

**TÜRKİYE’DE ENDEMİK OLARAK BULUNAN *PRANGOS* LINDL.
(UMBELLIFERAE) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

FEYZA ÖKE ALTUNTAŞ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞUSTOS 2012
ANKARA**

Feyza ÖKE ALTUNTAŞ tarafından hazırlanan “TÜRKİYE’DE ENDEMİK OLARAK BULUNAN *PRANGOS* LINDL. (UMBELLIFERAE) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ” adlı bu tezin doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Hayri DUMAN

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Belma ASLIM

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zeki KAYA

(Biyoloji, Orta Doğu Teknik Üniversitesi)

Prof. Dr. Hayri DUMAN

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Murat EKİCİ

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

Prof. Dr. Ayşegül GÜVENÇ

(Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi)

Tarih: 15/08/2012

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Feyza ÖKE ALTUNTAŞ

**TÜRKİYE’DE ENDEMİK OLARAK BULUNAN *PRANGOS* LINDL.
(UMBELLIFERAE) TÜRLERİNİN MOLEKÜLER SİSTEMATİĞİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ
(DOKTORA TEZİ)**

FEYZA ÖKE ALTUNTAŞ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ağustos 2012**

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de endemik olarak bulunan *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) türlerinin moleküler sistematığının ve biyolojik aktivitelerinin araştırılmasıdır. Moleküler sistematik çalışmalarında; endemik *Prangos* türlerinin kloroplast genomunun kodlanmayan transfer ribonükleik asit bölgelerinin (*trnV5’-trnV3’*, *trnL5’-trnL3’*, *trnL-trnF*) ve nüklear ribozomal DNA’sının iç transkribe olan ara bölgesinin (ITS; ITS-1+5.8S rRNA+ITS-2) DNA dizi analizleri yapılmıştır. Moleküler evrimsel analizler için MEGA versiyon 5.1 Beta 3 programı uygulanmıştır. Moleküler analizlere ek olarak türler arası genetik uzaklıklar SDS-PAGE yöntemi ile de belirlenmiştir. Moleküler analizler ve protein profilleri ile elde edilen genetik akrabalık morfolojik özelliklere göre yapılan sistematik ilişki ile benzerlik göstermiş ve *Prangos* cinsinin taksonomik problemlerinin çözümünde kullanılabilecek bilgiler vermiştir. Biyolojik aktivite çalışmalarında; birbirini tamamlayan *in vitro* testler (DPPH radikalini giderme, plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu ve metal şelatlama) ile endemik *Prangos* türlerinin antioksidan etkileri araştırılmıştır. En yüksek antioksidan etki gösteren endemik *Prangos* türünün ise comet tekniği ile genotoksik ve antigenotoksik etkisi incelenmiştir. Ayrıca, türlerin metanol, su ve aseton ekstraktlarında bulunan toplam fenol, β -karoten ve likopen miktarları tespit edilmiştir. Bununla birlikte, HPLC yöntemi ile de

ekstraktlardaki klorojenik asit ve rutin miktarları analiz edilmiştir. Endemik *Prangos* türleri arasında en yüksek antioksidan aktiviteyi *Prangos ilanae* Pimenov, Akalın & Kljuykov göstermiştir. *P. ilanae* ekstraktlarının muamelesi ile insan lenfositlerindeki hidrojen peroksit tarafından indüklenmiş oksidatif DNA hasarı önemli oranda azaltılmıştır ($p<0,05$). Sonuçlar, endemik *Prangos* türlerinin doğal bir antioksidan kaynağı olarak gıda takviyesinde ya da nutrasötiklerin geliştirilmesinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Bilim kodu : 203. 1.023

Anahtar sözcükler : *Prangos*, filogeni, *trn*, ITS, SDS-PAGE, antioksidan aktivite, antigenotoksisite, comet tekniği, HPLC

Sayfa adedi : 158

Tez yöneticisi : Prof. Dr. Hayri DUMAN

**MOLECULAR SYSTEMATICS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF
PRANGOS LINDL. (UMBELLIFERAE) SPECIES WHICH ARE ENDEMIC
TO TURKEY
(Ph.D. Thesis)**

FEYZA ÖKE ALTUNTAŞ

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
August 2012**

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate molecular systematics and biological activities of *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) species which are endemic to Turkey. In the molecular systematic studies, DNA sequence analysis were done for noncoding transfer ribonucleic acid regions of chloroplast genome (*trnV5'-trnV3'*, *trnL5'-trnL3'*, *trnL-trnF*) and nuclear ribosomal DNA's internal transcribed spacer region (ITS; ITS-1+5.8S rRNA+ITS-2) of endemic *Prangos* species. Molecular evolutionary analysis was carried out by using MEGA Version 5.1 Beta 3. In addition to molecular analysis, the genetic distances between species were determined by using SDS-PAGE. The genetic relationship obtained by the protein profiles and the molecular analysis were similar to the systematic relationship based on morphological characteristics and gave information that can be used to solve taxonomic problems of *Prangos* genus. In the biological activity studies, antioxidant effects of endemic *Prangos* species were evaluated by using complementary *in vitro* assays (DPPH radical scavenging, plasma lipid peroxidation inhibition and metal chelating). The genotoxic and antigenotoxic effects were investigated by using Comet assay for endemic *Prangos* species showing the highest antioxidant effect. In addition, the amounts of total phenol, β -carotene and lycopene compounds in the methanol, the water and the acetone extracts were determined. Also, chlorogenic acid and

rutin contents in the extracts were analyzed by using HPLC method. Among endemic *Prangos* species, *Prangos ilanae* Pimenov, Akalin & Kljuykov showed the highest antioxidant activity. Hydrogen peroxide induced DNA damage in human lymphocytes was significantly reduced by treatment of *P. ilanae* extracts ($p<0.05$). These results suggest that endemic *Prangos* species may be used as a source of natural antioxidants for food supplementation or in the development of nutraceuticals.

Science code : 203. 1.023

Key words : *Prangos*, phylogeny, *trn*, ITS, SDS-PAGE, antioxidant activity, antigenotoxicity, comet assay, HPLC

Page number : 158

Adviser : Prof. Dr. Hayri DUMAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan, üzerimde büyük emeği bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Hayri DUMAN'a ve bu tez çalışmasına önerileri ile katkıda bulunan ikinci danışman hocam sayın Prof. Dr. Belma ASLIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm tez izleme komitesi üyesi sayın Prof. Dr. Zeki KAYA'ya ve tez çalışmasına olan katkılarından dolayı tez izleme komitesi üyesi sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya teşekkür ederim.

Fenolik bileşiklerin HPLC analizinin yapılmasındaki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Murat KARTAL'a, tez çalışmalarımda kullanılan bazı bitki materyallerinin toplanmasındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ ve Yrd. Doç. Dr. Bilgehan BİLGİLİ'ye ve tez çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Aysun GÜVENDİREN GÜLSOY ve Uzm. Ecz. Ali Rifat GÜLPINAR'a teşekkür ederim.

Doktora süresince aldığım BİDEB 2211-Yurt içi doktora bursundan dolayı TÜBİTAK'a ve bu tez çalışmasını 05/2009-09 No'lu projeyle destekleyen Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme; annem Zekiye ÖKE ve babam Mehmet ÖKE'ye, desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim kardeşlerime ve yeğenim Defne'ye, tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için bana her türlü fedakârlık ve anlayışı gösteren eşim Doç. Dr. Halit ALTUNTAŞ'a ve varlığı ile bana güç veren canım oğlum Emir Kaan'a sonsuz minnettarlığımı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xiii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvii
HARİTALARIN LİSTESİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Umbelliferae (Apiaceae) Familyası	4
2.1.1. Umbelliferae familyasının morfolojik özellikleri	4
2.2. <i>Prangos</i> Lindl. (Umbelliferae) Cinsi	5
2.2.1. <i>Prangos</i> cinsinin morfolojik özellikleri	7
2.2.2. <i>Prangos</i> cinsinin halk arasında kullanım alanları	8
2.2.3. <i>Prangos</i> cinsi ile ilgili yapılan çalışmalar	9
2.3. Genetik Varyasyon ve Filogenetik Analiz	14
2.3.1. Bitki DNA'sında genetik varyasyon nerede görülür?	15
2.3.2. Kloroplast DNA'sı ve transfer ribonükleik asit (tRNA) bölgesi	16
2.3.3. Nüklear ribozomal DNA'nın iç transkribe olan ara (ITS) bölgesi	19
2.4. Tohum Depo Proteinleri	22

Sayfa

2.4.1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) .	23
2.5. Antioksidanlar	24
2.5.1. Tarihçe.....	24
2.5.2. Serbest radikaller ve oluşum yolları	25
2.5.3. Oksidatif stres ve serbest radikallerin neden olduğu biyolojik bozukluklar	28
2.5.4. Antioksidan savunma sistemi	32
2.5.5. Antioksidan özelliğindeki vitamin ve mineraller	33
2.5.6. Fenolik bileşikler	35
2.5.7. Antioksidanlar ve beslenme	37
2.6. Genotoksisite	38
2.6.1. Tarihçe.....	39
2.6.2. Alkali comet tekniği	41
2.6.3. Comet tekniğinin avantajları ve sınırlamaları	45
3. MATERYAL VE METOT.....	47
3.1. Materyal	47
3.1.1. Bitki materyali	47
3.1.2. Kimyasallar.....	49
3.2. Metot	51
3.2.1. Bitki yapraklarından DNA izolasyonu	51
3.2.2. DNA saflığı ve miktar tayini	51
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile kodlanmayan <i>trn</i> bölgelerinin ve ITS bölgesinin amplifikasyonu	51

Sayfa

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi.....	54
3.2.5. DNA dizi analizi.....	54
3.2.6. Dizilerin işlenmesi ve hizalanması.....	55
3.2.7. Moleküler evrimsel ve filogenetik analizler.....	55
3.2.8. Proteinlerin SDS-PAGE ile analizi	56
3.2.9. Bitki ekstraktlarının elde edilmesi.....	59
3.2.10. DPPH radikalini giderim testi	59
3.2.11. Plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu testi	59
3.2.12. Metal iyonlarını şelatlama testi	60
3.2.13. Toplam fenol bileşik miktarlarının tespiti	60
3.2.14. β -karoten ve likopen bileşik miktarlarının tespiti.....	60
3.2.15. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin tespiti ve miktar tayini.....	61
3.2.16. Genotoksik ve antigenotoksik etkinin belirlenmesi	62
3.2.17. İstatistiksel analizler	64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	65
4.1. Endemik <i>Prangos</i> Türlerinin Moleküler Analizleri	65
4.1.1. DNA saflığı ve miktar tayini	65
4.1.2. PCR ürünleri.....	65
4.1.3. PCR ürünlerinin DNA dizi analizi.....	67
4.1.4. Moleküler evrimsel analizler ve filogenetik değerlendirme.....	68
4.2. Endemik <i>Prangos</i> Türlerinin Protein Analizleri	78
4.3. Endemik <i>Prangos</i> Türlerine Ait Ekstraktların Verimleri.....	80

Sayfa

4.4. Endemik <i>Prangos</i> Türlerinin Antioksidan Aktivitesi	81
4.4.1. DPPH radikalini giderim aktivitesi	81
4.4.2. Plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu	88
4.4.3. Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi	91
4.4.4. Toplam fenol bileşik miktarları.....	97
4.4.5. β -karoten ve likopen bileşik miktarları.....	99
4.5. Endemik <i>Prangos</i> Türlerinin HPLC Analizi ile Elde Edilen Klorojenik asit ve Rutin Miktarları	100
4.6. Endemik <i>Prangos</i> Türlerinin Genotoksisite ve Antigenotoksisite Sonuçları.....	107
5. TARTIŞMA.....	110
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	119
KAYNAKLAR	121
EKLER	139
EK-1. DNA dizi analizi kromatogramları.....	140
EK-2. Kloroplast DNA'sı kodlanmayan <i>trn</i> bölgelerinin sekans analizi sonucu örneği.....	144
EK-3. nrDNA ITS bölgesinin sekans analizi sonucu örneği	145
EK-4. HPLC analizi kromatogramları	146
EK-5. Etik kurul belgesi.....	154
ÖZGEÇMİŞ	155

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye’de yetişen <i>Prangos</i> Lindl. cinsine ait taksonların listesi	7
Çizelge 2.2. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri	26
Çizelge 2.3. Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları	27
Çizelge 2.4. Antioksidan savunma sisteminde görev yapan enzimler	33
Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan endemik <i>Prangos</i> türleri, lokaliteleri, toplanma zamanları ve toplayıcı numaraları	48
Çizelge 3.2. <i>Trn</i> ve ITS bölgesi primerlerinin dizileri ve Tm sıcaklıkları	52
Çizelge 3.3. <i>Trn</i> ve ITS bölgeleri için uygulanan PCR amplifikasyon koşulları	52
Çizelge 3.4. <i>Trn</i> bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PCR döngü şartları	53
Çizelge 3.5. ITS bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan PCR döngü şartı	54
Çizelge 3.6. Klorojenik asit ve rutin bileşiklerinin HPLC analizinde uygulanan gradient akış programı	62
Çizelge 4.1. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin NCBI gen bankasında maksimum benzerlik gösterdiği taksonlar	67
Çizelge 4.2. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin kodlanmayan <i>trn</i> bölgelerine ait moleküler farklılık parametreleri	69
Çizelge 4.3. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin ITS bölgesine ait moleküler farklılık parametreleri	70
Çizelge 4.4. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin kodlanmayan <i>trn</i> bölgelerinin (<i>trnV</i> intron + <i>trnL</i> intron + <i>trnL-F</i> intergenik bölge) % nükleotit kompozisyonu	74
Çizelge 4.5. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin ITS bölgelerinin % nükleotit kompozisyonu	74
Çizelge 4.6. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin <i>trn</i> analizine göre gruplar arası genetik uzaklığı	75

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin ITS analizine göre gruplar arası genetik uzaklığı.....	75
Çizelge 4.8. Endemik <i>Prangos</i> türlerine ait ekstraktların verimleri (% w/w)	80
Çizelge 4.9. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin DPPH radikalini giderim aktivitesi	82
Çizelge 4.10. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu	89
Çizelge 4.11. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin metal şelatlama aktivitesi	92
Çizelge 4.12. Ekstraktların toplam fenol bileşik miktarları	98
Çizelge 4.13. Meyve ekstraktlarının toplam β -karoten ve likopen miktarları	99
Çizelge 4.14. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin klorojenik asit miktarları.....	104
Çizelge 4.15. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin rutin miktarları	104
Çizelge 4.16. <i>P.ilanae</i> yaprak su ekstraktının insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş DNA hasarına karşı koruyucu etkisi	107
Çizelge 4.17. <i>P.ilanae</i> yaprak metanol ekstraktının insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş DNA hasarına karşı koruyucu etkisi.....	108

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>rbcL</i> ve <i>accD</i> genleri arasındaki kloroplast IGS lokusu	17
Şekil 2.2. <i>TrnT-F</i> bölgesinin şematik gösterimi	18
Şekil 2.3. Nüklear ribozomal DNA bölgesinin evrensel yapısının şematik gösterimi	19
Şekil 2.4. ITS bölgesi en çok dizilenen Embryophyta'ya ait ilk 10 familya	22
Şekil 2.5. Oksidatif stres durumunun şematize şekli	29
Şekil 2.6. Alkali comet tekniği	42
Şekil 2.7. Çeşitli DNA hasar derecelerine sahip bireysel lökositlerin dijitalleştirilmiş comet görüntüleri	44
Şekil 2.8. Comet tekniğinin parametreleri	45
Şekil 4.1. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin <i>trnV</i> intron, <i>trnL</i> intron, <i>trnL-F</i> intergenik bölgesinin kombinasyonu ile oluşturulan dendrogramı	76
Şekil 4.2. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin ITS bölgesine göre oluşturulan dendrogramı.....	77
Şekil 4.3. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin tohum protein profilleri sonucu oluşturulan dendrogramı.....	79
Şekil 4.4. <i>P. ilanae</i> türünün DPPH radikali giderim aktivitesi	84
Şekil 4.5. <i>P. denticulata</i> türünün DPPH radikali giderim aktivitesi	85
Şekil 4.6. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> türünün DPPH radikali giderim aktivitesi	86
Şekil 4.7. <i>P. heyniae</i> türünün DPPH radikali giderim aktivitesi.....	87
Şekil 4.8. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu.....	90
Şekil 4.9. <i>P. ilanae</i> türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi	93
Şekil 4.10. <i>P. denticulata</i> türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi	94

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. <i>P.platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi	95
Şekil 4.12. <i>P.heyniae</i> türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi	96
Şekil 4.13. Gallik asit standardı	97
Şekil 4.14. Klorojenik asit maddesinin kromatogramı.....	100
Şekil 4.15. Rutin maddesinin kromatogramı.....	101
Şekil 4.16. Klorojenik asit ve Rutinin UV spektrumları.....	102
Şekil 4.17. Klorojenik asit ve Rutin UV spektrumlarının <i>P.ilanae</i> yaprak metanol ekstraktı UV spektrumu ile karşılaştırılmış hali.....	102
Şekil 4.18. Klorojenik asit kalibrasyon eğrisi	103
Şekil 4.19. Rutin kalibrasyon eğrisi	103
Şekil 4.20. <i>P. denticulata</i> yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı	105
Şekil 4.21. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı	106
Şekil 4.22. <i>P.ilanae</i> yaprak su ekstraktının HPLC kromatogramı.....	106
Şekil 4.23. <i>P.ilanae</i> yaprak su ekstraktının insan lenfosit hücrelerinde oluşturulmuş DNA hasarına karşı gösterdiği antigenotoksik etkinin comet görünümü.....	109

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Türkiye’de endemik olarak bulunan bazı <i>Prangos</i> türleri	12
Resim 4.1. <i>Prangos</i> türlerinin kloroplast genomu kodlanmayan <i>trn</i> bölgelerinin agaroz jeldeki görüntüsü	66
Resim 4.2. <i>Prangos</i> türlerinin nüklear DNA ITS bölgesinin agaroz jeldeki görüntüsü	66
Resim 4.3. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i> ’nin <i>trnL</i> intron bölgesindeki indel durumu	71
Resim 4.4. <i>P. turcica</i> ’nın ITS bölgesindeki T indel durumu ile <i>P. sp. nova</i> ’nın ITS bölgesindeki C ve T indel durumu	71
Resim 4.5. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin <i>trnV</i> intron bölgesine ait parsimoni informatik alan	72
Resim 4.6. Endemik <i>Prangos</i> türlerinin ITS bölgesine ait parsimoni informatik alanlar	73
Resim 4.7. Endemik <i>Prangos</i> türlerin tohum proteinlerin elektroforetik profilleri.....	78
Resim 4.8. <i>P. ilanae</i> yaprak su ekstraktının DPPH radikaline karşı renk değişimi	83

HARİTALARIN LİSTESİ

Harita	Sayfa
Harita 2.1. Umbelliferae familyasının dünyadaki yayılışı	5
Harita 2.2. Türkiye’de endemik olarak bulunan <i>Prangos</i> türlerinin coğrafik dağılımları	6

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
%	Yüzde
°C	Celcius (Santigrat) derece
FeCl ₂	Demir 2 Klorür
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
M	Molar
m	Metre
mA	Miliamper
mg	Miligram
mg/g	Miligram/Gram
mg/ml	Miligram/Mililitre
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı

V	Volt
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

Açıklama

bp	Base pair (Baz çifti)
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk.	Dakika
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
DPPH	2,2-difenil-1- pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiaminotetra asetik asit
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi)
IC₅₀	The half maximal inhibitory concentration (% 50 inhibisyon oluşturan konsantrasyon)
ITS	Internal Transcribed Spacer (İç Transkribe olan Ara)
mat K	Maturase (Maturaz) K geni
MDA	Malondialdehit
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nrDNA	Nüklear ribozomal DNA
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PBS	Fosfat Tamponu
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
subsp.	Subspecies (alttür)
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi)
sn.	Saniye
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris Asetik asit EDTA
TBA	Tiyobarbiturik asit
trn	Transfer Ribonükleik Asit
trnF	Transfer Ribonükleik Asit Fenilalanin
trnL	Transfer Ribonükleik Asit Lösin
trnV	Transfer Ribonükleik Asit Valin
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Avarage
var.	Varyete

1. GİRİŞ

Prangos Lindl. (Umbelliferae) cinsi ülkemizde 9'u endemik olmak üzere, 17 tür ve tür altı seviyede takson ile temsil edilmektedir. Biyolojik zenginliklerimizden biri olan endemik *Prangos* türleri; korunması, özen gösterilmesi gereken türlerimizdendir. Gen koruma çalışmalarını kolaylaştırmaları açısından doğal populasyonların genetik yapılarının anlaşılması önemlidir. Ayrıca genetik yapıların anlaşılması bu türlerin doğru taksonomisi açısından da oldukça önem arz etmektedir. Bununla birlikte, endemik *Prangos* türlerinin taksonomik sınıflandırmasında bazı problemler bulunmaktadır. Morfolojik karakterlerin yetersiz olduğu zamanlarda dizi analizleri filogenetik analizler için çok faydalı olabilmektedir [Yokoyama ve ark., 2000]. Moleküler çalışmalarda, taksonomik açıdan önemli veriler sağlayan bölgeler bulunmaktadır. Kloroplast DNA'sı üzerindeki kodlanmayan bölgeler çok yüksek frekanslı mutasyon gösterdiği için evrimsel ilişkilerin analizinde etkin olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, iç transkribe olan ara (ITS) bölge nükleer DNA'nın en çok çeşitlilik gösteren bölümü olup, bu bölgedeki farklı mutasyon oranları birçok taksonomik seviyede filogenetik sonuç alınmasına olanak sağlamaktadır. Bu bilgiler ışığında bu tez kapsamında; Türkiye'de endemik olarak bulunan *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) türlerinin özgün polimorfik bölgelerini tespit etmek, genetik varyasyonunu belirlemek ve bu cinsin kloroplast genomunun kodlanmayan transfer ribonükleik asit (*trn*) bölgelerine (*trnV5'-trnV3'*, *trnL5'-trnL3'*, *trnL-trnF*) ve nüklear ribozomal DNA (nrDNA)'nın iç transkribe olan ara (ITS; ITS-1+5.8S rRNA+ITS-2) bölgesine ait veri tabanı oluşturmak için DNA dizi analizi çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır. Proteinler genlerin doğrudan ürünleri olduğu için protein analizleri de taksonomik çalışmalarda oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında moleküler analizlere ek olarak endemik *Prangos* türlerinin tohum depo profillerinin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bitkilerin biyolojik aktivite bakımından önemli ve farklı özellikte birçok bileşikten meydana geldiği bilinmektedir. Özellikle bitkilerdeki bu bileşikler antioksidan etkide önemli rol oynamaktadırlar. Antioksidanlar reaktif oksijen türlerinin organizmada,

gıdalarda ve çevrede meydana getireceği hasarlarla mücadelede kullanılmaktadır. Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. Serbest radikallerle ilgili mevcut araştırmalar, antioksidanlar yönünden zengin yiyeceklerin kardiyovasküler hastalıkların, kanserlerin, parkinson ve alzheimer dahil nörodejeneratif hastalıkların ve ayrıca inflamasyonun, hücre ve deri yaşlanmasının neden olduğu problemlerin önlenmesinde önemli rol oynadıklarını açıkça göstermektedir [Gerber ve ark., 2002]. Antioksidanların gıdalara katılması gıdaların lezzetini, rengini korumak ve vitaminlerin yıkımını engellemek için de gereklidir. Gıdaların korunmasında en çok kullanılan sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)'dir. Raporların BHA ve BHT'nin kanserojenik olduğunu göstermesi ve tüketicilerin gıda katkı maddelerinin güvenilirliği hakkında bilinçliliğinin artması nedeniyle doğal ve güvenilir gıda antioksidanlarının tanımlanması gerekmiştir [Sherwin, 1990]. Buna göre, bilhassa bitkisel orijinli doğal antioksidanlar için araştırma yapılması ve alternatif gıda antioksidanlarının keşfedilmesi gerekmektedir. "Çakşır otu" adıyla bilinmekte olan *Prangos* cinsine ait türler, aroma ve tat vermek amacıyla Van yöresinde otlı peynir yapımında ve çeşitli yörelerde halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Bu doğrultuda, bu tez çalışmasında, Türkiye'de endemik olarak bulunan *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) türlerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Doğal antioksidanlar bitkilerin yaprak, gövde ve tohumları başta olmak üzere bütün dokularında meydana gelebilmektedir. Polifenoller, flavonoidler, β -karoten ve likopen gibi bileşikler potansiyel antioksidanlar oldukları için antioksidan aktivite belirlemede bu bileşiklerin madde miktarlarının bilinmesi önemlidir. Klorojenik asit ve rutin ise biyolojik aktivitede önemli rol oynayan iki fenolik bileşiktir. Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteye olan katkılarının belirlenmesi açısından bitkide ne oranda bulunduğu bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, endemik *Prangos* türlerinde doğal olarak bulunan; polifenol, β -karoten ve likopen bileşiklerinin toplam miktarlarının belirlenmesi ve ayrıca HPLC analizi ile de klorojenik asit ve rutin bileşiklerinin miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Canlının bütün genetik bilgilerini DNA molekülü ihtiva ettiğinden DNA’da meydana gelen olumsuz değışiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgiyi de değıştirebilmektedir. İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediğİ takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir [Dikilitaş ve Koçyiğİt, 2010]. Herhangi bir kimyasal mutajenin neden olduğı genotoksik etkinin doğal bir kaynak kullanılarak giderilmesi, bu tür hastalıkların önlenmesi açısından özellikle de bu doğal kaynakların gıdalara ilave edilerek bu tür mutajenlere karşı önlemler alınması açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada, antioksidan aktiviteye ek olarak, en yüksek antioksidan aktivite gösteren endemik *Prangos* türünün, hidrojen peroksit tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı antigenotoksik etkisinin Comet tekniğı ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte, biyolojik aktiviteye sahip bitkisel ürünlerin endüstride kullanılmadan veya satışa sunulmadan önce güvenilirliklerinin test edilmesi gerekir. Çünkü bu bitkisel ürünler yüksek biyolojik aktivitelerin yanı sıra mutajenik bileşikler içerebilmekte, prooksidan ve antioksidan olarak ikili etkide bulunabilmektedirler. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, en yüksek antioksidan aktivite gösteren endemik *Prangos* türünün insan lenfositlerinde herhangi bir DNA hasarı oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması sonucunda; endemik *Prangos* türlerinin moleküler analizlerinin yapılması ile taksonomik ilişkileri hakkında yardımcı olabilecek önemli bilgilere ulaşılması ve bu türlerin kloroplast ve nüklear genomuna ait bazı bölgelerinin veritabanının oluşturulması, ayrıca bu türlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile de gıda veya ilaç endüstrisinde kullanılabilecek doğal ürünlerin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Prangos Lindl. cinsinin bitki sistematikteki yeri

Bölüm: Spermatophyta

Alt Bölüm: Angiospermae

Sınıf: Dicotyledones

Takım: Umbelliflorae (Apiales)

Familya: Umbelliferae (Apiaceae)

Subfamilya: Apioideae

Tribe: Smyrnieae

Cins: *Prangos* [Harborne ve Williams, 1972, Hernstadt ve Heyn, 1972].

2.1. Umbelliferae (Apiaceae) Familyası

Umbelliferae karakteristik özellikleri ile kolaylıkla ayırt edilen, kozmopolit bir familyadır. Dünyada geniş bir alanda dağılış göstermekte olup çok soğuk bölgelerden tropikal bölgelere kadar yayılış gösterir. Özellikle de kuzeyde ılıman bölgelerde bulunmaktadır (Harita 2.1). Türkiye'deki dağılışı homojen olmayıp, Güneybatı ve Doğu Anadolu bölgelerinde daha boldur. Umbelliferae familyasının dünyada yaklaşık 455 cinsi ve 3600-3750 türü yetişmektedir. Türkiye'de ise Umbelliferae familyasının 109 cinsi ve 450 türü bulunmaktadır. Bunların içinde 4 cins ve 42 cinse ait 140 tür endemiktir [Heywood, 1979; Pimenov ve Leonov, 1993].

2.1.1. Umbelliferae familyasının morfolojik özellikleri

Bir, iki veya çok yıllık otsu nadiren yarı çalı veya çalılardır. Yaprakları alternant, nadiren karşılıklı veya dairesel, palmat veya pinnat parçalı veya basit, stipulasızdır. Petiolleri genellikle geniş ve tabanı kın şeklindedir. Çiçek durumu basit veya birleşik umbella, başcık veya körelmiş simozdur. Brakte ve brakteoller var veya yoktur. Çiçekler epigin, hermafrodit veya tek eşeyli nadiren dioik bitkilerdir. Sepaller küçük,

5, birleşik, bazen yoktur. Petal 5 serbest, genellikle uç kısımları içe kıvrık, beyaz, sarı, sarımsı yeşil, soluk mavi veya pembe. Stamenler 5, pistil 1, stilus stilopotik, ovaryum alt durumlu 2 lokuslu ve karpelli, ovüller her lokusta 1 adettir. Meyve kuru, olgunlukta açılmayan, (1-) 2 merikarpa ayrılan şizokarptır. Merikarplar genellikle karpofor adı verilen bir sapla birbirine bağlanır ve her birinin sırt kısmında kosta denilen 5 çıkıntı bulunur. Merikarplarda vittae denen reçine kanalları çoğunlukla vardır [Herrnstadt ve Heyn, 1972].

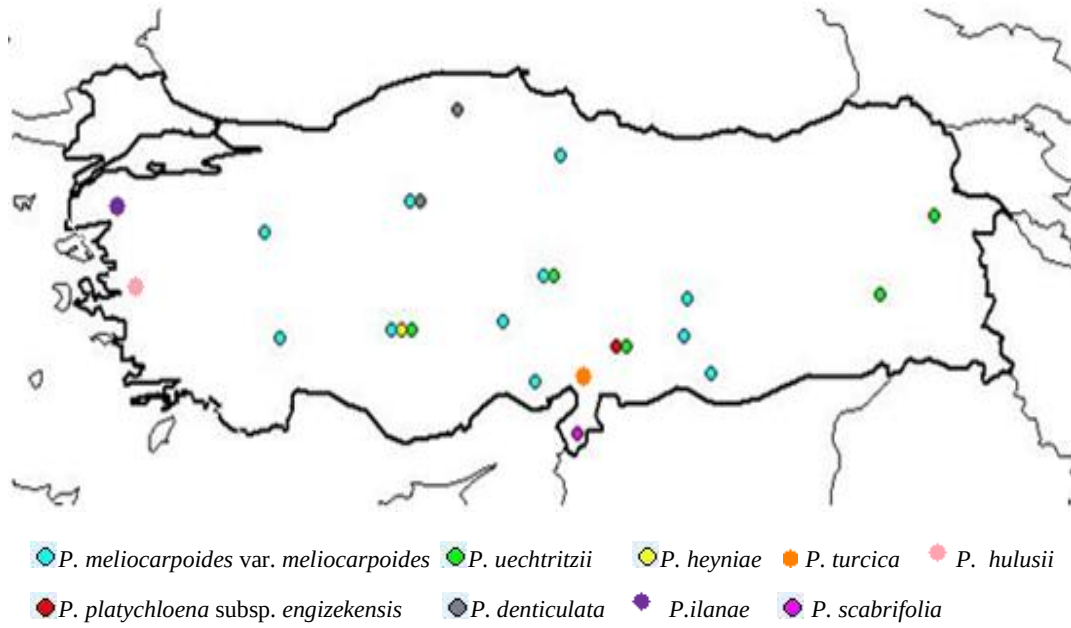


Harita 2.1. Umbelliferae familyasının dünyadaki yayılışı [Heywood, 1979]

2.2. *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) Cinsi

Prangos Lindl. (Umbelliferae) cinsi dünyada yaklaşık 30 tür ile temsil edilmekte olup İran-Turan fitocoğrafik bölgesinin değişik merkezlerinde yetişmektedir. Bu cinsin türleri arasında *P. ferulacea* Lindl., *P. pabularia* Lindl., *P. trifida* (Mill.) Herrnst. & Heyn oldukça geniş bir yayılış alanına sahiptir. Kalan türlerin tümü; türlerin çoğunu ihtiva eden batı bölgesi (Suriye’de dâhil olmak üzere Türkiye’den Batı İran’a kadar) ve doğu bölgesi (Doğu İran, Afganistan’dan Orta Asya’ya kadar) olmak üzere iki merkezin etrafında kümelenmiştir. *Prangos* türleri tebeşirli kayalardan oluşan topraklarda, nadiren de killi, bazaltlı ve Orta Asya’daki tuzlu topraklarda yetişirler. Endemik olan türleri büyük oranda İran-Turan fitocoğrafik bölgesinin yüksek dağlık bölgelerinde yetişmektedir [Herrnstadt ve Heyn, 1977; Duran ve ark., 2005].

