilişkili olan bazı proteinlerin sentezini bozar (Köhler ve ark., 2016; Callegari, 2016). Beta-karoten, E ve C vitaminleri gibi antioksidanların DNA hasarını önlemedeki koruyucu rolü ve ayrıca kanser gibi bazı hastalıkların

patofizyolojisinde DNA'nın rolü göz önüne alındığında antioksidanların rolünün araştırılması gerekmektedir.

2.9 *In Vitro* Antioksidan Tayin Yöntemleri

Bu yöntemlerin, etkinliklerinin bir ölçüsünü sağladığı için, antioksidan bileşenlerin basitçe ölçülmesine göre faydaları vardır. *In-vitro* kapsamındaki çeşitli geleneksel ve en son yöntemlerden bazıları aşağıda başlıklar halinde verilmiştir. Uygun bir antioksidan tahlil yöntemi seçmek çok zordur. Antioksidanlar çeşitli mekanizmalarla hareket eder ve hiç kimse antioksidanın farklı etki biçimlerini yakalayamaz. Radikal süpürme etkinliğinin geleneksel küvet tahlili, geçtiğimiz birkaç yıldaki 96 oyuklu plaka titre tahlili ile değiştirilmiştir. Küvet tahlil yönteminde, absorbansı görmek için UV-Görünür spektrofotometre kullanılır, 96 kuyulu plaka yönteminde ise absorbans için ELISA plaka okuyucusu kullanılır. İlk yöntem çok meşakkatlidir ve zaman alıcı bir yöntemdir, sadece bir numunenin bir zamanı okumasına izin verir ve yüksek miktarda reaktif gerektirirken, ikinci yöntem zamandan tasarruf sağlar ve az miktarda reaktif ile bir seferde yaklaşık 96 numune okumaktadır (Badarinath ve ark., 2010).

Biyolojik numunelerin toplam anti-oksidan kapasitesini ölçmek için birkaç yöntem bilinmektedir, ancak ferriktripiridiltriazin (Fe(III)-TPTZ) kompleksinin, ferrostripiridiltriazine (Fe(II)-TPTZ) indirgenmesine bağlı olan FRAP yöntemi düşük pH'da bile iyi bir indirgeyicidir. Fe(II)-TPTZ yoğun bir mavi renge sahiptir ve 593 nm'de izlenebilmektedir (Benzie ve Strain, 1996). Orijinal olarak Benzie ve Strain tarafından insan vakaları için geliştirilmiş olan FRAP yöntemi, fitoterapide kullanmak ve şifalı bitkilerin toplam antioksidan kapasitesini ve durumunu ölçmek için uygundur (Szöllösi ve Varga, 2002). ET tabanlı bir yöntem olarak CUPRAC yöntemi; FRAP yöntemine benzer şekilde, bazı durumlarda yanıt vermeyen FRAP yönteminin aksine, önde gelen bir tiyol grubu antioksidan olan GSH ile reaksiyona girebilir. CUPRAC yöntemi antioksidan kapasiteyi hemen hemen her fizyolojik pH'da (yani pH 7) ölçer, bu nedenle bu antioksidanların fizyolojik etkisini daha iyi simüle etmektedir. Tek değerli yüklü CUPRAC kromoforu ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$), hem sulu hem de organik çözücülerde çözünür, hidrofilik ve lipofilik antioksidanların aynı anda belirlenmesini sağlayabilmektedir (Apak ve ark., 2004).

2.9.1 Total Antioksidan Aktivite Tayini

FTC (Ferrik Tiyosiyanat Yöntemi ile Total Antioksidan Aktivite Tayini) olarak da bilinen bu yöntemi, peroksitin demir klorür ile reaksiyona girdiği ve demir iyonları

oluşturduğu lipid peroksidasyonunun başlangıcındaki peroksit miktarını ölçmek için kullanılmaktadır. Ferrik iyonlar daha sonra amonyum tiyosiyanat ile reaksiyona girmekte ve kırmızı renkli bir FTC üretmektedir. Renk ne kadar koyu olursa, absorbans o kadar yüksek olmaktadır (Kikuzaki ve Nakatani, 1993).

Elde edilen ekstraksiyon örneklerinin linoleik asit peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri aşağıda belirtilen formülle hesaplanmaktadır:

$$\text{Linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu (\%)} = 100 - (A_{\text{numune}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100$$

Burada A_{kontrol} absorbansı (test edilen bileşik hariç tüm reaktifleri içerir) ve A_{numune} , test edilen bileşiğin absorbansıdır.

2.9.2 Demir (III) iyonu indirgeme yöntemi (FRAP)

FRAP yöntemi, bir test numunesindeki indirgeyici (elektron veren) antioksidanların birleşik ("toplam") antioksidan aktivitesini ölçmek için nispeten basit, hızlı ve pahalı olmayan doğrudan bir yöntemdir (Benzie & Strain 1996). Test, sinyal veya gösterge, reaksiyon olarak demir iyonlarının (Fe^{3+}) demir iyonlarına (Fe^{2+}) indirgenmesini kullanır ve bu bir renk değişimine bağlıdır. FRAP testinde çok çeşitli numune tipleri test edilebilir ve özel ekipman yolunda çok az şey gerektiren basit bir manuel versiyonda, mikrolaka okuyucu kullanan yarı otomatik bir versiyonda başarılı bir şekilde kullanılabilir ve bir biyokimyasal analizörde kullanıcı tanımlı programlar kullanılarak tam otomatik modda çalışacak şekilde uyarlanabilmektedir. Reaktifler stabildir ve düşük toksisiteye sahiptir, yöntemin duyarlılığı ve kesinliği yüksektir, reaksiyona giren antioksidanların stokiyometrik faktörleri geniş bir konsantrasyon aralığında sabittir ve test, reaksiyon koşullarındaki küçük farklılıkların sonuçları belirgin şekilde etkilemediği için sağlamdır. Ferrik indirgeme aktivitesi ve askorbik asit konsantrasyonu (FRASC) testi olarak bilinen değiştirilmiş bir versiyonda, test numunesinin hem NEAC hem de askorbik asit (C vitamini) konsantrasyonu neredeyse aynı anda ölçülebilir (Benzie & Choi 2014; Benzie & Strain 1996). Ek olarak, plazma gibi insan biyolojik sıvılarının NEAC ölçümünde olası bir karıştırıcı olan ürik asidin katkısı, ürik asit olmayan FRAP değeri sağlanarak (ürik asit konsantrasyonu biliniyorsa) basit bir hesaplama ile ortadan kaldırılabilir (Benzie & Strain 1996).

2.9.3 Bakır (II) iyonu indirgeme yöntemi (CUPRAC)

Diyet polifenolleri, C vitamini ve E vitamini için kromojenik oksidan olarak bakır(II)-neocuproin (Cu(II)-Nc) reaktifini kullanan basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite testinin uygulanması, buna CUPRAC (küprük indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi denilmektedir. Antioksidan solüsyonun (doğrudan veya asit hidrolizinden sonra) pH 7'de CuCl₂, neocuproin ve amonyum asetat solüsyonları ile karıştırılmasını ve 30 dakika sonra 450 nm'de absorbansın ölçülmesini içermektedir. Yavaş reaksiyona giren antioksidanlar, bu yöntem ile renk gelişimi için 50 °C 'de 20 dakika inkübasyon gerekmektedir (Apak ve ark., 2004).

2.9.4 Metal Şelatlama Aktivitesi

Organizmalar, kendilerini ROS'un neden olduğu oksidatif strese karşı korumak için etkili bir savunma sistemine sahiptir (Reiter ve ark., 2001). Son araştırmalar, antioksidan etkinliğinin oksidatif savunma sistemi ile ilişkili olduğunu ve kanser, ateroskleroz dahil olmak üzere farklı insan hastalıkları ve yaşlanma süreçlerinin oksidatif hasarla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Tan ve ark., 2001). Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek, serbest katalitik metalleri şelatlayarak ve ayrıca oksijen yan ürünlerini süpürücü olarak hareket ederek oksidasyon sürecine müdahale eder. Antioksidanlar, serbest radikal sonlandırıcılar ve bazen de metal şelatörler olarak işlev görmektedir (Tan ve ark., 2001; Gülçin ve ark., 2002)

O₂'nin iki elektronlu indirgenmesiyle oluşan H₂O₂ bir serbest radikal değil, oksitleyici bir ajandır. O₂ ve geçiş metal iyonlarının varlığında, H₂O₂, Fenton reaksiyonu yoluyla OH⁻ üretebilir (Halliwell ve Gutteridge. 1985). H₂O₂ membranları geçebilir ve bir dizi biyomolekül ve bileşiği yavaşça oksitleyebilir. H₂O₂, süperoksit mutasyona uğradığında ve ayrıca birçok oksidaz enzimi tarafından *in vivo* oluşturulur. Mikromolar seviyelerde H₂O₂ zayıf reaktiftir. Bununla birlikte, daha yüksek H₂O₂ seviyeleri bazı enerji üreten sistemlere saldırabilir. H₂O₂, glikolitik enzim gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenazı inaktive eder. Ayrıca H₂O₂ metal iyonlarının varlığında OH⁻ oluşturur ve oksijen bu reaksiyonu kolaylaştırır. Bu nedenle metal şelatlama ve H₂O₂ temizleme süreçleri canlı organizmalar için önemlidir (Aruoma, 1998). Şelatlama aktivitesine ait denklem aşağıda verilmiştir.

$$*\text{Şelatlama Aktivitesi (\%)} = [1 - Ae / Ak] \times 100$$

*Denklemden Ae, ekstraktların absorbans değerini ifade ederken Ak, kontrolün absorbans değerini göstermektedir.

2.9.5 DPPH radikal süpürme yöntemi

Bu yöntem, stabil bir serbest radikal α , α -difenil- β -pikrilhidrazil (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,33$) kullanılarak benzer bir şekilde antioksidan aktivitenin belirlenmesi bakış açısıyla Blois (1958) tarafından geliştirilmiştir. Tahlil, antioksidanların ona doğru süpürme kapasitesinin ölçümüne dayanmaktadır. DPPH' deki azot atomunun tek elektronu, antioksidanlardan ilgili hidrazine bir hidrojen atomu alarak indirgenir (Contreras-Guzman ve Srong 1982). DPPH, bir bütün olarak molekül üzerinde yedek elektronun delokalizasyonu sayesinde kararlı bir serbest radikal olarak karakterize edilir, böylece moleküller diğer çoğu serbest radikal gibi dimerleşmez. Delokalizasyon ayrıca, yaklaşık 520 nm'de etanol solüsyonunda bir absorpsiyon ile koyu mor renge yol açar. DPPH çözeltisi, hidrojen atomu verebilen bir madde ile karıştırıldığında, menekşe rengi kaybıyla indirgenmiş forma yol açar (Blois, 1958).

2.9.6 ABTS radikal süpürme yöntemi

ABTS yöntemi mavi yeşil ABTS radikaline (ABTS) dönüştürülmesiyle sonuçlanan, hem içeren proteinlerin peroksidaz aktivitesine dayanıyordu. Başlangıçta, bu aktivite doku örneklerinin hemoglobin içeriğini belirlemek için kullanıldı (Marklund, 1979). Bu hemoglobin tahlilinde, C vitamini gibi indirgeyici bileşikler, ABTS ile reaksiyona girerek renksiz, radikal olmayan bir ürün verdikleri için müdahale etmektedir. Bu dezavantaj, ABTS yönümlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Orijinal olarak ABTS yöntemi, metmiyoglobinin peroksidaz aktivitesi tarafından oluşturulan ABTS birikiminin antioksidanlar tarafından azaltılmasına dayanıyordu (Miller ve diğerleri, 1993). Bu tahlilin önemli bir engeli, bileşiklerin peroksidaz aktivitesini inhibe edebilmesidir (Strube ve diğerleri, 1997). Bu nedenle, tahlil önceden oluşturulmuş ABTS kullanılarak uyarlanmıştır (van den Berg ve diğerleri, 1999; Re ve diğerleri, 1999). Tahlilde, belirli bir süre sonra (genellikle 5 veya 6 dakika) temizlenen ABTS miktarını yansıtan bir bileşik tarafından ABTS'nin renginin giderilmesi, troloksunkiyle ilgilidir.

ABTS tahlili, antioksidanları sıralamak ve yapı aktivite ilişkilerinin oluşturulması için sıklıkla kullanılır. ABTS değerinin antioksidan aktivite ile tam olarak ilişkili olmadığına dair göstergeler vardır. Örneğin, krisin nispeten yüksek bir ABTS değerine sahipken, diğer birçok tahlilde antioksidan aktivitesi nispeten düşüktür (Heijnen, 2001).

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Ranunculus bitkisine ait türlerin içeriğinde bulunan maddeler dolayısıyla çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler.

Çeşitli Ranunculus türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar, triterpenoid saponinler, alkaloidler, flavonoidler, yağ asitleri ve organik asitler dâhil olmak üzere farklı ikincil metabolit gruplarına ait bileşikleri ihtiva ettiklerini göstermiştir (Markham ve ark., 1997; Marston ve ark., 2006; Tian ve ark., 2006; Chi ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2007; Liang ve ark., 2007; Kaya ve ark., 2010). Ranunculus cinsinin birkaç türünün antibakteriyel, antiviral, antimikrobiyal, antienflamatuar, antiprotozoal ve antienzim aktivitesi gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Chi ve ark., 2007; Kaya ve ark., 2010).

Akkol ve arkadaşları Türkiye’de yaptıkları bir çalışmada *R. constantinopolitanus*’un yara iyileştirici ve antienflamatuar etkilerini araştırmak amacıyla fareler üzerinde hazırladıkları *in vivo* yaralanma modelleri sonucunda *R. constantinopolitanus*’un metanol ekstresinin iyileşmede önemli bir etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca yine metanol ekstresinin iyileşme üzerinde önemli bir parametre olan iyileşen dokudaki hidrokspirolin içeriğinde önemli bir artışa sebep olduğu ve yara iyileşmesi üzerindeki esas etken olan antienflamatuar aktivite üzerine de olumlu bir etkisinin olduğu yapılan denemelerde belirlenmiştir. Bu sonuçlar bitkinin Türkiye’deki etnobotanik kullanımlarını destekler niteliktedir. Etki, *R. constantinopolitanus*’un içerdiği fenoler, terpenoitler ve flavonoitlerden kaynaklanmaktadır (Akkol ve ark., 2012). *Ranunculus*’larda yapılan önceki çalışmalarda kersetin ve kemferol gibi flavonoitlerin pek çok türde bulunduğu tespit edilmiştir (Webster, 1991).

Fostok ve arkadaşlarının Lübnan’da yaptıkları bir çalışmada *R. constantinopolitanus*’un topraküstü kısımlarının antienflamatuar aktivitesini araştırmak amacıyla interlökin (IL)-6 seviyesini enflamasyonun işareti olarak seçilmiş ve farelerin endotoksin (ET) ile uyarılmış meme epitel SCp2 hücreleri üzerindeki antienflamatuar etkisi incelenmiştir. Bunun sonucunda, metanol ekstresinin SCp2 hücrelerine karşı farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50 veya 100 g/mL) IL-6 seviyesini düşürerek antienflamatuar etkide olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresinden elde edilen fraksiyonun yağ asitleri metil esterlerine dönüştürülerek GC-MS ile incelendiğinde karışımın sırasıyla “palmitik asit, stearik asit, linoleik asit ve oleik asit” içerdiği tanımlanmıştır. Balık yağının içerdiği ω -3 yağ asitleri pentaenoik asit (EPA) ve

heksaenoik asit (DHA) içeriğinin endotoksinin ET ile uyarılmış IL-6 seviyelerini azaltma miktarı metanol ekstresi ile karşılaştırıldığında, metanol ekstresinin kısa süreli uygulamada IL-6 seviyesini düşürmede daha etkili olduğu fakat uzun süreli uygulamada balık yağının daha etkili olduğu görülmüştür (Fostok ve ark., 2009).