Prangos cinsi için Türkiye önemli bir merkez konumundadır. *Prangos*'un tüm türlerinin neredeyse yarısı Anadolu'da yetişmekte olup geniş bir yayılış alanına sahiptir. Endemik *Prangos* türleri de Türkiye'nin değişik bölgelerinde yayılış göstermektedir (Harita 2.2). Türkiye'ye komşu ülkelerin florasında yetişen *Prangos* cinsinin türlerinin sayıları, Flora Iranica'da 16, Flora USSR'de 14, Flora of Syria'da 4, Flora Europea'da 3 tür olarak tespit edilmiştir [Duran ve ark., 2005].



Harita 2.2. Türkiye'de endemik olarak bulunan *Prangos* türlerinin coğrafik dağılımları [Tübives, 2012'den modifiye edilmiştir]

Flora of Turkey için Herrnstadt ve Heyn (1972) tarafından bu cins revize edilmiş ve burada *Prangos bornmuelleri* ve *Cachrys papillaris* “tam tanınmayan türler” olarak kayıt edilmiştir. 1999 yılında Duman ve Watson tarafından *Prangos bornmuelleri* yeni monotipik bir cins *Ekimia* (*E. bornmuelleri*) olarak tanımlanmıştır. 1972 yılından beri Türkiye'de yetişen *Prangos* cinsi üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda 6 yeni takson (5 yeni tür) daha tanımlanmış ve böylece yetişen türlerin sayısı 15 olmuştur. Bunların içinde 9 endemik takson bulunmaktadır (Çizelge 2.1) [Herrnstadt ve Heyn, 1972; Davis ve ark., 1988; Duman, 2000; Duran ve ark., 2005; Pimenov ve ark., 2005; Şenol ve ark., 2011].

Çizelge 2.1. Türkiye’de yetişen *Prangos* Lindl. cinsine ait taksonların listesi [Herrnstadt ve Heyn, 1972; Davis ve ark., 1988; Duman, 2000; Duran ve ark., 2005; Pimenov ve ark., 2005; Şenol ve ark., 2011]

Endemikler		Endemik olmayanlar	
1	<i>Prangos denticulata</i> Fisch. & Mey.	10	<i>Prangos acaulis</i> (DC.) Bornm
2	<i>Prangos heyniae</i> H. Duman & M.F. Watson	11	<i>Prangos corymbosa</i> Boiss.
3	<i>Prangos meliocarpoides</i> Boiss. var. <i>meliocarpoides</i>	12	<i>Prangos meliocarpoides</i> Boiss. var. <i>arcis romanae</i> (Boiss. & Huet) Herrnstadt & Heyn
4	<i>Prangos platychloena</i> Boiss. subsp. <i>engizekensis</i> H. Duman & M.F. Watson	13	<i>Prangos platychloena</i> Boiss. subsp. <i>platychloena</i>
5	<i>Prangos scabrifolia</i> Post & Beauverd	14	<i>Prangos ferulacea</i> Lindl.
6	<i>Prangos uechtritzii</i> Boiss. & Hausskn.	15	<i>Prangos peucedanifolia</i> Fenzl
7	<i>Prangos turcica</i> A. Duran, M. Sağiroğlu & H. Duman	16	<i>Prangos uloptera</i> DC.
8	<i>Prangos ilanae</i> Pimenov, Akalın & Kljuykov	17	<i>Prangos pabularia</i> Lindl.
9	<i>Prangos hulusii</i> S.G. Şenol, H. Yıldırım & Ö. Seçmen		

2.2.1. *Prangos* cinsinin morfolojik özellikleri

Çok yıllık, yükselici, gövde 15-150 cm, petiollere ait lifli kalıntılar çok iyi gelişmiştir. Yapraklar (3-) 4-6 pinnat, genellikle lobların sayısı çok, şeritsi-ipliksi, mukronat, gövde üst yaprakları daha dar, alt yaprakların kınları belirgin ve genellikle noduslardan petiolla ayrılırlar. Terminal umbellalar hermafrodit, yan umbellalar hermafrodit veya erkek çiçeklidir. Brakte ve brakteoller çok subulat-ipliksi, kalıcı veya düşücü veya ovat ve kalıcıdır. Sepaller belirgin veya belirsizdir. Petaller sarı, nadiren beyaz, tüysüz veya dış yüzeyi papillat-pubessenttir. Stilopodium genellikle

büyük, $\pm$ yassı. Meyve $\pm$ yandan basık, dar eliptik-globoz, merikarp 5 düz, undulat veya plikat, tam veya krenat kanatlı veya kanatsızdır. Mezokarpın iletim demetleri olduğu bölgelerdeki temel tabakalar altında 5 katlı suberinli doku bulunmakta veya (*P. meliocarpoides*) mezokarp devamlı ve içinde düzenli dağılmış iletim demetleri bulunmakta olup vittae çoktur [Herrnstadt ve Heyn, 1972].

2.2.2. *Prangos* cinsinin halk arasında kullanım alanları

Prangos cinsinin bazı türleri halk arasında tedavi amacıyla emolijan, tonik, antifungal, antihelmentik olarak çok eskiden beri kullanılmaktadır [Çoruh ve ark., 2007]. Bazı bölgelerde kurutulmuş ve toz haline getirilmiş kökünün afrodizyak olarak tüketildiği kaydedilmiştir [Baser ve ark., 2000]. Orta Asya'da *Prangos* cinsinin ekstraktlarının haricen kanamayı durdurucu ve yara izlerini iyileştirici olarak kullanıldığı belirtilmektedir [Tada ve ark., 2002]. *P. ferulacea* Kafkasya'da ve İran'da halk tarafından sindirim sistemi bozukluklarının tedavisinde, Sırbistan ve civarındaki bölgelerde ise bağırsak yaralarını iyileştirmede kullanılmaktadır [Kazeroni ve ark., 2006]. Özbekistan'da, *P. tschimganica* B. Fedtsch'in toprak üstü kısımlarının halk arasında cilt hastalığının (leukoplakik) tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir [Shikishima ve ark., 2001].

Prangos ferulacea özellikle Doğu Anadolu ve Erzurum'da gıda amacı ile çok fazla tüketilen bir bitkidir. Yaprakları tuzlu suda salamura halinde saklanmakta ve sebze olarak kullanılmaktadır [Baytop, 1999]. Ayrıca, bitkinin toprak üstü kısımları çiçek açmadan önce özellikle peynire ve diğer süt ürünlerine güzel koku vermek için katılır [Çoruh ve ark., 2007]. Otlı peynire yöresel olarak sirno (*Allium* sp.), mendi (*Chaerophyllum macropodum* Boiss.), helis (*Prangos ferulacea*) ve siyabo (*Ferula rigidula* DC.) gibi isimlerle bilinen otlar katılmaktadır. Bu otların peynire değişik tat, koku ve aroma katmasının yanı sıra peynirin olgunlaşmasında da etkili olduğu belirtilmektedir [Coşkun ve Tunçtürk, 2000]. Yapılan bir çalışmanın sonucuna göre *P. ferulacea* hayvanlar için iyi bir besin kaynağı olup yüksek enerji içermektedir [Coşkun ve ark., 2004].

2.2.3. *Prangos* cinsi ile ilgili yapılan çalışmalar

Prangos cinsi ile yapılan moleküler çalışmalar

Literatür araştırması sonucunda, ülkemizde yayılış gösteren endemik *Prangos* türleri ile ilgili bu alanda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dünyada ise tez kapsamına girmeyen, *Prangos* cinsine ait diğer bazı türlerin çeşitli çalışmaları bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, İran’da endemik olarak bulunan, Umbelliferae (*Apiaceae*) familyasından bazı türlerin taksonomik ilişkisine bakılmıştır. Çalışmada, *Prangos* cinsine ait *Prangos uloptera*’nın (ITS-1: 217 bp; ITS-2: 222 bp); *Prangos acaulis*’in (ITS-1: 219 bp ; ITS-2: 222 bp); *Prangos haussknechtii*’nin (ITS-1: 216 bp; ITS-2: 221 bp) nükleer DNA’sının ITS-1 ve ITS-2 bölgelerinin genetik yapısı DNA dizi analizleri çalışmaları sonucunda belirlenmiştir [Valiejo-Roman ve ark., 2006]. Başka bir çalışmada ise *P. pabularia*’nın ITS-1 (217 bp) ve ITS-2 (223 bp) bölgeleri ayrı ayrı amplifiye edilerek dizi analizleri çıkarılmıştır [Downie ve ark., 1998]. İran’da yayılış gösteren Apioideae subfamilyasına ait 5 grubun filogenetik ilişkilerinin incelendiği bir çalışmada ise *Prangos uloptera*, *Prangos goniocarpa* ve *P. ferulacea* türlerinin ITS bölgelerinin dizi analizleri yapılmış ve 602 bp uzunluğunda bir bölge elde edilmiştir [Ajani ve ark., 2008].

Prangos cinsi ile yapılan biyolojik aktivite çalışmaları

Çeşitli araştırmalar sonucu bu cinse ait bazı türlerin sitotoksik [Tsetlin ve ark., 1972], antimikrobiyal [Tada ve ark., 2002, Sagun ve ark., 2006; Durmaz ve ark., 2006; Uzel ve ark., 2006] ve anti- HIV [Shikishima ve ark., 2001], antioksidatif [Mavi ve ark., 2004; Çoruh ve ark., 2007; Ahmed ve ark., 2011] özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada farklı *Prangos* türlerinden elde edilen fenolik ve kumarin türevlerinin *in vitro* olarak tümör hücre kültürlerine karşı sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. *P. latiloba* ve *P. seravschanica*’nın köklerinden elde edilen kumarinlerin aktivite gösterdiği, ancak bunlardan elde edilen fenolik asitler ile diğer

türlere ait kumarin ve fenolik asitlerin aktivite göstermediği ya da çok az aktivite gösterdiği belirtilmiştir [Tsetlin ve ark., 1972].

1988 yılında yapılan bir çalışmada, *Prangos pabularia*'nın tohumlarından elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve bu yağın test edilen gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı düşük aktivite gösterdiği belirtilmiştir [Meena ve ark., 1988].

Türkiye'de yetişen *P. platychlaena*'dan izole edilen sekiz kumarin türevinin çeşitli bakteri suşlarına ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitelerine bakılmış ve genel olarak kumarinlerin iyi aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir [Ulubelen ve ark., 1995]. Yapılan başka bir çalışmada, Türkiye'de yetişen *P. uechtritzi*'nin antimikrobiyal aktivitesi altı mantar türüne karşı incelenmiş ve en fazla etkilenen mantar *Penicillium digitatum* olarak belirlenmiştir [Özcan, 1999].

Yapılan bir çalışmada, Özbekistan'da yetişen *P. pabularia*'nın kök ve gövdesinden elde edilen 16 kumarin türevinin çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon yöntemi ile incelenmiştir [Tada ve ark., 2002]. Başka bir çalışmada ise Özbekistan'da yetişen *P. tschimganica*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen kumarinlerin anti-HIV aktiviteleri tespit edilmiştir [Shikishima ve ark., 2001].

Prangos ferulacea'nin toprak üstü kısımlarına ait metanol, etanol, n-hekzan ve su ekstraktlarının *Listeria monocytogenes*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. En iyi etkiyi metanol ekstraktının gösterdiği belirtilmiştir [Sagun ve ark., 2006]. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, aynı türün 4 ekstraktının diğer gıda patojenlerine karşı gösterdikleri etki incelenmiştir. Su ekstraktı dışındaki diğer ekstraktlar çalışılan tüm gram pozitif bakterilere karşı etki göstermiştir. Ancak hiçbir ekstraktın gram negatif bakterilere karşı etki göstermediği belirlenmiştir [Durmaz ve ark., 2006].

P. platychlaena ve *P. uechtritzi*'nin meyvelerinden elde edilen uçucu yağların mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Her iki yağın da çalışılan bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ancak *P. uechtritzi*'nin daha etkin olduğu belirtilmiştir [Uzel ve ark., 2006].

P. ferulacea'nin su ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH radikali giderme yöntemi, lipit peroksidasyon inhibisyon yöntemi (Tiyobarbiturik asit testi), total fenol bileşik miktar tayini ve redüktaz güç tayin etme yöntemleri ile test edilmiş ve *P. ferulacea*'nin antioksidan aktivite yönünden etkili bir bitki olduğu belirtilmiştir [Mavi ve ark., 2004].

Çoruh ve arkadaşları (2007), *P. ferulacea*'nin toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktının antioksidan aktivitesini DPPH yöntemi, lipit peroksidasyon inhibe etme, total fenol bileşik tayin etme ve glutatyon S transferaz üzerindeki etki yöntemleri ile incelemişlerdir. Lipit peroksidasyon yönteminde *P. ferulacea* metanol ekstraktı ($IC_{50} = 0,152$ mg/ml) kontrol olarak kullanılan α -tokoferolden ($IC_{50} = 0,23$ mg/ml) daha etkili bulunmuştur. Ayrıca, yapılan diğer yöntemlerde de *P. ferulacea*'nin iyi bir antioksidan olduğu belirlenmiştir. *P. ferulacea*'nin kumarin, flavonoit ve terpenik yapıda bileşikler içermesi nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, Konya çevresinden toplanan 4 *Prangos* türünün kök, herba ve meyvelerinden su ve metanol ile hazırlanan ekstraktlarının total fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri; serbest radikal süpürücü aktivite kalitatif DPPH yöntemi ile, lipozom lipit peroksidasyonu ise tiyobarbitürik asit yöntemi ile çalışılmıştır. Total fenolik madde miktarları kuru ağırlık üzerinden gallik asit eşdeğeri olarak metanol ekstraktları 77,99-140,29 mg/g arasında; sulu ekstraktları ise 37,53- 97,29 mg/g arasında hesaplanmıştır. Bütün ekstraktlar DPPH• testinde zayıf bir antioksidan aktivite göstermiştir. TBA testinde metanol ekstraktlarında sulu ekstraktlara oranla daha yüksek aktivite gözlemlenmiştir [Ahmed ve ark., 2011].

**a****a₁****b****b₁**

Resim 2.1. Türkiye’de endemik olarak bulunan bazı *Prangos* türleri: a) *P. sp. nova*, a₁) *P. sp. nova*’nın meyvesi b) *P. denticulata*, b₁) *P. denticulata*’nın meyvesi c) *P. platychloena* subsp. *engizekensis* d) *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* e) *P. heyndiae* f) *P. ilanae*



c



d



e



f

Resim 2.1. (Devam) Türkiye’de endemik olarak bulunan bazı *Prangos* türleri: a) *P. sp. nova*, a₁) *P. sp. nova*’nın meyvesi b) *P. denticulata*, b₁) *P. denticulata*’nın meyvesi c) *P. platychloena* subsp. *engizekensis* d) *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* e) *P. heyniae* f) *P. ilanae*

2.3. Genetik Varyasyon ve Filogenetik Analiz

Bitki türlerinin morfolojik karakterlere dayanılarak yapılan taksonomik sınıflandırması, bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmekte ve ayrıca morfolojik özellikleri birbirine yakın olan grupların genetik olarak birbirinden çok farklı olabildiği de bilinmektedir. Bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen moleküler genetik belirteçler bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır [Havey, 1991; Yang ve Quiros, 1993].

Doğrudan genotip üzerinde değerlendirme yapan DNA temelli belirteçler, türler arası ve tür içi varyasyonun evrimsel hızını ve kalıtım modelini açıklamak için oldukça önemlidir. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Basit Dizi Tekrarları Arası (ISSR), Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler (SCARs), Tek Zincirli Konformasyonel Polimorfizm (SSCP), Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (CAPS) gibi şekillerde olabilen bu yöntemler evrim çalışmaları [Faivre-Rampant ve ark., 1992], ıslah çalışmaları [Das ve ark., 1999], bitki sistematigi [Cho ve ark., 1996] gibi değişik kullanım alanlarına sahiptir.

Bununla birlikte, taksonomistler için genlerin genetik varyasyonunu doğru tahmin etmenin en iyi yolu DNA dizi analizi olarak görülmektedir [Hwang ve Kim, 1999]. Dizi analizlerinin kullanılması ve yeni filogenetik analiz metotlarının bulunmasıyla bitki moleküler sistematigi son 20 yıldır hızla gelişme göstermiştir. Dizi analizi yöntemleri canlıların coğrafik orijinlerinin bulunmasından [Allan ve ark., 2004], canlıların filogenilerini moleküler olarak ispatlamaya kadar [Cohen ve Wedymann, 2005] birçok alanda kullanılmaktadır.

Organizmaların evrimsel tarihi filogeni olarak adlandırılır. Filogenetik analiz farklı türler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilir. Moleküler

filogenetik alışmalar, DNA ve proteinlerde oluşan değişikliklerin hızını ve karakterini saptamaya ve böylece genler ve organizmaların evrimsel tarihini araştırmaya yöneliktir. Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir [Saitou ve Imanishi, 1989].

2.3.1. Bitki DNA'sında genetik varyasyon nerede görülür?

iekli bir bitkinin bilinen en küçük haploid genomu hala 63 milyon baz ifti DNA'nın üzerindedir ve bazıları ise 100 milyar baz ifti DNA içermektedir. Bu durumda genetik varyasyon ararken genomun hangi parçası (rneğin hangi lokus) incelenmelidir. Bitkilerde düzenleme (regülatör) ve kodlama dizileri son derece korunmuş olma eğilimindedir ve genellikle bunlar sadece farklı cinse, familyaya, takıma, sınıfa ve divisyona ait bitkiler karşılaştırıldığında yani yüksek taksonomik seviyelerde varyasyon göstermektedirler. Familya seviyesinden yukarıdaki bitki kategorilerinde, bitkilerin morfolojik farklılıkları bitkileri uygun kategorilere yerleştirmeye yeterli olduğundan sınıflandırma ile ilgili büyük tartışmalar bu kısımda çok olmamaktadır. Ancak, alt taksonomik seviyeler için (cins ve tür) morfolojik benzerlikler birbirine o kadar yakın olabilir ki, bitki sistematığı içinde büyük tartışmalar meydana gelebilmekte ve bu nedenle uygun sınıflandırma yapılamayabilmektedir. Jeolojik zaman ölçeğinde, bu hiyerarşik birimler sadece son zamanlarda atalarından farklılaşmışlardır ve onların DNA'sında mutasyonlarının birikmesi çok az zamanda olmuştur. Bu nedenle, bu seviyelerde bitkiler karşılaştırıldığında, organizma üzerinde zararlı bir etkisi olmadan çok hızlı bir şekilde mutasyon biriktiren lokuslarla çalışmak gereklidir. Önceden “nemsiz” DNA olarak bilinen bu bölgeler, korunmuş yapısal genler arasında serpiştirilmiştir [Brinegar, 2009].

Angiospermilerin moleküler filogenisi ile ilgili çalışmalar kloroplast DNA'sı [Graham ve Olmstead, 2000; Savolainen ve ark., 2000; Lee ve Wen 2004], mitokondriyal DNA [Qui ve ark., 1999] ve yüksek oranda tekrarlı nükleer ribozomal

DNA [Beier ve ark., 2004; Guzman ve Vargas, 2005; Bellarosa ve ark., 2005] üzerine olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre bu üç genomdaki DNA dizileri farklı oranlarda değişime uğramıştır. Nüklear genom daha hızlıyken, mitokondriyal ve plastid genomlarının daha yavaş değiştiği tahmin edilmektedir [Palmer, 1985]. Mitokondri DNA'sı oldukça değişken bir yapı gösterir. Bu nedenle bitki sistematğinde daha çok kloroplast genomundaki ve çekirdek genomundaki özel bölgeler kullanılır. Bu tür çalışmalarda, taksonların bu bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılıp dizi analizleri yapılmakta ve baz polimorfizmine bakılarak taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiler belirlenmektedir.

2.3.2. Kloroplast DNA'sı ve transfer ribonükleik asit (tRNA) bölgesi

Kloroplast DNA'sı kapalı, halkasal bir moleküldür. Çiçekli bitkilerin kloroplast genomu 120-217 kilobaz uzunluğunda olup yüksek derecede korunmuştur. Çok fazla kodlanmayan bölge içermediği için nüklear genoma göre çok daha yavaş hızla evrimleşmektedir [Pillay ve Mazzella, 1997]. Çekirdek genomuna göre kloroplast DNA'yı saflaştırmak ve karakterize etmek, kloroplast kodlayıcı genlerini klonlamak ve dizinlemek daha kolaydır. Ayrıca kloroplast DNA'nın yavaş evrim oranı büyük taksonomik gruplar arasındaki çalışmalar için oldukça avantajlıdır [Clegg, 1993].

Kloroplast DNA'sı yaygın olarak populasyonlar, tür, cins ve bazen daha yüksek taksonomik seviyelerinin arasındaki çeşitlilik değerlendirilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır [Brinegar, 2009]. Muhtemelen daha az kısıtlama altında olan ve böylece daha hızlı bir şekilde evrimleşebilen kloroplast DNA'sının kodlanmayan bölgeleri, alt taksonomik düzeyler için faydalı filogenetik bilgi sağlayabilmektedir [Sang ve ark., 1997]. İntronları ve intergenik araları (IGS) içeren birkaç kodlanmayan bölge son zamanlarda familya ve cins içi ilişkileri değerlendirilmesinde dizilenmişlerdir [Bohle ve ark., 1994; Maner ve ark., 1994; Sang ve ark., 1997]. Moleküler sistematikçiler intron, kodlanan bölge, intergenik bölge olmak üzere kloroplast DNA'sının *rbcL*, *matK*, *ndhF*, *rpl16*, *atpB-rbcL*, *rps4-Trns*, *rps16*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *Trns-G* gibi fragmentleri ile çeşitli taksonomik düzeylerde çalışmalar yapmışlardır [Gao ve ark., 2008; Li, 2008; Wilson, 2009].

Kloroplast tarafından kodlanan ribuloz 1,5-bifosfatkarboksilaz/oksijenaz (RUBISCO) geninin büyük fragmenti *rbcL* bitki filogenisi için kullanılmaktadır. İki sebepten dolayı *rbcL*'nin sistematik çalışmalarda kullanılması avantajlıdır. Bunlardan birincisi *rbcL* genlerinin dizisi çok açıktır. İkincisi de yavaş bir hızla evrimleşmesidir. Böylece, *rbcL* gen dizisi analizi bitki filogenisinde cins ve daha üst taksonomik seviyeler için yardımcı bir kaynaktır [Lin ve ark., 2005]. Filogenetik değerlendirilmesi için kullanılan bir başka kloroplast IGS lokusu, *rbcL* ve *accD* genler arasında bulunmuştur (Şekil 2.1). *rbcL* gen dizisi familyalar içindeki cinsler arasındaki ayırımı kullanılmakta iken, IGS bölgesi popülasyonlar ve filojeografik çalışmalarda daha kullanışlıdır [Brinegar, 2009].



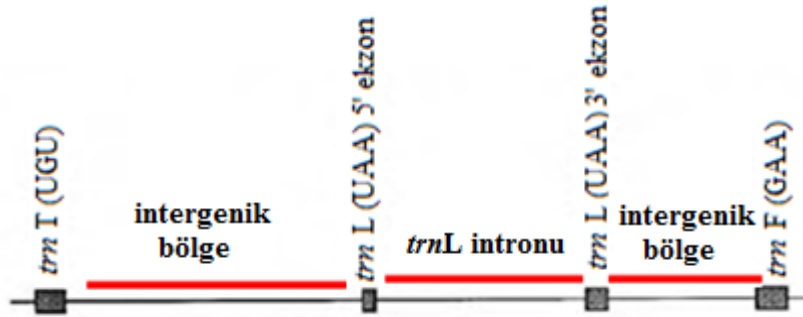
Şekil 2.1. *rbcL* ve *accD* genleri arasındaki kloroplast IGS lokusu [Brinegar, 2009]

NdhF geninin (gözlenen homoloji bazında) NADH dehidrojenaz sisteminin alt ünitesi 6'yı kodladığı kabul edilmektedir [Sugiura, 1992]. NdhF dizisinin sistematik çalışmalardaki ilk uygulamaları familyalar arasındaki ilişkiyi belirlemeye dayanır. Farklı familyalardan farklı dizilerle çalışmak mümkün oldukça *ndhF* dizilerinin uygulamalarının filogenetik sorunlarda familyalar arasında çok daha başarılı olduğu belirlenmiştir [Olmstead ve ark., 2000].

MatK geni kloroplast genomunda şimdiye kadar bulunan en hızlı evrim geçiren kodlama bölgesi olarak öne sürülmüştür [Olmstead ve Palmer, 1994]. MatK kodlama bölgesi çoğu angiospermde 1500-1600 baz çifti uzunluğundadır ve *trnK* UUU grup II intron V etki alanı (domain) içinde yer almaktadır. Yapısal benzerliklere dayanarak, bu bölgenin bir maturazı kodladığı öne sürülmüştür ki aslında *matK* yüksek bitki plastidlerin tek maturazıdır. Transkripsiyon çalışmaları *matK*'nin kendisini içeren *trnK* ile birlikte transkribe olduğunu göstermiştir [Wanke ve ark., 2007]. MatK kodlanan bölgesinin dizileri angiospermilerin arasındaki familya içi

düzeyde, örneğin Polemoniaceae [Steele ve Vilgalys, 1994] ve Saxifragaceae [Johnson ve Soltis, 1994]'de filogenetik ilişkilerin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

Kloroplast DNA'sı üzerindeki kodlanmayan bölgeler çok yüksek frekanslı mutasyon gösterdiği için evrimsel ilişkilerin analizinde etkin olarak kullanılmaktadır. Bu bölgelerden en çok çalışılardan birisi familya seviyesi altında filogenetik ilişkileri belirlemede kullanılan *tRNA* (*trnT-trnF*) bölgesidir. Bu bölge, *trnL* (UAA) genini ve yanyana iki intergenik bölgeyi (IGS) (*trnT-L* ve *trnL-F*) kapsamaktadır (Şekil 2.2) [Taberlet ve ark., 1991; Kelchner, 2000]. Bunlardan lösin transfer RNA'sını kodlayan *trnL* geni ve fenilalanin transfer RNA'sını kodlayan *trnF* geni arasında bulunan intergenik boşluk, filogenetik çalışmalarda kloroplast DNA'sının en sık kullanılan kodlanmayan bölgesini temsil etmektedir [Bohle ve ark., 1994; Gielly ve Taberlet, 1994].



Şekil 2.2. *TrnT-F* bölgesinin şematik gösterimi [Taberlet ve ark., 1991]

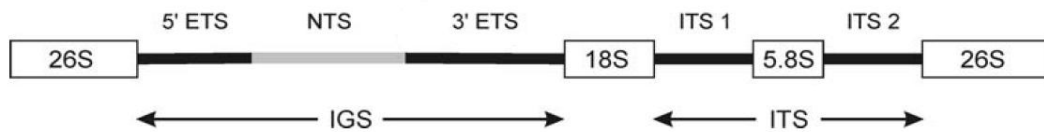
Bununla birlikte, valin transfer RNA'yı kodlayan *trnV* (GAC) geni arasında kalan intron bölgesi de filogenetik çalışmalarda sıklıkta kullanılmaktadır [Wang ve ark., 1999].

Bu bölgelerden başka, iki *trnL* ekzonunu ayıran ve belirgin sekans farklılığı gösteren intron sekansı olan *trnL* (UAA) intronu da çok yakın akraba türler arasında filogenilerin oluşturulmasında [Scharaschkin ve Doyle, 2005; McDade ve ark., 2005; Chen ve ark., 2005] veya bitki türlerinin tanımlanmasında [Ronning ve ark.,

2005; Ward ve ark., 2005] geniş çapta kullanılmaktadır. Bununla birlikte, *trnL* (UAA) bölgesinin kloroplast DNA'sının en değişken kodlanmayan bölgesini temsil etmediği kabul edilmektedir [Shaw ve ark., 2005]. Ancak, bu bölge bazı özel avantajlar taşımaktadır. Bu bölge için evrensel primerler 20 yıl önce tasarlanmış [Taberlet ve ark., 1991] ve daha sonra yakın cins ve türler arasında başta filogenetik çalışmalar olmak üzere yaygın olarak kullanılmıştır [Gielly ve Taberlet, 1996]. *trnL* (UAA) intronunun evrimi iyice analiz edilmiş ve anlaşılmıştır [Quandt ve ark., 2004; Quandt ve Stech, 2005]. Ayrıca, bu bölge kloroplast DNA'sında sadece Grup I introndur [Shinozaki ve ark., 1986; Palmer, 1991]. Bu ifade korunmuş ve değişken bölgelerin ard arda sıralanarak oluşturduğu korunmuş ikincil bir yapıya sahip olduğu anlamına gelmektedir [Davies ve ark., 1982; Quandt ve ark., 2004]. Bunun sonucu olarak, çeşitli *trnL* intron dizilerinin hizalanması korunmuş bölgelerde gömülü olan çok yönlü yeni primer tasarımına ve aradaki kısa değişken bölgenin çoğaltılmasına izin verebilmektedir [Taberlet ve ark., 2007].

2.3.3. Nüklear ribozomal DNA'nın iç transkribe olan ara (ITS) bölgesi

Ökaryotik ribozomal RNA genleri (ribozomal DNA veya rDNA) ribozomun RNA parçasını kodlar ve birbiri ardına gelen dizilerin bir parçası olan tekrarlı üniteler NOR (Nucleolar organizer regions) olarak bilinen kromozom bölgelerinde bulunur. Her tekrarlı ünite transkribe olan ve 18S, 5.8S ve 26S rRNA genlerini içeren bir bölgeye, dış transkribe olan ara bölgelere (ETS; External Transcribed Spacer) ve transkribe olmayan bir ara bölgeye (NTS; non-transcribed spacer) sahiptir. İç transkribe olan ara bölgeler (ITS-1 ve ITS-2; Internal Transcribed Spacer) 5.8S, 18S ve 26S rRNA alt ünitelerini kodlayan genlerin arasında yerleşmiştir (Şekil 2.3) [Dhar ve ark., 2006].



Şekil 2.3. Nüklear ribozomal DNA bölgesinin evrensel yapısının şematik gösterimi [Calonje ve ark., 2009]

ITS-1 ve ITS-2 bölgeleri ribozomal transkripsiyonel ünitenin birer parçası olsalar da bu diziler olgun ribozomların yapısına katılmazlar. Bunlar ribozomal RNA'ların olgunlaşması sırasında spesifik bir yarıma geçirirler. Bu nedenle, bunlar hemen hemen nötral gelişen DNA belirleyiciler olarak kabul edilebilir, buna rağmen bu bölgeler, korunduğunu bir dereceye kadar ima eden ve filogenetikte kullanılabilirliğine yol açan rRNA transkripti ve ITS'in ikincil yapısına bağlı süreçler için gerekli sinyalleri içerirler [Calonje ve ark., 2009].

ITS-1 ve ITS-2 doğada yapısal değildir ve ayırdığı 18S, 5.8S, ve 26S rRNA'lara göre çok daha yüksek mutasyon oranlarına sahiptir. Genellikle bu iki lokus küçük 5.8S rRNA bölge ile birlikte amplifiye edilip dizilenmektedir [Brinegar, 2009]. ITS-1 ve ITS-2 bölgeleri ve bunlara ek olarak 5.8S geni ITS bölgesi olarak adlandırılır. ITS-1 ve ITS-2 yaklaşık olarak 250 bp uzunluğunda, 5.8S alt ünitesi ise angiospermiler içerisindeki uzunluğu sabit olup 163-164 bp uzunluğundadır [Baldwin, 1992].

ITS (ITS-1 + 5.8S rRNA + ITS-2) nrDNA'nın en çok çeşitlilik gösteren bölümüdür ve bitki filogenetiğinin yeniden yapılanmasında önemli bir lokus olduğu kanıtlanmıştır. Bu ITS bölgeleri genel olarak tür içinde korunmuştur, fakat türler arasında ya da cinsler arasında filogenetik ağaçların yapımında yararlı olabilecek yeterli varyasyonu gösterirler. Birçok faktör ITS bölgesini filogenetik çalışmalarda kullanışlı kılmaktadır. İlk olarak ITS bölgesi bitki nüklear genomunda oldukça fazla tekrarlı haldedir. nrDNA'nın yüksek kopya sayısı amplifikasyonunu ve dizilenmesini daha kolay hale getirmektedir. İkinci olarak homolog olmayan kopyaları nokta mutasyonu ve/veya insersiyon/delesyon (indel) şeklinde bulunabilmekte ve bir türün bireyleri arasında küçük varyasyonlara sebep olabilmektedir. Son olarak, ITS bölgesi küçüktür (~700 bp) ve yanında oldukça yüksek seviyede korunmuş 18S ve 26S nrDNA genleri gibi diziler bulunmaktadır [Cerbah ve ark., 1998; Urbatsch ve ark., 2000; Meerow, 2000].

ITS bölgesinin amplifikasyonu ve dizilenmesi için evrensel primerler (Örneğin; Standart ITS1 ve ITS4 primerleri) kullanılabilmektedir [White ve ark., 1990].

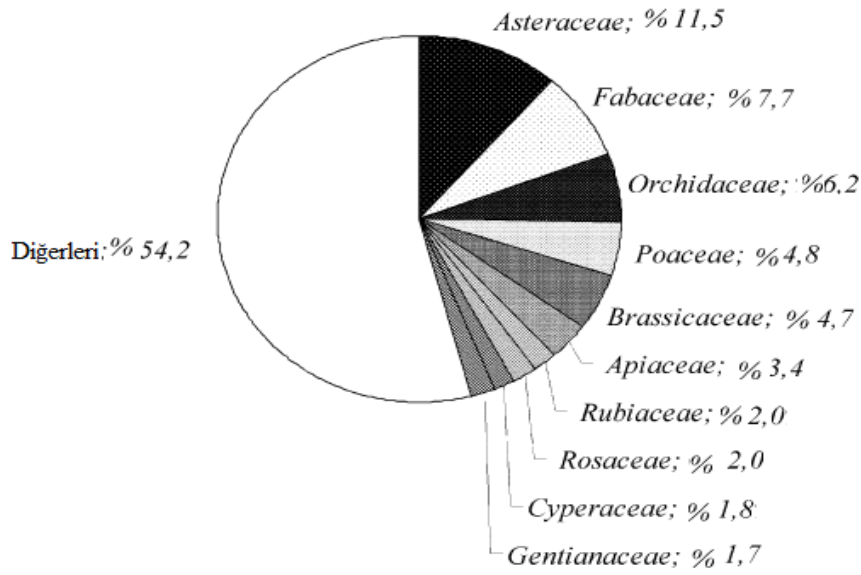
Bununla birlikte bazı bitki türlerinin DNA'sı evrensel primerler ile amplifiye olmayabilir ve bu yüzden türe özgü ITS primerler gerekebilir.

ITS-1 ya da ITS-2 bölgelerinin dizi analizi sonuçlarına dayanan filogenetik ağaçlar, diğer diziler tarafından desteklenmeyen sonuçlar ortaya çıkartabilir. Bu yüzden ITS-1 ve ITS-2 bölgelerinden elde edilen bilgilerin birleştirilmesi ile açığa çıkan sonuçlar daha doğru, sağlam ve tam ağaçlar ortaya çıkartır [Baldwin, 1992].

Bu zamana kadar nüklear ITS bölgelerinin bitki gruplarının doğru filogenileri için çok yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bir ITS'den türetilen filogeni Nyctaginaceae Nyctagineae tribusundaki cinslerin arasındaki evrimsel ilişkilerini çözümlerken, *rbcL*-*accD* IGS dizisi sadece göreceli birkaç bilgilendirici bölge sağlamıştır [Levin, 2000].

Yaygın cins *Astragalus*'un 115 türünün oldukça çözülmüş filogenisi ITS dizilerinden oluşturulmuştur [Wojciechowski ve ark., 1999]. ITS yüksek tekrarlanabilirlik, hızlı mutasyon, istikrar gibi özel özellikleri nedeniyle sistematik araştırmaların yanı sıra bazı şifalı bitkilerin kökeninin incelenmesi amacıyla da kullanılmıştır [Xu ve ark., 2006, Shen ve ark., 2005; Yu ve ark., 2003].

ITS'in filogenetik rekonstrüksiyonlar için en yaygın kullanılan bölgelerden biri olmaya devam etmesi, dizilenen sayısının giderek artmasına neden olmuştur. Örneğin; Embryophyta için 2003 yılında dizilenen ITS bölgesi sayısı 23937 iken, bu sayı 2007 yılında 74866 olmuştur. Haziran 2007'ye göre ise ITS bölgesi en çok dizilenen familya Asteraceae olmuş, bunu ardından Fabaceae, Orchideaceae, Poaceae, Brassicaceae ve Apiaceae takip etmiştir (Şekil 2.4) [Calonje ve ark., 2009].



Şekil 2.4. ITS bölgesi en çok dizilenen Embryophyta'ya ait ilk 10 familya [Calonje ve ark., 2009]

2.4. Tohum Depo Proteinleri

Pek çok türün tohum depo proteinleri moleküler sistematik çalışmalarında 1960'lardan beri kullanılmaktadır. Tohum protein profilleri genetik homolojinin moleküler seviyede araştırılmasında, taksonomik ve filogenetik problemlerin çözülmesinde kullanılan bir tekniktir [Singh ve ark., 1991].

Tohum proteinlerinin elektroforezlerinin geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre avantajı, proteinlerin gelişme mevsimlerinden bağımsız olması, bitkilerin yetiştirilmesine gerek olmaması, materyalin tüm yıl boyunca elde edilebilir olması, hızlı analiz edilebilmesi, saklanmasıdaki kolaylıklar ve az miktarda örneğin yeterliliğidir. Ayrıca, yapılan çalışmalar tohumların gösterdikleri direncin ve fizyolojik tohum faaliyetinin, denatüre olmuş proteinlerin elektroforetik sonuçlarını etkilemediğini; yüksek veya düşük direnç gösteren tohumların elektroforetik sonuçlarının aynı olduğunu, kurumuş tohumların bile incelenbildiğini göstermiştir [Dinelli ve Lucchese, 1999].

2.4.1. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez, yüklü proteinlerin ve DNA'nın elektriksel alandaki hareketine dayanan bir işlemdir. Bu işlemde makromolekülü hareket ettiren güç elektrik potansiyelidir. Proteinleri ayırmak ve karakterize etmekte kullanılan en yaygın teknik Poliakrilamit Jel Elektroforezi (PAGE)'dir. Bu teknikte, poliakrilamit jeller akrilamit ve çapraz bağlayıcı bisakrilamidin kopolimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Akrilamit ve bisakrilamit yüzdelерinin değiştirilmesiyle de çeşitli por çaplarında jeller elde edilebilmektedir. Amonyum persülfattan oluşan serbest radikaller (R') polimerizasyonu başlatmak, N,N,N',N',-tetrametilenetilendiamin (TEMED) ise ortama polimerizasyonu hızlandırmak için ilave edilmektedir. TEMED ya da amonyum persülfat derişimi arttırıldığında polimerizasyon hızlanmaktadır [Hames ve Rickwood, 1990; Alberts ve ark., 1994].

Sodyum Dodesil Sülfat-PAGE, poliakrilamit jel elektroforezinin değişik bir uygulama şeklidir. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), hem hidrofobik bölge ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}$ kuyruğu) hem de hidrofilik bölge ($\text{SO}^{3-} \text{Na}^+$ başı) içermesi nedeniyle amfipatik bir maddedir. Güçlü bir deterjan olan SDS, polipeptit omurgasının etrafını sararak proteini denatüre etmektedir. Proteinler, SDS ve bir tiol reaktifi (2-merkaptoetanol) içeren ortamda ısıtılarak denatüre edildiklerinde disülfid bağları kırılmakta ve yaklaşık her iki aminoasit rezidusu için bir molekül SDS bağlanmaktadır. Bağlanan SDS ile proteinler negatif yüklenmekte ve anoda doğru hareket etmektedir. Böylece proteinler yalnız molekül ağırlıklarına göre ayrılmış olmaktadır. Proteinin birden fazla alt birimi varsa değişik molekül ağırlıklı her bir alt birim için ayrı bir bant gözlenmektedir [Hames ve Rickwood, 1990; Alberts ve ark., 1994].

Proteinlerin SDS-PAGE analizi ile elde edilen dendrogramları proteinlerin genel özellikleri, kültürlerin belirlenmesi, tohum gelişimi, tohum protein polimorfizmi, türlerin karşılaştırılması gibi pek çok farklı alandaki çalışmalarda kullanılmaktadır [Bianchi-Hall ve ark., 1993]. SDS-PAGE ile elde edilen protein profilleri *Asteraceae* [Fischer ve Jensen, 1992], *Lauraceae* [Kamel ve Loutfy, 2001], *Leguminosae* [Badr,

1995; Schmit ve ark., 1996], *Rosaceae* [Dowidar ve ark., 2003], *Solanaceae* [Khalifa ve ark., 1998] gibi çeşitli familyalara ait tür, cins, seksiyon ve tribusların taksonomik ve filogenetik ilişkilerini aydınlatmakta başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

2.5. Antioksidanlar

Oksijen yaşam için önemli olan metabolizma işlemlerinde gereklidir. Bu metabolizma işlemleri oksidasyon ve redüksiyon kimyasal reaksiyonlarına bağlıdır. Ancak, oksidasyon sonucu moleküllerin eşlenmemiş elektronlara bölünmesiyle serbest radikaller oluşmakta ve çok reaktif olan bu moleküller hücre hasarlarına neden olmaktadır. Antioksidanlar serbest radikalleri zarar vermeden durdurabilen ve oksidatif reaksiyonları engelleyebilen maddeler olup, etkileri karşılaşılan serbest radikalin türüne göre oluşmaktadır [Milbury ve Richer, 2008]. Gerçekte antioksidanlar ve radikaller yaşam biyokimyasının çoğunu etkilerler. Oluşan bu serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri bulunsada, bazı metabolik olayların devamı için bunların oluşumu kaçınılmazdır. Antioksidanlar biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin düzeyini regüle ederler, böylece bunların zarar vermeden yararlı biyolojik fonksiyonlarını yerine getirmeleri sağlanmış olur [Freeman ve Crapo, 1982; Halliwell ve Gutteridge, 2006].

2.5.1. Tarihçe

Serbest radikal ve oksidatif stres teorisinin kökeni, 19. Yüzyılın sonlarına dayanmaktadır. Hidrojen peroksit ile Fe^{++} iyonlarının varlığında tartarik asitin oksidasyonunun keşfi bu yolda atılan ilk adımdır [Fenton, 1876]. Moses Gomberg (1866-1947) adlı araştırmacı, heksafeniletan sentezi için Michigan Üniversitesindeki laboratuvarında çalışırken, bir tesadüf sonucu renksiz trifenil metil halojenlerinin gümüş ile reaksiyona girdiğinde sarı renkli trifenil metil radikali oluşturduğunu gözlemlemiştir. Trifenil metil radikali organik kimyada tanımlanmış ilk radikaldır [Gomberg, 1900]. 1954'de elektron spin rezonans tekniği kullanılarak yapılan çalışmada, serbest radikallerin hücrede oluştuğunu ortaya koyan ilk kanıtlar elde edilmiştir. Nature dergisinde yayınlanan bu çalışmada metabolik olarak aktif olan

dokularda oluşan serbest radikal düzeyinin diğer dokulara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [Commoner ve ark., 1954; Çakatay, 2006].

1957 yılında Denham Harman “yaşlanmanın serbest radikal teorisi”ni önermiştir. Onun hipotezine göre, yaşlanmanın sonuçları özellikle hücre mitokondrilerinde normal metabolizma sırasında radikallerin saldırıları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Yine onun hipotezine göre, dengesiz yapılarından dolayı oldukça reaktif olan radikaller sağlıklı hücre dokularına zarar veren kontrol dışı reaksiyonlara girmekte ve protein, yağ ve nükleik asitlere verilen hasar vücutta biriktikçe yaşlanma etkileri ortaya çıkmaktadır [Harman, 1957]. Harman’ın teorisi başlangıçta çok kabul görmemiştir, çünkü zamanın bilim adamlarının çoğu serbest dolaşan radikallerin canlı biyokimyasında çok önemli bir etkisinin olmayacağına inanmışlardır [Pryor, 1968]. Serbest radikallerin biyolojide önemli bir rol oynayabileceği yönünde ilk güvenilir kanıt 1968 yılında süperoksit dismutaz (SOD) adlı ve fonksiyonu süperoksit radikallerinin detokslaması olan özel bir enzimin keşfiyle bulunmuştur [McCord ve Fridovich, 1968]. Serbest radikallerin var olabildiği ve biyomoleküllerle etkileşebildiği ve ana fonksiyonları radikallerin kontrolü olan enzim sistemlerinin var olduğu tespit edilince Harman’ın teorisi kabul edilmeye başlamıştır. Bu radikal kontrol kavramı beraberinde radikallerin biyolojik ortamlarda tehlikeli varlıklar olduğu anlayışını taşımaktadır [Milbury ve Richer, 2008].

2.5.2. Serbest radikaller ve oluşum yolları

Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivlik kazandırarak protein, lipid, DNA gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır [Diplock, 1998].

Hücresinin normal solunumu sırasında yan ürün olarak oluşan bu reaktif oksijen ve azot türleri radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir. Biyolojik sistemlerde bulunan süperoksit anyon radikali ($\cdot\text{O}_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve singlet oksijen ($^1\Delta_g / ^1\text{O}_2$) oldukça önemlidirler (Çizelge 2.2) [Frei, 1994; Halliwell ve ark., 2000].

Çizelge 2.2. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS)				Reaktif nitrojen türleri (RNS)			
Serbest radikaller		Radikal olmayanlar		Serbest radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil	$\cdot\text{OH}$	Hipoklorik asit	HOCl	Nitrik oksit	$\text{NO}\cdot$	Nitroksi anyonu	NO^-
Süperoksit	$\cdot\text{O}_2^-$	Hidrojen peroksit	H_2O_2	Nitrojen dioksit	$\text{NO}_2\cdot$	Peroksinitrit	ONOO^-
Tiyol	$\text{RS}\cdot$	Singlet oksijen	$^1\Delta_g(^1\text{O}_2)$			Nitrozil katyonu	NO^+
Peroksit	$\text{RO}_2\cdot$	Ozon	O_3			Peroksi nitrozaset	ONOOH
Alkoksi	$\text{RO}\cdot$	Lipit peroksit	LOOH			Dinitrojen trioksit	N_2O_3
Tiyil peroksit	$\text{RSO}_2\cdot$					Nitröz asit	HNO_2

Süperoksit radikalinin kendisi doğrudan zarar vermemektedir. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Hidrojen peroksit ise eşleşmemiş elektronu olmadığı için aslında bir radikal değildir. Ancak, süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu veya Fe^{2+} gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek fenton reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali hidroksil radikalinin oluşmasına neden olarak toksik etki gösterebilmektedir [Frei, 1994; Halliwell ve ark., 2000]. Hidroksi radikali oldukça reaktif bir tür olup, hızlı bir şekilde lipit radikallerini oluşturarak lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını

başlatmaktadır [Miller, 1996]. Normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" molekülü, yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen, hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksidlerin oluşumuna yol açar [Halliwell, 1991].

Başta elektron taşıma zinciri olmak üzere oksidan enzimlerin reaksiyonu, fagositik hücrelerin aktivasyonu, otooksidasyon reaksiyonları, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları reaktif oksijen partiküllerini oluşturan başlıca endojen kaynaklar olup ekzojen kaynaklar arasında ise redoks döngüsü maddeleri, ilaç oksidasyonları, iyonize radyasyon, güneş ışığı, sigara kullanımı sayılabilir (Çizelge 2.3) [Cooke ve ark., 2003].

Çizelge 2.3. Reaktif oksijen partiküllerinin kaynakları [Cross ve ark., 1987]

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Kaynakları	
<i>I - Normal biyolojik işlemler</i>	
Oksijenli solunum	Katabolik ve anabolik işlemler
<i>II - Oksidatif stres yapıcı durumlar</i>	
- İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite -intoksikasyon	Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
Ksenobiotik maddelerin etkisi a-) İn hale edilenler b-) Alışkanlık yapan maddeler c-) İlaçlar	Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eozinofil, endotelial hücreler)
Oksidan enzimler Ksantin oksidaz, İndolamin dioksijenaz, Triptofan dioksijenaz, Galaktoz oksidaz, Siklooksijenaz, Lipooksijenaz, Monoamino oksidaz	Uzun süreli metabolik hastalıklar Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara
<i>III - Yaşlanma süreci</i>	

Reaktif oksijen türleri ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz, sitokrom P-450, siklooksijenaz, lipooksijenaz, dehidrojenaz, peroksidaz gibi birçok enzimin aktivitesinin bir sonucu olarak da üretilmektedir [Punchard ve Kelly, 1996; Meydani,

2001]. Ksantin oksidaz, canlı sistemde reaktif oksijen türlerini oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir. Ksantin oksidazın faaliyeti sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır. Canlı sistemde güçlü oksidan kaynaklarından biri de hidrojen peroksit tarafından klorid iyonlarının oksidasyonu yoluyla hipoklorik asit üretimini katalizleyen “Nötrofilik miyeloperoksidad” enzimidir. Bu reaksiyonun toksisitesi savunma sisteminde bakterilerin öldürülmesine katkıda bulunur. Buna karşılık, oluşan hipoklorik asit aynı zamanda α 1-antiproteinazı inaktive etmekte ve sağlıklı insan dokusunu zarara uğratarak iltihaplanmalara neden olmaktadır [Lavelli ve ark., 2000].

İnfeksiyöz olaylarda başta *Staphylococcus aureus* gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatör maddeler nötrofil, eozinofil ve makrofajları aktive ederler, membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla reaktif oksijen türlerinin salgılanmasına yol açarlar [Çavdar ve ark., 1997].

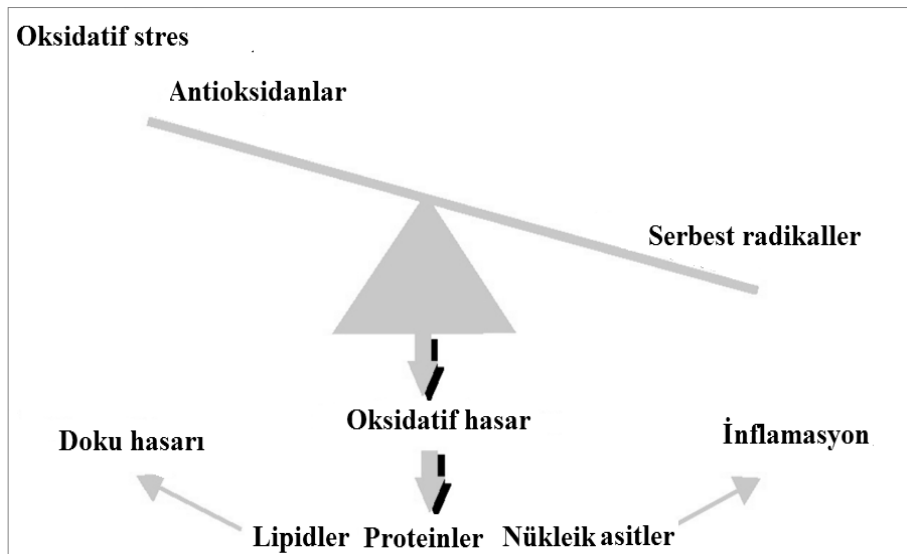
Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları da canlı sistemde serbest radikal oluşturan güçlü birer oksidatif katalist olarak görev yapmaktadırlar. Geçiş metalleri arasında olan demir yüksek reaktivitesi nedeniyle en önemli lipid oksidasyonunun pro-oksidanı olarak bilinir. Demirin ferröz durumu, hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin fenton reaksiyonları tarafından reaktif serbest radikallere kırılmasıyla lipid oksidasyonunu hızlandırmaktadır ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$). Ayrıca, oranı Fe^{2+} iyonuna göre on kat daha az olmasına rağmen Fe^{3+} iyonu peroksitlerden radikalleri üretir [Miller ve ark., 1996]. Fe; oksidatif reaksiyonları teşvik etmede daha etkili bir metal iken, Cu katalizli reaksiyonlar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [Halliwell ve Gutteridge, 1990].

2.5.3. Oksidatif stres ve serbest radikallerin neden olduğu biyolojik bozukluklar

Radikal üretimi, bir organizmanın bu radikallerden oluşan hasarı kontrol, önlem veya onarma yeteneklerini aştığı durumda “oksidatif stres” denen bir durum ortaya çıkar. Oksidasyon nedeniyle biyomoleküllerde oluşan hasar normal hücre fonksiyonlarını

engeleyebilir. Radikaller potansiyel olarak biyomoleküllere çok zararlı oldukları için birçok bilim adamı kontrol dışı radikaller görüldüğünde hastalıkların reaktif radikal hasarlardan ve “oksidatif streten” ileri geldiği hipotezini öne sürmüşlerdir [Milbury ve Richer, 2008].

Oksidatif stres sonucunda serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve böylece doku hasarı ve inflamasyon gibi durumların ortaya çıkmasına yol açarlar (Şekil 2.5). Serbest oksijen radikallerinin en zararlı etkilerinden biri, bir konjuge dien üreterek lipit peroksidasyonu başlatmaları ve hücre membranını yok etmeleridir.



Şekil 2.5. Oksidatif stres durumunun şematize şekli [Kelly, 2003]

Serbest radikallerin lipitlere etkisi

Lipit peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Radikal, lipit molekülünden bir hidrojen atomu çıkartarak karbon merkezli lipit radikalının oluşmasını sağlar. Lipit radikallerinin ($L\cdot$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ($LOO\cdot$) oluşur. Oluşan peroksit radikali yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup membran

yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipithidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder [Frei, 1994; Kargın ve Fidancı, 1997].

Lipit peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur ve üretilen bu reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verilir. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu, malondialdehit meydana gelir. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon göstermesi nedeniyle, lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Bu zincirleme olaylar durdurulmazsa; Ca^{+2} iyonları gibi hücre zarını geçebilen maddelerin geçirgenliğinde artış meydana gelebilir ve böylece hücre içindeki iyon dengesinin muhafazası engellenir. Geçirgenlik zara bağlı enzimlerin (Na/K, ATPaz) ya da hormonların hücrelere girmelerine yardım eden yüzey reseptör moleküllerinin inaktivasyonuna neden olur. Hücrelerin parçalanması ile sonuçlanabilen hücre membran bozuklukları oluşabilir. Organellerin zarlarında bozulmalar, kopmalar meydana gelebilir. Örneğin, lizozim zarlarında oluşan kopma, hidrolitik enzimlerin hücre içine dağılmasına ve hasarın artışına neden olur. Lizozomal zardaki kopmaların bazı kanser türlerinin başlangıç safhasında görüldüğü bildirilmektedir. Zar proteinlerinin hasarı, kavşaklardaki zarları ya da molekülleri etkileyerek komşu hücreler arasındaki haberleşmeyi inhibe eder [Mead, 1984; Kargın ve Fidancı, 1997].

Serbest radikallerin DNA'ya etkisi

Serbest radikaller DNA'yı etkileyerek nükleik asit modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine bağlı olarak hücrede mutasyona yol açarlar. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift zincir dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenleme), şeker hasarı meydana gelebilmekte veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilmektedir [Cooke ve ark., 2003; Evans ve Cooke, 2004]. DNA'da oksidatif hasar yapan başlıca

etkenler; iyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları ve TNF- α 'dır [Burçak ve Andican, 2004].

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü membranı kolayca geçebilen H₂O₂'in hedefi haline getirmektedir. H₂O₂ ise nukleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmaktadır. Hidroksil radikalleri DNA'daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz fosfatlarla reaksiyon verirler. Reaksiyon sonucu, DNA bazlarını modifiye eder ve riboz-fosfat zincirinin kırılmasına yol açar. $\cdot\text{OH}$ radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken, singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) çok daha seçicidir. $^1\text{O}_2$ dal kırığından daha çok, guanin türevli ürünler olan 8-hidroksi-guanin ve FAPyGuanin (FAPyG) oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda oksidatif DNA hasar göstergesi olarak sıklıkla baz hasarları analizlenmiştir. Cu²⁺ iyonları DNA'da G-C'den zengin bölgelerde yüksek oranda bulunduğundan oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenle en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8OHdG'dir [Burçak ve Andican, 2004; Halliwell ve Gutteridge, 2006].

Serbest radikallerin proteinlere etkisi

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde agregasyon, fragmantasyon, çapraz bağ ve floresan oluşumu gözlenmektedir. Kükürt içeren aminoasitler ve doymamış aminoasitlerin (triptofan, tirozin, fenilalanin, metiyonin, sistein, histidin) serbest radikallerle reaksiyonları sonucu kimyasal değişiklikler ortaya çıkar. Aktivliği, bu aminoasitlere bağlı olan papain ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz gibi enzimler radikallere maruz kaldıkları zaman inhibe olurlar. Sitoplazmik ve membran proteinleri çapraz bağlanma sonucu dimerleşirler. Çok aktif olan $\cdot\text{OH}$ radikalleri peptit ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olarak onların yapı ve fonksiyonlarını bozarlar [Akpoyraz ve Durak, 1995].

2.5.4. Antioksidan savunma sistemi

Antioksidan savunma sistemi oksidatif stresi azaltarak ve serbest radikalleri süpürerek, okside olabilen materyallerin oksidasyonunu önleyebilen, inhibe edebilen veya yok edebilen bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Bu sistemin çalışması pek çok endojen ve ekzojen faktöre bağlı olup kompleks bir yapıdadır [Aruoma, 1998]. Eğer oksidasyon olaylarını kontrol eden bu savunma sistemi zayıflarsa veya dengeler antioksidan sistem aleyhine dönerse oksidasyon süreci kontrolü kaybederek hastalık oluşturacak seviyelere erişebilir (örn. damar sertliği, kanser, karaciğer rahatsızlıkları v.b.) [Yokoyama, 2004; Davies, 2004].

Antioksidan savunma sisteminde çeşitli enzimler görev yapmakla birlikte belli başlıları süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleridir (Çizelge 2.4). Süperoksit dismutazın yapısında bakır, çinko ve manganez; glutatyon peroksidazın ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzimler olarak da adlandırılırlar. Süperoksit dismutaz, süperoksidin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. Süperoksit radikallerinin dismutasyonu ile ya da direkt olarak oluşan hidrojen peroksit ise glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir [Halliwell, 1991].

Katalaz tamamıyla olmasa da büyük oranda içinde birçok hidrojen peroksit üreten enzim bulunan peroksizomların içinde yerleşir. Böylece katalaz, üretilen hidrojen peroksit ile hücrenin diğer bölgelerine yayılmadan onunla etkileşerek onu etkisiz hale getirir. Katalaz bütün aerobik organizmalarda bulunan ve teramerik hem içeren bir enzimdir. Geniş dağılımı, evrimsel korunumu ve hidrojen peroksiti hızla indirgeme kapasitesi nedeniyle katalazın organizmaların aerobik ortamlarda yaşayabilmesine izin veren sistemlerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [Scandalios ve ark., 1997].

Çizelge 2.4. Antioksidan savunma sisteminde görev yapan enzimler [Mehlhorn ve ark., 1996].

Enzim	EC sayısı	Katalizlediği Reaksiyon
Süperoksit dismutaz	1.15.1.1	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Katalaz	1.11.1.6	$2H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + 2H_2O$
Glutasyon peroksidaz	1.11.1.12	$2GSH + PUFA-OOH \leftrightarrow GSSG + PUFA + 2H_2O$
Glutasyon S-transferaz	2.5.1.18	$RX + GSH \leftrightarrow HX + R-S-GSH^*$
Fosfolipit-hidroperoksit glutasyon peroksidaz	1.11.1.9	$2GSH + PUFA-OOH(H_2O_2) \leftrightarrow GSSG + 2H_2O$
Askorbat peroksidaz	1.11.1.11	$AA + H_2O_2 \leftrightarrow DHA + 2H_2O$
Guaiacol peroksidaz	1.11.1.7	$Donor + H_2O_2 \leftrightarrow oksidize\ donor + 2H_2O^{**}$
Monodehidroaskorbat redüktaz	1.6.5.4	$NADH + 2MDHA \leftrightarrow NAD^+ + 2AA$
Dehidroaskorbat redüktaz	1.8.5.1	$2GSH + DHA \leftrightarrow GSSG + AA$
Glutasyon redüktaz	1.6.4.2	$NADPH + GSSG \leftrightarrow NADP^+ + 2GSH$

*R: alifatik, aromatik ve heterosiklik bir grup; X: sülfat, nitrit ve halojen, **AA: elektron verici

2.5.5. Antioksidan özelliğindeki vitamin ve mineraller

Bazı vitaminler ve mineraller antioksidan özelliğine sahiptirler. C ve E vitaminleri, beta-karoten, selenyum ve çinko gibi antioksidan özellikleriyle bilinen vitamin ve mineraller, güçlü antioksidan etkileriyle serbest radikal denen vücudumuzda oluşan zararlı maddeleri toplayarak, bunların dokulara zarar vermesini önlemektedirler. C vitamini kolayca elektron verdiği için mükemmel bir indirgeme ajanı ve antioksidandır. C vitamini elektronlarını verdiği için kendisi bir radikal olur ancak askorbil radikali (semidehidroaskorbik asit) göreceli olarak dengeli ve biyolojik sistemlerde etkisizdir. C vitamini ROS ve RNS ile karşılaştığında onları indirger ve diğer molekülleri ağır hasardan kurtarır. C vitaminin LDL (low density lipoprotein) oksidasyonunu önleyerek kalp damar hastalıklarını engelleyebileceği söylenmektedir. Yüksek dozlarda C ve E vitamini kullanılarak lipit oksidatif

hasarların azaltılabileceği görülmüştür ancak bunun için gereken miktarlar günlük önerilen vitamin değerlerinden daha yüksektir [Milbury ve Richer, 2008].