Antioksidan aktivite çalışmalarından biri 92 ayrı bitkiye ait total fenolik madde içerisine bakılmıştır. Finlandiya'da gerçekleştirilen bu çalışmada *R. repens*'e ait sulu metanol ekstraksiyonunun antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Marja ve ark., 1999).

R. sceleratus'un toprak üstü kısımlarından farklı fraksiyonların toplam polifenol içeriği incelenmiş ve farklı miktarlarda olsa da solventler arasında aynı genel polifenol dağılımını göstermiştir (Shahid ve ark., 2015). *R. arvensis* ve diğer türler için flavonoidler, tanenler ve terpenoidlerin varlığı rapor edilmiştir, ancak bunlar nicelleştirilmemiştir (Hachelaf ve ark., 2013; Khan ve ark., 2017).

R. repens'in metanolik ham özü için daha düşük bir verim bildirilmiştir. Aynı çalışmada, kloroform fraksiyonu ham metanolik ekstraktın %13'ünü (a/a) sunduğu bildirilmiştir (Khan ve ark., 2006). *R. ternatus*'un köklerinden hidro-etanol özütünün verimi ise Khan ve ark., bulduğu oranlara yakındır (%16, w/w) Aynı araştırma aynı zamanda sulu fraksiyon (%64,5, w/w) için karşılaştırılabilir bir verim bildirmiştir (Deng ve ark., 2013).

Mantle ve ark. çalışmasında *R. repens* L.'nin yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan metanol-su (8:2) ekstraktlarının antioksidan aktivitesi sırasıyla 0.13 ± 0.01 ve 0.12 ± 0.01 mM TE/g kuru ağırlık olarak bildirilmiştir (Mantle ve ark., 2001). Başka bir çalışmada, *R. sardous* Crantz polenin serbest radikal süpürme kapasitesinde flavonoid veya fenolik bileşenlerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Campos ve ark., 2003). Flavonoidler; *Ranunculus* türlerinden izole edilen ana bileşenler arasında yer aldığından ve bu cinste iyi taksonomik belirteçler olarak kabul edilmektedir (Prieto ve ark., 2003).

Serbest radikaller, canlı sistemde geri dönüşü olmayan oksidatif hasara neden olabilen bazı hastalıklara neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidasyon, doku hasarı, kardiyovasküler hastalıklar, iltihaplanma, genetik materyalde mutasyon, kanser ve insan nörolojik bozuklukları gibi birçok hastalığın gelişmesine ve yayılmasına yol açabilen membran protein hasarı ve DNA mutasyonu ile sonuçlanmaktadır (Azqueta ve Collins, 2016).

Bhatti ve ark. tarafından yapılan çalışmada *R. arvensis* türünün farklı ekstraktın hidrojen peroksit üzerindeki etkilerini havada, suda, insan vücudunda, bitkilerde,

mikroorganizmalarda ve yiyeceklerde doğal olarak bulunan H_2O_2 kadar düşük konsantrasyon seviyelerde olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca hızla oksijene (O_2) ve suya (H_2O) ayrılan ve lipid peroksidasyonunu başlatabilen ve DNA hasarına neden olabilen hidroksil radikalleri (OH) oluşturabileceği bildirilmiştir. *R. arvensis*'in sulu çözeltisi, hidrojen peroksite elektron bağışlayabilen ve böylece onu H_2O 'ya nötralize edebilen fenolik grupların varlığına atfedilebilen hidrojen peroksiti temizleyebileceği bildirilmiştir (Bhatti ve ark., 2015).



4. MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada *R. cornutus* DC. bitkisi; çiçekli dönemde 05.05.2022 tarihinde Doğu Anadolu, Muş, Çöğürlü Köyü mevkiinden toplandı ve Bitlis Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Murat Kurşat tarafından tür tayini yapıldı. Kimyasal işlemler ise Muş Alparslan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. *R. cornutus* DC. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan drog örneğinin ilk defa tarafımızdan kapsamlı olarak incelenmesi sebebiyle fenolik madde içeriği ve biyolojik aktivite özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda Sekonder Bileşik Tayini; LC-MS/MS yöntemi ile fenolik madde içeriği; Total antioksidan aktivite tayini, Fe⁺³ indirgeme kapasitesi tayini (FRAP), Cu⁺² indirgeme kapasitesi tayini (CUPRAC), DPPH ve ABTS radikal süpürme aktiviteleri ve Fe⁺² şelatlama aktivitesi çalışıldı. Ayrıca çalışmamızda *R. cornutus* DC. bitki ekstraktlarının DNA üzerindeki etkilerine de bakıldı.

4.1 Ekstraktların Hazırlanışı

Vejetasyon döneminde bitkiler toplandıktan sonra kurumaya bırakıldı. Tür tayini yapıldıktan sonra su ve metanol ekstraktları elde edildi. Ekstraktlar için yaklaşık 50 g bitki örneği 300 mL çözücüde çözüldü. Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı yardımı ile hazırlanan ekstraktlar süzgeç kağıdı yardımı ile süzülerek, Muş Alparslan Üniversitesi Kimya Bölümü Laboratuvarlarında liyofilize edildi. Analiz edilinceye kadar renkli şişelerde +4 °C'de muhafaza edildi.

4.1.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı
- Zorbax SB-C18 (4.6x100mm; 3.5 Mikron) kolonu ile donatılmış Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass/Mass Spectrometer, Agilent Technologies). Doğu Anadolu İleri Teknolojiler Araştırma ve Uygulama Merkezi (DAYTAM), Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- UV-Vis. Spektrofotometresi: Mikrohacim Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go) spektrofotometre Muş Alparslan Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Muş
- Etüv: Nüve EN 018 model cihaz

- Isıtıcılı Magnetik Karıştırıcı: Heildolph marka cihaz
- Elektronik Terazi: Radwak AS 220/C/2
- Rotary Evaporatör: Heidolph marka cihaz
- pH – metre (Hanna)
- Otoklav: Nüve
- Jel Elektroforez cihazı: Biorad
- Elektroforez tankı: Biorad
- Jel görüntüleme cihazı : (CemiDoc XRS Biorad)

4.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Etanol, metanol, DMSO, H₂O₂, ABTS, DPPH, Ferrozin, Neokuprin, NH₄SCN, Na₂HPO₄, K₃Fe(CN)₆, TCA, FeCl₃, CuCl₂, CH₃COONH₄ (Trikloro asetik asit), HCl, Linoleik asit Sigma-Aldrich ve Merck'ten temin edildi.

4.1.3 Kullanılan çözeltiler

4.1.3.1 Ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini

Fosfat Tamponu: 80 ml destile su içerisinde 3,17 g Na₂HPO₄ çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı. Toplam hacim 100 mililitre olacak şekilde destile su ile tamamlandı.

Linoleik asit emülsiyonunun hazırlanması: 265 µL linoleik asit 50 mL ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponuna ilave edildi. Emülgatör olarak Tween-20 ilave edilerek karışım homojenize edildi.

%3,5'luk HCl çözeltisinin hazırlanması: %37'lik HCl'den 4,73 mL alınarak 50 mL'ye destile suyla tamamlandı.

FeCl₂ çözeltisi hazırlanması: 141 mg FeCl₂.3/4H₂O, %3,5' luk HCl ile çözümlenerek hacim aynı çözeltiyle 50 mL'ye tamamlandı.

%30'luk NH₄SCN çözeltisinin hazırlanması: 6 g NH₄SCN saf suda çözüldü, hacmi 20 mL'ye tamamlandı.

4.1.3.2 Fe⁺³ indirgeme kuvveti tayini (FRAP)

Fosfat tamponunun hazırlanması: 80 mL destile su içerisinde 3,12 g Na₂HPO₄ çözüldü ve pH-metre kullanılarak pH'sı 6,6'ya ayarlandı. Toplam hacim 100 mililitre olacak şekilde destile su ile tamamlandı.

$K_3Fe(CN)_6$ çözeltisi: 1 g $K_3Fe(CN)_6$ saf suda çözdürüldü ve toplam hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

TCA çözeltisi: 5 g TCA, destile suda çözüldü ve toplam hacmi 50 mL'ye destile su ile tamamlandı.

$FeCl_3$ çözeltisi: 82,5 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ saf suda çözdürüldü ve toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

4.1.3.3 Cu^{+2} indirgeme kuvveti tayini (CUPRAC)

$CuCl_2$ çözeltisi: 25 mL saf suda 23,5 mg $CuCl_2$ maddesinin çözünmesi sonucu, 0,001 M'lık çözeltisi hazırlandı.

Etanolik neokuprin çözeltisi: 39 mg neokuprinin 25 mL etanolde çözünmesiyle $7,5 \times 10^{-3}$ M'lık etanolik neokuprin çözeltisi elde edildi.

Asetat tamponu: 2 g CH_3COONH_4 , 16 mL destile suda çözdürüldü, toplam hacim 50 mL olacak şekilde üzeri saf su ile tamamlandı ve pH'sı 6,5 olan 1 M'lık CH_3COONH_4 tamponu hazırlandı.

4.1.3.4 Fe^{+2} şelatlama aktivitesi

$FeCl_2$ çözeltisi: 0,014 g $FeCl_2 \cdot 3/4H_2O$ alındı ve 50 mL etanolde çözüldü.

Ferrozin çözeltisi: 0,0062 g ferrozin 25 mL saf etanolde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı.

4.1.3.5 DPPH· radikal giderme aktivitesi tayini

DPPH· çözeltisi: 25 mL etanolde 9,7 mg DPPH tamamen çözününceye kadar magnetik karıştırıcı ile bir gece boyunca karıştırıldı ve 10^{-3} M'lık DPPH çözeltisi hazırlandı.

4.1.3.6 ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi

Fosfat tamponunun hazırlanması (pH: 7,4): 1,42 g Na_2HPO_4 80 mL saf suda çözüldü. pH metre kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlandı. Toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

ABTS çözeltisinin hazırlanması: 22 mg ABTS 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar bir gece boyunca karıştırıldı. Toplam hacim saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.

Potasyum persülfat çözeltisinin hazırlanması: 13,25 mg $K_2O_8S_2$ 0,1 M'lık ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda tamamen çözününceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Toplam hacim safsu ile 20 mL'ye tamamlandı.

4.1.3.7 DNA koruyucu aktivite çalışmasında kullanılan çözeltiler

Agaroz jel hazırlanışı: 1 gr agaroz alınarak 100 mL TAE_{x1} tampon çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra 1-2 dakika mikrodalga fırında çözdürüldü. Soğuduktan sonra 7 µL etidyum bromür eklenip karıştırıldı. Agaroz deniz yosunundan ekstrakte edilmiştir (toksik değildir).

10 X TBE tamponu hazırlanışı: 108 g Tris bazı [tris (hidroksimetil) aminometan], 55 g borik asit, 7,5 g EDTA, disodyum tuzu, deiyonize su kullanıldı. Hazırlanan örnekler agaroz jel tankında 70 voltta 80 dk süre ile doğru akımda yürütüldü. Bu işlemler bittikten sonra son olarak 3 mL etidyum bromid ile boyanarak görüntüleme doğru ışık altında görüntüleme yapıldı.

4.2 Kullanılan Metotlar

4.2.1 LC-MS/MS Method (Sıvı Kromatografisi - Kütle - Kütle Spektrometresi)

LC-MS/MS analizleri Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu İleri Teknolojiler Araştırma ve Uygulama Merkezi (DAYTAM) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin tespiti, bir Zorbax SB-C18 (4,6x100mm; 3,5 Mikron) kolonu ile donatılmış Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass/Mass Spectrometer, Agilent Technologies) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz modu, çoklu reaksiyon izleme modudur (MRM). Mobil faz, kullanımdan önce 0,45 µm Millipore membran filtre ile süzüldü. Toplam çalışma süresi 7,0 dakikaydı. Örnek ekstraktları için enjeksiyon hacmi 5 µL idi. Mobil faz A, su (çözücü A) içinde %0,1 (h/h) formik asitten ve mobil faz B, asetonitril (çözücü B) içinde %0,1 formik asitten oluşuyordu.

4.2.2 Antioksidan özelliğinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

4.2.2.1 Ferrik tiyosiyanat metoduna göre total antioksidan aktivite tayini

R. cornutus DC'nin total antioksidan aktivite tayini tiyosiyanat metodunun (Mitsuda ve ark., 1966) küçük bir modifikasyonuna göre belirlendi. Bu metoda göre; istenilen miktarlara karşılık gelen konsantrasyonlarda stok çözelti, endorf tüplere

otomatik pipetlerle pipetlendi ve hacim tampon çözeltiyle 500 µL'ye tamamlandı. Daha sonra üzerine 500 µL linoleik asit ilave edildi. 500 µL tampon çözeltisi ve 500 µL linoleik asit karışımı kontrol amaçlı olarak kullanıldı. 37 °C'de inkübasyondan sonra, sekiz saatte bir numunelerden 20'şer µL alınarak, içerisinde 470 µL etanol bulunan ependorf tüplerin üzerine konuldu. Ardından, 20 µL Fe²⁺ çözeltisi ve 20 µL SCN⁻ çözeltisi ilave edildi. 480 µL etanol bulunan kaba 20 µL Fe²⁺ ve 20 µL SCN⁻ ilavesiyle hazırlanan çözelti kör olarak kullanıldı. Numunelerin 500 nm'deki absorbansları Mikrohacim Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go)'de köre karşı okundu. İnkübasyona, kontrolün maksimum absorbansa ulaşmasıyla son verildi.

4.2.2.2 Demir iyonlarını (Fe³⁺) indirgeme analizi (FRAP)

Ekstraktların ve standart antioksidanların Fe³⁺ indirgeme kuvveti tayini, Oyaizu yönteminin (Oyaizu, 1986), ufak bir modifikasyonuna göre yapıldı. Stok çözeltiden 15, 30 ve 45 µg/mL olacak şekilde numuneler alınarak ve deney 2 mL'lik deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 200 µL'ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 500 µL, 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 500 µL, % 1'lik potasyumferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] ilave edildikten sonra karışım inkübasyona bırakıldı (50 °C, 20 dk.). Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 500 µL, %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 500 µL alındı, üzerine 500 µL destile su ve %0,1'lik 100 µL FeCl₃ ilave edildikten sonra 700 nm'de absorbans değerleri Mikrohacim Spektrofotometre'de kaydedildi.

4.2.2.3 Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini

Numunelerin kuprik iyonu (Cu²⁺) indirgeme kapasiteleri Apak ve arkadaşlarının kullandığı Kuprak metodunun kısmi revize edilmiş bir modifikasyonuna göre yapıldı (Gülçin, 2006). Bunun için kaplara, 0,01 M'lık 0,25 mL CuCl₂ çözeltisi, aynı hacimde 7,5x10⁻³ M'lık etanolik neokuprin ve 1 M'lık asetat tamponu konuldu. Çözelti karıştırıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (15-30-45 µg/ mL) numune ve standartlar eklendi. 30 dakikalık inkübasyondan sonra absorbansları kaydedildi (450 nm).

4.2.2.4 Demir Şelatlama Aktivitesi

Ekstraktların ve standart antioksidanların (BHA, BHT ve Askorbik asit) demir şelatlama aktiviteleri önceki yöntemle göre yapıldı (Dinis ve ark., 1994). Bu işlem için 100 µL FeCl₂.4H₂O ve 70 µL distile su içeren 2 mM solüsyon 15, 30 ve 45 µg/ mL

konsantrasyonlarında numune içeren 50 µL solüsyona eklenmiştir. Distile etanol eklenerek toplam hacim 1 mL'ye tamamlandı. Reaksiyon, 50 µL 5 mM ferrozin solüsyonu eklenerek başlatıldı. Çözelti vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra çözeltilerin 562 nm'de absorbanları UV-Vis spektrofotometre (Thermo Scientific MULTISKAN GO) kullanılarak kaydedildi.