Vitamin E (Tokoferoller) bir antioksidan olarak serbest radikallerin biyolojik membranlarda ve plazma lipoproteinlerinde verdiği hasarların aktarılmasını engeller. Peroksil radikallerini baskılayarak doymamış yağ asitlerin lipid peroksidasyonuna karşı korur. Ayrıca, bağışıklık sistemini güçlendirerek kansere karşı koruyucu etki gösterdiği öne sürülmektedir [Jialal ve Fuller, 1995]. E vitamini 4 tokoferol ve 4 tokotrienol içerir. Hepsinde hidroksil bir grup içeren kromanol halka vardır ve bu hidroksil grup 1 hidrojen atomu vererek serbest radikalleri indirgeyebilir. Molekülde bulunan hidrofobik yan bağı sayesinde yağ asitleri gibi biyolojik membranlar içine girebilirler [Milbury ve Richer, 2008]. Doğada 4 değişik formu vardır (alfa, beta, delta, gama). E vitamini içeriği ya da aktivitesi genelde alfa-tokoferol miktarıyla ilişkilidir. Bu nedenle en yüksek besin değerinin alfa tokoferolde bulunduğu varsayılmaktadır [Kamal-Eldin ve Appelqvist, 1996]. Alfa-tokoferolün bu kadar güçlü bir antioksidan olmasının sebepleri şunlardır: 1) Peroksil radikalle çok hızlı tepkimeye girer. 2) Oksitleyici yağ asidinin radikal özelliğini ortadan kaldırır ve onun radikal reaksiyonlara girmesini engeller. 3) Antioksidan reaksiyonu sonunda alfa-tokoferol oldukça dengeli bir radikale dönüşür. Normal şartlar altında ancak bir diğer radikalle (bir tokoferoksil radikal veya bir yağ asidi peroksil radikal) reaksiyona girerek stabil ve radikal olmayan ürünler oluşturur [Schneider, 2005].

Karoten 600'den fazla yağda çözülebilen fitokimyasal doğal pigmentlerin en yaygınları arasındadır [Krinsky ve Johnson, 2005]. Önemli diyet karotenoidlerinden β -karoten; sarı, turuncu sebze ve meyvelerde, yeşil sebzelerde, likopen; domateste ve lutein; brokoli ve lifli yeşil sebzelerde bulunmaktadır [Diplock, 1998]. Karotenlerin peroksil radikallerini tuzaklama ve tekli oksijeni baskılama yeteneğinin kalbi koruyucu olduğu kavramı, yüksek düzeyde A vitamini karotenini kan serumunda taşıyan kişilerde kalp damar hastalıkları ve kolorektal kanserden ölüm risklerini önemli oranda düşmesiyle doğrulanmaktadır [Ito ve ark., 2006]. Besinlerle birlikte veya hap olarak alınan beta-karotenler, LDL'nin vücut içinde ve dışında oksidasyonunu engellenmektedir. Ancak bazı karotenler LDL oksidasyonunu

arttırabilmektedirler [Carpenter ve ark., 1997]. Günümüze kadar yapılan karoten çalışmaları karotenlerin yararlı etkilerinin yeterli miktarda E ve C vitaminlerinin yanı sıra selenyum alındığında görüldüğünü ve karotenlerin antioksidan savunma sisteminde ancak yüksek oranlarda alındığında yararlı olduğunu göstermektedir. Yalnız başlarına karotenler dengesiz olup oksidasyona uğrayarak zararlı radikallere dönüşebilmekte ve vücutta kansere neden olabilmektedirler [Milbury ve Richer, 2008].

Selenyum birçok bitkide bulunmakta olup kendisi doğrudan bir radikal baskılayıcı değildir. Ancak doğal antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenleri olan selenoproteinlerin uygun çalışması için gereklidir. Selenyum hidrojen peroksidi suya indirgemek için kullanılan reaksiyonda katalizör olan glutatyon peroksidaza bir kofaktör olarak çalışır. Benzer şekilde selenoprotein enzimler, moleküller arası disülfid bağlarını indirgeyerek C vitaminini oksitlenmiş halinden yeniden üretirler [Milbury ve Richer, 2008].

2.5.6. Fenolik bileşikler

Polifenoller, bitkilerde bulunan bir kimyasal maddeler grubu olup her molekülde birden fazla fenol bulunmasıyla karakterize edilirler. Polifenoller genel olarak hidroliz edilebilir taninler (glikoz ve diğer şekerlerin gallik asit esterleri) ve fenilpropanoidler (lignin, flavonoid, ve kondense taninler) olarak iki gruba ayrılırlar. Bu bileşiklerin çeşitliliğine örnek olarak bitkisel fenolikler (fenoller, kumarinler, stilbenler, fenolik asitler, flavonoidler, taninler, lignanlar, ligninler) verilebilir. Fenolikler bitkilerde pigmentasyona katkıda bulunan fitoaleksinler, UV ışığına karşı koruyucu ajanlar, antioksidanlar, polenleşme için çekiciler olarak görev alırlar. Yiyeceklerde acılık, tad, büzücülük ve renk katkısında bulunurlar. Ayrıca bazı bitki fenollerinin sağlığı koruyucu ve oksidatif dengeyi sağlayıcı yetenekleri vardır. Bu yetenekler üreticiler, gıda işleyiciler ve tüketiciler için önemlidir [Milbury ve Richer, 2008].

Fenolikler primer antioksidanlar ve tekli oksijen söndürücüleridir [Kandaswami ve ark., 1994]. Fenolik bileşikler serbest radikal alıcıları (akseptörleri) ve zincir kırıcıları olarak hareket ederler. Aynı zamanda çok güçlü metal şelatlayan ajanlardır. Polifenoller indirgeyici ajanlardır ve diğer diyet indirgeme ajanlarıyla birlikte (C ve E vitamini gibi) vücut dokularını oksidatif stresten korurlar. Genelde antioksidan denilen bu maddeler oksidatif strese bağlı kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıkları önleyebilirler [Scalbert ve Williamson, 2000].

Flavonoidler; bitkisel polifenollerin bir alt sınıfı olup günümüze kadar 6000'den fazla bileşik belirlenmiştir. Flavonoidler bitkilerin 1000 yıllık bir evrim sonrası çeşitlendirdiği ve elde tuttuğu ikincil metabolitlerdir. Bütün flavonoidler bir oksijen ve 3 karbon atomu içeren oksijenlenmiş heterosiklik bir köprü ile bağlı iki veya daha çok aromatik halkadan oluşurlar. Temel yapılarındaki farklılıklara göre 6 sınıfa ayrılırlar: antosiyonidin, flavanol (kateşin), flavanon, flavone, flavonol ve isoflavon. Doğada bütün flavonoidler bitki materyallerindeki şekerlere bağlıdır [Milbury ve Richer, 2008].

Bitki içinde halka yapılarındaki şeker değişimleri nedeniyle daha az antioksidan özelliğinde olurlar. Canlı hayvanlar içinde bitkilerinde bulunan ata bileşiklerinden farklı özellikler gösterirler. Flavonoidlerin üzerindeki hidroksil grupları, bakır ve demir gibi geçiş minerallerini “chelate” (şelatlama) yoluyla Fenton ve Weiss-Haber reaksiyonlarını engelleyerek metal indirgenmiş ROS üretimini durdurabilirler. Bazı flavonoidler demir tutarak demir eksikliği anemisini arttırabilirler [Zijp ve ark., 2000].

Hücre kültürleri ve hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda flavonoidlerin insan sağlığını olumlu etkilediği ve bazı kronik hastalıkların oluşma riskini azalttığı yönünde bulgular elde edilmiştir. Flavonoidlerin kalp-damar hastalıkları, kanser, nöron dejenerasyon hastalıkları, diyabet, osteoporoz gibi hastalıkların üzerinde olumlu etkilerinin yanı sıra antibakteriyal, antikarsinogen, antienflamatuar, diüretik ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkilerinin olduğu öne sürülmektedir [Milbury ve Richer, 2008].

Yapılan antioksidanların kansere ve hastalıklara karşı koruyucu özelliklerini izleme çalışmaları ve bu deneylerin hastalık ortaya çıkmış hastalar üzerinde yapılmış olması antioksidanların koruyucu etkilerinden ziyade ortaya çıkmış hastalık ya da hasarı durdurma veya onarma güçlerini ölçmektedir. Bu çalışmaların sağlıklı bireyler üzerinde hastalık ortaya çıkmadan antioksidanların devreye sokulması ile yapılması antioksidanların gerçek koruyucu potansiyellerinin ortaya çıkmasını sağlayacaktır [Milbury ve Richer, 2008].

2.5.7. Antioksidanlar ve beslenme

Vücudun antioksidan dengesi diyetten büyük ölçüde etkilenmektedir. Besin yetersizlikleri nedeniyle vücudun savunma mekanizmaları tahrip olduğu zaman patolojik koşullar oluşabilmektedir. Reaktif oksijen türlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki bir yetersizlik vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına ve oksidatif stres koşullarının oluşmasına neden olmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin etkinliği; E vitamini, C vitamini ve karotenoidler gibi antioksidan vitaminleri ve esansiyel iz mineralleri içeren gıdaların yeterince alınmasına bağlıdır. [Duthie ve ark., 1989].

Antioksidan yönünden zengin besinlerin tüketilmesinin sağlık açısından öneminin yanında, antioksidanların besin kalitesini ve güvenliğini sağlama konusunda da önemli rolleri bulunmaktadır. Antioksidan bileşikler, üretimi ve muhafazası sürecinde gıda ürünlerinin bozulmasının temel sebeplerinden biri olan lipid peroksidasyonu sürecini geciktirirler ve serbest radikalleri süpürebilirler [Barros ve ark., 2007]. Gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak için çeşitli antioksidanlar gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların canlılarda tümör oluşumuna neden olabilecekleri rapor edilmiştir. Bu nedenle, gıda işleme endüstrisinde antioksidan etkisi gösteren doğal katkılar için bir talep bulunmaktadır. Böylece antioksidanların gıdalardan elde edilmesi de önemli bir araştırma alanı olmuştur.

2.6. Genotoksisite

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidi gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA’da hasar meydana getirmesi veya baz değişimlerine yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır [Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011].

Çeşitli ajanların DNA üzerinde hasar oluşturup oluşturmadığının ve eğer hasar oluşturuyor ise hasar derecesinin belirlenmesi önemlidir. DNA hasarının belirlenmesi ile ilgili çok sayıda teknik kullanılmıştır. Yakın zamana kadar en çok ya bireysel hücrelerde DNA onarım sentezi testi (= programsız DNA sentezi- “UDS” testi) ya da toplanmış hücre popülasyonunda alkali elüsyon testi kullanılarak tek zincir kırıklarının (SSB) ve alkali labil kısımlarının (ALS) tespiti yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazılarının radyoaktif çalışmaları içermesi, zahmetli olup uzun çalışma süresi gerektirmesi ve sınırlı hassasiyet göstermesi, bazılarının ise çok sayıda hücre gerektirmesi ve çalışma sonunda beklenen başarıyı sağlayamaması gibi sorunlarının olması bu alanda çalışma yapılmasını güçlendirmiştir [Tice ve ark., 2000].

Ancak son 10 yıl içinde yukarıda belirtilen sorunlara cevap verebilecek tek hücre jel elektroforez tekniği (Single cell gel electrophoresis; SCGE) veya Comet tekniği olarak adlandırılan yeni bir moleküler test sistemi geliştirilmiş, bu metot sayesinde çeşitli ajanların yol açtığı DNA hasarını hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçmek ve analiz etmek mümkün hale gelmiştir. Comet tekniğinin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini hücrelerin DNA’larını tek tek inceleyerek tespit etmek ve DNA sarmal kırıklarını, çapraz bağlantılarını, alkali labil kısımlarını değerlendirerek potansiyel genotoksik etkiyi tahmin etmektir [Tice ve ark., 2000; Moller ve ark., 2000]. Bu yöntem pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve

tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılmaktadır [Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011]. Sadece genotoksik ve mutajenik maddeler değil, aynı zamanda oksidatif stres de DNA üzerinde hasar oluşturduğundan, bu çalışma konuları içinde de yer alabilecek önemli bir yöntemdir [Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010].

Daha fazla ilgi belki de hücreler varsayılan bir ajana maruz kaldıktan sonra herhangi bir maddenin ortama verilerek bu maddenin DNA'yı koruma etkisine bakılması olmuştur. Bu yaklaşım besinsel antioksidanların, bitkilerin, gıda ve gıda bileşenleri ve takviyelerinin, fitokimyasalların potansiyel antigenotoksik etkisinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [Duthie ve Dobson, 1999; Johnson ve Loo, 2000; Collins ve ark., 2003; Moller ve ark., 2004]. Çeşitli amaçlara ulaşmak için comet tekniğinin çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir. Bu bize potansiyel genotoksik ve gen koruyucu ajanların etki mekanizmalarını keşfetmemize ve *in vitro* etkilerine bakmamızı sağlar [Azqueta ve ark., 2009; Cemeli ve ark., 2009].

2.6.1. Tarihçe

Son otuz yıl içerisinde DNA hasarını değerlendirmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. 1976 yılında non iyonik deterjan ve yüksek molaritede sodyum klorür ile hücrelerin lizisine dayalı nüklear yapı araştırılmasıyla ilgili bir makale yayınlanmıştır [Cook ve ark., 1976]. Yapılan bu çalışmada; yüksek tuz nedeniyle hemen hemen tüm histonların çözülmesinden dolayı nükleozomlar dağılmış, ortama etidyum bromid gibi interkalatör bir ajan eklendiğinde ise süpersarmal DNA yapısı açılarak boyayı içine almış ve floresan renk sinyali oluşturmuştur ve bu sinyalden hareketle de DNA hasarı tayin edilmiştir [Collins, 2004; Piperakis, 2009].

DNA zincirindeki kırılmaları ölçmek için ilk girişim 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından yapılmıştır. Bu yöntemde, hücreler mikroskop lamı üzerinde agaroz gömülmüş ve hafif alkali koşullar altında lizis edilmiştir. Nötralizasyondan sonra akridin oranj ile DNA boyanmıştır. DNA hasarının derecesi bir fotometre kullanılarak kırmızı floresanın (tek sarmalı belirtir) yeşil floresana (çift sarmalı

belirtir) oranı ölçülerek hesaplanmıştır. Ancak bu yöntem pek çok kritik basamak içerdiğinden yaygın kullanılmamıştır [Ryberg ve Johanson, 1978; Cotelle ve Fèrard, 1999].

Tek hücre jel elektroforezi veya comet tekniği ise ilk kez Ostling ve Johanson (1984) tarafından temelleri oluşturulmuş, daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından günümüze kadar modifiye edilerek yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur. Bu çalışmada, araştırmacılar tek hücre düzeyinde DNA hasarını tespit etmek için mikrojel elektroforez (mikroelektroforetik) tekniğini geliştirmişlerdir. Radyasyona tabi tutulmuş memeli hücreleri erimiş agaroz içine süspanse edilerek mikroskop lamı üzerine yayılmış ve yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren nötral solüsyonda lizis edilmiştir. Nötral koşullarda zayıf bir elektrik alanı (5V/cm), jel üzerine 5 dk. süreyle verilerek elektroforez gerçekleştirilmiştir. Jeldeki DNA, bir floresan boya olan akridin oranj ile boyanmış ve mikroskop fotometre ile yeşil emisyon vermiştir. DNA anoda doğru göç etmiş ve bu göcün kontrol hücrelerine nazaran ışınlanmış hücrelerde daha belirgin olduğu gözlenmiştir [Ostling ve Johanson, 1984]. Elektrik akımı uygulanması kırılmış ve gevşemiş DNA fragmentlerinin çekirdekten anoda doğru göçünü sağlamış ve görünüşlerinden dolayı daha sonra kuyruklu yıldız (comet) diye adlandırılan görüntüler DNA hasarının varlığını belirlemek için ölçülmüştür [Cotelle ve Fèrard, 1999].

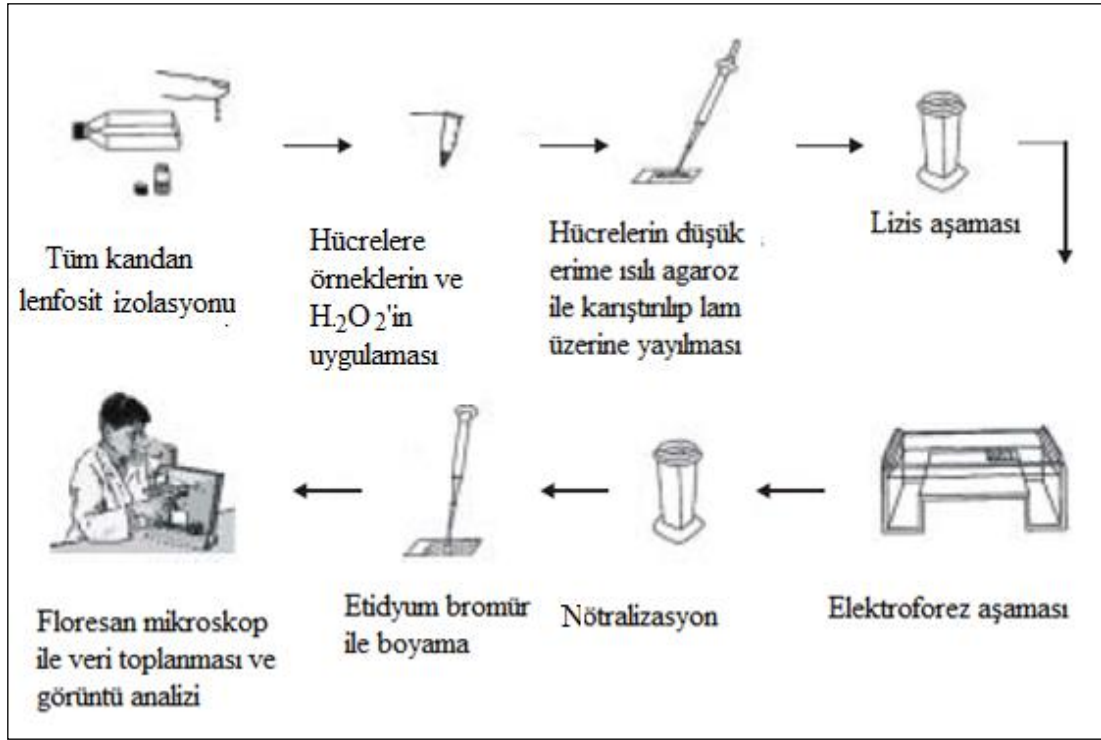
Hemen hemen bütün genotoksik ajanlar, DNA çift sarmalından daha çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir [Tice ve ark., 2000]. Nötral şartların tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemesi, bunun yanında bu şartlarda proteinlerin tam olarak uzaklaştırılamaması gibi nedenlerden dolayı 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali koşullarında uygulanmıştır. Alkali elektroforez uygulaması, çift zincir kırıklarının tespitine imkan vermesi ile birlikte aynı zamanda alkali labil bölgelerinin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınmasını da sağlamıştır [Singh ve ark., 1988; Cotelle ve Fèrard, 1999]. Daha sonraki yıllarda bundan başka modifiye protokoller de geliştirilmiştir [Olive ve ark., 1990; Singh ve ark., 1994].

2.6.2. Alkali comet tekniği

Alkali comet tekniği, alkali pH’da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozaya yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA’lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümünü oluşturmaktadırlar. Bu görünüm nedeniyle bu tekniğe "Comet" adı verilmiştir [Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011].

Comet tekniğinin alkali protokolü ile düşük düzeylerdeki zincir kırılmalarını yüksek duyarlılık ile tayin edilmesi amaçlanmıştır. Alkali comet tekniği, 1990’larda oldukça popüler hale gelmiştir ve bugün DNA hasar tamirinin değerlendirilmesinde en çok kullanılan tekniklerden biridir [Piperakis, 2009]. Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen alkali comet protokolü 7 basamak içermektedir (Şekil 2.6):

1. Mikroskobik lamaların hazırlanması
2. DNA’nın serbestleşmesi için hücrelerin lizisi
3. Zincir kırıkları gibi lezyonların açığa çıkması için alkali muamele (pH>13)
4. Alkali şartlarda elektroforez (pH>13)
5. Alkali şartların nötralizasyonu (pH=7,5)
6. DNA’nın boyanması ve comet görüntülenmesi
7. Comet skorlaması



Şekil 2.6. Alkali comet tekniği [Park ve ark., 2005]

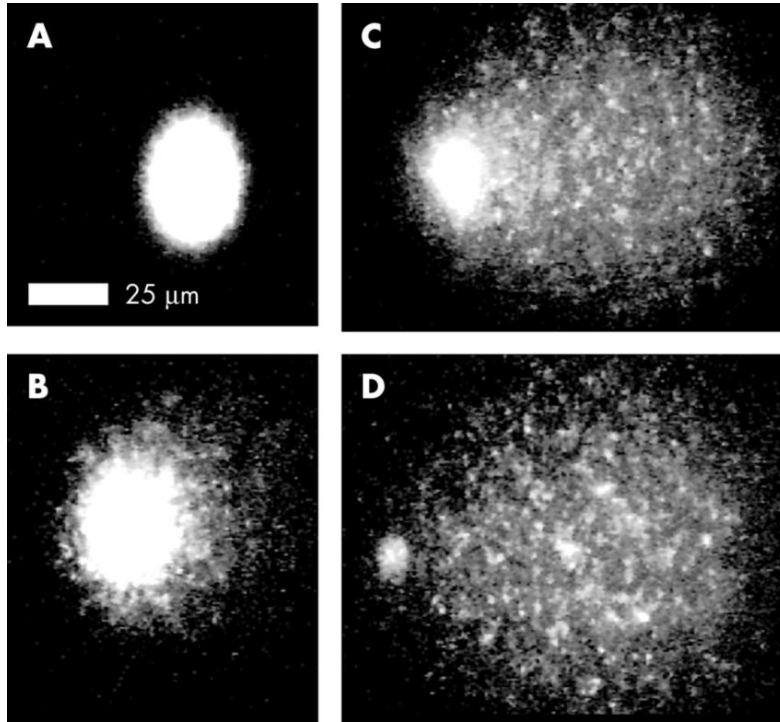
Comet tekniğinde, çekirdekli hücreler bir mikroskop lamının üzerine düşük erime ısıları agarozla gömülmektedirler. Agaroz jelin donmasından sonra lamlar en azından bir saat yoğun tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonu içinde bekletilir. Orijinal lizis solüsyonu (pH=10); 100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorit, % 1 N-lauroylsarcosin, 10 mM Trizma base içermekte olup kullanılmadan hemen önce % 1 Triton X-100 ilavesi gerektirmektedir [Singh ve ark., 1988]. Ayrıca, orijinal lizis solüsyonuna kan doku örneklerinde bulunan eritrositlerin lizisi sırasında salınan demirle ilişkili radikallere bağlı DNA hasarını önlemek için % 10 DMSO (dimetilsülfoksit) ilavesi yapılmaktadır [Tice ve ark., 1991]. Agaroz jelin stabilitesi için lizis solüsyonu kullanımdan önce soğutulmaktadır. Lizis sırasında protein ve lipidler uzaklaştırılmakta ve hücre membranındaki porlar açılmaktadır [Tice ve ark., 2000].

Elektroforezden önce lamlar tek zincirli DNA oluşturmak, SSB ve ALS'lerin ortaya çıkmasını sağlamak için alkali elektroforez tamponu (pH>13) içinde inkübe edilmektedir. Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilen alkali solüsyon (pH>13); 1 mM EDTA, 300 mM NaOH içermektedir. Bu, comet çalışmalarında hâlâ

en sık kullanılan solüsyondur, çünkü tek zincir kırıkları, ALS'lerin ekspresyonunu maksimize etmektedir. Gereken süre, çalışmalar ve araştırmacılar arasında farklılık göstermektedir. Genel olarak 20 dk. inkübasyon süresi kullanılmaktadır. Elektroforez koşulları ise 25 V ve 300 mA şeklindedir. Elektroforezden sonra alkali jel nötralize edilmektedir (pH=7,5; 0,4 M Tris). Nötralizasyonda her biri 5 dk. olmak üzere trizma tamponu ile lamalar üç kez yıkanmaktadır. Nötralizasyondan sonra lamalar boyanıp comet skorlaması yapılabilir ya da jel kurutulup lamalar saklanabilir ve ne zaman uygunsa cometler o zaman skorlanır. İlk durumda jeldeki DNA'nın difüzyonunu önlemek için lamalar makul zaman uzunluğunda (24 saat içinde) skorlanmalıdır. İkinci durumda jel absolute etanol ya da metanol içine kısa bir süre (5 dk.) daldırılarak dehidrate edilmelidir [Tice ve ark., 2000].

En sık kullanılan floresan boyalar etidyum bromid [Singh ve ark., 1988], propidium iyodid [Olive, 1989], YOYO-1 (benzoxazolium-4-quinolium oxazole yellow homodimer) [Singh ve ark., 1994], DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) [Gedik ve ark., 1992] ve SYBR green [Tice ve ark., 1998]'dir. Cometleri görüntülemek için gümüş nitrat ile boyamaya dayalı floresan olmayan boyama teknikleri [Kizilian ve ark., 1999] de bildirilmiştir.

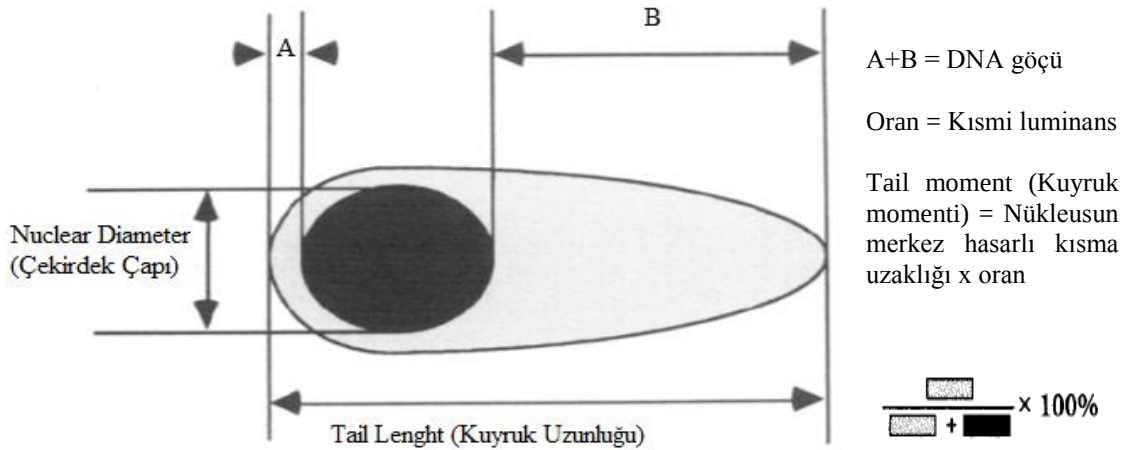
Comet tekniğinde, hasarsız hücreler yuvarlak ve kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümündedirler. Bu hücrelerin görünümü "nonmigration" olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeniyle düzensiz kenarlı bir görünüm alır (low migration). Hasar arttıkça hücreler kuyruklu yıldız (comet-high migration) şeklini alırlar. Son aşama ise apoptozistir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu kuyruk uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (Şekil 2.7) [Collins, 2002; Fairbairn ve ark., 1995].



Şekil 2.7. Çeşitli DNA hasar derecelerine sahip bireysel lökositlerin dijitalleştirilmiş comet görüntüleri (A) hasar görmemiş hücre, (B) hafif hasarlı hücre, (C) hasarlı hücre veya klasik comet, (D) oldukça hasar görmüş hücre [Lebailly ve ark., 2003]

Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde DNA göçü gözle değerlendirilebileceği gibi, aynı zamanda bilgisayar destekli comet görüntülü analiz tekniği (comet software) ile sayısallaştırılabilmektedir. Gözle değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayrılırlar. Hasarlanan hücre DNA'ları hasarın derecesine göre genellikle beş kategoride değerlendirilmektedir. Dairesel şekilde hiç kuyruk oluşturmamış DNA görüntülerinden hiç hasarlanmamış DNA'lar "0", çok az hasarlanmış DNA'lar "I", az hasarlı DNA'lar "II", hasarlı DNA'lar "III" ve çok hasarlı DNA'lar "IV" derece hasar olarak değerlendirilir. Ayrıca mikroskobun okülerine yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden de yararlanılabilir [Fairbain ve ark., 1995; Collins, 2002]. Bilgisayar destekli programlarda comet skorlaması genellikle kuyruk uzunluğu (Tail Length = TL), kuyruk momenti (Tail Moment = TM), kuyruktaki DNA yoğunluğu (Tail Intensity = TI) lenfosit DNA hasarının göstergesi olarak ölçülmektedir. "Tail moment" kuyruk

uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranı olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.8) [Fairbairn ve ark., 1995; Collins, 2002].



Şekil 2.8. Comet tekniğinin parametreleri [Lu ve ark., 1997].

2.6.3. Comet tekniğinin avantajları ve sınırlamaları

Comet tekniği aşağıda belirtilen birçok avantaja sahiptir [Olive ve ark., 1990; Gedik ve ark., 1992; Fairbairn ve ark., 1995; Lu ve ark., 1997; Tice ve ark., 2000; Piperakis, 2009]:

- ✓ Hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Sonuçlar aynı gün içinde elde edilmektedir.
- ✓ Tek hücre düzeyinde hasar tespit eder.
- ✓ Oldukça hassas bir biyomarkerdir (50-15 000 kırık /hücre). Diğer genotoksisite testlerine oranla düşük düzeylerdeki DNA hasarının seviyesini ölçebilmektedir.
- ✓ Hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyar. Hücrenin DNA kırıklarını onarma yeteneğini takip edilebilir. Bu da bizim mutagenез ve karsinogenezin karmaşık süreçlerini anlamamıza yardımcı olur.
- ✓ Çeşitli doku ve hücre tiplerine uygulanabilir. Bitkilerde dâhil olmak üzere ökaryotların herhangi bir organında ve birçok prokaryotik hücrelerde başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

- ✓ Taze veya donmuş numunelere uygundur.
- ✓ Basit, ekonomik ve zaman tasarruflu bir biyomarkerdir. Araç gereç gereksinimi azdır. Ayrıca, genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektiren bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Sınırlamaları ise; tek hücre jel elektroforezi (comet tekniği) çevresel izlemede çapraz bağlama hasarı için duyarlı gibi görülmemektedir. Elektroforez sonrası hücre “kuyruk” görüldüğünde olumlu sonuca ulaşılabilmesine rağmen, sonuçları açıklamak için daha dikkatli olunması gerekmektedir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Bu tez kapsamında bitki materyali olarak Türkiye’de yetişen endemik *Prangos* türleri kullanılmıştır. Bu türlerden *P. scabrifolia* türü doğadan hiç toplanamamış, *P. turcica* türü ise sadece moleküler çalışmalara yetecek kadar toplanabilmiştir.

Moleküler çalışmalara; *P. scabrifolia* hariç tüm endemik türler ile yeni bir tür olduğu düşünülen *P. sp. nova* dâhil edilmiştir. Doğru bir moleküler çalışma için her lokaliteden bir türe ait en az beş bireyin toplanması sağlanmıştır.

Biyolojik aktivite çalışmalarında bir bütünlük olması için tez kapsamına hem meyve hem de yaprak kısımları çalışılan endemik *Prangos* türleri; *P. denticulata*, *P. heyniae*, *P. ilanae*, *P. platychloena* subsp. *engizekensis* dâhil edilmiştir.

Materyal olarak kullanılan tüm örnekler Gazi Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hayri Duman tarafından teşhis edilmiştir. Materyaller 2008-2011 yaz döneminde toplanmıştır. Tez kapsamında kullanılan endemik *Prangos* türleri, lokaliteleri, toplanma zamanları ve toplayıcı numaraları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan endemik *Prangos* türleri, lokaliteleri, toplanma zamanları ve toplayıcı numaraları

	<i>Bitki ismi</i>	<i>Lokale</i>	<i>Toplanma zamanı (TZ)</i>	<i>Toplayıcı no</i>
1	<i>P. denticulata</i> Fisch. & Mey.	A4 Ankara: Hüseyin Gazi Tepesi, metamorfik yamaçlar, 1400 m	1.TZ: 18.7.2009 (Meyve)	HD 10046
		A4 Ankara: Hüseyin Gazi Tepesi, metamorfik yamaçlar, 1400 m	2.TZ: 14.06.2010 (Yaprak)	FO 1001
2	<i>P. heyniae</i> H. Duman & M.F. Watson	C3 Konya: Beyşehir-Akseki yolu, Derebucak Kavşağı, 1350 m	1.TZ: 24.07.2010 (Meyve)	HD 10224
		C3 Konya: Bozkır Korualan yolu, 15 km	2.TZ:19.06.2011 (Yaprak)	HD 10284
3	<i>P. meliocarpoides</i> Boiss. var <i>meliocarpoides</i>	Konya: Bozkır Hadim yolu, Korualan çevresi, 1300 m	1.TZ: 07.07.2009 (Meyve)	HD 10025
		B6 Sivas: Zara, jipsli step, 1600 m	2.TZ: 17.06. 2011 (Yaprak)	HD10301
4	<i>P. platychloena</i> Boiss. ex Tchih. subsp. <i>engizekensis</i> H. Duman & M.F. Watson	Kahramanmaraş: Kaleköy, Çağlayan, 1700 m	03.07.2010 (Meyve+Yaprak)	BB 3809
5	<i>P. sp. nova</i>	Antalya: Akseki-Seydişehir yolu 30 km, 1661 m	1.TZ: 23.07.2010 (Meyve)	HD 10209
		Antalya: Akseki-Seydişehir yolu 30 km, 1661 m	2.TZ: 19.06.2011 (Yaprak)	HD10289

Çizelge 3.1. (Devam) Tez kapsamında kullanılan endemik *Prangos* türleri, lokaliteleri, toplanma zamanları ve toplayıcı numaraları

	<i>Bitki ismi</i>	<i>Lokale</i>	<i>Toplanma zamanı(TZ)</i>	<i>Toplayıcı no</i>
6	<i>P. uechtritzi</i> Boiss. & Hausskn.	B5 Kayseri: Yahyalı Çamlıca köyü, Dönberi çevresi, 1536 m	1.TZ: 27.07. 2008 (Meyve)	HD 9885
		Kahramanmaraş: Çağlayan, Kaleköyü, Mahmutlar mahallesi güneyi, 1700 m	2.TZ: 03.07.2010 (Yaprak)	BB 3811
7	<i>P. turcica</i> A.Duran, M. Sağiroğlu & H.Duman	Osmaniye: Yarpuz Yağlıpınar yolu, 1483 m	1.TZ: 04.07.2010 (Meyve + Yaprak)	BB 3813
8	<i>P. ilanae</i> Pimenov, Akalın & Kljuykov	Balıkesir-Zeytinli: Kazdağı -Ayı Dere Yolu, 460 m	1.TZ: 29.06.2010 (Meyve + Yaprak)	FO 1002
		Balıkesir-Zeytinli: Kazdağı -Ayı Dere Yolu, 460 m	2.TZ: 21.06.2011 (Yaprak)	FO 1003

3.1.2. Kimyasallar

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallardan; sodyum klorür (NaCl), kloroform, izomilalkol Merck'ten, trizma base, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 2-merkaptotanol, izopropil alkol ve etilendiaminotetra asetik asit (EDTA) Sigma-Aldrich GmbH.'ten temin edilmiştir.

PCR reaksiyonlarında kullanılan kimyasallardan; dNTP mix, Taq buffer (10X tampon), Taq DNA polimeraz ve MgCl₂ Fermentas'tan, primerler AlphaDNA'dan temin edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasallardan; TAE (Tris+Asetik asit+EDTA) tamponu, agaroz ve etidyum bromid Sigma-Aldrich GmbH.'ten, yükleme boyası ve DNA marker (standart) Gene Mark'tan temin edilmiştir.

Protein çalışmalarında kullanılan kimyasallardan; üre, potasyum hidroksit (KOH), hidroklorik asit (HCl), metanol, trikloroasetik asit (TCA) Merck'ten, Glisin, 2-merkaptotetanol, N,N'-Metilen-bisakrilamit, akrilamit, amonyum persülfat (AP), Tris-HCl, N,N,N',N' Tetrametiletilendiamin (TEMED), sodyum dodesil sülfat (SDS), Sigma-Aldrich GmbH.'ten, protein marker (standart) Thermo Scientific'ten temin edilmiştir.

Antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılan kimyasallardan; sodyum karbonat, folin-ciocalteu fenol ayracı, demir (II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dimetilsülfoksit (DMSO), metanol, etanol, aseton, 1-butanol, hidrojen peroksit (H_2O_2), glasiyal asetik asit ve *n*-hekzan Merck'ten, EDTA, β -karoten, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 3-(2-pyridil)-5,6-bis(4-fenil-sulfonik asit)-1,2,4-triazin (ferrozin), demir (II) klorit (FeCl_2), gallik asit, BHA, BHT, TCA, 2-tiyobarbitürik asit (TBA), α - tokoferol Sigma-Aldrich GmbH.'ten temin edilmiştir.

HPLC çalışmalarında kullanılan kimyasallardan; metanol, kloroform, aseton asetonitril ve formik asit Merck'ten, klorojenik asit ve rutin Sigma-Aldrich GmbH.'ten temin edilmiştir.

Comet çalışmalarında kullanılan kimyasallardan; düşük erime ısılı agaroz (LMA), Biocoll (Lenfosit ayracı), Triton X-100, DPBS (10X)($\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 'suz) Amresco'dan, sodyum hidroksit (NaOH), DMSO, H_2O_2 , NaCl Merck'ten, Tris, EDTA, normal erime ısılı agaroz (NMA), etidyum bromid Sigma-Aldrich GmbH.'ten temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bitki yapraklarından DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda Doyle ve Doyle'nin (1987) önerdiği CTAB yöntemi kullanılmıştır. Buna göre toz haline getirilmiş bitki örneklerine ekstraksiyon tamponu ilave edilip 1,5 ml eppendorf tüplere aktarılmıştır. Örnekler sıcak su banyosunda 65°C'de 1 saat kadar bekletilip santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım yeni tüplere aktarılmış ve üzerlerine 500 µl kloroform: izomilalkol (24:1) ilave edilip tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen üst faz yeni tüplere aktarılıp üzerine izopropanol ilave edilmiş ve -20°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüpler 10 dk. santrifüj edilmiş ve daha sonra etanol ile iki kez yıkanmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen DNA'lar oda sıcaklığında kurutulmuş ve üzerlerine Tris EDTA (TE) tamponu ilave edilerek -20°C de saklanmıştır.

3.2.2. DNA saflığı ve miktar tayini

İzole edilen DNA'lar % 0,8 agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Daha sonra mikropate spektrofotometre cihazında (Biotek-EPOCH) A_{260}/A_{280} nm'de saflık oranlarına bakılmış ve miktar tayinleri yapılmıştır.

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile kodlanmayan *trn* bölgelerinin ve ITS bölgesinin amplifikasyonu

Kloroplast DNA' sı içinde yer alan kodlanmayan *trn* bölgeleri ile nüklear ribozomal DNA' da yer alan ITS bölgesi PCR cihazında (Applied Biosystems Veriti®, Foster City, CA) uygun primerler kullanılarak ayrı ayrı amplifiye edilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerler

Çalışmada kullanılan evrensel *trn* primerleri [Taberlet ve ark., 1991] ile ITS primerleri [White ve ark., 1990] Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Trn* ve ITS bölgesi primerlerinin dizileri ve T_m sıcaklıkları

Primer adı	Primer dizisi (5' → 3')	T _m (°C)
<i>trnVF</i> (Forward)	GTA GAG CAC CTC GTT TAC AC (20-mer)	60
<i>trnVR</i> (Reverse)	CTC GAA CCG TAG ACC TTC TC (20-mer)	62
<i>trnc</i> (Forward)	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG (20-mer)	62
<i>trnd</i> (Reverse)	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC (20-mer)	62
<i>trne</i> (Forward)	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC (20-mer)	62
<i>trnf</i> (Reverse)	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG (20-mer)	58
ITS 1 (Forward)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G (19-mer)	62
ITS 4 (Reverse)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (20-mer)	58

PCR koşullarının optimizasyonu

PCR reaksiyonları optimize edilmiş PCR koşullarında (Çizelge 3.3) toplam hacim 50 µl olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. *Trn* ve ITS bölgeleri için uygulanan PCR amplifikasyon koşulları

	PCR'daki hacmi (µl)	Son konsantrasyon
dH ₂ O	34	-
10X PCR Buffer	5	1 X
MgCl ₂ (25 mM stok)	6	3 mM
dNTP (25mM stok)	0,5	0,25 mM
Forward primer (50µM)	0,5	0,5 µM
Reverse primer (50µM)	0,5	0,5 µM
Taq DNA polimeraz (5u/µl)	0,5	0,05 u/µl
DNA (150 ng/µl)	3	9 ng/ µl
Toplam hacim	50	-

Çalışmalarda kullanılan PCR döngü şartları ise Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5’de belirtildiği gibi uygulanmıştır.

Çizelge 3.4. *Trn* bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PCR döngü şartları

<i>Trn</i> bölgesi	Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
<i>trnV5’-trnV3’</i>	Ön Denatürasyon	94	3 dk.	1 döngü
	Denatürasyon	94	45 sn.	30 döngü
	Primer Bağlanma (Annealing)	58	50 sn.	
	Uzatma (Extension)	72	1 dk. 20 sn.	
	Son Uzatma (Final Extension)	72	5 dk.	1 döngü
	Son Sıcaklık (Final Hold)	4	∞	
<i>trnL5’-trnL3’</i>	Ön Denatürasyon	94	5 dk.	1 döngü
	Denatürasyon	94	30 sn.	30 döngü
	Primer Bağlanma (Annealing)	57	30 sn.	
	Uzatma (Extension)	72	50 sn.	
	Son Uzatma (Final Extension)	72	5 dk.	1 döngü
	Son Sıcaklık (Final Hold)	4	∞	
<i>trnL-trnF</i>	Ön Denatürasyon	94	2 dk.	1 döngü
	Denatürasyon	94	1 dk.	35 döngü
	Primer Bağlanma (Annealing)	59	1 dk.	
	Uzatma (Extension)	72	2 dk.	
	Son Uzatma (Final Extension)	72	5 dk.	1 döngü
	Son Sıcaklık (Final Hold)	4	∞	

Çizelge 3.5. ITS bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan PCR döngü şartı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	4 dk.	1 döngü
Denatürasyon	94	1 dk.	30 döngü
Primer Bağlanma (Annealing)	58	1 dk.	
Uzatma (Extension)	72	1 dk.	
Son Uzatma (Final Extension)	72	7 dk.	1 döngü
Son Sıcaklık (Final Hold)	4	∞	

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülüp jel dokümantasyon cihazında görüntülenmiştir. Bunun için; 1 g agaroz 50 ml 1X TAE tamponu içinde mikrodalga fırında kaynatılarak çözülmüş ve jel kasetine dökülüp polimerleşmesi için 15 dk. bekletilmiştir. Hazırlanan jel elektroforez tankına (Scie-Plas) yerleştirilip üzeri kaplanıncaya kadar 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur. 4 µl PCR ürünü, 1 µl yükleme boyası (6X DNA loading dye) ile boyanmış ve kuyucuklara pipet yardımıyla yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta 40 dk. yürütülmüş ve jel etidyum bromid solüsyonuna alınmıştır. Daha sonra kullanılan jel, görüntüleme cihazına (UVP Biospectrum 410 görüntüleme sistemi) alınıp UV ışığı altında bantlar gözlemlenmiş, jel görüntüleme cihazının bilgisayar programı ve fotoğraf makinesi yardımıyla fotoğrafları çekilip veriler kaydedilmiştir. Çalışmada olası bir DNA kontaminasyonunu belirlemek amacıyla her uygulamada genomik DNA içermeyen bir negatif kontrol ve bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla da moleküler büyüklüğü bilinen bir DNA standardı (100 bp DNA ladder) kullanılmıştır.

3.2.5. DNA dizi analizi

DNA dizi analizi, otomatik DNA dizileme cihazlarında hizmet satın alımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için; PCR ürünleri primerleri ile birlikte ülke içinde bu

hizmeti veren ticari kuruluşlara (REFGEN+MOBAM) gönderilmiştir. Hizmet alımı; PCR ürünlerinin saflaştırılması, dizileme reaksiyonları (cycle sequencing), dizileme ürünlerinin saflaştırılması (purification) ve poliakrilamid jel elektroforezi yardımıyla dizileme ürünlerinin kromatogramlar (elektroferogramlar) haline getirilmesi kısımlarını içermiştir.

3.2.6. Dizilerin işlenmesi ve hizalanması

Hem ileri hem de geri yönde okutulan DNA dizileri kromatogramdaki piklerin güçlülüğüne ve temizliğine bakılarak kontrol edilmiş ve kontig dizileri elde edilmiştir. Böylelikle çalışılan taksonların ITS ve *trn* bölgelerinin ileri DNA dizileri oluşturulmuştur. Oluşturulan DNA dizileri Word'e kopyalanmış ve dizi hizalaması için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Dizi hizalaması için internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilen ClustalW programı kullanılmıştır.

3.2.7. Moleküler evrimsel ve filogenetik analizler

Çalışılan taksonların moleküler evrimsel ve filogenetik analizleri günümüzde dünya çapında çok yaygın olarak kullanılan Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versiyon 5.1 Beta 3 akrabalık analiz bilgisayar programının uygun parametreleri ile yapılmıştır [Tamura ve ark., 2011]. Dendrogramlar oluşturulurken karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri seçilerek bootstrap yöntemi [Felsenstein, 1985] uygulanmıştır. *Trn* ve ITS bölgesinin her ikisinde de analiz için oluşturulacak maksimum ağaç sayısı 10 000, tekrar sayısı da 10 000 olarak seçilmiştir. Ağaçlarda bootstrap desteği % 50'in altında olan dallar çökeltilerek verilmiştir. Genetik uzaklıklar MEGA versiyon 5.1 Beta 3 analiz programında yer alan Kimura 2 parametre testi [Kimura, 1980] kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.8. Proteinlerin SDS-PAGE ile analizi

Tohumdan depo protein izolasyonu

Bitkilerin tohumlarından depo protein izolasyonu Saraswati ve arkadaşları (1993) tarafından kullanılan yöntemine göre yapılmıştır. Her tür için 40'ar mg olacak şekilde tohum tartılarak havanda toz haline getirilmiştir. Toz halindeki örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplerine konularak üzerlerine ekstraksiyon tamponu ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir. 3 dk. kaynar suda bırakılmış ve 10 000 rpm de 10 dk. santrifüjlenmiştir.

Protein miktarlarının belirlenmesi

İzole edilen proteinlerin miktarları kolorimetrik olarak Bradford yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir [Bradford, 1976]. 100 µl örnek alınarak üzerine 1 ml Bradford çözeltisi ilave edilmiştir. 5 dk. karanlıkta ve oda sıcaklığında bekleyen karışım 595 nm'de körve karşı spektrofotometrede okunmuştur. Standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE)

Türlere ait toplam protein izolatlarına SDS-PAGE uygulaması Laemmli (1970), Bushuk ve arkadaşları (1997) ile Demiralp ve arkadaşlarının (2000) önerdiği yöntemlere göre yapılmıştır.

SDS-PAGE uygulaması için % 10'luk ayırma ve % 4,5'luk yığma jeli kullanılmıştır.

Ayrırma Jeli: 16,7 ml Akrilamid/Bis Akrilamid (% 30'luk), 19,8 ml distile su, 12,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH=8,6), 500 µl % 10' luk amonyum persülfat (AP), 500 µl % 10'luk SDS birbirine karıştırıldıktan sonra 30 µl TEMED ilave edilerek 1 mm aralığa sahip iki jel camı arasına hızlı bir şekilde dökülmüştür. Jelin üst kısmı distile su ile kaplanarak hava ile teması önlenmiş ve polimerize olması sağlanmıştır.

Yığıma Jeli: 3,4 ml % 30'luk Akrilamid/Bis Akrilamid, 13,6 ml distile su, 2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 200 µl % 10'luk AP ve 200 µl % 10'luk SDS birbiri ile karıştırıldıktan sonra 20 µl TEMED ilave edilmiştir. Bu karışım, polimerize olan ayırma jelinin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan sonra ayırma jeli üzerine dökülmüştür.

Yığıma jelinin üzerine tarak yerleştirilmiş ve jelin polimerize olması sağlanmıştır. Polimerize olan jelden tarak çıkarılmış, jel tanka sabitlenmiş ve dikey konumdaki elektroforez düzeneği (Scie-Plas) yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Protein marker (standart) (2 µl) ve protein miktarları belirlenen örnekler kuyucuklara yüklenmiştir.

Elektroforez işlemi güç kaynağı (Biometra) bağlantısı ile 20 mA sabit akımda, 16-18 °C sabit sıcaklıkta, izleme boyası jelden çıkana kadar (6-8 saat) yürütülerek gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminin hemen ardından jeller, tespit çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama iki gün bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra jeller distile su ile 20 dk.'lık aralıklarla yıkanarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır.

SDS-PAGE 'de Kullanılan Çözeltiler

Akrilamid Çözeltisi (% 30): 29,2 g akrilamid, 0,8 g N, N' metilen-bis-akrilamid 100 ml distile suya tamamlanarak çözölmüştür. Hazırlanan çözelti Whatman No:1 filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüş ve 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

1,5 M Tris-HCl (pH=8,6): 18,165 g Tris, 75 ml distile suda çözölp 1 M HCl ile pH'sı 8,6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

1M Tris-HCl (pH=6,8): 12,01 g Tris, 75 ml distile suda çözölp 1 M HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

SDS (% 10'luk): 10 g SDS 100 ml distile suya tamamlanarak çözülmüştür.

Amonyum persülfat (AP) (% 10'luk): 0,1 g AP 1 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Elektroforez stok yürütme tamponu (pH=8,3) (5x): 25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 1 (w/v) SDS, distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Tespit çözeltisi: 25 ml % 100 (w/v) Trikloroasetik asit (TCA), 82,5 ml Metanol, 142,5 ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Stok boya çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Mavisi G-250, 46,5 ml HCl ile karıştırılarak hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

Boyama çözeltisi: 150 ml stok boya çözeltisi, 17,5 ml 10 M (w/v) KOH, 25 ml % 100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlanmıştır.

Genetik Uzaklık Tayini

SDS-PAGE ile elde edilen protein jellerinin, UVP Biospectrum 410 dijital görüntüleme sistemi (UVP Inc. Upland CA) ile fotoğrafları çekilmiştir. Bu görüntüleme sisteminin içerdığı analiz programı UPGMA [Sneath ve Sokal, 1973] ile türlerin protein profilleri karşılaştırılmış ve türler arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram oluşturulmuştur.

3.2.9. Bitki ekstraktlarının elde edilmesi

30 gram öğütülmüş bitki örneği (endemik *Prangos* türlerinin yaprakları ve meyveleri) çeşitli çözücüler ile soxhlet cihazı kullanılarak (yaklaşık 4-6 saat) kaynatılmıştır. Elde edilen sıvı kısım filtreden geçirilerek, çözücüler düşük basınçla rotary evaporatörde (Laborota 4000, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany) uzaklaştırılmıştır. Çözücü ekstraksiyonu için ayrı ayrı; su, metanol ve aseton çözücüler kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar kullanıncaya kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.10.DPPH radikalini giderim testi

Ekstraktların serbest radikal giderim aktiviteleri 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH) kullanılarak belirlenmiştir [Brand-Williams ve ark., 1995]. Farklı konsantrasyonlardaki ekstrakt çözeltileri % 0,004 DPPH çözeltisi ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin 517 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometrede (model U-1800, Hitachi, Tokyo, Japan) körve karşı okunmuştur. Pozitif kontrol olarak BHT, BHA ve α - tokoferol kullanılmıştır. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - [(A_1 / A_0) \times 100]$$

(Burada; A_0 kontrolün absorbansı ve A_1 örneğin absorbansıdır).

3.2.11.Plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu testi

Plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu çalışması, Rodriguez-Martinez ve Ruiz Torres’in (1992) önerdiği metoda göre, bazı modifikasyonlar kullanılarak yapılmıştır. Buna göre; 0,4 ml plazma (Kan merkezi, Gazi Üniversitesi), 0,1 ml FeSO_4 (0,5 mM), 0,1 ml H_2O_2 (0,5 mM) ve 0,2 ml ekstrakt (2 mg/ml) karıştırılmış ve 37 °C’de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra karışıma % 4’lük TCA ve 0,5 mM BHT eklenmiştir. Karışım buz banyosunda 5 dk. bekletildikten sonra 15 dk. 5000 g’de santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faza % 0,6’lık TBA ilave edilmiş ve 95

°C’de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.12. Metal iyonlarını şelatlama testi

Metal şelatlama aktivitesi, Decker ve Welch’in (1990) belirledikleri yöntemle göre bazı modifikasyonlar kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem için çeşitli konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarına 2 mM FeCl₂ ve 5 mM ferrozin çözeltisi ilave edilmiştir. Çözeltiler vorteksde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra çözeltilerin 562 nm dalga boyundaki absorbans değerleri körve karşı spektrofotometrede okunmuştur. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - [(A_1 / A_0) \times 100]$$

(Burada; A₀ kontrolün absorbansı ve A₁ örneğin absorbansıdır).

3.2.13. Toplam fenol bileşik miktarlarının tespiti

Toplam fenolik bileşik miktarları, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir [Singleton ve Rossi, 1965]. Bunun için; 0,1 ml ekstrakt 0,2 ml % 50’lik folin reaktifi ile karıştırılmış ve 3 dk. inkübe edilmiştir. Bu karışıma % 2’lik Na₂CO₃ eklenmiş ve 45 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra çözeltilerin 760 nm dalga boyundaki absorbans değerleri körve karşı spektrofotometrede okunmuştur.

3.2.14. β -karoten ve likopen bileşik miktarlarının tespiti

Meyve ekstraktlarının içerdiği β -karoten ve likopen miktarlarının tespiti Nagata ve Yamashita’ya (1992) göre yapılmıştır. 100 mg kuru ekstrakt 10 ml aseton-hekzan (4:6) karışımında çözülmüş ve daha sonra karışım filtre edilmiştir (0,45 μ m; Millipore). Filtratların absorbans değerleri; 453 nm, 505 nm ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçülmüştür.

3.2.15.Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile fenolik bileşiklerin teşhisi ve miktar tayini

Türlerin yaprak ve meyvelerinin metanol ve su ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin (klorojenik asit ve rutin) teşhisi ve miktar tayini Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi laboratuvarında HPLC analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Ekstraktların hazırlanması

10 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlar 0,45 µm membran filtreden süzölmüş ve HPLC analizi için viyallere aktarılmıştır.

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

10 ml’lik balon joje içinde 10,4 mg klorojenik asit ve aynı şekilde 10 ml’lik balon joje içinde 9,98 mg rutin 15 dk. boyunca metanol (% 70 h/h) ile ultrasonik banyoda çözülmüş ve hacimleri 10 ml’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok standart çözeltilerinden farklı oranlarda dilüsyonlar yapılmıştır (1/10, 1/100, 1/200, 1/1000, 1/2000). Bu dilüsyonlardan ise 10 µl sisteme 3’er kez enjekte edilerek pik alanına karşı kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri denklemi hesaplanmıştır.

HPLC Analiz yöntemi

Analiz için ikili pompa, vakum degazör, otosampler ve diyot array detektör içeren AGILENT 1200 Series HPLC sistemi ve AGILENT ECLIPSE XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü) tipi kolon kullanılmıştır. Hareketli faz 40 mM Formik asit çözeltisi (Hareketli faz A) ve Asetonitril (Hareketli faz B), akış hızı 1 ml/dk. ve akış tipi gradient elüsyon olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.6). Enjeksiyon hacmi ise 10 µl’dir. Diyod Array Dedektör (DAD) ile klorojenik asit 330 nm, rutin ise 254 nm dalga boyunda belirlenmiştir [Gulpinar ve ark., 2012].

Çizelge 3.6. Klorojenik asit ve rutin bileşiklerinin HPLC analizinde uygulanan gradient akış programı*

Zaman (dk.)	%A	%B	Akış Hızı
0	90	10	1 ml/dk.
18	70	30	1 ml/dk.
25	55	45	1 ml/dk.
30	20	80	1 ml/dk.
34	20	80	1 ml/dk.
35	10	90	1 ml/dk.

*Bekleme Süresi: 2 dk.

3.2.16. Genotoksik ve antigenotoksik etkinin belirlenmesi

Bu çalışmaların yapılması için gerekli olan etik rapor Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 295 karar no ile onaylanmış ve alınan rapor EK-5’de sunulmuştur.

Genotoksik etkinin belirlenmesi

Buradaki amaç bitki ekstraktlarının (metanol ve su ekstraktları) lenfosit hücrelerinin DNA’sında herhangi bir DNA hasarı oluşturup oluşturmadığına bakılması yani genotoksik etkisinin belirlenmesidir. Çalışılan her bir bitki türü için bir bayan ve bir erkek olmak üzere iki sağlıklı bireyden alınan periferik kan lenfositleri kullanılmıştır. Sağlıklı gönüllüler; herhangi bir hastalığı bulunmayan, sigara, alkol ve periyodik ilaç kullanmayan, 25-29 yaş arası bireylerden seçilmiştir. Daha sonra bu lenfosit hücrelerine değişik konsantrasyonlarda (5 farklı konsantrasyonda; 25-500 µg/ml) bitki ekstraktları uygulanmıştır. Lenfosit DNA’sında herhangi bir hasar oluşup oluşmadığına ise comet tekniği ile bakılmıştır.

Comet tekniği (Tek hücre jel elektroforezi)

Comet tekniği, Singh ve arkadaşlarının (1988) yaptığı çalışmaya göre bazı modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Bu amaçla heparinli enjektörle donörlerden alınan taze periferal kanın üzerine eşit miktarda PBS (fosfat tampon çözeltisi) eklenmiş ve süspanse edilmiştir. Her bir tüpün dip kısmına 2 ml lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) eklenmiş ve 4 °C’de 2400 rpm’de 20 dk. santrifüj (Sigma-2-16KC) edilmiştir. Santrifüj sonrası tüplerin içerisindeki eritrositlerin üzerinde oluşan bulutsu kısmın 2 ml’si alınarak ayrı bir tüpe aktarılmış ve buz üzerine konulmuştur. İzole edilen lenfositlerin trypan blue ile canlılıklarına bakılmıştır. Daha sonra lenfositler, bitki ekstraktlarının çeşitli konsantrasyonları (0,025-0,500 mg/ml) ile süspanse edilerek, 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin bitiminde ependorflar 3000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Düşük erime ısılı agarın 75 µl’si, 100 µl lenfositlerle karıştırılıp, önceden normal erime ısılı agar ile kaplanan lamaların üzerine damlatılarak 24X60 mm’lik lamel ile kapatılmıştır. Bu halde preparatlar 15-20 dk. buzda bekletilmiştir. Lamaların üzerindeki lameller dikkatlice kaldırılıp içerisinde lizis solüsyonu bulunan şaleler içerisine konulmuş ve buzdolabında en az 1 saat bekletilmiştir. Lizis işleminden sonra lamalar, içerisinde elektroforez tamponu (pH>13) bulunan tanka (Scie-Plas) yerleştirilip, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dk. bekletilmiştir. Daha sonra 25 V, 300 mA’da 20 dk. elektroforez yapılmıştır (Bio-Rad PowerPack 300). Preparatlar, nötralizasyon tamponu (pH=7,5) ile 5’er dk. toplam 3 kez muamele edilmiştir. Nötralizasyon sonucunda lamaların üzerine 20 µg/ml’lik etidyum bromidin 50 µl’si yayılmış ve 24X60 mm’lik lamel ile kapatılmıştır. Tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapılmıştır.

Antigenotoksik etkinin belirlenmesi

Buradaki amaç; hücrelerde genotoksik etki yaratmadan H₂O₂ kaynaklı DNA hasarını engelleyebilecek bitki ekstrakt konsantrasyonunun belirlenmesidir. Lenfosit hücreleri önce 1 saat belirlenmiş konsantrasyondaki (1. aşamada genotoksik etki göstermeyen konsantrasyonlarda) bitki ekstraktları ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamadan

sonra 5 dk. H_2O_2 (50 μM)'e maruz bırakılmış ve sonraki işlemlere comet protokolündeki gibi devam edilmiştir.

Görüntü analizi ve comet sayımı

Boyanan preparatlar (her lamda 100 hücre) Leica DFC425C (Leica, Germany) marka floresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtreli) altında incelenerek bilgisayarlı görüntüleme sistemi ile (Comet Analysis Software, versiyon 4.0, π Perceptive Instruments Ltd., UK) DNA hasar dereceleri kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk göçü olarak değerlendirilmiştir.

3.2.17. İstatistiksel analizler

Antioksidan aktivite çalışmaları için;

Tüm çalışmalar her çalışma üç paralelli olacak şekilde üç tekrarlı yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, bu tekrarların ortalaması $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analizler; SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA) programı, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post host Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. Pearson korelasyon analiz testi ile de toplam fenol miktarı ile antioksidan aktivite çalışmaları karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ alınmıştır.

Genotoksik ve antigenotoksik etki çalışmaları için;

Tüm çalışmalar her çalışma iki paralelli olacak şekilde üç tekrarlı yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, bu tekrarların ortalaması $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Tek hücre jel elektroforez (Comet) çalışmasında, lenfositlerde DNA hasarının istatistiksel değerlendirmesi; SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA) programı, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post host Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar negatif kontrol (% 1 DMSO ya da PBS) ve pozitif kontrol (H_2O_2) ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ alınmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Endemik *Prangos* Türlerinin Moleküler Analizleri

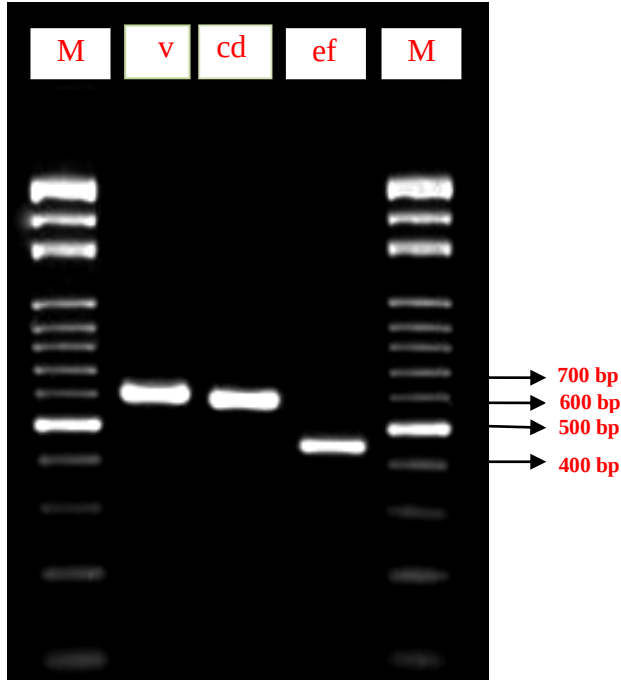
Bu çalışmada; öncelikle endemik *Prangos* taksonlarının yapraklarından DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş, daha sonra bu taksonların kloroplast DNA'sının kodlanmayan *trn* bölgeleri ile nrDNA'sının ITS bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan bu bölgelerin DNA dizi analizleri gerçekleştirilmiş ve MEGA 5.1 Beta 3 analiz programı ile bu dizilere dayalı filogenetik analizler yapılmıştır. Böylelikle, ilk kez endemik *Prangos* taksonlarının DNA dizilerine dayalı akrabalık dereceleri belirlenmiştir.