4.2.2.5 DPPH radikal süpürme aktivitesi

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi (Blois, 1958) metodunun küçük bir modifikasyonuna göre yapıldı. 1 mM'lık DPPH· çözeltisi için serbest radikal olarak kullanıldı. Deney kaplarına, farklı konsantrasyonlarda (15, 30 ve 45 µg/ µL) numuneler alınarak total hacimleri saf etanolle 600 µL'ye tamamlandı. 200 µL DPPH· çözeltisinden eklendi. 30 dakika inkübasyondan sonra Mikrohacim Spektrofotometre kullanılarak 517 nm'de absorbanları, etil alkolden oluşan köre karşı kaydedildi.

4.2.2.6 ABTS⁺ radikal süpürme aktivitesi

Bu metot, renkli ABTS⁺ katyon radikalini ektre ile muamele edilmesi sonucunda renk değiştirmesi esasına dayanır (Re ve ark., 1999). ABTS⁺ katyon radikali, ABTS (2 mmol/L 1) çözeltisi ile 2,45 mmol/L-1 potasyum persülfat (K₂S₂O₈) çözeltisinin karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 14 saat inkübasyonu ile hazırlandı. ABTS⁺ katyon radikalini kullanmadan önce, radikal çözeltisi 734 nm'de 0,750 ± 0,025'lik bir absorban elde edene kadar sodyum fosfat tamponu (0,1 mol/L 1, pH 7,4) ile seyreltildi. Daha sonra ekstresi hazırlanan stok çözeltilerinden 15, 30, 45 µL alınarak üzerine hacimleri saf su ile 100 µL'ye tamamlandı. Üzerlerine hazırlanan 1 mL ABTS⁺ çözeltisi eklenerek vortekslendi. 734 nm'de radikal giderme aktivitesi ölçüldü.

4.2.3 DNA üzerindeki etkide kullanılan yöntemler

R. cornutus DC'nin DNA üzerindeki olası etkisi pBR322 plazmid DNA kullanılarak agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlendi (Siddall ve ark., 2002). Bu amaçla 10 mg madde örneği 1 mL DMSO'da çözülerek ana stok maddeler hazırlandı. Bu stoklar seyreltilerek 1, 0,5 ve 0,25 mg/mL konsantrasyonlarına sahip maddeler kullanıldı. 16 tane PCR tüpüne sırasıyla miktarları; 1. pBR322 DNA (50 ng) 10 µL, Hidrojen peroksit (H₂O₂) 5 µL, 3. DMSO 10 µL ve 4. *R. cornutus* DC. konsantreleri ile toplamda 25 µL'ye tamamlanacak şekilde hazırlandı. H₂O₂ eklenmeyen tüpleri 25 µL'ye tamamlamak için 5 µL deiyonize saf su kullanıldı.

1. DNA
2. DNA+ H₂O₂
3. DNA+ H₂O₂+ DMSO
4. DNA + DMSO
5. DNA+ RcEks (H₂O) (0.25 mg/mL)
6. DNA+ RcEks (H₂O) (0.5 mg/mL)
7. DNA+ RcEks (H₂O) (1 mg/mL)
8. DNA+ H₂O₂+RcEks (H₂O) (0.25 mg/mL)
9. DNA+ H₂O₂+RcEks (H₂O) (0.5 mg/mL)
10. DNA+ H₂O₂+RcEks (H₂O) (1 mg/mL)
11. DNA+ RcEks (MeOH) (0.25 mg/mL)
12. DNA+ RcEks (MeOH) (0.5 mg/mL)
13. DNA+ RcEks (MeOH) (1 mg/mL)
14. DNA+ H₂O₂+RcEks (MeOH) (0.25 mg/mL)
15. DNA+ H₂O₂+RcEks (MeOH) (0.5 mg/mL)
16. DNA+ H₂O₂+RcEks (MeOH) (1 mg/mL)

Her örneğin DNA üzerindeki etkisi agaroz jel elektroforezi yardımıyla belirlendi. PCR tüpleri karanlık ortamda inkübe edildi (37 °C’de 24 saat). İnkübasyondan sonra DNA karışımının 5 µL’si yükleme tamponu ile karıştırılarak %1’lik agaroz jele yüklendi (Şekil 5. 2). Daha sonra TBE tamponu içerisinde 40 V’ta, 2-3 saat boyunca elektroforez yapıldı. Elektroforezden sonra jeller etidyum bromid ile boyandı ve jel fotoğrafları CemiDoc XRS BIORAD görüntüleme cihazı yardımıyla görüntülendi.

4.3 İstatistiksel Analiz

Tüm testler 3 defa tekrarlandı. FRAP ve CUPRAC sonuçları g ekstrakttaki µM Troloks eşdeğeri (µM TE/g Ekstrakt) olarak hesaplandı. Diğer testlerde hem ekstrakt hemde standartlar (total antioksidan, demir şelatlama, DPPH ve ABTS radikal giderme aktiviteleri)’in sonuçları % radikal giderme olarak hesaplanarak standartlar ve ekstrakt sonuçları kıyaslandı. Daha sonra sonuçların IC₅₀ değeri hesaplandı. Tüm karşılaştırmalar “One-way ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparisons” testi kullanılarak yapıldı ve değerler ortalama ± standart hata (Mean±Standard Deviation) olarak verildi. BHA standartına karşı kıyaslamada “●” simgesi, BHT standardına karşı kıyaslamada “■” simgesi, ve askorbik asit (AA)’e karşı kıyaslamada “◆” simgesi anlamlılık dereceleri olarak kullanıldı ve anlamlı şekilde değişmeyen kıyaslama sonuçları “ns” olarak ifade

edildi. Buna göre bir simge (● yada ■ yada ◆) anlamlı, iki simge (●● yada ■■ veya ◆◆) çok anlamlı, üç simge (●●● yada ■■■ veya ◆◆◆) yüksek derecede anlamlı olarak ifade edildi.



5. BULGULAR ve TARTIŞMA

Gıda, ilaç ve tıbbi amaçlı kullanılan bitkilerin veya bunlardan saflaştırılmış olan biyo-aktif maddelerin biyolojik aktivitelerini ortaya koymak açısından yoğun olarak antioksidan tayin metotları kullanılmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan metotlar şunlardır; Total Antioksidan Aktivite Tayini, FRAP, CUPRAC, Demir şelatlama kapasitesi, DPPH^{*}, ABTS⁺⁺ (Gülçin 2006). Bu çalışmada da mevcut metotlar kullanıldı ve bulgular BHA, BHT, AA ve troloks gibi antioksidan aktiviteleri bilinen standart antioksidanlar ile karşılaştırıldı.

R. cornutus DC. bitkisinin liyofilize su ekstresinin fenolik asit içeriğinin belirlenmesi ise LC-MS/MS analiz metoduna göre yapıldı. *R. cornutus* DC.'nin liyofilize su ekstresinde bulunan fenolik madde bileşenlerinin miktarları µg/L ekstre olarak hesaplandı.

5.1. Fenolik madde tayini

LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen *R. cornutus* DC.'nin fenolik bileşik kompozisyonu standart olarak tanıtılan fenoliklerle değerlendirildi. Çizelge 5. 1'de görüldüğü gibi fumarik asit (3261,43 µg/L), vanilik asit (1217,70 µg/L), ferulik asit (769,40 µg/L), kafeik asit (509,10 µg/L), klorojenik asit (311,90 µg/L) ve p-Kumarik Asit (136,60 µg/L) miktarı diğerlerine (Sinapik Asit, Siyanidin-3-O-Glukozit, Kinik Asit, Rozmarinik Asit vd.) nazaran daha yüksek çıktığı tespit edildi.

Bhatti ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada *R. arvensis* bitkisinin metanol ekstraktında kafeik asitlerin (%0.017) varlığını göstermişlerdir. Ayrıca metanol ekstraktına kıyasla metanol:su ekstraktında daha az miktarda kafeik asit (%0.008) tespit etmişlerdir (Bhatti ve ark., 2015). Önceki çalışmalara baktığımızda; *R. peltatus* özütlerinde kuersetin-7-O-glukozit ve rutin varlığını göstermiştir (Prieto ve ark., 2008).

Noor ve ark. tarafından *R. repens*'ten birçok flavonoid ve fenolik rapor etmiştir (Noor ve ark., 2006). Campos ve ark. tarafından 1996 yılında yapılan bir başka çalışmada *R. sardous* Crantz türüne ait polenlerin fenolik profilleri incelenmiş, analiz edilen tüm polenlerin flavonol glikozitler, genellikle kersetin, kaempferol, herbasetin veya isorhamnetin türevleri içerdiği ve bazılarının genellikle glikozitler olarak temsil edilmeyen aglikon türleri olan mirisetin, trisetin, luteolin ve 3-O-metilkuersetin içerdiği ifade edilmiştir. Bazı polenlerde önemli seviyelerde fenolik asit türevleri de tespit edilmiştir (Campos ve ark., 1996).

Çizelge 5. 1 *R. cornutus* DC. fitokimyasal fenolik bileşik içeriğinin LC-MS/MS yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmesi

Standart Bileşikler	RT	Konsantrasyon (µg L ⁻¹)
4-OH-Benzoik Asit	11,269	33,8778
Apigenin	14,033	ND
Ellajik Asit	12,073	ND
Epigallokatekin Galat	11,518	ND
Epikateşin	11,233	ND
Ferulik Asit	12,571	769,4048
Fumarik Asit	3,597	3261,4255
Galanjin	15,672	ND
Gallik Asit	5,451	ND
Hesperidin	11,937	26,9232
İzorhamnetin	14,160	ND
Kafeik Asit	11,571	509,1006
Kateşin	11,174	ND
Kerasiyanin Klorür	10,385	0,5261
Kinik Asit	2,390	36,3593
Klorojenik Asit	10,896	311,8981
Krizin	15,586	ND
Kuersetin	13,494	ND
Kurkumin	15,682	ND
Luteolin	13,423	ND
Mirisetin	12,753	ND
Naringenin	14,062	ND
Naringin	11,909	ND
Peonidin-3-O-Glukozit	11,039	9,3682
Pirogalol	6,570	ND
p-Kumarik Asit	12,312	136,5990
Resveratrol	13,107	10,6104
Rozmarinik Asit	12,520	35,0895
Sinapik Asit	12,367	50,1630
Sirinjik Asit	11,657	ND
Siyanidin-3-O-Glukozit	10,706	38,8923
Taksifolin	12,391	ND
Vanilik Asit	11,877	1217,7027
Vanilin	12,617	11,3878
Viteksin	11,736	ND

N.D.;Tespit edilemedi, RT; Alıkonma zamanı, µg; Mikro gram, L; Litre

Wang ve ark. yaptıkları çalışmada ise *R. japonicus* türüne ait ekstaktın LS-MS fenolik madde tayini sonuçlarına göre sırasıyla Şaftosit, Apigenin-7-O- β -D-glukozit, Yangonin, Luteolin-7-O- β -D-glukozit ve Berberin bileşikleri içerdiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2021). Deghima ve ark. tarafından yapılan çalışmada etil asetat fraksiyonunun kılcal LC-DAD ve LC-MS/MS analizi, yüksek miktarlarda gallik asit (9.3 ± 0.6 mg/g d.e), dihidroksibenzoik asit (8.1 ± 0.2 mg/g d.e) ve hesperidin (5.9 ± 0.6 mg/g) ortaya çıkardığını göstermektedir. Bu kadar yüksek miktarda polifenol ve güçlü antioksidan aktivite ile *R. macrophyllus* Desf. bitkisinin kökleri, farmasötik ve nutrasötik endüstrilerinde potansiyel bir kullanıma sahip olabileceği ifade edilmiştir (Deghima ve ark., 2020). Çalışmamızda elde edilen fenolik bileşik kompozisyonunun diğer çalışmalarla kıyaslandığında bazı ortak fenolik bileşikler içerdiği ancak bu konuda *R. cornutus* DC.'ye ait herhangi bir kaynak mevcut olmadığından farklı bileşik sonuçlarının elde edilmesinin sebebi tür farkı veya bitkinin coğrafik iklim koşullarında ki farklılıklar olarak yorumlanabilir.

5.2. Antioksidan Aktivite Tayini

Ekstraktların antoksidan aktivite tayini için farklı *in vitro* metotlar kullanıldı. FRAP ve CUPRAC sonuçları $\mu\text{g TE/ mL}$ olarak hesaplanırken, diğer sonuçlar IC_{50} değeri alınarak hesaplandı (Çizelge 5.2).

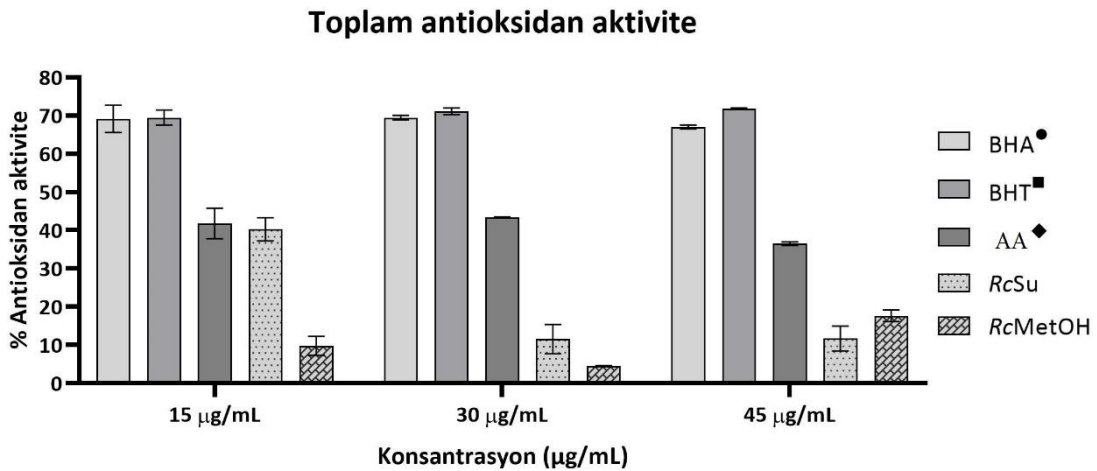
Çizelge 5. 2 Ekstrakt ve standartların antioksidan aktivite sonuçları

Numune	Total antioksidan aktivite (IC_{50}) (%)	FRAP ($\mu\text{g TE/mL}$)	CUPRAC ($\mu\text{g TE/ mL}$)	Fe-Şelatlama (IC_{50}) (%)	DPPH (IC_{50}) (%)	ABTS (IC_{50}) (%)
Rc-Su	106,79 \pm 0,12	5,03 \pm 0,01	6,21 \pm 0,01	124,1 \pm 1,98	152,67 \pm 0,06	155,23 \pm 0,22
Rc-MetOH	146,41 \pm 0,04	6,01 \pm 0,02	7,88 \pm 0,01	128,2 \pm 0,77	121,24 \pm 0,02	125,43 \pm 0,15
BHA	26,13 \pm 0,02	90,34 \pm 0,01	101,47 \pm 0,03	38,29 \pm 0,81	20,14 \pm 0,01	18,29 \pm 0,08
BHT	24,96 \pm 0,02	18,16 \pm 0,01	72,81 \pm 0,04	38,1 \pm 0,43	26,86 \pm 0,04	24,65 \pm 0,02
AA	46,72 \pm 0,01	38,71 \pm 0,02	21,33 \pm 0,01	32,41 \pm 0,91	19,4 \pm 0,01	20,19 \pm 0,03

5.2.1. Total antioksidan aktivite

Çalışmada kullandığımız *R. cornutus* DC. elde edilen su ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktivitesi ferrik tiyosiyanat metoduna göre belirlendi. *R. cornutus* DC.'den elde edilen su ve metanol ekstrelerinin toplam antioksidan aktivite tayini için sırasıyla 15, 30 ve 45 $\mu\text{g/ mL}$ konsantrasyonları kullanıldı. (Şekil 5. 2). Şekilde de görüldüğü gibi *R.*

cornutus DC.'den elde edilen su ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi, artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır.



BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen, AA: askorbik asit; RcSu: *R. cornutus* DC. su çözeltisi; RcMetOH: *R. cornutus* DC. metanol çözeltisi

Şekil 5. 1 Ekstrakt ve standart antioksidanların lipit peroksidasyonu giderme aktiviteleri

Numunelerin lipit peroksitlerini süpürme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Lipit peroksitlerini giderme (\%)} = 100 - \left(\frac{A_e}{A_k} \times 100 \right)$$

Denklemden Ae, ekstraktların absorbans değerini ifade ederken, Ak, kontrolün absorbans değerini göstermektedir.

Total antioksidan sonuçlarına göre standart antioksidanların lipit peroksitlerini daha iyi süpürdüğü, bununla birlikte numunelerin genel olarak konsantrasyon artışına bağlı olarak aktivitelerinin arttığı görüldü. Ayrıca su ekstraktının (IC₅₀:106,79) metanol ekstraktından (IC₅₀:146,41) daha güçlü aktivite sergilediği belirlendi. Numunelerin lipit peroksitlerini giderme güçleri sırasıyla şu şekilde gerçekleşti: BHT (IC₅₀: 24,96 mg/mL) > BHA (IC₅₀: 26,13 mg/mL) > AA (IC₅₀: 46,72 mg/mL) > RcSu (IC₅₀: 106,79 mg/mL) > RcMet (IC₅₀: 146,41 mg/mL) (Şekil 5. 1).

Bhatti ve ark. 2015 yılında yayımladıkları çalışmada *R. arvensis* ekstraktları arasında, toplam flavonoid içeriği tahmini, kloroform ekstraktı dışında flavonoidlerin varlığını ortaya çıkarmışlardır. Çalışmada metanol ekstraktı önemli miktarda flavonoid bulunurken (6,00 ± 0,02 mg RE/g), karşılaştırmalı miktar olan metanol:su ekstraktında (5,72 ± 0,01 mg RE/g) ve su ekstraktında ise (2,19 ± 0,01 mg RE/g) nispeten diğerlerine göre daha az miktarda flavonoid tespit edilmiştir (Bhatti ve ark., 2015). Bir başka çalışma da daha önce, numune renginin değişmesiyle *R. arvensis*'te flavonoidlerin mevcut

olduğunu göstermiştir (Hachelaf ve ark., 2013). Marja ve ark., Finlandiya’da yaptıkları bir çalışmada 92 farklı bitki türünün total fenolik madde içeriğine bakılmış ve bu bitkilerden biri olan *R. repens*’in sulu metanol ekstresinin daha fazla antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Marja ve ark., 1999).

Yapılan bir başka çalışmada *R. sceleratus* bitkisinin etil asetat çözeltilisinin, diğer çözeltilere kıyasla en yüksek toplam antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir. n-Butanol çözeltilisinin iyi bir toplam antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Kloroform çözeltisi orta düzeyde aktivite gösterirken n-heksan çözeltisi ve sulu çözeltisinin iyi aktivite göstermediği ifade edilmiştir. Sonuçların, toplam antioksidan aktivitesi olarak bulunan bir referans standardı olan bütillenmiş hidroksil-toluen (BHT) ile karşılaştırıldığı belirtilmiştir (Shadid ve ark., 2015).

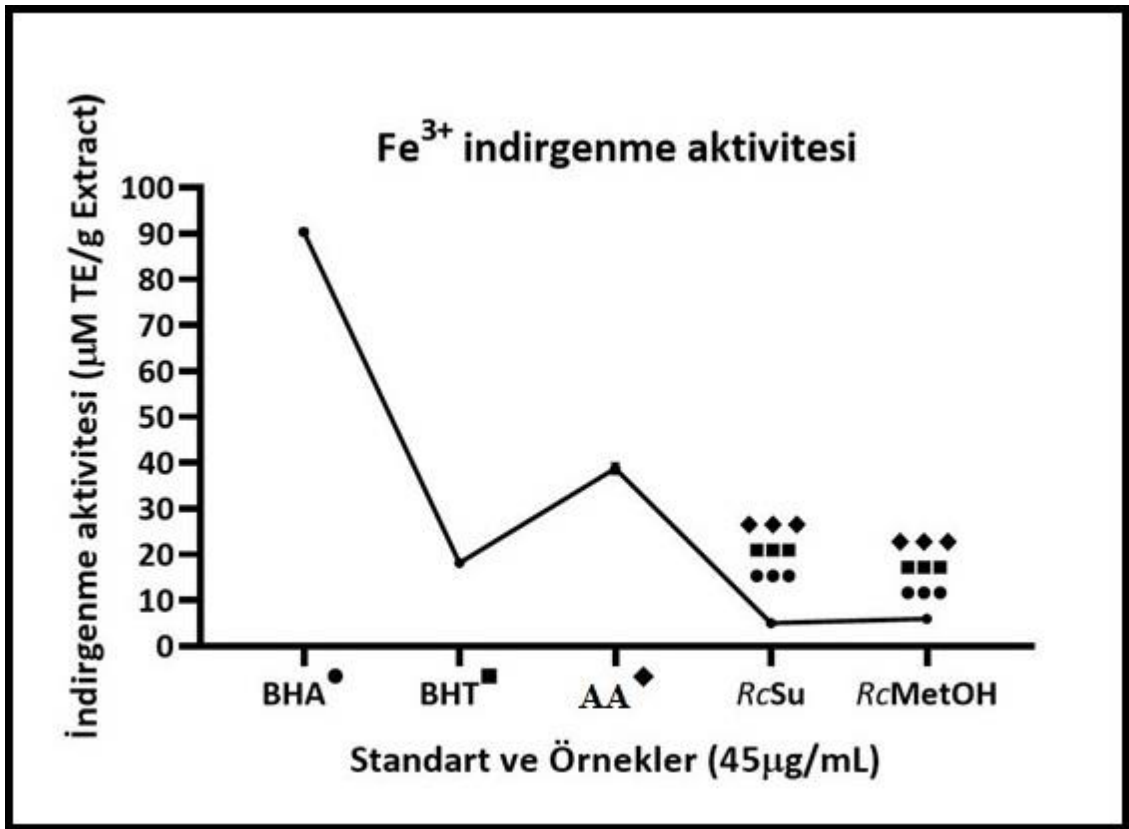
Farklı çözeltilerin toplam antioksidan kapasitesi ve değerlendirilen standart bileşikler, diğer çözeltilere kıyasla en güçlü toplam antioksidan kapasitesini (361 ± 1) mg AAE/mg (d.e) sergileyen etil asetat çözeltisidir. Hem kloroform hem de heksan çözeltileri, sırasıyla (210 ± 9) ve (154 ± 6) mg AAE/mg (d.e) ile orta düzeyde total antioksidan aktivite göstermiş; butanolik çözeltisi (93 ± 2) mg AAE/mg (d.e) ve sulu çözeltisi (84 ± 4) mg AAE/mg (d.e) en düşük aktiviteyi göstermiştir. Etil asetat aktivitesi, BHA (284 ± 2) mg AAE/mg (d.e) ve kersetin (243 ± 8) mg AAE/mg (d.e) standart bileşiklerinden önemli ölçüde daha yüksekti. BHT (353 ± 6) mg AAE/mg (d.e)'ye benzer, ancak yine de gallik asit aktivitesinden (737 ± 2) mg AAE/mg (d.e) daha düşük olarak ölçülmüştür. Ek olarak, bu testte, gallik asit, sentetik antioksidanlardan daha yüksek toplam antioksidan kapasiteye sahipken, kersetin, BHA ve BHT'den daha düşük toplam antioksidan kapasite göstermiştir (Deghima ve ark., 2020). Daha önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da su ekstraktının diğer ekstraktlardan daha güçlü aktivite gösterdiği belirlendi. Bu yönüyle bu çalışma önceki çalışmaları desteklemektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçların önceki çalışmalardan farklı olmasının nedenleri olarak tür farklılığı, iklim şartları, coğrafi koşulların farklı olması ve kullanılan çözücülerin farklı olması olarak yorumlanabilir. Fenolik içerik sonuçlarına göre bu bitkinin fenolik madde bakımından zengin olmadığı göz önünde bulundurulduğunda antioksidan sonuçların standartlara göre daha düşük olmasının sebebi anlaşılabilir.

5.2.2. FRAP demir iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme analizi

Demir iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme analizi (FRAP) bir elektron transferi olarak tanımlanabilir. Bir numunede bulunan indirgeyicileri (antioksidanlar) bir

spektrofotometrik redoks reaksiyonu temelinde ölçen elektron transferine dayalı bir deney olarak tanımlanabilir. (Huang ve diğerleri, 2005). Ek olarak, bu elektron verme yeteneği, polifenollerin E vitamini gibi diğer oksitlenmiş antioksidanları yenilemesine veya onarmasına izin verebilmektedir (Shahidi ve diğerleri, 1992).

Ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ekstre miktarına yani konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. İndirgeme kuvveti her bir bitki ekstresi için 15, 30 ve 45 µg'larının içinde bulunduğu test çözeltilerinin 700 nm'de absorbanslarının ölçülmesiyle belirlendi (Şekil 5. 2).



BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen, AA: askorbik asit; RcSu: *R. cornutus* DC. su çözeltisi; RcMetOH: *R. cornutus* DC. metanol çözeltisi

Şekil 5. 2 *R. cornutus* DC. ekstraktlarının Fe^{3+} iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla (BHA, BHT ve AA) kıyaslanması

FRAP Fe^{+3} indirgenme aktivitesi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA, BHT ve AA'nın radikalleri ekstraktlara göre daha güçlü indirgediği görüldü. Tabloya göre en iyi etkiyi BHA (IC_{50} : 90,34 mg/mL) sergilerken, BHA'yı sırasıyla AA (IC_{50} : 38,71 mg/mL), BHT (IC_{50} : 18,16 mg/mL), RcMetOH (IC_{50} : 6,01 mg/mL) ve RcSu (IC_{50} : 5,03 mg/mL) izledi (Şekil 5. 2).

Shahid ve ark. *R. sceleratus* üzerinde yaptıkları çalışmada bitkinin FRAP değerleri hesaplanmış ve tüm ekstaktlar arasında etil asetatta çözültisinin en yüksek FRAP değerini ($238,5 \pm 1,1$ TE μM) gösterdiği bildirilmiştir. n-bütanolde çözünen ekstakt ve kloroformda çözünen ekstakt tarafından sergilenen FRAP değerleri sırasıyla $148 \pm 0,9$ TE μM ve $158,5 \pm 1,1$ TE μM iken sulu ekstakt çözültisi ve n-hekzan çözültisinin zayıf olduğu tespit edilmiştir (Shahid ve ark., 2015).

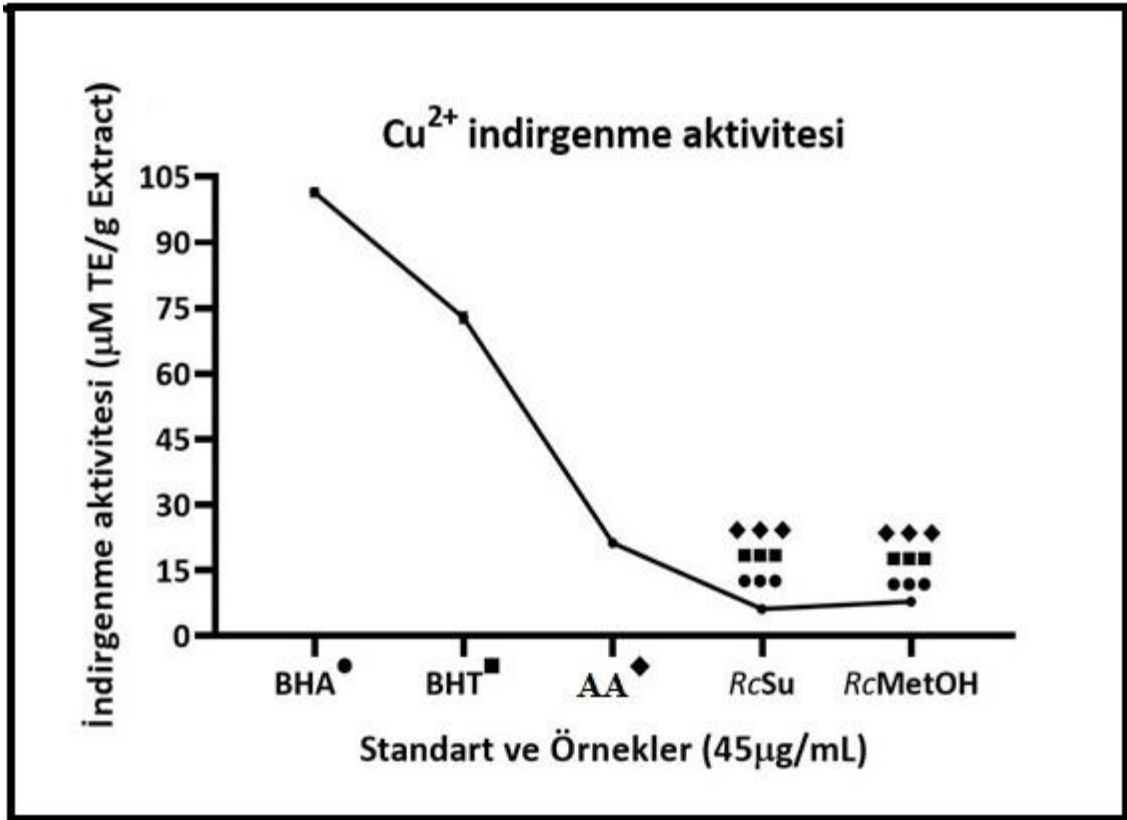
R. sceleratus hidroalkolik özütünün antioksidan aktivitesinin IC_{50} değerleri şunlardı: 103 μM ET/100 mL özü (FRAP). *R. sceleratus* gliserol-etanol özütünün antioksidan aktivitesi ise: 60 μM ET/100 mL özü (FRAP) (Neag ve ark., 2017).

Yapılan bir başka çalışmada *R. macrophyllus* Desf. bitki çözültilerinin tahmini indirgeme gücü (FRAP) incelenen tüm çözültiiler arasında Etil Asetat çözültisi ile karşılaştırılabilir (310 ± 2 mg) AAE/mg (d.e) FRAP değeriyle en iyi indirgeme gücünü göstermiştir. BHT'nin indirgeme gücü değerine kadar ve analiz edilen diğer çözültiiler için belirlenenlerden önemli ölçüde yüksektir. Kloroform çözültisi orta düzeyde indirgeme gücü ($53,2 \pm 0,5$) mg AAE/mg (d.e) sergilerken, kalan çözültiilerin indirgeme gücü ($21,7 \pm 0,1$) mg AAE/mg (d.e)'yi geçmemiştir. Referans standartları, gallik asit için kayıtlı bir maksimum değer (1129 ± 5) ve BHA (435 ± 4) mg AAE/mg (d.e) için bir minimum değer ile bitki çözültiilerinden daha yüksek aktivite sergilemiştir. Ayrıca, standart saf bileşikler (kersetin ve gallik asit), sentetik bileşiklerden (BHA ve BHT) daha üstün indirgeme gücü göstermiştir.