4.1.1. DNA saflığı ve miktar tayini

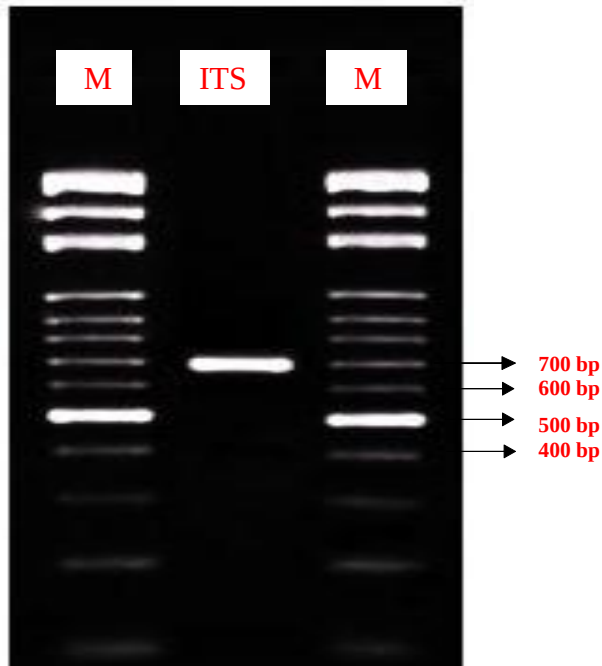
Endemik *Prangos* türlerine ait DNA'lar CTAB yöntemi ile izole edildikten sonra % 0,8'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflıkları (A_{260}/A_{280} oranları) 1,7- 1,9 arasında, miktarları ise 319-2190 ng/μl arasında tespit edilmiştir. Her bir örneğin DNA'sı 150 ng/μl olacak şekilde dilüe edilmiştir.

4.1.2. PCR ürünleri

Endemik *Prangos* türlerinin kloroplast genomuna ait kodlanmayan *trn* bölgeleri ve çekirdek genomuna ait ITS bölgesi, optimize edilmiş PCR koşullarında uygun primerler kullanılarak çoğaltılmış ve elde edilen PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir (Resim 4.1 ve Resim 4.2).



Resim 4.1. *Prangos* türlerinin kloroplast genomu kodlanmayan *trn* bölgelerinin agaroz jeldeki görüntüsü (v: *trnVF* ve *trnVR* primerleri ile çoğaltılan bölge, cd: *trnc* ve *trnd* primerleri ile çoğaltılan bölge, ef: *trne* ve *trn f* primerleri ile çoğaltılan bölge, M: 100 bp DNA standardı)



Resim 4.2. *Prangos* türlerinin nükleer DNA ITS bölgesinin agaroz jeldeki görüntüsü (ITS: ITS1 ve ITS4 primerleri ile çoğaltılan bölge, M: 100 bp DNA standardı)

4.1.3. PCR ürünlerinin DNA dizi analizi

PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri otomatik DNA dizileme cihazlarında hizmet satın alımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi sonucu elde edilen kromatogramlara ait bazı örnekler EK-1’de verilmiştir. Kloroplast DNA’sı kodlanmayan *trn* bölgelerinin dizi analizi sonucu örnekleri EK-2’de ve nrDNA ITS bölgesinin dizi analizi sonucu örneği ise EK-3’de verilmiştir. Endemik *Prangos* türlerinin kloroplast DNA’sının kodlanmayan *trn* bölgelerinin ve nrDNA ITS bölgesinin dizi analizi sonuçları blast fonksiyonu ile NCBI Gen bankasında taranarak türlerin benzerlik gösterdikleri taksonlar belirlenmiştir. Maksimum benzerlik gösteren 10 takson gen bankası numaraları ile birlikte Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Endemik *Prangos* türlerinin NCBI gen bankasında maksimum benzerlik gösterdiği taksonlar

	Gen Bank No	Takson
<i>trnV</i> intron	GQ984093.1	<i>Angelica sylvestris</i>
	GQ984120.1	<i>Coriandrum sativum</i>
	AJ429716.1	<i>Apium graveolens</i>
	DQ898156.1	<i>Daucus carota</i>
	GU456628.1	<i>Anthriscus cerefolium</i>
	GQ984134.1	<i>Heteromorpha arborescens</i> var. <i>abyssinica</i>
	GQ984124.1	<i>Arctopus dregei</i>
	AJ429718.1	<i>Aralidium pinnatifidum</i>
	GQ984099.1	<i>Azorella caespitosa</i>
	AJ429721.1	<i>Torricellia tiliaefolia</i>
<i>trnL</i> intron	GQ244569.1	<i>Angelica archangelica</i>
	AY379221.1	<i>Aletes acaulis</i>
	AF444025.1	<i>Musineon tenuifolium</i>
	GQ244820.1	<i>Conioselinum tataricum</i>
	AY379318.1	<i>Tauschia texana</i>
	AY379315.1	<i>Tauschia glauca</i>
	AY379292.1	<i>Oreoxis humilis</i>
	AY379291.1	<i>Oreoxis bakeri</i>
	AY379245.1	<i>Cymopterus bulbosus</i>
	AY379228.1	<i>Aletes macdougallii</i> subsp. <i>breviradiatus</i>

Çizelge 4.1. (Devam) Endemik *Prangos* türlerinin NCBI gen bankasında maksimum benzerlik gösterdiği taksonlar

	Gen Bank No	Bitki Türü
<i>trnL-F</i> intergenik bölgesi	AY379208.1	<i>Pteryxia terebinthina</i> var. <i>californica</i>
	AY379185.1	<i>Oreonana clementis</i>
	AY379130.1	<i>Angelica breweri</i>
	AY379129.1	<i>Angelica arguta</i>
	AF444030.1	<i>Shoshonea pulvinata</i>
	AF444026.1	<i>Neoparrya lithophila</i>
	AF444008.1	<i>Aletes anisatus</i>
	AB037189.1	<i>Angelica acutiloba</i>
	AY379188.1	<i>Oreoxis alpina</i>
	AY379173.1	<i>Lomatium brandegei</i>
ITS	EU169311.1	<i>Prangos goniocarpa</i>
	EU169310.1	<i>Prangos ferulacea</i>
	EU169312.1	<i>Prangos uloptera</i>
	GU182367.1	<i>Diplotaenia</i> sp.
	EU169258.1	<i>Diplotaenia cachrydifolia</i>
	GU182368.1	<i>Diplotaenia</i> sp.
	EU169259.1	<i>Diplotaenia damavandica</i>
	EU169247.1	<i>Azilia eryngioides</i>
	AF077889.1	<i>Ferulago galbanifera</i>
	AF077906.1	<i>Prangos pabularia</i>

4.1.4. Moleküler evrimsel analizler ve filogenetik değerlendirme

Genetik çeşitlilik verileri ve filogenetik ilişkilendirmeler dizi analizi sonuçları kullanılarak MEGA 5.1 Beta 3 yazılımı ile yapılmıştır.

Elde edilen verilere göre, *Prangos* türlerinin kloroplast DNA'sının kodlanmayan üç *trn* bölgesinin uzunluğu 1436 baz çifti (bp) [(*trnV* intron; 567 bp) + (*trnL* intron; 506 bp) + (*trnL-F* intergenik bölgesi; 363 bp)] olarak bulunmuştur. Bu aralığı oluşturan *trn V* primerleri tarafından çoğaltılan *trnV* intron bölgesi 567 bp olarak tespit edilmiştir. *Trn c* ve *trn d* primerleri tarafından çoğaltılan bölgenin (*trnL* intronunun tamamı ve *trnL* ekzonunun çok az bir kısmı) uzunluğu ise 540 bp olarak belirlenmiş olup sadece *trnL* intron bölgesinin uzunluğu 506 bp olarak tespit edilmiştir. *P.*

meliocarpoides var. *meliocarpoides* türünün *trnL* intron bölgesinin uzunluğu 15 bazlık bir indel olması nedeniyle 521 bp olarak bulunmuştur. *Trn e* ve *trn f* primerleri tarafından çoğaltılan bölgenin uzunluğu ise 405 bp olarak bulunmuştur. Çoğaltılan bu bölgenin içerdiği *trnL-F* intergenik bölgesinin uzunluğu ise 363 bp olarak tespit edilmiştir. Kodlanmayan *trn* bölgelerin analizinde toplam 1436 (*P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides*; 1451) karakter incelenmiş ve bunlardan 1431 (*P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides*; 1446) karakter korunan (conserved), 5 karakter ise değişken (variable) çıkmıştır. Ve bu 5 değişken karakterin hepsi parsimoni yönünden bilgi verici karakterler olarak tespit edilmiştir. Tek nükleotit farklılığı gösteren karakter bulunamamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Endemik *Prangos* türlerinin kodlanmayan *trn* bölgelerine ait moleküler farklılık parametreleri

	<i>trnV</i> intronu (bp)	<i>trnL</i> intronu (bp)	<i>trnL-F</i> intergenik bölgesi (bp)	Toplam (bp)
Toplam nükleotid uzunluğu	567	506	363	1436
Korunan (Conserved) karakter	565	506	360	1431
Değişken (Variable) karakter	2	-	3	5
Tek nükleotit farklılığı (Singleton) gösteren karakter	-	-	-	-
Parsimoni bilgi verici (Parsimony informative) karakter	2	-	3	5
İndel	-	15	-	15

ITS bölgesi analizi ile elde edilen sonuçlara bakıldığında; endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgesinin (ITS-1+5.8SrRNA+ITS-2) uzunluğu 602 bp olarak belirlenmiştir. *P. turcica*'da 1 bazlık indel nedeniyle bu bölge 603 bp, *P. sp. nova*'da 2 bazlık indel nedeniyle 604 bp olarak belirlenmiştir. Tek tek bakıldığında; endemik

Prangos türlerinin ITS-1 bölgesinin uzunluğu 216 bp, 5.8S rRNA bölgesinin uzunluğu 162 bp, ITS-2 bölgesinin uzunluğu ise 224 bp olarak tespit edilmiştir. Çalışılan *Prangos* türleri arasında yapılan ITS bölgesinin analizinde toplam 602 karakter incelenmiş ve bunlardan 570 karakter korunan (conserved), 32 karakter değişken (variable) çıkmıştır. Tek nükleotit farklılığı gösteren karakter ise bulunamamıştır. Parsimonik bilgi verici karakter sayısı ise 32 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgesine ait moleküler farklılık parametreleri

	ITS (bp)
Toplam nükleotid uzunluğu	602
Korunan (Conserved) karakter	570
Değişken (Variable) karakter	32
Tek nükleotit farklılığı gösteren (Singleton) karakter	-
Parsimoni bilgi verici (Parsimony informative) karakter	32
İndel	2+1

P. meliocarpoides var. *meliocarpoides*'in *trnL* intron bölgesindeki 15 bazlık indel (insersiyon-delesyon) durumu Resim 4.3'de belirtilmiştir. *P. turcica*'nın ITS bölgesindeki 1 bazlık Timin (T) indel durumu ile *P. sp. nova*'nın ITS bölgesindeki 2 bazlık Sitozin-Timin (C-T) indel durumu Resim 4.4'de belirtilmiştir.

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help									
DNA Sequences									
Species/Abbrv									
1. <i>P. denticulata</i> (1)									
2. <i>P. denticulata</i> (2)									
3. <i>P. denticulata</i> (3)									
4. <i>P. denticulata</i> (4)									
5. <i>P. denticulata</i> (5)									
6. <i>P. uechtritzii</i> (1)									
7. <i>P. uechtritzii</i> (2)									
8. <i>P. uechtritzii</i> (3)									
9. <i>P. uechtritzii</i> (4)									
10. <i>P. uechtritzii</i> (5)									
11. <i>P. turcica</i> (1)									
12. <i>P. turcica</i> (2)									
13. <i>P. turcica</i> (3)									
14. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (1)									
15. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (2)									
16. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (3)									
17. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (4)									
18. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (5)									
19. <i>P. sp. nova</i> (1)									
20. <i>P. sp. nova</i> (2)									
21. <i>P. sp. nova</i> (3)									
22. <i>P. sp. nova</i> (4)									
23. <i>P. sp. nova</i> (5)									
24. <i>P. heyniae</i> (1)									
25. <i>P. heyniae</i> (2)									
26. <i>P. heyniae</i> (3)									
27. <i>P. heyniae</i> (4)									
28. <i>P. heyniae</i> (5)									
29. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i> (1)									
30. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i> (2)									
31. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i> (3)									
32. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i> (4)									
33. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i> (5)									
34. <i>P. ilanae</i> (1)									
35. <i>P. ilanae</i> (2)									

Resim 4.3. *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides*'nin *trnL* intron bölgesindeki indel durumu (15 bazlık)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help									
DNA Sequences									
Species/Abbrv									
7. <i>P. uechtritzii</i> (2)									
8. <i>P. uechtritzii</i> (3)									
9. <i>P. uechtritzii</i> (4)									
10. <i>P. uechtritzii</i> (5)									
11. <i>P. turcica</i> (1)									
12. <i>P. turcica</i> (2)									
13. <i>P. turcica</i> (3)									
14. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (1)									
15. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (2)									
16. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (3)									
17. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (4)									
18. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i> (5)									
19. <i>P. sp. nova</i> (1)									
20. <i>P. sp. nova</i> (2)									
21. <i>P. sp. nova</i> (3)									
22. <i>P. sp. nova</i> (4)									
23. <i>P. sp. nova</i> (5)									
24. <i>P. heyniae</i> (1)									
25. <i>P. heyniae</i> (2)									

Resim 4.4. *P. turcica*'nın ITS bölgesindeki T indel durumu ile *P. sp. nova*'nın ITS bölgesindeki C-T indel durumu

Endemik *Prangos* türlerinin kodlanmayan *trn* bölgelerine ait 5 parsimoni informatik alanın 2 tanesi *trnV* intron bölgesinde, 3 tanesi *trnL-F* intergenik bölgesinde bulunmaktadır. Resim 4.5'te *trn* bölgesine ait informatik alanlardan bir örnek verilmiştir. Burada; *trnV* intron bölgesinin 151. bazının *P. uechtritzi* ve *P. platychloena* subsp. *engizekensis*'de sitozin (C), diğer türlerde ise adenin (A) olduğu görülmektedir.

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help																																							
																																							
DNA Sequences																																							
Species/Abbrev																																							
1. P. denticulata (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
2. P. denticulata (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
3. P. denticulata (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
4. P. denticulata (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
5. P. denticulata (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
6. P. uechtritzi (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
7. P. uechtritzi (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
8. P. uechtritzi (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
9. P. uechtritzi (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
10. P. uechtritzi (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
11. P. turcica (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
12. P. turcica (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
13. P. turcica (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
14. P. platychloena subsp. engizekensis (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
15. P. platychloena subsp. engizekensis (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
16. P. platychloena subsp. engizekensis (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
17. P. platychloena subsp. engizekensis (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
18. P. platychloena subsp. engizekensis (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
19. P. sp. nova (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
20. P. sp. nova (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
21. P. sp. nova (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
22. P. sp. nova (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
23. P. sp. nova (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
24. P. heyniae (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
25. P. heyniae (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
26. P. heyniae (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
27. P. heyniae (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
28. P. heyniae (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
29. P. meliocarpoides var. meliocarpoides (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
30. P. meliocarpoides var. meliocarpoides (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
31. P. meliocarpoides var. meliocarpoides (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
32. P. meliocarpoides var. meliocarpoides (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
33. P. meliocarpoides var. meliocarpoides (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
34. P. ilanae (1)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
35. P. ilanae (2)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
36. P. ilanae (3)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
37. P. ilanae (4)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C
38. P. ilanae (5)	G	G	G	G	T	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	C	C	C	T	T	T	A	G	G	T	C	C	A	A	A	C	G	G	A	C	C	A	T	C

Resim 4.5. Endemik *Prangos* türlerinin *trnV* intron bölgesine ait parsimoni informatik alan

Endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgesinde toplam 32 parsimoni informatik alan bulunmaktadır. Resim 4.6’da ITS bölgesine ait parsimoni informatik alanlardan birkaçı gösterilmiştir. Burada ITS bölgesine ait 22. nükleotitin *P. heyniae*’da Timin (T) iken, diğerlerinde Sitozin (C) olduğu, 26. nükleotitin *P. sp. nova*’da Timin (T) iken, diğerlerinde Sitozin (C) olduğu, 39. nükleotitin *P. turcica*’da sitozin (C) iken, diğerlerinde Adenin (A) olduğu, 42. nükleotitin ise *P. turcica*’da Timin (T) iken, diğerlerinde Adenin (A) olduğu görülmektedir.



Resim 4.6. Endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgesine ait parsimoni informatik alanlar

Dizi analizi sonuçlarına bakıldığında; incelenen tüm *trn* bölgesinin ortalama % 29,8 Timin (T), % 17,3 Sitozin (C), % 34,1 Adenin (A) ve % 18,8 Guanin (G) nükleotit içeriğine yani % 36,1 GC içeriğine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Endemik *Prangos* türlerinin kodlanmayan *trn* bölgelerinin (*trnV* intron + *trnL* intron + *trnL-F* intergenik bölge) % nükleotit kompozisyonu

	T	C	A	G	Total
Gp. 1. <i>P. denticulata</i>	29,8	17,3	34,1	18,8	1436,0
Gp. 2. <i>P. uechtritzii</i>	29,8	17,3	34,0	18,9	1436,0
Gp. 3. <i>P. turcica</i>	29,8	17,3	34,1	18,8	1436,0
Gp. 4. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	29,8	17,4	34,0	18,8	1436,0
Gp. 5. <i>P. sp. nova</i>	29,8	17,3	34,1	18,8	1436,0
Gp. 6. <i>P. heyntiae</i>	29,8	17,3	34,1	18,8	1436,0
Gp. 7. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i>	29,8	17,2	34,2	18,7	1451,0
Gp. 8. <i>P. ilanae</i>	29,8	17,3	34,1	18,8	1436,0
Ortalama	29,8	17,3	34,1	18,8	1437,9

ITS bölgesinin ortalama %21,5 T, % 28,4 C, % 22,0 A, % 28,1 G nükleotit içeriğine yani % 56,5 GC içeriğine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgelerinin % nükleotit kompozisyonu

	T(U)	C	A	G	Total
Gp.1. <i>P.denticulata</i>	21,3	28,7	21,9	28,1	602,0
Gp. 2. <i>P. uechtritzii</i>	21,4	28,6	21,9	28,1	602,0
Gp. 3. <i>P. turcica</i>	21,4	28,7	21,9	28,0	603,0
Gp. 4. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	21,4	28,6	21,9	28,1	602,0
Gp. 5. <i>P. sp. nova</i>	22,7	27,5	21,9	28,0	604,0
Gp. 6. <i>P. heyntiae</i>	21,3	28,7	22,1	27,9	602,0
Gp.7. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i>	21,4	28,1	22,3	28,2	602,0
Gp. 8. <i>P. ilanae</i>	21,3	28,2	22,4	28,1	602,0
Ortalama	21,5	28,4	22,0	28,1	602,3

Endemik *Prangos* türleri için her türe ait 5 birey kendi arasında gruplanmış ve grupların hem kendi içindeki hem de birbirlerine göre genetik uzaklıkları MEGA versiyon 5 analiz programında yer alan Kimura 2 parametre testi (1980) ile hesaplanmıştır. *Trn* analizine göre; endemik *Prangos* türlerinin grup içi genetik uzaklıkları 0, gruplar arası genetik uzaklıkları ise 0,000-0,003 arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Endemik *Prangos* türlerinin *trn* analizine göre gruplar arası genetik uzaklığı

	1	2	3	4	5	6	7
Gp 1. <i>P.denticulata</i>							
Gp 2. <i>P. uechtritzi</i>	0,003						
Gp 3. <i>P. turcica</i>	0,001	0,002					
Gp 4. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	0,002	0,001	0,001				
Gp 5. <i>P. sp. nova</i>	0,000	0,003	0,001	0,002			
Gp 6. <i>P. heyntiae</i>	0,000	0,003	0,001	0,002	0,000		
Gp 7. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i>	0,001	0,002	0,000	0,001	0,001	0,001	
Gp 8. <i>P. ilanae</i>	0,000	0,003	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001

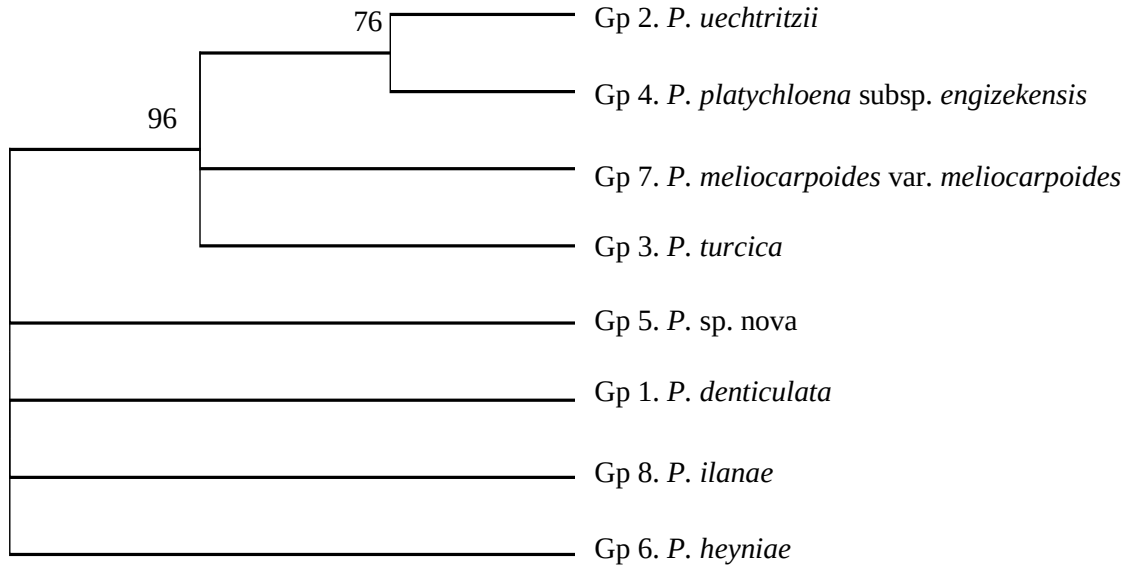
ITS analizine göre ise endemik *Prangos* türlerinin grup içi genetik uzaklıkları 0, gruplar arası genetik uzaklıkları da 0,000-0,036 arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Endemik *Prangos* türlerinin ITS analizine göre gruplar arası genetik uzaklığı

	1	2	3	4	5	6	7
Gp1. <i>P.denticulata</i>							
Gp 2. <i>P. uechtritzi</i>	0,005						
Gp 3. <i>P. turcica</i>	0,020	0,022					
Gp 4. <i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	0,005	0,000	0,022				
Gp 5. <i>P. sp. nova</i>	0,022	0,020	0,036	0,020			
Gp 6. <i>P. heyntiae</i>	0,002	0,007	0,022	0,007	0,024		
Gp 7. <i>P. meliocarpoides</i> var. <i>meliocarpoides</i>	0,019	0,019	0,032	0,019	0,029	0,020	
Gp 8. <i>P. ilanae</i>	0,015	0,015	0,029	0,015	0,025	0,017	0,003

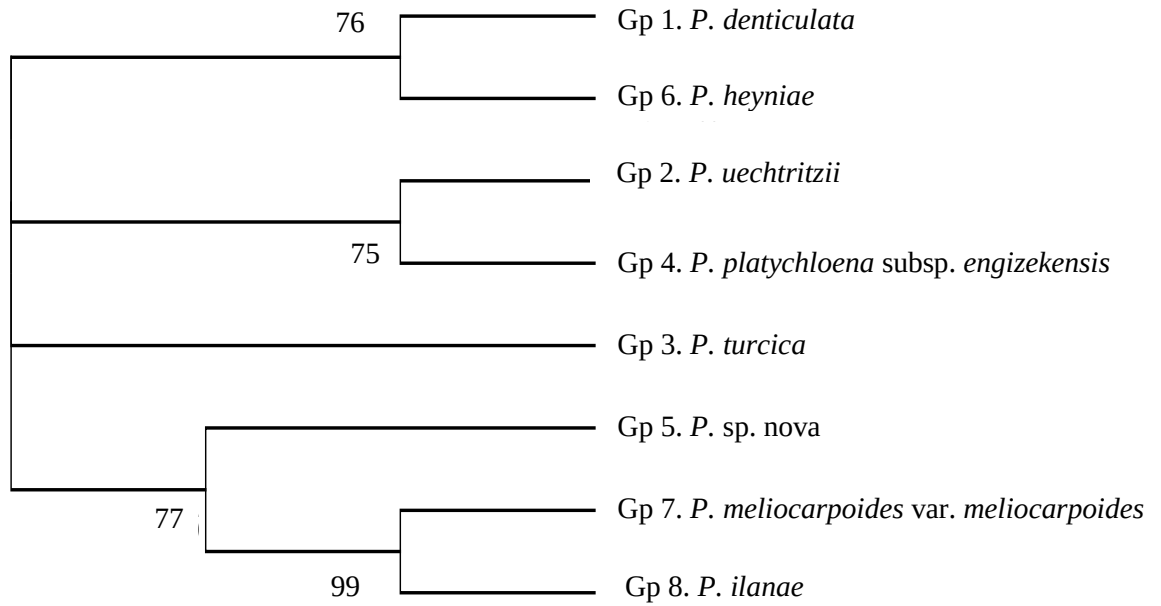
Türkiye’deki endemik *Prangos* türlerinin, türler arasındaki filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogramları MEGA 5.1 Beta analiz programı ile oluşturulmuştur.

Kodlanmayan *trn* bölgelerinin (*trnV* intron, *trnL* intron, *trnL-F* intergenik bölge) kombinasyonu sonucu oluşturulan dendrogramda; *P. uechtrizii* ve *P. platychloena* subsp. *engizekensis* türlerinin birbirlerine yakın çıktığı görülmektedir. Bu iki türün bulunduğu dal % 76 desteklenmiştir. Bu iki tür ile birlikte *P. meliocarpoides* ve *P. turcica* türleri % 96 destekli diğer endemik türlerden ayrılmıştır. Bununla birlikte, *trn* bölgesi çok fazla parsimoni informatik karakter içermediğinden türler arası farklılaşma fazla olmamıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Endemik *Prangos* türlerinin *trnV* intron, *trnL* intron, *trnL-F* intergenik bölgesinin kombinasyonu ile oluşturulan dendrogramı (dallardaki sayılar bootstrap değerlerini (%) göstermektedir)

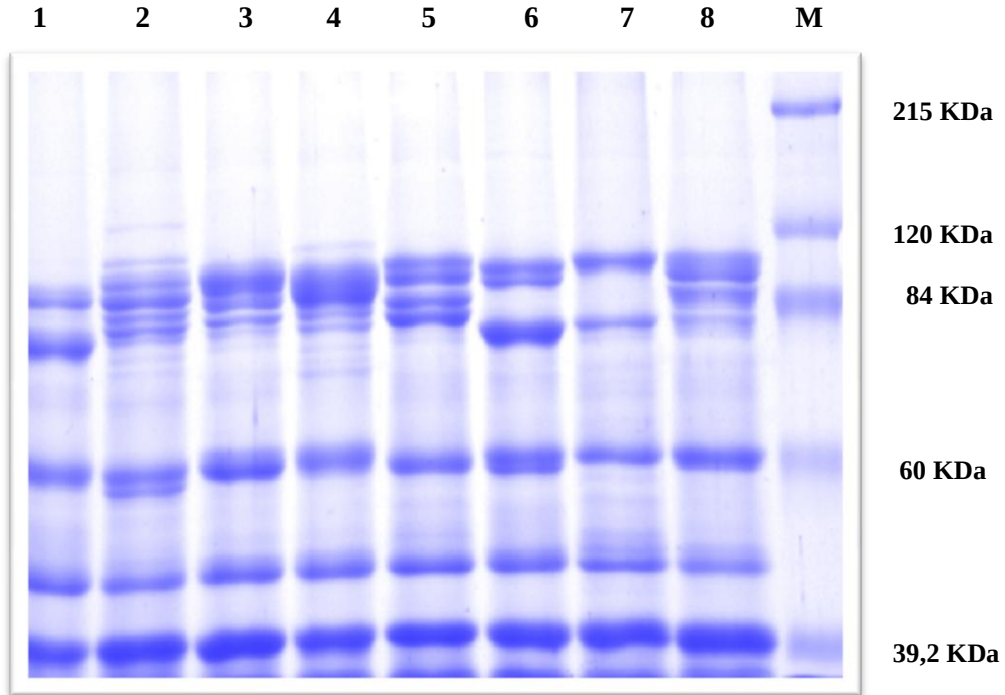
ITS bölgesinin analizi sonucu oluşturulan dendrogramda ise; *trn* bölgesi dendrogramında olduğu gibi, *P. uechtritzi* ve *P. platychloena* subsp. *engizekensis* birbirlerine çok yakın çıkmıştır. Bu türlerinin bulunduğu dal % 75 desteklenmiştir. Bununla birlikte, *P. heyniae* ve *P. denticulata*'nın birbirlerine diğer türlere nazaran daha yakın çıktığı dikkati çekmektedir. ITS bölgesinin analizinde *P. denticulata* ve *P. heyniae*'nin bulunduğu dal % 76 desteklenmiştir. ITS bölgesi *trn* bölgesine göre daha çok bilgi verici karakter içerdiğinden oluşan dendrogramda türler birbirinden farklılaşmıştır. *P. turcica* ve *P. sp. nova* türleri diğer türlerden farklılaşarak ayrı ayrı gruplar oluşturmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgesine göre oluşturulan dendrogramı (dallardaki sayılar bootstrap değerlerini (%) göstermektedir)

4.2. Endemik *Prangos* Türlerinin Protein Analizleri

Prangos cinsine ait 8 endemik türün tohum depo proteinleri izole edilmiş ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi'nde (SDS-PAGE) yürütülmüştür. SDS-PAGE ile elde edilen jeller tespit edilip boyanmıştır (Resim 4.7). Daha sonra *Prangos* türlerinin jel üzerinde oluşturduğu protein bantları UVP dijiital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bu değerlendirme UPGMA filogenetik analiz metodu ve Jaccard similarity kullanılarak yapılmıştır.