Bu nedenle, diğer çalışmalar tarafından bildirilen sonuçlarla tam bir uyum içinde olan, bitki fraksiyonlarının indirgeme gücünden sorumlu ana bileşiklerin polifenoller olduğu varsayılabilir (Zhang ve ark., 2013; Aklima ve ark., 2014).

Daha önce yapılmış benzer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da su ekstraktının diğer ekstraktlardan daha düşük Fe^{+3} indirgeme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bu yönüyle bu çalışma önceki çalışmaları desteklemektedir.

5.2.3. Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini (CUPRAC)



BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen, AA: askorbik asit; RcSu: *R. cornutus* DC. su çözeltisi; RcMetOH: *R. cornutus* DC. metanol çözeltisi

Şekil 5. 3 *R. cornutus* DC. ekstraktlarının Cu²⁺ indirgeme aktivitesi

Kuprak metoduna göre indirgeme kuvveti tayini sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA, BHT ve AA'nın radikalleri ekstraktlara göre daha güçlü süpürdüğü görüldü. Tabloya göre en iyi etkiyi BHA (IC₅₀: 101,47 mg/mL) sergilerken, BHA'yı sırasıyla BHT (IC₅₀: 72,81 mg/mL), AA (IC₅₀: 21,33 mg/mL), RcMetOH (IC₅₀: 7,88 mg/mL) ve RcSu (IC₅₀: 6,21 mg/mL) izledi (Şekil 5. 3).

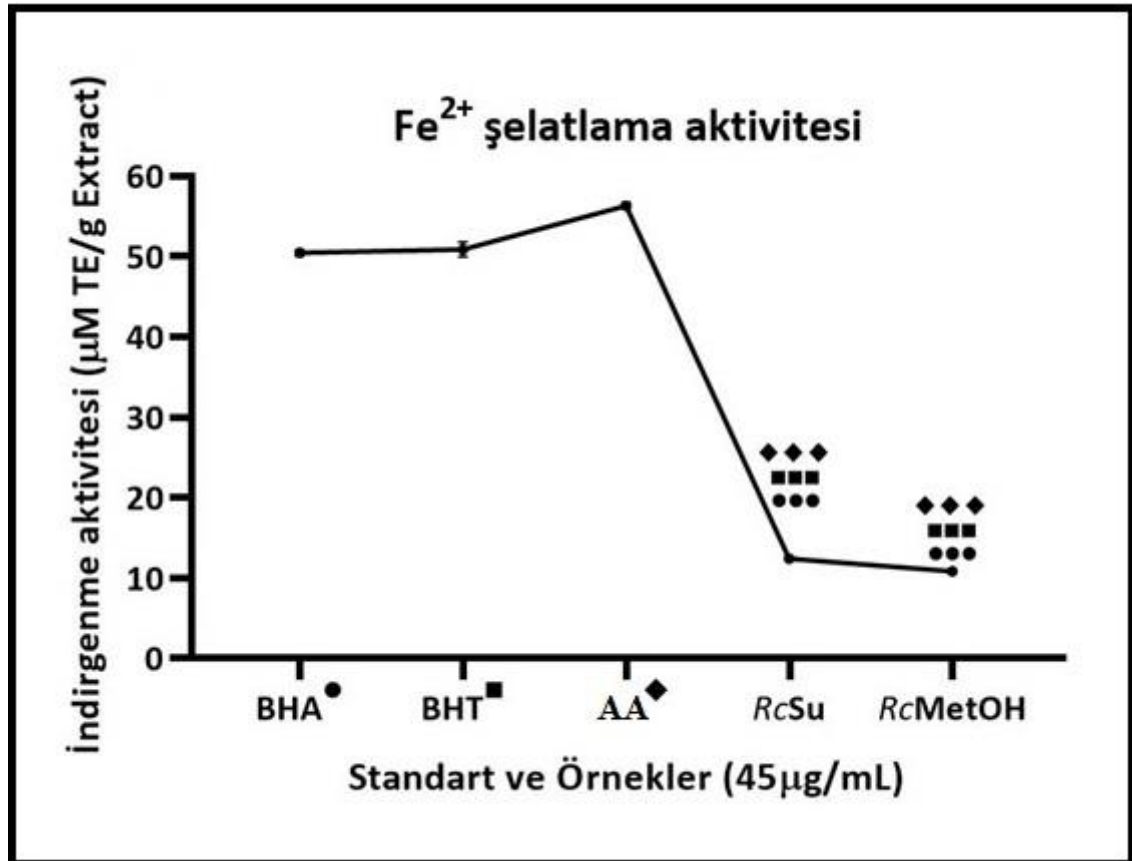
R. sceleratus hidroalkolik özütünün antioksidan aktivitesinin IC₅₀ değerleri şunlardı: 61 uM ET/100 mL özü (CUPRAC). *R. sceleratus* gliserol-etanol özütünün antioksidan aktivitesi ise: 49 uM ET/100 mL özü (CUPRAC) (Neag ve ark., 2017).

Say ve ark., *R. constantinopolitanus* bitkisinin antioksidan kapasitesini azaltan bakır iyonu (CUPRAC) Apak ve ark. tarafından belirtildiği gibi belirli değişikliklerle, Cu (II) indirgeme kuvveti analiz edilmiştir (Apak ve ark., 2004). *R. constantinopolitanus* özütü çözeltilerinin antioksidan aktivitesinin EC₅₀ değerleri sırasıyla; hekzan: 0,082 ± 0,049 mgTEAC/mL, etil asetat: 1,032 ± 0,126 mgTEAC/mL, metanol: 2,260 ± 0,150

mgTEAC/mL, su: $0,981 \pm 0,020$ mgTEAC/mL ve Troloks: $0,045 \pm 0,010$ mgTEAC/mL (Say ve ark., 2022).

Daha önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da su ekstraktının diğer ekstraktlardan daha düşük Cu^{2+} indirgeme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bu yönüyle bu çalışma önceki çalışmaları desteklemektedir.

5.2.4. Demir şelatlama aktivitesi



BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen, AA: askorbik asit; RcSu: *R. cornutus* DC. su çözeltisi; RcMetOH: *R. cornutus* DC. metanol çözeltisi

Şekil 5.4 *R. cornutus* DC. ekstraktlarının Fe^{2+} şelatlama aktivitesi

Demir şelatlama aktivitesi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA, BHT ve AA'nın radikalleri ekstraktlara göre daha güçlü demir şelatladığı saptanmıştır. Çizelge 5.2'ye göre en iyi etkiyi AA (IC_{50} : 32,41 mg/mL) sergilerken, AA'yı sırasıyla BHT (IC_{50} : 38,1 mg/mL), BHA (IC_{50} : 38,29 mg/mL), RcSu (IC_{50} : 124,1 mg/mL) ve RcMetOH (IC_{50} : 128,2 mg/mL) izledi (Şekil 5. 4).

Deghima ve ark., *R. macrophyllus* Desf. ile alakalı yaptıkları bir çalışmada farklı çözeltiler demir şelasyon yetenekleri açısından test edilmiştir. Tüm çözeltiler farklı ve

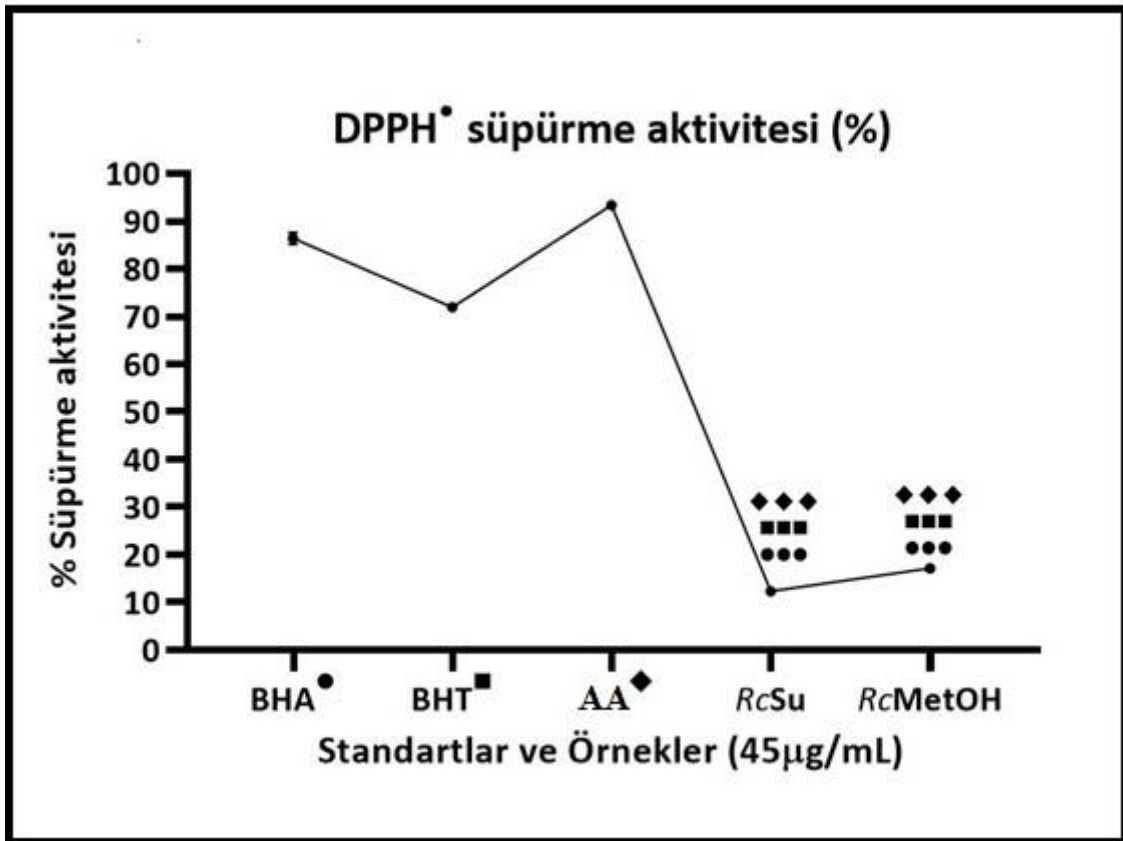
doza bağı demir şelasyon kapasiteleri göstermiştir. Sonuç olarak, kesirler en yüksek kapasiteden en düşük kapasiteye şu şekilde sıralanabilir: Sulu Çözelti > Hekzan Çözeltisi > Butanolik Çözelti > Kloroform Çözeltisi > Etil Asetat Çözeltisi.

Çalışmamızda daha önceki çalışmalardan benzer olarak su ekstraktının diğer ekstraktlardan daha yüksek demir şelatlama aktivitesi gösterdiği belirlendi. Her ne kadar bazı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş olsa da bu çalışma genel olarak önceki çalışmalarla örtüşmektedir. Mevcut farklılıkların ise kullanılan bitkinin türüne ve içerdiği fenolik madde miktarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

EDTA standart demir şelatlama maddesi ($IC_{50} = 22 \pm 1$ mg/mL) ile karşılaştırıldığında, tüm çözeltiler genel olarak zayıf demir şelatlama kabiliyeti gösterdi. En yüksek polifenol miktarlarında bile, Etil Asetat çözeltisi en zayıf demir şelasyon kabiliyetini göstermiştir. Biyoaktif bileşikler ve demir şelasyonu arasındaki korelasyon incelenirken, demir şelasyonu ve nicel biyoaktif bileşikler arasında önemli korelasyonlar bulunamamıştır (Deghima ve ark., 2020). Hiçbir fenolik bileşik iyi bir demir şelatlama ajanı maddeler olarak görülmemiştir. Yine de bu yetenek, bileşiklerin yapısal özellikleri ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve bazı fonksiyonel grupların varlığı bu yeteneği engelleyebilir veya güçlendirebilmektedir.

Yapılmış bir başka çalışmada *R. macrophyllus* Desf.'nin Fe^{3+} -TPTZ'yi Fe^{2+} -TPTZ'ye indirgeyebilen mükemmel indirgeme gücünü, BHA'nınkinden daha yüksek, Vitamin C'ninkine benzer ve gallik asitten daha düşük bir FRAP değeriyle ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, *R. macrophyllus* Desf.'nin demir iyonlarını (Fe^{2+}) bağlama ve demir şelatlama deneyinde ferrozine- Fe^{2+} kompleksi oluşumunu önleme konusunda zayıf bir yeteneği vardı, bu etki standart demir şelatlama maddesi olarak kullanılan EDTA'dan daha düşük olarak ölçülmüştür (Deghima ve ark., 2021).

5.2.5. DPPH radikal süpürme aktivitesi



BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen, AA: askorbik asit; RcSu: *R. cornutus* DC. su çözeltisi; RcMetOH: *R. cornutus* DC. metanol çözeltisi

Şekil 5. 5 *R. cornutus* DC. ekstraktlarının DPPH' indirgeme aktivitesi

DPPH radikal süpürme sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA, BHT ve AA'nın radikalleri ekstraktlara göre daha güçlü süpürdüğü görüldü. Tabloya göre en iyi etkiyi AA (IC_{50} : 19,4 mg/mL) sergilerken, AA'yı sırasıyla BHA (IC_{50} : 20,14 mg/mL), BHT (IC_{50} : 26,86 mg/mL), RcMetOH (IC_{50} : 121,24 mg/mL) ve RcSu (IC_{50} : 152,67 mg/mL) izledi (Şekil 5. 5).

IC_{50} değeri, DPPH aktivitesinde %50 kayba neden olan substrat konsantrasyonu olarak tanımlanır ve test edilen bileşiklerin konsantrasyonuna karşı antiradikal aktivite yüzdesinin grafiklerinde belirtilen lineer regresyon ile hesaplanmıştır. IC_{50} , bir bileşiğin biyolojik veya biyokimyasal fonksiyonu inhibe etmedeki etkinliğinin bir ölçüsüdür. Bu nicel ölçü, belirli bir biyolojik süreci engellemek için belirli bir ilacın veya başka bir maddenin (inhibitör) ne kadarının gerekli olduğunu gösterir. Daha düşük bir değer, fraksiyonun daha yüksek antioksidan aktivitesini yansıtabacaktır (Ebrahimzadeh ve diğerleri, 2008).

R. marginatus ve *R. sprunerianus* türlerine ait hazırlanan n-hegzan, etil asetat, metanol ve su ekstrakt çözeltilerinin antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. Ekstrakt çözeltilerinin antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemleriyle tespit edilmiştir. İki yöntemin sonuçlarına göre metanol ekstreleri her ikisi içinde yüksek antioksidan aktivite göstermiş olduğu bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2010). Başka bir çalışmada farklı *R. arvensis* ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, öncelikle DPPH'nin fenoller gibi proton donörleri ile reaksiyona girme kabiliyetine dayanan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ile değerlendirilmiştir. *R. arvensis*'in serbest radikal süpürme yeteneği daha önce bilinmemektedir. Bu amaçla yapılan çalışmada *R. arvensis*'in, özellikle metanol özütünün (IC_{50} : 34,71 $\mu\text{g/mL}$) önemli serbest radikal süpürme potansiyeli sergilediğini göstermektedir. *Nigella sativa*'da gösterilen DPPH aktivitesi EC_{50} ($29,40 \pm 0,35$) (Kirca ve Arslan, 2008) iken, kloroform özütünün ve etil asetat özütünün IC_{50} değerleri sırasıyla 106,56 ve 121,62 $\mu\text{g/mL}$ 'dir (Meziti ve ark., 2012). Zengin ve ark., *Centaurea urvillei*'nin ham ekstresinin IC_{50} değerini ise 137,06 $\mu\text{g/mL}$ olarak rapor etmişlerdir (Zengin ve ark., 2011). Bu sonuçlara dayanarak *R. arvensis*'in, ailenin diğer üyelerine kıyasla DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi için iyi bir kaynak olduğu belirtilmiştir (Bhatti ve ark., 2015).

Shahid ve ark., *R. sceleratus* bitkisine ait yaptıkları analizde çözelti konsantrasyonunun artmasıyla DPPH aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Etil asetatta çözeltisinin çeşitli konsantrasyonları, diğer çözeltilere kıyasla DPPH radikalinin en yüksek inhibisyon yüzdesini sergilediği belirtilmiştir. İncelenen fraksiyonların IC_{50} değerlerine bakıldığında; etil asetat çözeltisi, IC_{50} : $58,9 \pm 1,8$ olan standart bir referans antioksidan olan askorbik aside göre, çalışılan diğer fraksiyonlara kıyasla en düşük IC_{50} değerini, yani $44,1 \pm 0,8$ $\mu\text{g/mL}$ olarak ölçmüşlerdir. Kloroform çözeltisi ayrıca en iyi IC_{50} değerini ($47,0 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$) gösterirken, n-butanol çözeltisi orta değer ($85,0 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$) gösterdiği ifade edilmiştir. Heksan çözeltisi ve sulu çözelti için çok zayıf IC_{50} değerler tespit edilmiştir (Sahid ve ark., 2015).

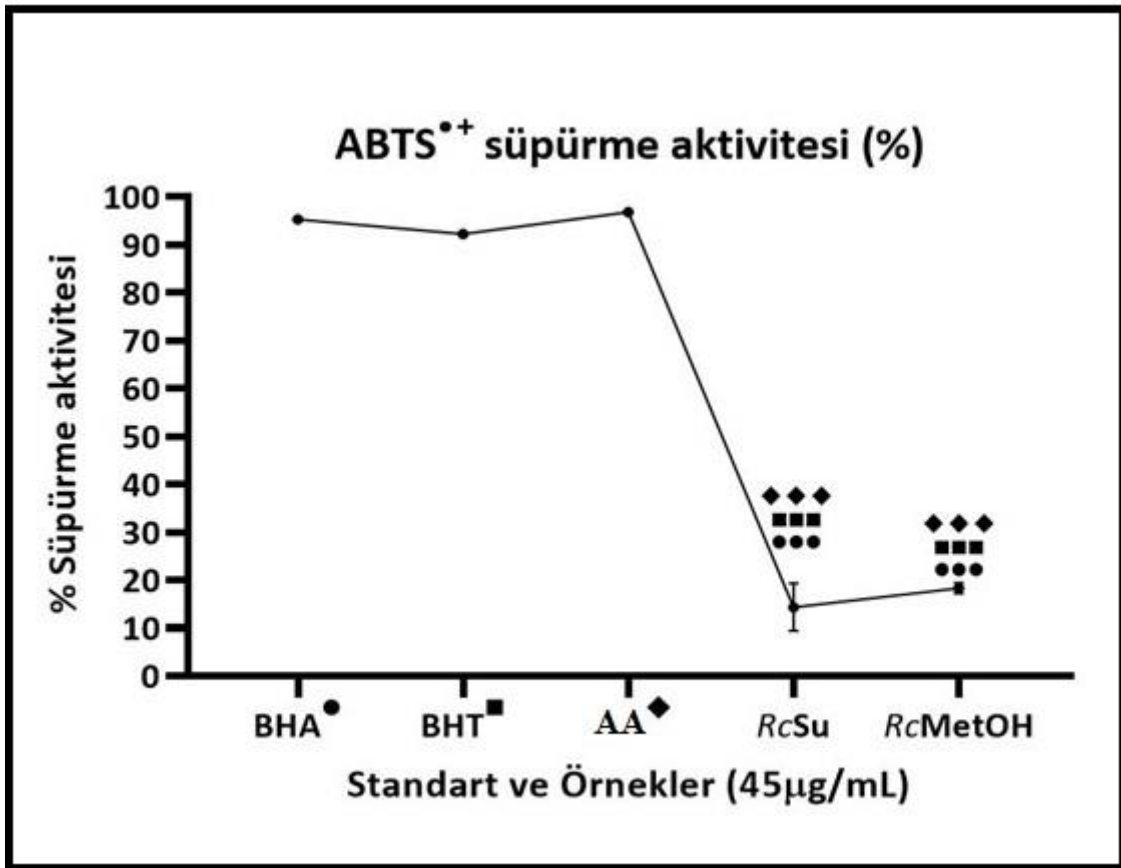
R. sceleratus hidroalkolik özütünün antioksidan aktivitesinin IC_{50} değerleri şunlardı: 872,1 μl (DPPH). *R. sceleratus* gliserol-etanol özütünün antioksidan aktivitesi ise: 988,4 μl (DPPH) (Neag ve ark., 2017). Ekstraktlar, DPPH antioksidan tahlilleri için taranmıştır. *R. sceleratus*'un etanolik özütü DPPH radikal süpürme aktivitesi gösterirken, kloroform özü, ihmal edilebilir antioksidan aktivite göstermiştir (Solanki ve ark., 2020). *R. sceleratus*'un sürgün ve kök ekstreleri (DPPH) tahlili kullanılarak antioksidan aktivite için araştırılmıştır. Metanolik ekstraktın (fenoller, saponinler ve tanenler açısından

zengin) IC₅₀ değeri, katekol için 0,15 mg/ mL ile karşılaştırıldığında, sürgün ve kök metanolik ekstraktları için sırasıyla 0,37 mg/ mL ve 0,34 mg/ mL olarak tespit edilmiştir (Serag ve ark., 2020). Etil asetat çözeltisi, güçlü bir radikal süpürme sergilemiştir.

Deghima ve ark., *R. macrophyllus* Desf. bitkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada etil asetat çözeltisi, güçlü bir radikal süpürme sergilemiştir. DPPH (3,7 ± 0,1) mg/mL IC₅₀ değerine sahip aktivite gösterdiği ifade edilmiştir. Kloroform çözeltisi ayrıca DPPH IC₅₀ (19 ± 1) mg/mL ile önemli bir antiradikal aktivite göstermiştir. Heksan ve sulu çözeltisi, diğer çözeltiler ve analiz edilen standart ilaçlar tarafından gösterilene kıyasla en zayıf antiradikal aktiviteyi sergilemiştir. Sentetik antioksidanlar ve doğal saf bileşikler, hem DPPH hem de ABTS'ye karşı benzer radikal süpürme yeteneği göstermiştir (Deghima ve ark., 2020).

Daha önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da su ekstraktının diğer ekstraktlardan daha düşük DPPH süpürme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bu yönüyle bu çalışma mevcut literatürlerde bildirilen önceki çalışmaları desteklemektedir. Farklı sonuçların verildiği bazı çalışmalarda mevcuttur. Bu farklılığın kullanılan bitkinin türüne ve içerdiği fenolik madde miktarına ve farklı çözücü kullanımına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5.2.6. ABTS^{•+} radikal süpürme aktivitesi



BHA: bütillenmiş hidroksianisol; BHT: bütillenmiş hidroksitoluen, AA: askorbik asit; RcSu: *R. cornutus* DC. su çözeltisi; RcMetOH: *R. cornutus* DC. metanol çözeltisi

Şekil 5. 6 *R. cornutus* DC. ekstraktlarının ABTS^{•+} süpürme aktivitesi

ABTS^{•+} süpürme aktivitesi sonuçlarına göre standart olarak kullanılan BHA, BHT ve AA'nın radikalleri ekstraktlara göre daha güçlü süpürdüğü görüldü. Tabloya göre en iyi etkiyi AA (IC₅₀: 20,19±0,03 mg/mL) sergilerken, AA'yı sırasıyla BHA (IC₅₀: 18,29±0,08 mg/mL), BHT (IC₅₀: 24,65±0,02 mg/mL), RcMetOH (IC₅₀: 125,43±0,15 mg/mL) ve RcSu (IC₅₀: 155,23±0,22 mg/mL) izledi (Şekil 5. 6).

R. sceleratus hidroalkolik özütünün antioksidan aktivitesinin IC₅₀ değerleri şunlardır: 186,7 µL (ABTS^{•+}), *R. sceleratus* gliserol-etanol özütünün antioksidan aktivitesi ise: 250,7 µL (ABTS^{•+})'dir (Neag ve ark., 2017).

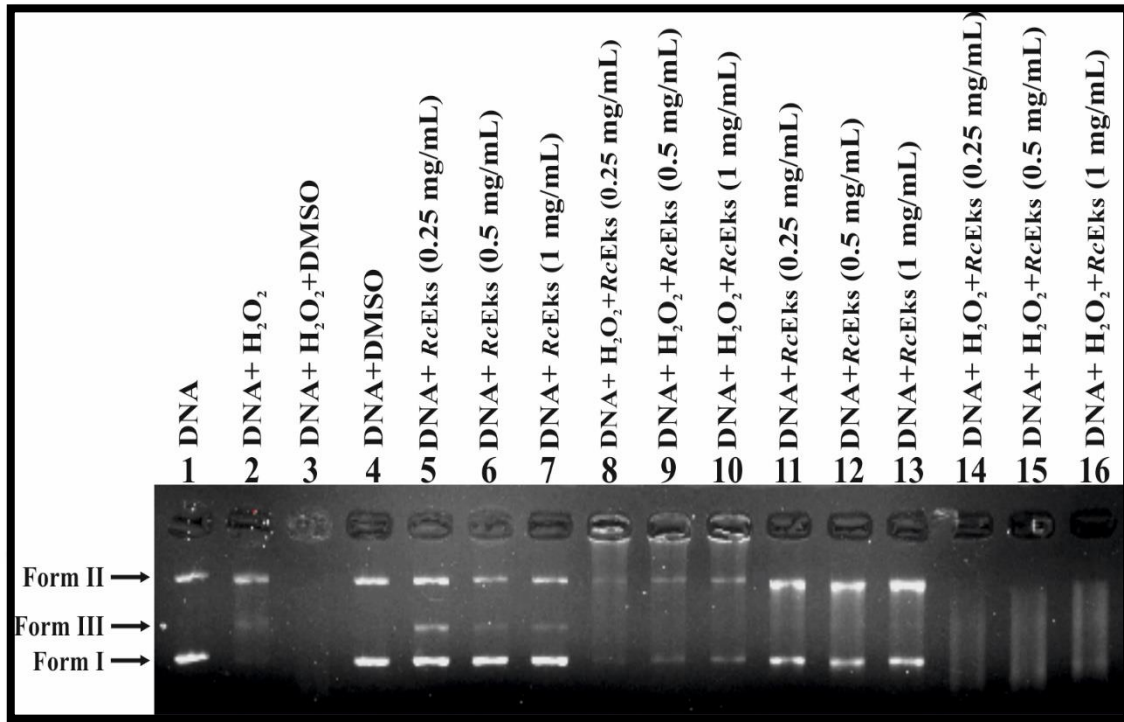
Ekstraktlar, DPPH, ABTS^{•+} ve hidrojen peroksit tahlilleri dahil olmak üzere antioksidan tahlilleri için taranmıştır. *R. sceleratus*'un etanolik özütü, maksimum H₂O₂ temizleme aktivitesi ve optimum ABTS^{•+} süpürme aktivitesi gösterirken, kloroform özü, ihmal edilebilir antioksidan aktivite göstermiştir (Solanki ve ark., 2020).

Ranunculaceae ailesi içerisinde bulunan *A. palaestina* bitkisinin sulu ve etanolik ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri ABTS⁺⁺ ve toplam fenolik metotlar kullanılarak belirlenmiş ve ekstraktların her iki metotta da aktivite sergilediği bildirilmiştir (Üçüncü ve ark., 2020).

Deghima ve ark., *R. macrophyllus* Desf. bitkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada etil asetat çözeltisinin ABTS⁺⁺ ($80,7 \pm 3$ mg/mL) sonuçları için çok düşük IC₅₀ değerine sahip aktivite ortaya koyduğu belirtilmiştir (Deghima ve ark., 2020). Bu aktivite, referans ilaçlar olarak kullanılan saf standart bileşiklerin (kersetin ve gallik asit) yanı sıra sentetik antioksidanlarınkine (BHA ve BHT) benzemektedir. Kloroform çözeltisi ayrıca ABTS⁺⁺ IC₅₀ (369 ± 19 mg/mL) ile önemli bir antiradikal aktivite göstermiştir. Heksan ve sulu çözeltisi, diğer çözeltiler ve analiz edilen standart ilaçlar tarafından gösterilene kıyasla en zayıf antiradikal aktiviteyi sergilemiştir. Sentetik antioksidanlar ve doğal saf bileşikler, hem DPPH hem de ABTS⁺⁺'ye karşı benzer radikal süpürme yeteneği göstermiştir (Deghima ve ark., 2020).

Daha önceki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da su ekstraktının diğer ekstraktlardan daha düşük ABTS⁺⁺ süpürme aktivitesi gösterdiği belirlendi. Bu yönüyle bu çalışma mevcut literatürlerde bildirilen önceki çalışmaları desteklemektedir. Farklı sonuçların verildiği bazı çalışmalarda mevcuttur. Bu farklılığın kullanılan bitkinin türüne ve içerdiği fenolik madde miktarına ve farklı çözücü kullanılmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5.2.7. DNA üzerindeki etkileri



H₂O₂: hidrojen peroksit; DMSO: Dimetil sülfoksit; RcEks: *R. cornutus* DC. ekstraktı

Şekil 5. 7 *R. cornutus* DC. ekstraktlarının DNA üzerine etkisinin karşılaştırılması

DNA, I. Formu sağlıklı süpersarmal, II. Formu halkasal, III: Formu da lineer olmak üzere 3 farklı formda bulunur. Ekstraktların DNA koruyucu aktivitesi, pBR322 plazmit DNA'sı kullanılarak test edildi. Bu yöntemle göre, H₂O₂ ve DMSO'un DNA üzerindeki olası hasarların, farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar tarafından önlenilme potansiyelleri değerlendirildi (Şekil 5. 7).

Çalışma sonuçlarına göre, H₂O₂'nin ve H₂O₂ ile DMSO'nun birlikte DNA'nın kararlı formu olan Form I'i bozarak daha kararsız hale getirdiği görüldü. Su ve metanol ekstraktlarının tek başına DNA'nın kararlı yapısı üzerinde olumsuz bir etki yapmadığı ve Form I ile Form II yapısında tuttuğu gözlemlendi. Ayrıca konsantrasyon artışının DNA üzerinde çok önemli bir etkisinin olmadığı, bununla birlikte su ekstraktında konsantrasyon artışı ile birlikte Form III yapısında azalma meydana geldiği tespit edildi. Su ve metanol ekstraktlarının, peroksitin DNA üzerindeki zararlı etkilerini azaltma aktiviteleri kıyaslandığında su ekstraktının daha etkili olduğu tespit edildi. Su ekstraktı peroksitle birlikte kullanıldığında DNA'nın Form I ve Form II yapılarında kaldığı, ancak metanol ekstraktının önemli bir etki göstermediği belirlendi.

Yapılmış olan bir çalışmada *R. japonicus* Thunb'un etanol özütünün Hepatit B Virüsü (HBV) replikasyonunu birden fazla aşamada engelleyebildiğini ve özellikle CCC DNA oluşumu ve kapsid oluşumu üzerinde inhibitör etkiler gösterdiğini bildirilmiştir. Bu da *R. japonicus* Thunb'un HBV'ye karşı antiviral ajanların bir kaynağı olarak, özellikle de HBV kronik enfeksiyonunun moleküler temeli olan viral CCC DNA'yı hedef aldığı saptanmıştır (Luo ve ark., 2022).