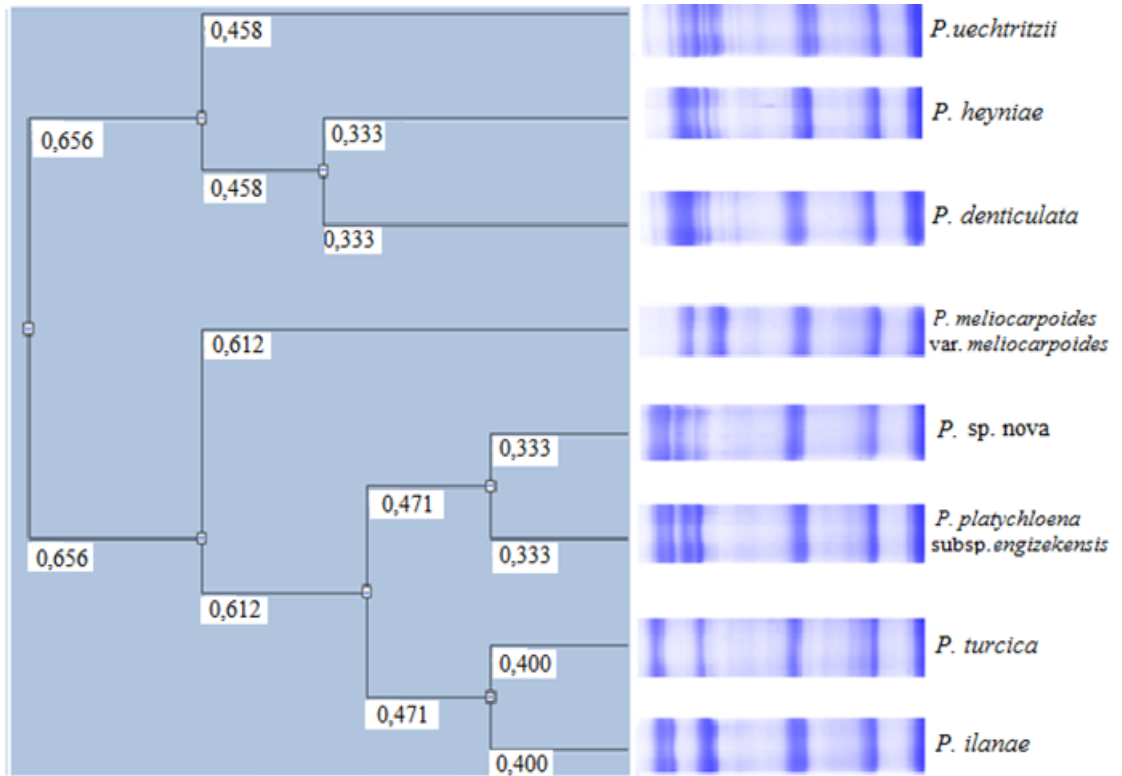
Resim 4.7. Endemik *Prangos* türlerin tohum proteinlerin elektroforetik profilleri;

1. *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* 2. *P. uechtritzii* 3. *P. heyniae*
4. *P. denticulata* 5. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* 6. *P. ilanae*
7. *P. turcica* 8. *P. sp. nova* M. Marker [Miyozin (215 KDa), Fosforilaz B (120 KDa), BSA-sığır serum albumini (84 KDa), Ovalbumin (60 KDa), Karbonik anhidraz (39,2 KDa)]

Protein profilleri sonucu elde edilen dendrogram sonuçlarına göre çalışılan toplam 8 endemik *Prangos* türü iki ana gruba ayrılmıştır.

I. grupta *P. uechtritzi*, *P. heyniae* ve *P. denticulata* türleri yer almıştır. Genetik uzaklık bakımından *P. uechtritzi* türü bu gruptaki diğer iki türden ayrılmıştır (0,458). *P. denticulata* ile *P. heyniae* (0,333) türü ise birbirine daha yakın çıkmıştır.

II. grupta ise diğer 5 endemik tür yer almıştır. Bunlardan *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* diğer endemik türlere genetik olarak daha uzak çıkmıştır (0,612). Bununla birlikte, *P. sp. nova* ile *P. platychloena* subsp. *engizekensis* (0,333) ve *P. ilanae* ile *P. turcica* (0,400) türlerinin genetik uzaklık bakımından birbirlerine daha yakın çıktığı görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Endemik *Prangos* türlerinin tohum protein profilleri sonucu oluşturulan dendrogramı

4.3. Endemik *Prangos* Türlerine Ait Ekstraktların Verimleri

Endemik *Prangos* Lindl. türlerine ait yaprakların ve meyvelerin her bir çözücünden elde edilen ekstrakt verimi aşağıda Çizelge 4.8’de belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre; çalışılan bütün endemik *Prangos* türlerinin her iki bitki kısmında (meyve ve yaprak) da en yüksek verim (% w/w) su ekstraktlarında gözlenmiştir. Aynı şekilde en düşük verim ise aseton ekstraktlarında gözlenmiştir. Bütün türlerde ekstraktların verimleri su > metanol > aseton şeklinde sıralanmıştır. En yüksek verim *P. denticulata*’nın yaprak su ekstraktında (% 40,3 w/w), en düşük verim ise *P. ilanae*’nin meyve aseton ekstraktında (% 3,8 w/w) belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Endemik *Prangos* türlerine ait ekstraktların verimleri (% w/w)

Materyal Çözücü	Yaprak				Meyve			
	<i>P.ilanae</i>	<i>P.denticulata</i>	<i>P.platychoena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P.heyntiae</i>	<i>P.ilanae</i>	<i>P.denticulata</i>	<i>P.platychoena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P.heyntiae</i>
Su	26,0	40,3	37,4	28,1	20,8	25,9	36,5	24,9
Metanol	18,5	32,9	27,0	17,6	10,0	14,5	27,6	16,6
Aseton	8,3	6,6	18,3	6,15	3,8	10,9	14,5	11,8

4.4. Endemik *Prangos* Türlerinin Antioksidan Aktivitesi

Elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri değişik parametreler ile belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışılan parametreler ile çalışma sonucu elde edilen veriler şu şekildedir.

4.4.1. DPPH radikalini giderim aktivitesi

Bitki ekstraktlarının serbest radikal süpürücü etkisine DPPH testi ile bakılmıştır. Antioksidanların DPPH radikal temizleme üzerindeki etkisi onların hidrojen verme yetenekleri veya radikal temizleme aktiviteleri nedeniyle düşünülmüştür. Bitki ekstraktlarının ve sentetik antioksidanların % DPPH giderim aktiviteleri 0,025 ile 0,200 mg/ml arasında değişen 5 farklı konsantrasyonda ölçülmüştür ve bu değerlere göre IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Başlangıç substrat konsantrasyonunu % 50 oranında azaltan antioksidan konsantrasyonu anlamına gelen IC_{50} , antiradikal verimliliğini ölçmek için geniş bir biçimde kullanılan bir parametredir. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktiviteyi göstermektedir.

DPPH radikali giderim aktivitesinin IC_{50} değerlerine göre belirlenen etkinlikteki azalma sırası tüm türler için su ekstraktı > metanol ekstraktı > aseton ekstraktı şeklinde sıralanmıştır. Elde edilen veriler, *Prangos* türlerinin yaprak ekstraktlarının meyve ekstraktlarından daha iyi bir DPPH giderim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Tüm ekstraktlar arasında en yüksek etki *P. ilanae* yaprak su ekstraktında çıkarken ($IC_{50} = 0,037 \pm 0,001$ mg/ml), en düşük etki *P.denticulata*'nın meyve aseton ekstraktında çıkmıştır ($IC_{50} = 0,243 \pm 0,005$ mg/ml). Bununla birlikte, ikinci sırada en yüksek DPPH giderim aktivitesini *P. ilanae* türüne ait yaprak metanol ekstraktı göstermiştir ($IC_{50} = 0,043 \pm 0,001$ mg/ml) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Endemik *Prangos* türlerinin DPPH radikalini giderim aktivitesi¹ -[IC₅₀² (mg/ml)]

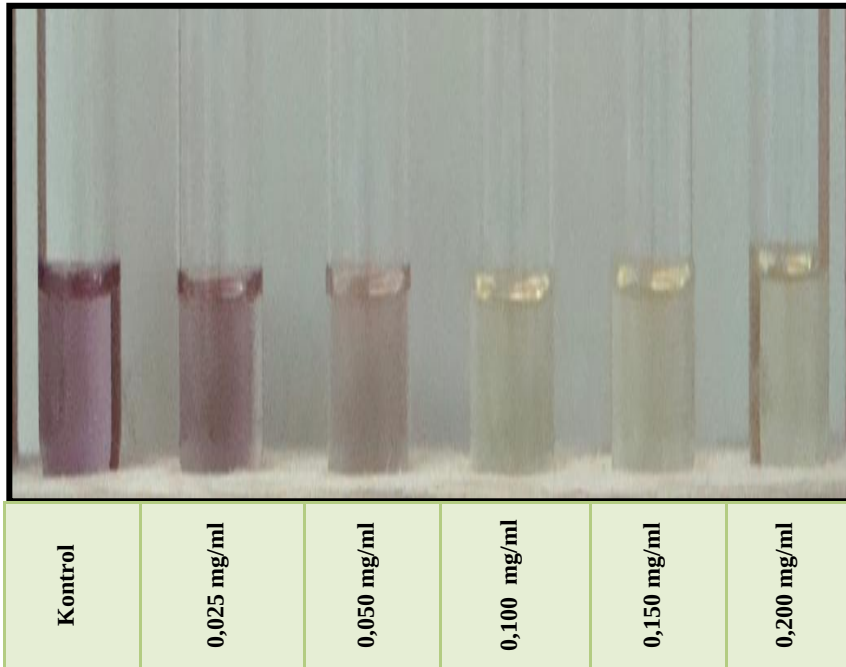
Materyal	Yaprak				Meyve			
	<i>P. ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyniae</i>	<i>P. ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyniae</i>
Su ekstraktı	0,037 ± 0,001 ^a	0,048 ± 0,001 ^a	0,057 ± 0,001 ^a	0,098 ± 0,002 ^a	0,114 ± 0,001 ^a	0,120 ± 0,002 ^a	0,102 ± 0,001 ^a	0,119 ± 0,001 ^a
Metanol ekstraktı	0,043 ± 0,001 ^b	0,058 ± 0,001 ^b	0,061 ± 0,001 ^b	0,099 ± 0,005 ^a	0,123 ± 0,001 ^b	0,132 ± 0,002 ^b	0,106 ± 0,002 ^b	0,128 ± 0,002 ^b
Aseton ekstraktı	0,090 ± 0,001 ^c	0,125 ± 0,002 ^c	0,066 ± 0,001 ^c	0,126 ± 0,002 ^b	0,124 ± 0,001 ^b	0,243 ± 0,005 ^c	0,115 ± 0,003 ^c	0,237 ± 0,004 ^c
α-Tokoferol	0,011 ± 0,001 ^d							
BHA	0,003 ± 0,000 ^e							
BHT	0,023 ± 0,001 ^f							

¹ Değerler üç deneyin ortalaması ± standart sapması şeklinde verilmiştir. Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p < 0,05$).

² IC₅₀: DPPH radikaline karşı % 50'sini inhibe eden konsantrasyon değerini belirtmektedir. IC₅₀ değerinin küçük olması bitkinin gösterdiği etkinin büyük olduğu anlamına gelmektedir.

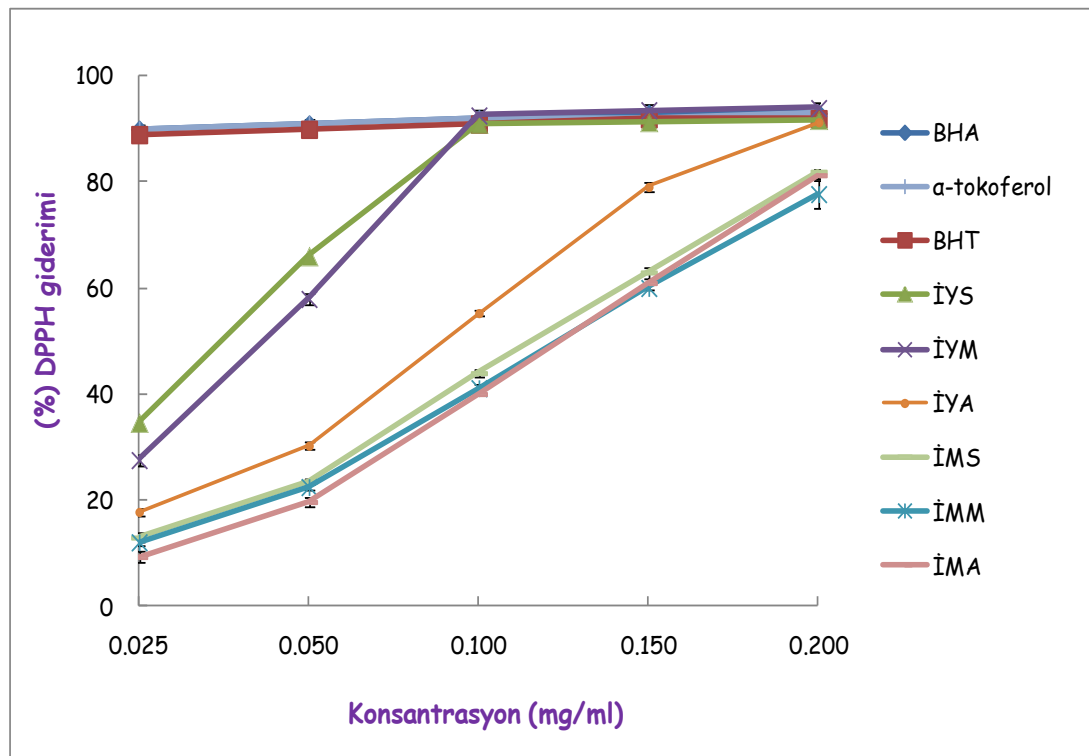
Türlere ait ekstraktlar sentetik antioksidanlar (BHT, BHA ve α -tokoferol) ile kıyaslandığında, sentetik antioksidanların ekstraktlardan daha düşük bir IC_{50} değerine (daha yüksek bir antioksidan aktiviteye) sahip olduğu görülmektedir. Ancak, *P. ilanae* 'nin yaprak su ekstraktının IC_{50} değerinin ($IC_{50} = 0,037 \pm 0,001$ mg/ml), BHT'nin IC_{50} değerine ($IC_{50} = 0,023 \pm 0,001$ mg/ml) oldukça yakın olduğu da dikkati çekmektedir.

Bir DPPH solüsyonu hidrojen atomu verebilen bir madde ile karıştırıldığı zaman mor rengin kaybolmasıyla indirgenmiş form olan difenilpikrilhidrazinin (radikal olmayan) oluşmasına neden olur. *P.ilanae* yaprak su ekstraktının, test edilen konsantrasyonlarda (0,025-0,200 mg/ml), DPPH radikale karşı renk değişimi Resim 4.8'de görülmektedir. Herhangi bir bitki ekstraktının olmadığı kontrol tüpünde renk mor iken, bitki ekstraktlarının olduğu diğer tüplerde konsantrasyon arttıkça mor rengin açılıp sarıya döndüğü görülmektedir.



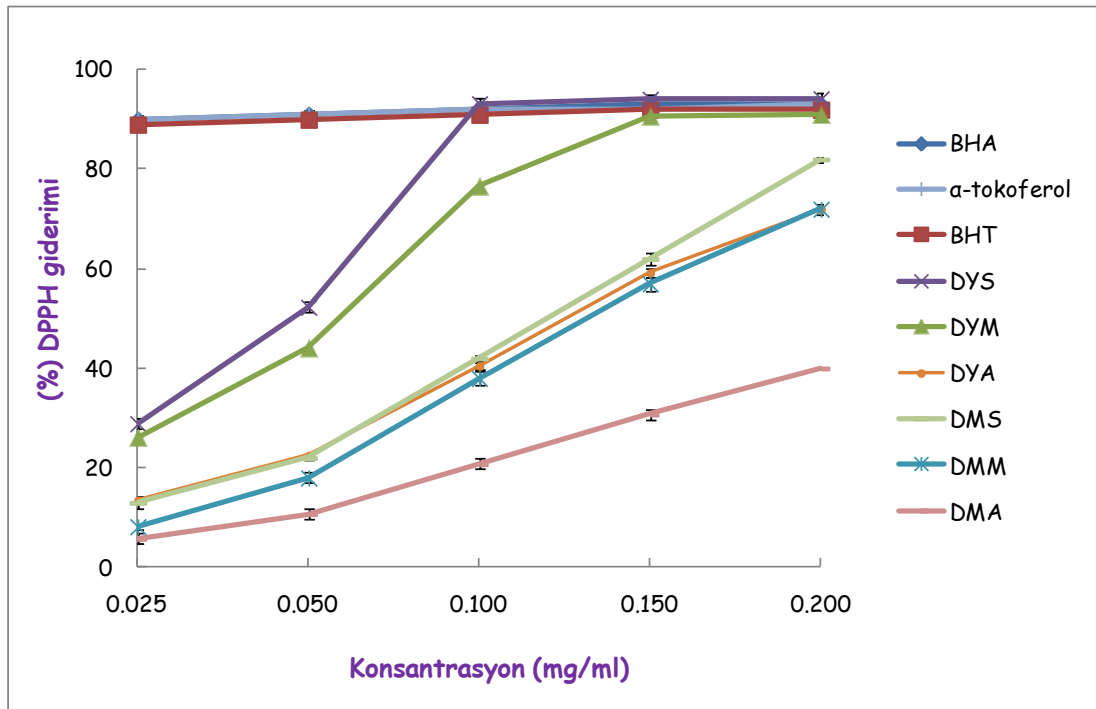
Resim 4.8. *P. ilanae* yaprak su ekstraktının DPPH radikale karşı renk değişimi

Şekil 4.4’de görüldüğü gibi çalışılan tüm konsantrasyonlarda (0,025-0,200 mg/ml) *P.ilanae* türünün yaprak ekstraktları meyve ekstraktlarından daha iyi DPPH radikal giderim aktivitesi göstermiştir. Bu aktivitede; *P. ilanae* türüne ait yaprak ekstraktları arasında en yüksek aktiviteyi İYS (*P. ilanae* yaprak su ekstraktı), meyve ekstraktları arasında en yüksek aktiviteyi ise İMS (*P. ilanae* meyve su ekstraktı) göstermiştir. *P. ilanae* türüne ait ekstraktlar sentetik antioksidanlar ile kıyaslandığında ise özellikle 0,100 mg/ml ve bu konsantrasyonun üzerinde, İYS ve İYM’nin sentetik antioksidanlar; BHA, α -tokoferol ve BHT ile aynı etkiyi gösterdiği, *P.ilanae* türüne ait diğer ekstraktların ise bu etkiye, ancak 0,200 mg/ml ve bu konsantrasyonun üzerinde ulaşabildiği görülmektedir.



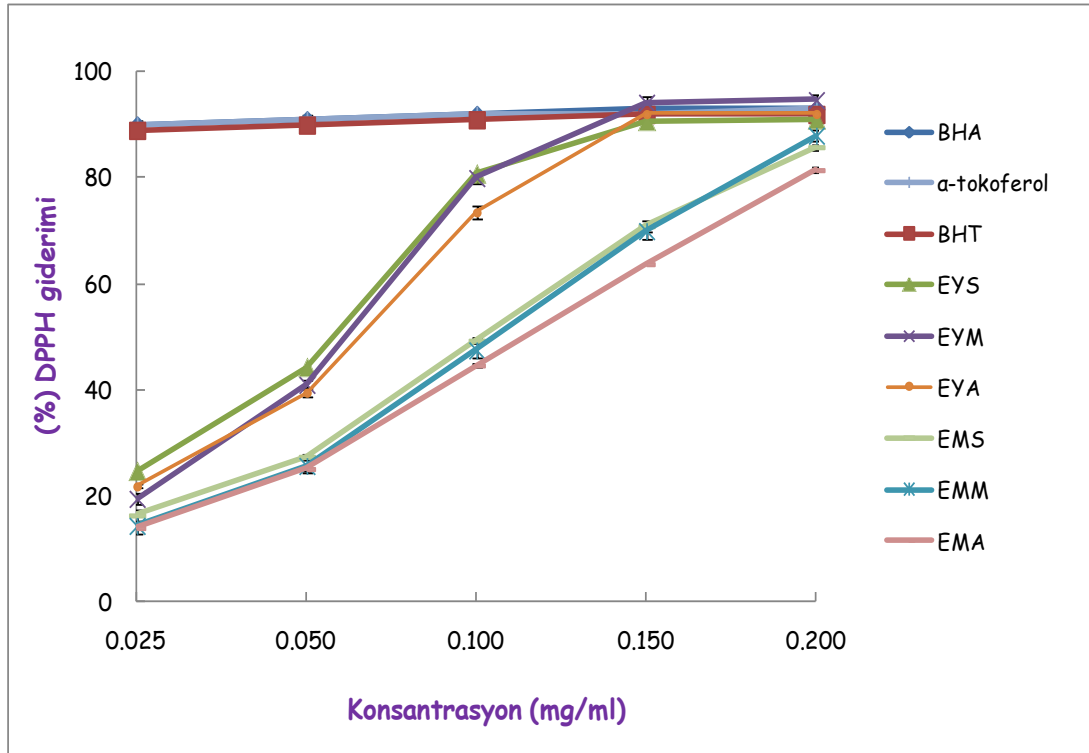
Şekil 4.4. *P.ilanae* türünün DPPH radikali giderim aktivitesi (İYS; *P. ilanae* yaprak su ekstraktı, İYM; *P. ilanae* yaprak metanol ekstraktı, İYA; *P. ilanae* yaprak aseton ekstraktı, İMS; *P. ilanae* meyve su ekstraktı, İMM; *P. ilanae* meyve metanol ekstraktı, İMA; *P. ilanae* meyve aseton ekstraktı)

P. denticulata türünün DPPH giderim etkisine bakıldığında ise; *P. ilanae*'de olduğu gibi yaprak ekstraktlarının meyve ekstraktlarından daha etkili olduğu, ancak *P. ilanae*'den farklı olarak, özellikle 0,100 mg/ml konsantrasyondan sonra, bir meyve ekstraktı olan DMS'nin (*P. denticulata* meyve su ekstraktı) bir yaprak ekstraktı olan DYA'dan (*P. denticulata* yaprak aseton ekstraktı) daha etkili olduğu görülmektedir. Sentetik antioksidanlar ile *P. denticulata* ekstraktları kıyaslandığında; 0,100 mg/ml ve bu konsantrasyonun üzerinde DYS'nin (*P. denticulata* yaprak su ekstraktı), 0,150 mg/ml ve bu konsantrasyonun üzerinde DYM'nin (*P. denticulata* yaprak metanol ekstraktı) sentetik antioksidanlarla aynı etkiyi gösterdiği dikkati çekmektedir (Şekil 4.5).



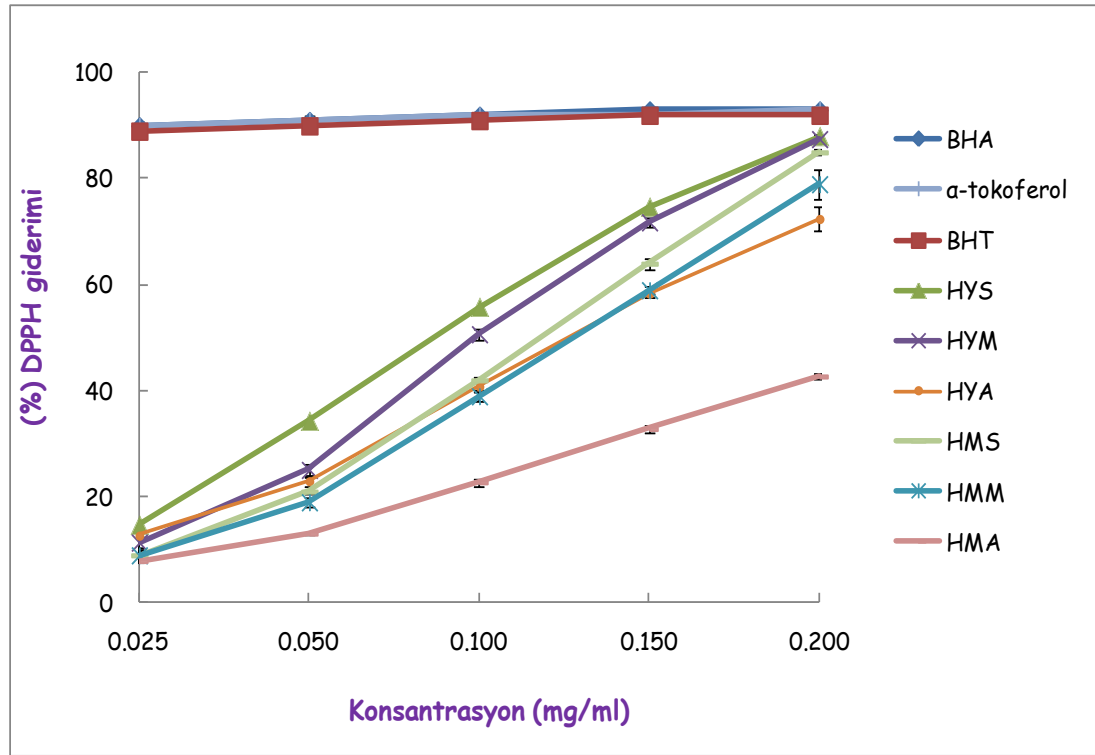
Şekil 4.5. *P. denticulata* türünün DPPH radikali giderim aktivitesi (DYS; *P. denticulata* yaprak su ekstraktı, DYM; *P. denticulata* yaprak metanol ekstraktı, DYA; *P. denticulata* yaprak aseton ekstraktı, DMS; *P. denticulata* meyve su ekstraktı, DMM; *P. denticulata* meyve metanol ekstraktı, DMA; *P. denticulata* meyve aseton ekstraktı)

P. platychloena subsp. *engizekensis* türünün DPPH süpürücü etkisine bakıldığında, *P. ilanae*'de olduğu gibi çalışılan tüm konsantrasyonlarda (0,025-0,200 mg/ml) yaprak ekstraktlarının meyve ekstraktlarından daha etkili olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, *P. platychloena* subsp. *engizekensis* türünün tüm yaprak ekstraktları kendi aralarında birbirine yakın, tüm meyve ekstraktları da aynı şekilde kendi aralarında birbirine yakın bir aktivite göstermiştir. Sentetik antioksidanlar ile *P. platychloena* subsp. *engizekensis* ekstraktları kıyaslandığında; 0,150 mg/ml konsantrasyonun üzerinde bu türe ait her üç yaprak ekstraktının (EYS, EYM ve EYA) sentetik antioksidanlar ile aynı etkiyi gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* türünün DPPH radikali giderim aktivitesi (EYS; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak su ekstraktı, EYM; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak metanol ekstraktı, EYA; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak aseton ekstraktı, EMS; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve su ekstraktı, EMM; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve metanol ekstraktı, EMA; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve aseton ekstraktı)

P. heyniae türünün DPPH süpürücü etkisine bakıldığında ise; test edilen konsantrasyonlarda en yüksek aktiviteyi HYS'nin (*P. heyniae* yaprak su ekstraktı), en düşük aktiviteyi ise HMA'nın (*P. heyniae* meyve aseton ekstraktı) gösterdiği görülmektedir. Yaprak ekstraktı olan HYA (*P. heyniae* yaprak aseton ekstraktı) ile meyve ekstraktları HMM (*P. heyniae* meyve metanol ekstraktı) ve HMS (*P. heyniae* meyve su ekstraktı) de zayıf bir DPPH süpürücü etki göstermişlerdir. Sentetik antioksidanlar ile aynı etkiyi test edilen konsantrasyonlarda *P. heyniae* türünün hiçbir ekstraktı gösterememiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *P. heyniae* türünün DPPH radikali giderim aktivitesi (HYS; *P. heyniae* yaprak su ekstraktı, HYM; *P. heyniae* yaprak metanol ekstraktı, HYA; *P. heyniae* yaprak aseton ekstraktı, HMS; *P. heyniae* meyve su ekstraktı, HMM; *P. heyniae* meyve metanol ekstraktı, HMA; *P. heyniae* meyve aseton ekstraktı)

4.4.2. Plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu

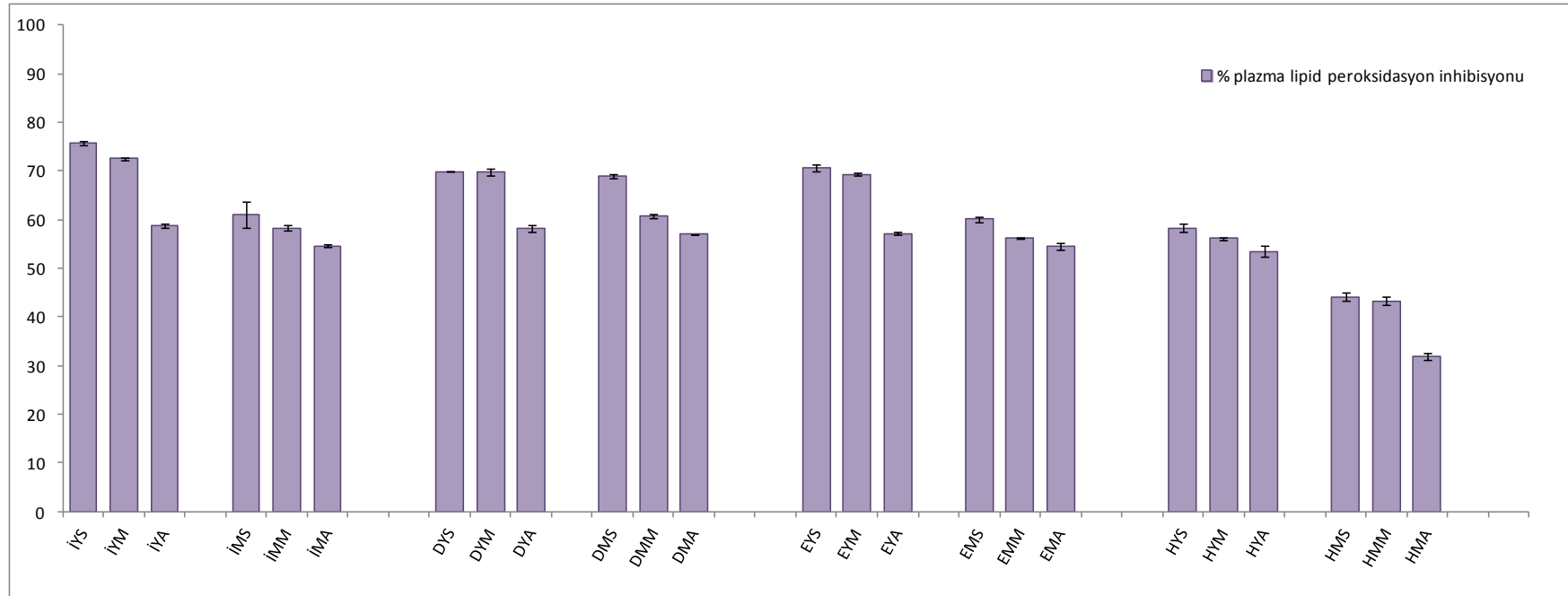
Özellikle, hücreler ve kan içerisinde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri lipit peroksitlerin üretilmesiyle sonuçlanan tepkimelere yüksek eğilimlidirler. Lipit peroksidasyonu sırasında, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile şekillenen düşük moleküler ağırlıklı nihai ürünler ki muhtemelen malondialdehitler (MDA), tiyobarbitürik asitin (TBA) iki molekülüyle pembemsi kırmızı renkli kromojen vermek için reaksiyona girebilmektedirler. Plazma lipit peroksidasyonu sonucu oluşan MDA miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan bu testte ise MDA plazma lipit oksidasyonu sonucunda oluşturulmuş ve TBA ile reaksiyona sokularak oluşan oksidasyonun inhibisyon derecesi belirlenmiştir. Bitki ekstraktları lipit peroksidasyonunun önlenmesine ve böylece MDA oluşumunun azalmasına neden olmaktadır. Yani yüksek inhibisyon etki yüksek antioksidan etkiyi göstermektedir. Buna göre; en yüksek etki *P. ilanae* yaprak su ekstraktında gözlenmiştir (2 mg/ml'de % 75,81 ± 0,46). Ekstraktlar arasında en düşük plazma lipit inhibisyon etkisi ise *P. heyniae*'nın meyve aseton ekstraktında (2 mg/ml'de % 31,86 ± 0,62) gözlenmiştir (Çizelge 4.10). DPPH testinde olduğu gibi, su ekstraktlarının inhibisyon etkisi metanol ekstraktlarından daha yüksek çıkmıştır. Yine bu testte de aseton ekstraktları diğer iki ekstrakttan daha zayıf inhibisyon etkisi göstermiştir. Bitki türlerinin kısımlarına bakıldığında ise; DPPH testinde olduğu gibi, yine yaprak ekstraktları meyve ekstraktlarından daha etkili çıkmıştır. Ancak, DPPH testinden farklı olarak bu testte yaprak ekstraktları meyve ekstraktlarından tür bazında daha etkili çıkmıştır. Farklı türler arasındaki ilişkiye bakıldığında, bazı türlere ait meyve ekstraktlarının diğer türlere ait yaprak ekstraktlarından daha etkili olduğu da dikkati çekmektedir (Şekil 4.8).