Savcı ve ark. yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri jel görüntüsüne göre H₂O₂'nin Form I'i parçaladığı ve DMSO ile birlikte DNA'yı parçaladığı gözlemlenmiştir. DMSO tek başına DNA'ya kısmen etki göstermiş, *N. transcaucasica* ekstraktının konsantrasyona bağlı olarak H₂O₂+DMSO'un süpürücü etkisini ortadan kaldıramadığı belirtilmiştir (Savcı ve ark., 2020). Başka bir çalışmada ise Lamiaceae familyasına ait bazı bitkilerin uçucu özellikte yağlarının plazmid DNA'yı kararlı hale getirdiği bildirilmiştir (Hamza ve ark., 2016). Benzer bir çalışmada ise Lamiaceae familyasına ait *Leucas aspera* bitkisinde elde edilen su ekstraktının DNA'yı daha iyi koruduğu tespit edilmiştir (Guha ve ark.,2011).

Bu çalışmada ise ekstraktın pBR322 plazmid DNA üzerinde H₂O₂+DMSO'un süpürücü etkisini ortadan kaldıramadığı gözlemlendi. Bu farklılığın farklı bir tür kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bununla birlikte daha önce bu tür ile yapılan biyolojik aktivite çalışmalarına rastlanmaması kıyas yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçların önceki çalışmalardan farklı olmasının nedenleri olarak tür farklılığı, iklim şartları, coğrafi koşulların farklı olması ve kullanılan çözücülerin farklı olması olarak yorumlanabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Hastalıkların önlenmesinde kullanılan ilaçların ve sentetik bileşiklerin yan etkilerinden dolayı bitkilerin iyileştirici etkisine yönelik araştırmalar artarak devam etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada Muş ilinde yetişen *R. cornutus* DC. bitkisinin içeriği ve biyolojik aktiviteleri çalışıldı. Literatür taramasında bu bitki türünün biyolojik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadı. Bu nedenle bitkinin sekonder metabolit içeriği LC-MS/MS ile belirlendikten sonra *in vitro* antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla farklı metotlar kullanıldı. Sonuçlar standart antioksidanlar olan BHA, BHT ve AA'nın sonuçları ile kıyaslandı. Son olarak da bitkinin DNA üzerindeki etkilerini belirlemek için pBR322 plazmidDNA ile çalışıldı. Fenolik madde içeriği sonuçlarına bakıldığında bitkinin fumarik asit, vanilik asit, ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit ve p-Kumarik Asit metabolitlerini diğerlerine nazaran daha fazla içerdiği ancak genel olarak toplam fenolik miktarının ortalama bir değerde olduğu tespit edildi. Fenolik içerik sonuçlarına göre bu bitkinin fenolik madde bakımından zengin olmadığı göz önünde bulundurulduğunda antioksidan sonuçların standartlara göre daha düşük olmasının sebebi anlaşılabilir. Antioksidan sonuçlar değerlendirildiğinde bitkinin su ve metanol ekstraktlarının standart antioksidanlara göre çok düşük aktivite sergilemelerinin nedeni içerdikleri fenolik miktarıyla ilişkili olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte metanol ekstraktının genel olarak su ekstraktından daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Son olarak ekstraktların DNA üzerindeki etkilerinin sonuçlarına göre, su ve metanol ekstraktlarının, peroksin DNA üzerindeki zararlı etkilerini azaltma aktiviteleri kıyaslandığında su ekstraktının daha etkili olduğu tespit edildi. Su ekstraktı peroksitle birlikte kullanıldığında DNA'nın Form I ve Form II yapılarında kaldığı, ancak metanol ekstraktının önemli bir etki göstermediği belirlendi. Tüm sonuçlar göz önüne alındığında bu çalışmanın literatüre çok önemli katkılar sağlayacağı ve bu bitkiye ait farklı çözümlerle hazırlanmış ekstraktlarla yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Aehle, E., Raynaud-Le Grandic, S., Ralainirina, R., Baltora-Rosset, S., Mesnard, F., Prouillet, C., ... & Fliniaux, M. A. 2004. Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure. *Food Chemistry*, 86(4), 579-585.
- Akkol, E. K., Süntar, I., Erdoğan, T. F., Keleş, H., Gonenc, T. M., & Kıvçak, B. 2012. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 478-484.
- Akkol, E.K.; Süntar, I.; Erdoğan, T.F.; Keleş, H.; Gonenc, T.M.; Kıvçak, B. 2012. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 478–484.
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. 2010. Bitkisel ürünleri ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(4), 401-49.
- Anonim 2013, *Ranunculus*. Botanical Dermatology Database, <https://www.botanical-dermatology-database.info/BotDermFolder/RANUNCULACEAE.html> [Erişim Tarihi: 01.09.2022].
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Aruoma, O. I. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American oil chemists' society*, 75(2), 199-212.
- Aslam MS, Choudhari BS, Uzair M, Ijaz AS, 2012. "Thegenus *Ranunculus*: A phyto Chemical and Ethnopharmacological review". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4 (5): 15–22.
- Avcı, M. 2005. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. *Coğrafya dergisi*, 13, 27-55.
- Azqueta, A., & Collins, A. 2016. Polyphenols and DNA damage: A mixed blessing. *Nutrients*, 8(12), 785.

- Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. 2001, Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, Konya, 211–61.
- Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. 2010. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Barbour, E. K., Al Sharif, M., Sagherian, V. K., Habre, A. N., Talhouk, R. S., & Talhouk, S. N. 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 1-7.
- Baytop A., 1977, Farmasötik Botanik, İ.Ü. *Eczacılık Fakültesi Yayınları*, Baha Matbaası, İstanbul, (25)2311:166-169.
- Baytop T. Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, İstanbul 1963;1039:141-142
- Baytop, A., 1987, Bitkisel drogların anatomik yapısı, *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, İstanbul, 52.
- Baytop, T., 1999, Therapy with medicinal plants in Turkey. *Past and Present*, 2, 348-349.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Benzie, I.F.F. & Choi, S.W. 2014. Antioxidants in food, content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Advances in Food and Nutrition Research*, 7, 1–51.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘antioxidant power’: the FRAP Assay. *Analytic Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bhatti, M. Z., Ali, A., Ahmad, A., Saeed, A., & Malik, S. A. 2015. Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC research notes*, 8(1), 1-8.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bohlmann, J., & Keeling, C. I. 2008. Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal*, 54(4), 656-669.

- Bonilla, F., Mayen, M., Merida, J., and Medina, M., 1999. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry*, 66(2), 209-215.
- Bonora A, Tosi B, Dall'olio G, Bruni A. 1990. Occurance and phylogenetic implications of quartenay alcoloids in *Ranunculus serbicus* (Ranunculaceae). *Phyton* (Horn, Austria), 30 (2): 265-272.
- Callegari, A. J. 2016. Does transcription-associated DNA damage limit lifespan?. *DNA repair*, 41, 1-7.
- Campos MG, Webby RF, Markham KR et al., 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 742-745.
- Campos, M. G., Markham, K., & Proença da Cunha, A. 1997. Quality assessment of bee-pollens using flavonoid/phenolic profiles. *Polyphenol Communications*, 96, 53-54.
- Carocho, M., & CFR Ferreira, I. 2013. The role of phenolic compounds in the fight against cancer—a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(8), 1236-1258.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192-208.
- Chi, Y. M., Yang, Y. Q., & Yu, S. 2007. Effect and composition of organic acid of radix *Ranunculus ternati*. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, 23, 365-367.
- Contreras-Guzmán, E. S., & Strong III, F. C. 1982. Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 65(5), 1215-1221.
- Agostini-Costa T. da S., Vieira R.F., Bizzo H.R., Silveira D., Gimenes M.A. 2012. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu S., editor. *Chromatography and Its Applications*. InTech.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG, 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, (Eds.). *American Society of Plant Physiologists*, 1250-1316.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H. (Eds.). 2008. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. *John Wiley & Sons*.

- Da-Cheng, H. 2018. Biodiversity, chemodiversity, and pharmacotherapy of Ranunculus medicinal plants. In H. Da-Cheng (Ed.), *Ranunculales medicinal plants: Biodiversity, Chemodiversity and pharmacotherapy*, Academic Press, London, 357–383.
- Davis PH, Cullen J, MJE Coode editors. 1965, Flora of Turkey and East Aegean Islands. *Edinburgh University Press*, Edinburg, 95:146-169.
- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Gómez-Mejía, E., Madrid, Y., ... & Bedjou, F. 2020. Bioactive polyphenols from *Ranunculus macrophyllus* Desf. Roots: Quantification, identification and antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 132, 204-214.
- Deghima, A., Righi, N., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Baali, F., Gómez Mejjía, E., ... & Bedjou, F. 2021. Valorisation of the Green Waste Parts from Large-Leaved Buttercup (*Ranunculus macrophyllus* Desf.): Phenolic Profile and Health Promoting Effects Study. *Waste and Biomass Valorization*, 12(8), 4307-4318.
- Demir, İ. ve Ünal, M. 2022. Çayır Mera Alanlarının Yabancı Ot Florası Üzerine Bir Araştırma: Türkiye, Muş İli Meraları. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 9(1), 24-33.
- Deng, K. Z., Xiong, Y., Zhou, B., Guan, Y. M., & Luo, Y. M. 2013. Chemical constituents from the roots of *Ranunculus ternatus* and their inhibitory effects on *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecules*, 18(10), 11859-11865.
- Diao, Q. X., Zhang, J. Z., Zhao, T., Xue, F., Gao, F., Ma, S. M., & Wang, Y. 2016. Vitamin E promotes breast cancer cell proliferation by reducing ROS production and p53 expression. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(12), 2710-7.
- Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. 1993. Microbiological properties of protoanemonin isolated from *Ranunculus bulbosus*. *Phytotherapy Research*, 7(1): 21-24.
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida MLM. 1994. Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 315: 161-169.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102-1115.

- Drevet, J. R. 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and cellular endocrinology*, 250(1-2), 70-79.
- Duh, P. D. 1998. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(4), 455-461.
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., ... & Georgopoulos, N. T. 2017. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International wound journal*, 14(1), 89-96.
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. 2008. Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of biology*, 32(1), 43-49.
- Edsall MS, 1985. Roadside Plants and Flowers: A Traveler's Guide to the Midwest and Great Lakes Area: With a Few Familiar Off-Road Wild flowers. *North Coast Books. University of Wisconsin Press.*
- Eichler, H.J., 1958. Revision der *Ranunculaceen malesiens*. *Bibliotheca Botanica*, 124, 1-110.
- Ekmekçigil M, 2006. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu (Ank) Ranunculaceae Familyası Revizyonu. *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Elitok, E. 1996. Et Teknolojisinde Antioksidantların Kullanımı, Yüksek Lisans Semineri, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Erdoğan, T. 2008. Brine shrimp lethality bioassay on some ranunculus species. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 37(3), 171-177.
- Escarpa, A. and Gonzalez, M.C., 1998. High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of chromatography A*, 823(1-2), 331-337.
- Esin, P. C. O., & Halil, B. 2010. Antimicrobial activity of the ethanol extracts of some plants natural growing in Aydın, Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21), 2318-2323.
- Ezer N, Avcı K, 2004. Folk Medicines of Çerkeş (Çankırı) in Turkey. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 24: 67- 80.
- Fitzmaurice, S. D., Sivamani, R. K., & Isseroff, R. R. 2011. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin pharmacology and physiology*, 24(3), 113-126.

- Fraga BM. 2008. Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports*, 25: 1180-1209.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation research*, 58(9), 537-552.
- Gershenzon J, Croteau R, 1991. Terpenoids. In Herbivores their interaction with secondary plantmetabolites, Vol I: The chemical participants, 2 nd ed., G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum, eds, *Academic press*, San Diego, 165-219.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 48:909–930.
- Goldberg G. 2003. Plants: diet and health. The report of a British nutrition foundation task force. Oxford, U.K.: *Blackwell Publishing*, 347.
- Góth L, Rass P, Páy A. 2004. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8:141–149.
- Grayson DH, 1998. Monoterpenoids. *Natural Product Reports*, 5:497-521.
- Guha, G., Rajkumar, V., Mathew, L., & KUMAR, R. A. 2011. The antioxidant and DNA protection potential of Indian tribal medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 35(2), 233-242.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*, 83(3), 371-382.
- Gülçin, İ. 2006. Antioxidant Activity of Caffeic Acid (3,4-Dihydroxycinnamic Acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., & Aslan, A. 2002. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3), 325-329.
- Gürhan, G., ve Ezer, N. 2004. Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler-I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (1), 37-60.
- Hachelaf A, Zellagui A, Touil A, Rhouati S. 2013. Chemical composition and analysis antifungal properties of *Ranunculus arvensis* L. *Pharmacophore* 4(3):89–91.
- Hachelaf, A., Zellagui, A., Touil, A., & Rhouati, S. 2013. Chemical composition and analysis antifungal properties of *Ranunculus arvensis* L. *Pharmacophore*, 4(3), 89-91.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. 2015. Free radicals in biology and medicine. *Oxford university press*, USA.

- Hamza, B., Boumediene, M., Aicha, T. T., & Şekeroğlu, N. 2016. Chemical composition and DNA damage protective effect of essential oil of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba*. *International Journal of Phytopharmacology*, 7(4), 196-201.
- Hart, D. J., & Scott, K. J. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101-111.
- Hegnauer, R. 1988. Biochemistry, distribution and taxonomic relevance of higher plant alkaloids. *Phytochemistry*, 27(8), 2423-2427.
- Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Vekemans, J.A.J.M., Bast, A., 2001. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 199–206.
- Hesse, M. 2002. Alkaloids: Nature's curse or blessing?. *John Wiley & Sons*.
- Michael, H., Hickey, M., King, C., & Clive, K. 1997. Common families of flowering plants. *Cambridge University Press*.
- Hörandl, E., Paun, O., Johansson, J.T., Lehnebach, C., Armstrong, T., Chen, L., Lockhart, P., 2005. Phylogenetic relationships and evolutionary traits in *Ranunculus* s.l. (Ranunculaceae) inferred from ITS sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, 305–327.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Harborne, J. B. 1993. Ed., *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman and Hall, London, 499-535.
- Karagöz, A., Cevahir, G., Özcan, T., Sadıkoğlu, N., Yentür, S., & Kuru, A. 2002. Bazı yüksek bitkilerden hazırlanan sulu ekstraktların antiviral aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı-Bildiriler*, Eskişehir, 318, 321.
- Kashiwazaki, N., Yamaguchi, R., Uesugi, R., Hishiyama, N., Kim, M., Nakatsukasa, E., ... & Shino, M. 2005. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Development*, 0510050025-0510050025.

- Kaya GI, Somer NÜ, Konyalıoğlu S, Yalçın HT, Yavařođlu NÜK, Sarıkaya B, Önür MA, 2010. Antioxidant and Antibacterial Activities of *Ranunculus marginatus* var. *trachycarpus* and *R. sprunerianus*. *Turkish Journal Biologia*, 34:139-146.
- Khan, W. N., Lodhi, M. A., Ali, I., Azhar-Ul-Haq, Malik, A., Bilal, S., ... & Choudhary, M. I. 2006. New natural urease inhibitors from *Ranunculus repens*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 21(1), 17-19.
- Kıranşan, K. 2017, Bulanık-Malazgirt Havzası'nın (Muş) fiziki coğrafyası, Doktora Tezi, *Fırat Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*, Elazığ, 14-15.
- Kikuzaki H., Nakatani N. 1993. Antioxidants effect of water extract of *Aegle marmelos* fruits in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:2007–2010.
- Kilimciğöldeliöğlu D. 2017. *Ranunculus Constantinopolitanus* (DC.) Bitkisi Üzerinde Kalite Kontrol Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.
- Ko, S. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Lee, S. W., Chun, S. S., & Park, E. 2014. Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Preventive nutrition and food science*, 19(1), 19.
- Köhler, K., Ferreira, P., Pfander, B., and Boos, D. 2016. Regulation of the Initiation of DNA Replication upon DNA Damage in Eukaryotes. In *The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes*, D.L. Kaplan, ed. *Cham: Springer International Publishing*, 443-460.
- Krajka-Kuzniak, V., Szaefer, H., Ignatowicz, E., Adamska, T., Markowski, J., & Baer-Dubowska, W. 2015. Influence of cloudy apple juice on n-nitrosodiethylamine-induced liver injury and phases i and ii biotransformation enzymes in rat liver. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 72, 267-276.
- Lehnebach CA, 2008. Phylogenetic Affinities, Species Delimitation and Adaptive Radiation of New Zealand *Ranunculus*, Palmerson North, Massey University, New Zealand.
- Li, H., Zhou, C. X., Pan, Y., Gao, X., Wu, X., Bai, H., ... & Zhao, Y. 2005. Evaluation of antiviral activity of compounds isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus*. *Planta medica*, 71(12), 1128-1133.
- Liang Y, Chen Z, Liu L, 2008. Studies on Chemical Constituents of *Ranunculus japonicus*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 33: 2201-2203.

- Loomis, W. D., & Croteau, R. 1980. Biochemistry of terpenoids. In Lipids: structure and function, *Academic Press*, 363-418.
- Lorimer S.D., Barns G., Evans A.C., Foster L.M., May B.C., Perry N.B., Tangney R.S., 1996. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Plants from New Zealand's Subantarctic Islands. *Phytomedicine*, 2 (4): 327-333.
- Lynch, M., & Kuramitsu, H. 2000. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. *Microbes and infection*, 2(10), 1245-1255.
- M.R. Berenbaum, eds, Academic press, San Diego, pp: 1991, 165-219.
- macrophyllus Desf. roots: Quantification, identification and antioxidant activity.
- Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in plant science*, 7(8), 366-373.
- Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R., and Carle, R., 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 112(3), 551-559.
- Malviya N, Jain S, Malviya S. 2010. Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67:113–8.
- Marja, P.K., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Markham KR, Mitchell KA, Campos M, 1997. An Unusually Lipophilic Flavanol Glycoside from *Ranunculus sardous* pollen. *Phytochemistry*, 45: 203-204.
- Marklund SL. 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochemical Journal*, 222:649-655.
- Marklund, S., 1979. A simple specific method for the determination of the hemoglobin content of tissue homogenates. *Clinica Chimica Acta*, 92, 229–234.
- Marston A, Cabo M, Lubrano C, Robin JR, Fromageot C, Hostettmann, 2006. Clarification of the Saponin Composition of *Ranunculus ficariatubers*. *Natural Product Communications*, 1: 27-32.
- Martín, M. L., San Román, L., & Domínguez, A. 1990. *In vitro* activity of protoanemonin, an antifungal agent. *Planta Medica*, 56(01), 66-69.
- Mazid M, Khan TA, 2011. Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3(2):232-249.

- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical science*, 84(4), 407-412.
- Minakata, H., Komura, H., Nakanishi, K., & Kada, T. 1983. Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 116(3-4), 317-322.
- Misra, S. B., & Dixit, S. N. 1980. Antifungal principle of *Ranunculus sceleratus*. *Economic Botany*, 362-367.
- Mitsuda, H., Yasumoto, K., & Wami, K. 1966. Antioxidativ action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo*, 19, 210-214.
- Mohammed, M. S., Osman, W. J., Garelnabi, E. A., Osman, Z., Osman, B., Khalid, H. S., & Mohamed, M. A. 2014. Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(4), 275-85.
- Nazır, S., Li, B., Tahir, K., Khan, A., Khan, ZUH., Khan, S. 2013. Antimicrobial activity of five constituents isolated from *Ranunculus muricatus*, *Medical Plants Research*, 7(47):3438-3443.
- Nazır, S., Zhao, W., Tahir, K., Jing, Q., Khan, S. 2014. *In vitro* antimicrobial activity of the chemical ingredients of *Ranunculus hirtellus*. *Global Journal of Pharmacology*, 8(1):53-59
- Neag, T., Toma, CC., Ardelean, NA. 2017. Polyphenols profile and antioxidant activity of some Romanian *Ranunculus species*. *Studia Ubb Chemia*, LXII(3):75-88.
- Nicholson, R. L., & Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual review of phytopathology*, 30(1), 369-389.
- Noor, W., Gul, R., Ali, I., Choudary, MI. 2006. Isolation and antibacterial activity of the compound from *Ranunculus repens* L. *J Chem Soc Pak* 28:271–274.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L., & Hartmann, T. 2003. Molecular evolution by change of function: alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12805-12812.
- Orhan, I., Sener, B., Atıcı, T., Brun, R., Perozzo, R., & Tasdemir, D. 2006. Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show *in vitro* antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. *Phytomedicine*, 13(6), 388-393.

- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 19, 210-214.
- Palozza, P., Calviello, G., Serini, S., Maggiano, N., Lanza, P., Ranelletti, F. O., & Bartoli, G. M. 2001. β -Carotene at high concentrations induces apoptosis by enhancing oxy-radical production in human adenocarcinoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(9), 1000-1007.
- Parr, A. J., & Bolwell, G. P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 985-1012.
- Paun, O., Lehnebach, C., Johansson, J.T., Lockhart, P., Hörandl, E., 2005. Phylogenetic relationships and biogeography of *Ranunculus* and allied genera (Ranunculaceae) in the Mediterranean region and in the European alpine system. *Taxon*, 54, 911–930.
- Prantl, K., 1887. Beitrage zur Morphologie und Systematik der Ranunculaceen. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 9, 225–273.
- Prieto, JM., Recio, MC., Ciner, RM., Manez, S., Rios, JL. 2003. Pharmacological approach to the pro- and anti- inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 89:131-137.
- Prieto, JM., Recio, MC., Giner, RM., Schinella, GR., Manez, S., Rios, JL 2008. *In vitro* and *in vivo* effects of *Ranunculus peltatus* subsp. *baudotii* methanol extract on models of eicosanoid production and contact dermatitis. *Phytotherapy Research*, 22:297–302.
- Prior, R.L., Cao, G.H. 2000. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *Journal of AOAC International*, 83(4), 950-956.
- Qian, G., Xue, K., Tang, L., Wang, F., Song, X., Chyu, M. C., ... & Wang, J. S. 2012. Mitigation of oxidative damage by green tea polyphenols and Tai Chi exercise in postmenopausal women with osteopenia. *PloS one*, 7(10), e48090.
- Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028-22034.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 2014.

- Rangel-Huerta, O. D., Aguilera, C. M., Martin, M. V., Soto, M. J., Rico, M. C., Vallejo, F., ... & Mesa, M. D. 2015. Normal or high polyphenol concentration in orange juice affects antioxidant activity, blood pressure, and body weight in obese or overweight adults. *The Journal of Nutrition*, 145(8), 1808-1816.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., & Qi, W. 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell biochemistry and biophysics*, 34(2), 237-256.
- Sadıkoglu N, Alpınar K. Bartın, 2000. From an Ethnobotanical point of view. In: Gurkan E, Tuzlacı E eds. XIII th Meeting on Plant Originated Crude Drugs Proceeding Book, *Marmara University press*, 87-100.
- Savcı, A., Koçpınar, E.F., Alan, Y., & Kürşat, M. 2020. *Nepeta transcaucasica* Grossh.(kaf pisikotu) Estraktının HPLC ile Fenolik Madde İçeriğinin Tayini, Antimikrobiyal, Antioksidan ve DNA Koruyucu Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 797-803.
- Say, D., Tastan, P., & Fafal, T. 2022. Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of *Ranunculus constantinopolitanus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 58(3), 527-530.
- Schiassi, M.C.E.V., de Souza, V.R., Lago, A.M.T., Campos, L.G., and Queiroz, F., 2018. Fruits from the Brazilian Cerrado region: physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 245, 305-311.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E. 2008. Tohumlu Bitkiler Sistematığı. *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi*, 8. Baskı, İzmir, 116.
- Serag, M. S., Khedr, A. E. H. A., El-Amier, Y. A., & El-Afify, S. M. 2020. Bioactive constituents and allelopathic activities of the invasive weed *Ranunculus sceleratus* L. Nile Delta, Egypt. *Journal of Experimental Sciences*, 11, 1-4.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Tanaka, T. 2001. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. *Journal of ethnopharmacology*, 75(2-3), 95-115.
- Shahid, S., Riaz, T., & Asghar, M. N. 2015. Screening of *Ranunculus sceleratus* for enzyme inhibition, antibacterial and antioxidant activities. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(2), 436-442.
- Sharangi, A. B. 2017. Secondary metabolites in spices and medicinal plants: an overview. *Plant Secondary Metabolites, Volume One*, 163-188.

- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A. V., & Boas, L. V. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food science and technology international*, 12(5), 385-395.
- Simpson, M.G. 2019. Plant Systematics. Amsterdam: *Elsevier/Academic Press*.
- Simpson MG, 2010. Plant Systematics. Bitki Sistematigi. Çeviri Editörü: Zeki Aytaç-Çeviri Editör Yardımcısı: Bahar Kaptaner İğci, 2. Basımdan. *Nobel Akademik Yayıncılık*, Ankara.
- Solanki, S., Prasad, D., & Singh, A. K. 2020. Antioxidant determination and thin layer chromatography of extract *Withania somnifera*, *Terminalia arjuna*, *Bacopa monnieri*, *Ranunculus sceleratus* and *Acalypha indica*. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(11), 4394-4408.
- Spadafranca, A., Conesa, C. M., Sirini, S., & Testolin, G. 2010. Effect of dark chocolate on plasma epicatechin levels, DNA resistance to oxidative stress and total antioxidant activity in healthy subjects. *British journal of nutrition*, 103(7), 1008-1014.
- Strube, M., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, H., Bast, A. 1997. Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radical Research*. 26, 515–521.
- Surai, PF. 2006. Selenium absorption and metabolism. In *Selenium nutrition and health*, *Nottingham University Press*, Nottingham, UK, 161–171.
- Szóllósi, R., & Varga, I. S. I. 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae: Adaptation of FRAP method. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3-4), 125-127.
- Tamura, M., 1995. Angiospermae. Ordnung Ranunculales. Fam. Ranunculaceae. II. Systematic Part. In: Hiepko, P. (Ed.), *Naturliche Pflanzenfamilien*, second ed., 17aIV., Duncker & Humblot, Berlin, Germany, 223–519.
- Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., ... & Hardeland, R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(2), 181-197.
- Tânia, da S. Agostini-Costa, Roberto, F. Vieira, Humberto, R., Bizzo, Dâmaris, Silveira and Marcos, A., Gimenes. 2012. Secondary Metabolites, *Chromatography and Its Applications*, Dr. Sasikumar Dhanarasu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0357-8, InTech.

- Tawaha, K., Alalı, Fq., Gharaıbeh, M., Mohammad, M., El-Elımat, T. 2007. "Antioxidant activity and total phenolic of selected Jordanian plant species." *Food Chemistry*, 104, 1372-1378.
- Taylor, I. B., Burbidge, A., & Thompson, A. J. 2000. Control of abscisic acid synthesis. *Journal of experimental Botany*, 51(350), 1563-1574.
- Terzioglu, S., Yasar, A., Yaylı, N., Yılmaz, N., Karaoglu, S., & Yaylı, N. 2008. Antimicrobial activity and essential oil compositions of two *Ranunculus* species from Turkey: *R. constantinopolitanus* and *R. arvensis*. *Asian Journal of Chemistry*, 20(4), 3277.
- Tian, JK., Sun, F., Cheng, YY. 2006. Chemical Constituents from the Rootsof *Ranunculus ternatus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 8: 35-39.
- Töngel, MÖ., Ayan, İ. 2005. Samsun ili çayır ve meralarında yetişen bazı zararlı bitkiler ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi dergisi*, 20(1): 84-93.
- Türkiye İstatistik Kurumu, 2016. Ölüm Nedeni İstatistikleri. www.tuik.gov.tr/PdfGetir.do?id=24572 [Erişim Tarihi: 01.09.2022].
- Türkiye'nin Bitkileri 2017. <https://turkiyebitkileri.com/en/photo-gallery/ranunculaceae-duğunciceğigiller/ranunculus-duğunciceği/ranunculus-cornutus.html> [Erişim Tarihi: 01.09.2022].
- Üçüncü, O. S. M. A. N., Baltacı, C., Akar, Z., Duzgun, A., Cuce, M., & Kandemir, A. 2020. Biological activities and phytochemical screening of ethanol extracts from *Adonis paryadricea* (Ranunculaceae). *Farmacia*, 68(6).
- Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, H., Bast, A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, 511–517.
- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., Bao, W., & Hu, F. B. 2014. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ: British Medical Journal*, 349.
- Wang, Z. Y., Chu, F. H., Gu, N. N., Wang, Y., Feng, D., Zhao, X., ... & Zou, D. X. 2021. Integrated strategy of LC-MS and network pharmacology for predicting active constituents and pharmacological mechanisms of *Ranunculus japonicus* Thunb. for treating rheumatoid arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, 271, 113818.

- Waterman, P. G. 2007. Roles for secondary metabolites in plants. In Ciba Foundation Symposium 171-Secondary Metabolites: their Function and Evolution: Secondary Metabolites: Their Function and Evolution: Ciba Foundation Symposium 171 Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. 255-275.
- Webster, S. D. 1991. A chromatographic investigation of the flavonoids of *Ranunculus* L. subgenus *Batrachium* (DC.) A. Gray (water buttercups) and selected species in subgenus *Ranunculus*. *Aquatic Botany*, 40(1), 11-26.
- Weisburger, J. H. 1999. Mechanisms of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 943-948.
- Whittemore, A., 1997. *Ranunculus*. In: Flora of North America Committee (Eds.), Flora of North America, North of Mexico, vol. 3. Magnoliophyta: Magnoliidae and Hamamelidae. *Oxford University Press*, New York, 88–135.
- Wink, M. and Van WYK, B.E., 2004, Medical plants of the world, Timber Pres. Metin A, Calka O, Behçet L, Yıldırım E. 2001, Phytodermatitis from *Ranunculus damascenus*. *Contact dermatitis*, 44: 183.
- World Health Organization, 2021 Cardiovascular Diseases Key Facts. [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Erişim Tarihi: 01.09.2022].
- World Health Organization, 2022. Cancer Key Facts. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [Erişim Tarihi: 01.09.2022].
- Yan, M., Zhu, Y., Zhang, H. J., Jiao, W. H., Han, B. N., Liu, Z. X., ... & Lin, H. W. 2013. Anti-inflammatory secondary metabolites from the leaves of *Rosa laevigata*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(11), 3290-3297.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122.
- Yen, G.C. and Chen, H.W., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 27- 32.
- Yıldırım H. ve Gül R, 2018. *Ranunculus bullatus* L.'un Ranunculaceae Türkiye'de varlığı üzerine. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 5(1), 10-14.
- Yıldız B, Aktoklu, 2012. Bitki Sistematığı, İlk Karasal Bitkilerden Bir Çeneklilere, *Palme Yayıncılık*, 189-193.
- Yoon, J. H., & Baek, S. J. 2005. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei medical journal*, 46(5), 585-596.

- Zhang L, Yang Z, Tian JK. 2007. Two New Indol Opyridoquinaz Olineal Kaloidal Glycosides From *Ranunculus ternatus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55: 1267-1269.
- Zhang, Z., Miao, Y., Xu, M., Cheng, W., Yang, C., She, X., ... & Zhang, Q. 2020. TianJiu therapy for α -naphthyl isothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis in rats treated with fresh *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 248, 112310.
- Zohary, M. 1966. Israel Academy of Sciences and Humanities, *Flora Palaestina*, vol. 1. Jerusalem, 364.
- Zou, Y., Tan, C., Wang, B., Jiang, S., & Zhu, D. 2010. Phenolic compounds from *Ranunculus chinensis*. *Chemistry of natural compounds*, 46(1), 19-21.