Çizelge 4.10. Endemik *Prangos* türlerinin plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu¹ (%)

Yaprak					Meyve			
Materyal	<i>P. ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyनियाe</i>	<i>P. ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyनियाe</i>
Su ekstraktı	75,81 ± 0,46 ^a	69,93 ± 0,07 ^a	70,74 ± 0,67 ^a	58,35 ± 0,74 ^a	61,33 ± 0,56 ^a	68,98 ± 0,51 ^a	60,06 ± 0,44 ^a	43,64 ± 0,54 ^a
Metanol ekstraktı	72,50 ± 0,19 ^b	69,76 ± 0,54 ^a	69,31 ± 0,34 ^b	56,22 ± 0,27 ^b	58,35 ± 0,48 ^b	60,74 ± 0,27 ^b	56,22 ± 0,14 ^b	43,29 ± 0,61 ^a
Aseton ekstraktı	58,69 ± 0,27 ^c	58,23 ± 0,75 ^b	57,18 ± 0,27 ^c	53,44 ± 1,11 ^c	54,67 ± 0,34 ^c	56,98 ± 0,07 ^c	54,49 ± 0,46 ^c	31,86 ± 0,62 ^b

¹Değerler üç deneyin ortalaması ± standart sapması şeklinde verilmiştir. Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p<0,05$).

Şekil 4.8. Endemik *Prangos* türlerinin plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu¹ (%)



¹İYS: *P.ilanae* yaprak su ekstraktı, İYM: *P. ilanae* yaprak metanol ekstraktı, İYA: *P. ilanae* yaprak aseton ekstraktı, İMS: *P. ilanae* meyve su ekstraktı, İMM: *P. ilanae* meyve metanol ekstraktı, İMA: *P.ilanae* meyve aseton ekstraktı, DYS: *P. denticulata* yaprak su ekstraktı, DYM: *P. denticulata* yaprak metanol ekstraktı, DYA: *P. denticulata* yaprak aseton ekstraktı, DMS: *P.denticulata* meyve su ekstraktı, DMM: *P.denticulata* meyve metanol ekstraktı, DMA: *P.denticulata* meyve aseton ekstraktı, EYS: *P. platychloena subsp. engizekensis* yaprak su ekstraktı, EYM: *P. platychloena subsp. engizekensis* yaprak metanol ekstraktı, EYA: *P. platychloena subsp. engizekensis* yaprak aseton ekstraktı, EMS: *P. platychloena subsp. engizekensis* meyve su ekstraktı, EMM: *P. platychloena subsp. engizekensis* meyve metanol ekstraktı, EMA: *P. platychloena subsp. engizekensis* meyve aseton ekstraktı; HYS: *P. heyniae* yaprak su ekstraktı, HYM: *P. heyniae* yaprak metanol ekstraktı, HYA: *P. heyniae* yaprak aseton ekstraktı, HMS: *P. heyniae* meyve su ekstraktı, HMM: *P. heyniae* meyve metanol ekstraktı, HMA: *P. heyniae* meyve aseton ekstraktı

4.4.3. Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi

Bitki ekstraktlarının metal şelatlama aktiviteleri ferrozin testi ile belirlenmiştir. Bu testte şelatlama ajanlarının varlığında kompleks formasyon, mor renginin azalması sonucuyla bozulmaya uğramaktadır. Bu metoda göre; en düşük absorbans en yüksek şelat oluşturma kapasitesini göstermektedir. Öncelikle, Ferrozin – Fe^{2+} kompleksi oluşumunu engelleme yüzdeleri hesaplanmış ve bu yüzdelere göre IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

Endemik *Prangos* türleri arasında en yüksek metal şelatlama aktivitesi *P. ilanae* meyve metanol ekstraktında bulunmuştur ($IC_{50} = 0,63 \pm 0,02$ mg/ml). Bununla birlikte, bu testte ön plana çıkan diğer ekstraktlar ise *P. ilanae* meyve su ekstraktı ($IC_{50} = 0,71 \pm 0,01$ mg/ml), *P. heyniae* meyve metanol ekstraktı ($IC_{50} = 0,74 \pm 0,01$ mg/ml) ve *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak su ekstraktı ($IC_{50} = 0,76 \pm 0,02$ mg/ml) olmuştur. Metal şelatlama aktivite testinde, diğer iki antioksidan aktivite çalışmasının aksine bazı türler için meyve ekstraktları yaprak ekstraktlarına göre daha yüksek aktivite göstermiştir. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve aseton ekstraktı en zayıf şelatlama aktivitesine sahip ekstrakt olmuştur ($IC_{50} = 15,21 \pm 0,24$ mg/ml). Tüm türler için meyve ekstraktları; metanol ekstraktı > su ekstraktı > aseton ekstraktı şeklinde sıralanırken, yaprak ekstraktları; su ekstraktı > metanol ekstraktı > aseton ekstraktı şeklinde sıralanmıştır (Çizelge 4.11).

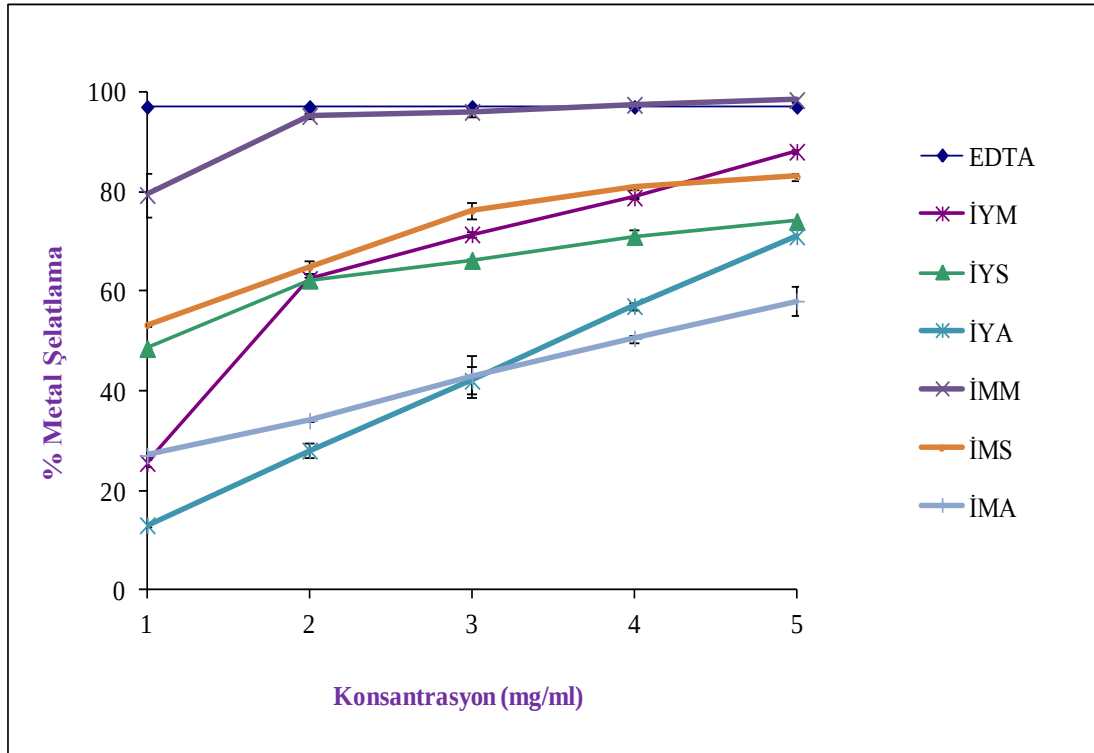
Çizelge 4.11. Endemik *Prangos* türlerinin metal şelatlama aktivitesi¹ -IC₅₀² (mg/ml)]

Yaprak					Meyve			
Materyal	<i>P. ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P.platyhloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyniae</i>	<i>P. ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P.platyhloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyniae</i>
Su ekstraktı	1,11 ± 0,01 ^a	0,94 ± 0,02 ^a	0,76 ± 0,02 ^a	1,59 ± 0,01 ^a	0,71 ± 0,01 ^a	3,39 ± 0,05 ^a	6,89 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,02 ^a
Metanol ekstraktı	1,66 ± 0,00 ^b	1,63 ± 0,01 ^b	3,88 ± 0,04 ^b	2,03 ± 0,01 ^b	0,63 ± 0,02 ^a	1,50 ± 0,02 ^b	2,66 ± 0,05 ^b	0,74 ± 0,01 ^b
Aseton ekstraktı	3,51 ± 0,06 ^c	2,67 ± 0,18 ^c	12,45 ± 0,08 ^c	3,63 ± 0,04 ^c	3,90 ± 0,10 ^b	7,76 ± 0,03 ^c	15,21 ± 0,24 ^c	8,71 ± 0,08 ^c

¹ Değerler üç deneyin ortalaması ± standart sapması şeklinde verilmiştir. Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p < 0,05$).

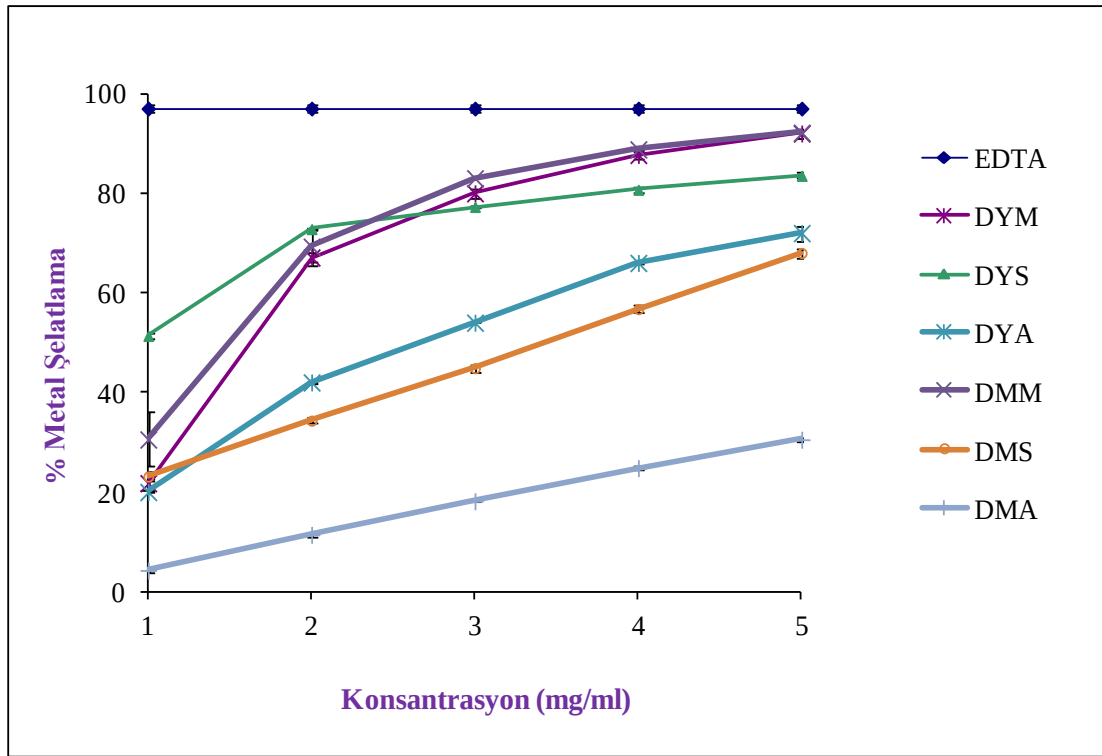
² IC₅₀: Ferrozin oluşumunun % 50'sini inhibe eden konsantrasyon değerini belirtmektedir. IC₅₀ değerinin küçük olması bitkinin gösterdiği etkinin büyük olduğu anlamına gelmektedir.

P. ilanae türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesinde; çalışılan tüm konsantrasyonlarda (1-5 mg/ml) en yüksek etkiyi meyve metanol ekstraktının (İMM) gösterdiği görülmektedir. Özellikle, İMM 2 mg/ml ve bu konsantrasyonun üzerinde pozitif kontrol EDTA ile aynı etkiye sahiptir. *P.ilanae* türünün diğer ekstraktlarına bakıldığı zaman ise aseton ekstraktlarının (hem yaprak hem de meyve) zayıf şelatlama etkisi dikkati çekmektedir. 2 mg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda yaprak ekstraktları şelatlama aktivitelerini meyve ekstraktlarına nazaran çok daha fazla arttırmışlardır (*P.ilanae* yaprak metanol ekstraktının (İYM) şelatlama aktivitesinde olduğu gibi) (Şekil 4.9).



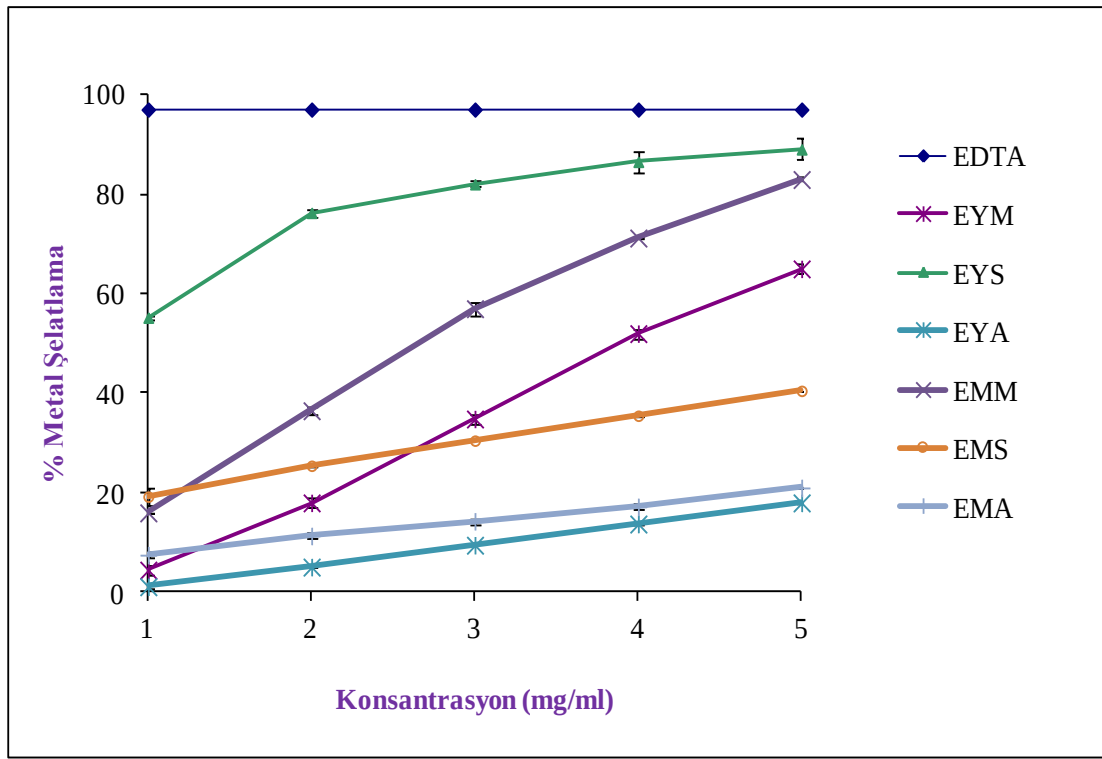
Şekil 4.9. *P.ilanae* türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi (İYM; *P. ilanae* yaprak metanol ekstraktı, İYS; *P. ilanae* yaprak su ekstraktı, İYA; *P. ilanae* yaprak aseton ekstraktı, İMM; *P. ilanae* meyve metanol ekstraktı, İMS; *P. ilanae* meyve su ekstraktı, İMA; *P. ilanae* meyve aseton ekstraktı)

P. denticulata türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesine bakıldığında, *P. ilanae*'nin aksine, *P. denticulata*'nın yaprak ekstraktlarının meyve ekstraktlarına nazaran (DMM hariç) daha etkili olduğu görülmektedir. Buna karşın, *P. ilanae*'de olduğu gibi *P. denticulata*'nın aseton ekstraktları da (hem meyve hem yaprak) bu testte zayıf bir etki göstermişlerdir. 2 mg/ml konsantrasyona kadar en etkili ekstrakt DYS (*P. denticulata* yaprak su ekstraktı) iken, bu konsantrasyonun üzerinde iki metanol ekstraktı; DYM (*P. denticulata* yaprak metanol ekstraktı) ve DMM (*P. denticulata* meyve metanol ekstraktı) ön plana çıkmıştır. Test edilen konsantrasyonlarda *P. denticulata*'ya ait hiçbir ekstrakt güçlü bir şelatlayıcı olan EDTA'nın gösterdiği etkiye ulaşamamıştır (Şekil 4.10).



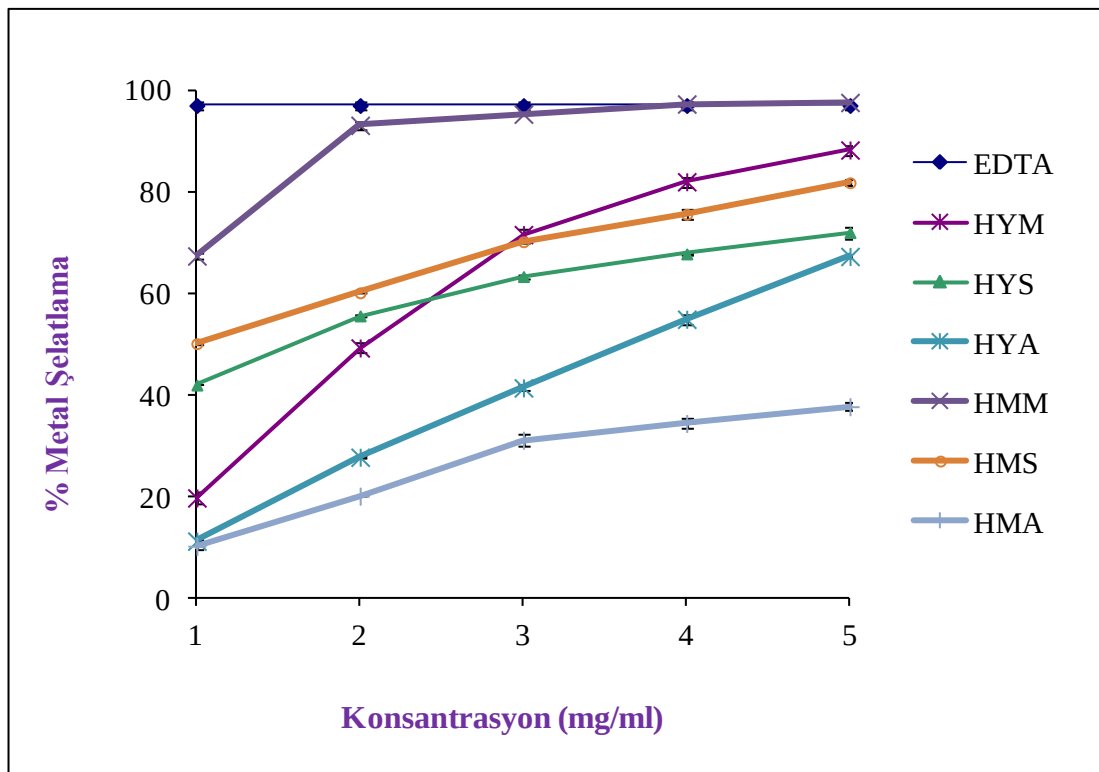
Şekil 4.10. *P. denticulata* türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi (DYM; *P. denticulata* yaprak metanol ekstraktı, DYS; *P. denticulata* yaprak su ekstraktı, DY A; *P. denticulata* yaprak aseton ekstraktı, DMM; *P. denticulata* meyve metanol ekstraktı, DMS; *P. denticulata* meyve su ekstraktı, DMA; *P. denticulata* meyve aseton ekstraktı)

P. platychloena subsp. *engizekensis* türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesine bakıldığında ise; test edilen tüm konsantrasyonlarda EYS (*P.platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak su ekstraktı) en yüksek etkiyi göstermiştir. En zayıf şelatlama aktivitesini ise diğer iki türde olduğu gibi yine aseton ekstraktları (hem yaprak hem meyve) göstermiştir. *P. denticulata*'da olduğu gibi, *P.platychloena* subsp. *engizekensis*'in de test edilen konsantrasyonlarda EDTA'nın gösterdiği aktiviteye ulaşabilen bir ekstraktı olmamıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi (EYM; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak metanol ekstraktı, EYS; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak su ekstraktı, EYA; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak aseton ekstraktı, EMM; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve metanol ekstraktı, EMS; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve su ekstraktı, EMA; *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve aseton ekstraktı)

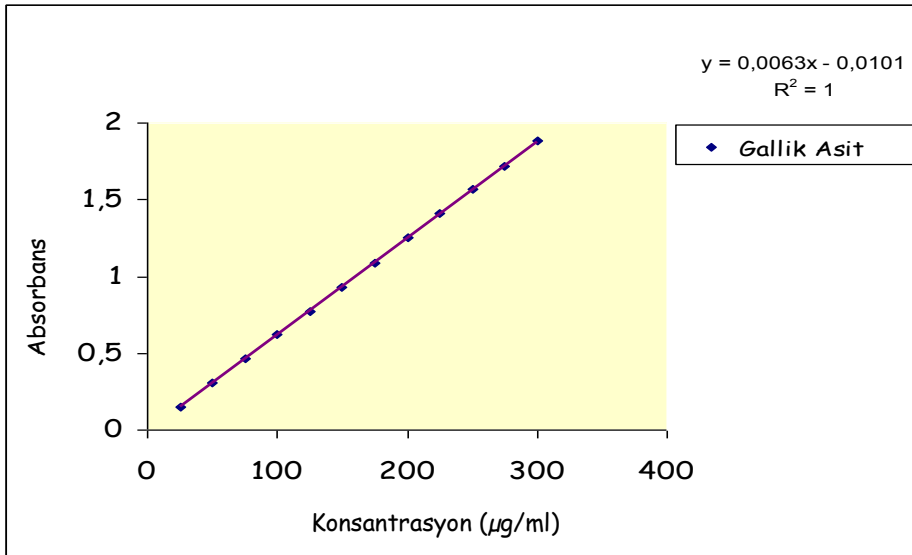
P. heyniae türünün metal şelatlama aktivitesine bakıldığında; *P. heyniae*'nin meyve metanol ekstraktının (HMM) yüksek şelatlama aktivitesi dikkati çekmektedir. *P. heyniae*'nin her iki aseton ekstraktı da (HMA ve HYA) zayıf bir etki gösterirken, su ekstraktları (HMS ve HYS) orta derecede bir şelatlama aktivitesi göstermiştir. *P. heyniae*'nin yaprak metanol ekstraktı (HYM) başta düşük bir etki göstermesine rağmen, konsantrasyonu arttıkça şelatlama aktivitesini çok fazla arttırdığı, hatta 3 mg/ml konsantrasyon ve üzerinde, *P. heyniae*'nin ekstraktları arasında HMM'den sonra ikinci sırada şelatlayıcı olarak yer aldığı görülmektedir. HMM 2 mg/ml konsantrasyon ve üzerinde neredeyse pozitif kontrol EDTA ile aynı etkiyi göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *P. heyniae* türünün metal iyonlarını şelatlama aktivitesi (HYM; *P. heyniae* yaprak metanol ekstraktı, HYS; *P. heyniae* yaprak su ekstraktı, HYA; *P. heyniae* yaprak aseton ekstraktı, HMM; *P. heyniae* meyve metanol ekstraktı, HMS; *P. heyniae* meyve su ekstraktı, HMA; *P. heyniae* meyve aseton ekstraktı)

4.4.4. Toplam fenol bileşik miktarları

Ekstraktların toplam fenol miktarları, Folin-Ciocalteu (FC) reaktifi kullanılarak gallik asit standardına göre belirlenmiştir. FC yöntemi, fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma elektron transfer edilmesine dayanmaktadır ($\text{Mo (VI)} + e^- \rightarrow \text{Mo (V)}$). Ekstraktların toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.13). Standart eğri denklemi; y (absorbans) = $0,0063 \times (\mu\text{g gallik asit}) - 0,0101$, $R^2=1$ şeklinde bulunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri denkleme konulmuş ve toplam fenolik bileşiklerin miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Gallik asit standardı

Ekstraktlar arasında en yüksek toplam fenol bileşik miktarı *P. ilanae*'nin su ekstraktında belirlenmiştir ($82,24 \pm 0,11 \mu\text{g/mg}$) (Çizelge 4.12). Bu ekstrakt, DPPH radikalini giderme aktivitesi ile plazma lipid peroksidasyon inhibisyonu testlerinde en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Aseton ekstraktlarının toplam fenol içerikleri düşük bulunmuştur ve bu ekstraktlar çalışılan testlerde düşük aktivite göstermiştir. Endemik *Prangos* türlerine ait ekstraktların içerdikleri toplam fenol miktarları ile DPPH radikalini giderme aktiviteleri ve plazma lipid peroksidasyon inhibisyonları arasında önemli oranda korelasyon bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.12. Ekstraktların toplam fenol bileşik miktarları¹ [GAE² (µg/mg)]

Materyal	Yaprak				Meyve			
	<i>P.ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P. platychlaena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyniae</i>	<i>P.ilanae</i>	<i>P. denticulata</i>	<i>P. platychlaena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	<i>P. heyniae</i>
Su ekstraktı	82,24 ± 0,11 ^a	72,03 ± 0,67 ^a	78,95 ± 1,08 ^a	64,22 ± 1,02 ^a	41,22 ± 0,43 ^a	39,05 ± 0,48 ^a	63,51 ± 1,04 ^a	39,16 ± 0,64 ^a
Metanol ekstraktı	76,77 ± 1,82 ^b	62,82 ± 0,09 ^b	72,87 ± 0,42 ^b	64,10 ± 0,73 ^a	38,91 ± 0,34 ^b	35,68 ± 0,64 ^b	45,68 ± 0,67 ^b	37,87 ± 0,11 ^a
Aseton ekstraktı	57,71 ± 0,46 ^c	51,13 ± 1,91 ^c	62,08 ± 1,68 ^c	48,12 ± 1,24 ^b	28,87 ± 0,45 ^c	20,65 ± 0,28 ^c	39,22 ± 0,23 ^c	22,13 ± 0,80 ^b

¹Değerler üç deneyin ortalaması ± standart sapması şeklinde verilmiştir. Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p < 0,05$).

²GAE: gallik asit eşdeğeri

4.4.5. β -karoten ve likopen bileşik miktarları

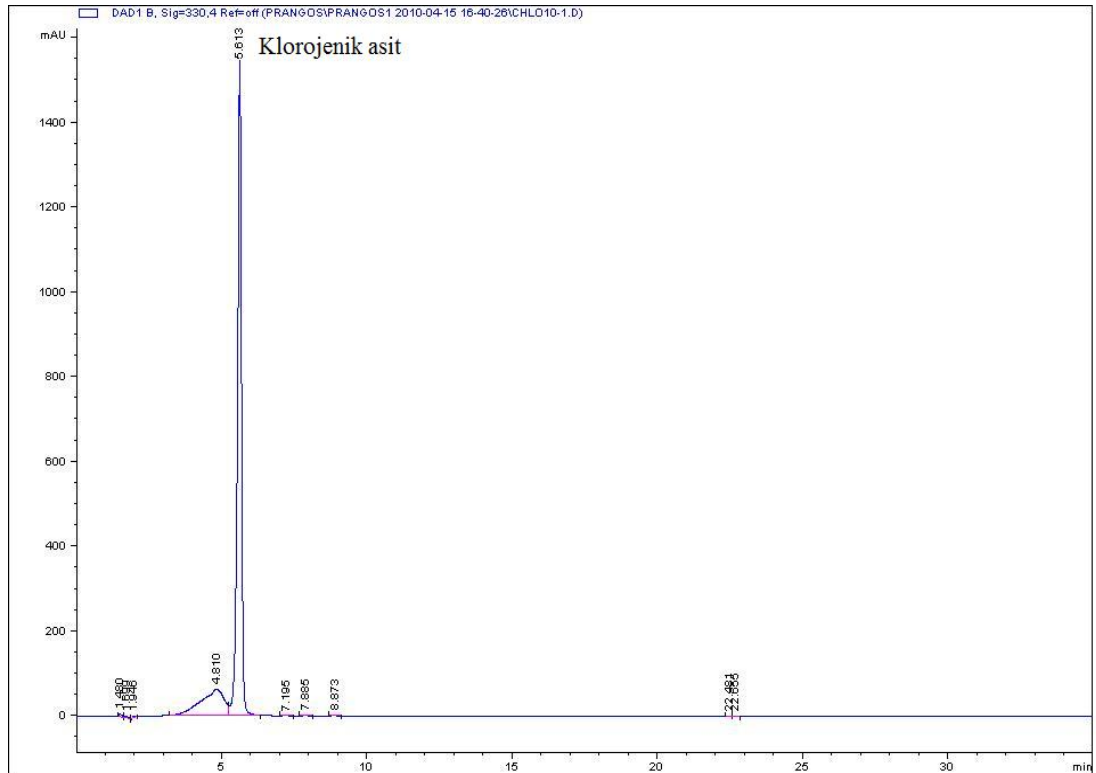
β -karotenin antioksidan özelliği konjuge alkil yapısında bulunan serbest organik peroksit radikallerinin stabilizasyonundan kaynaklanmaktadır. Endemik *Prangos* türlerinin meyve ekstraktlarının içerdiği antioksidan özellikteki β -karoten ve likopen bileşik miktarları Çizelge 4.13'te belirtilmiştir. β -karoten ve likopen bileşiklerinin miktarları meyvelerin su ekstraktlarında tespit edilememiştir. Aseton ekstraktları arasında; *P. denticulata* en yüksek β -karoten miktarını içerirken ($0,193 \pm 0,003$ $\mu\text{g}/\text{mg}$), metanol ekstraktları arasında; *P. ilanae* ($0,158 \pm 0,004$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) en yüksek miktarı içermiştir. Likopen miktarlarına bakıldığında ise en yüksek miktar *P. ilanae* metanol ekstraktında ($0,059 \pm 0,002$ $\mu\text{g}/\text{mg}$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. Meyve ekstraktlarının toplam β -karoten ve likopen miktarları ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

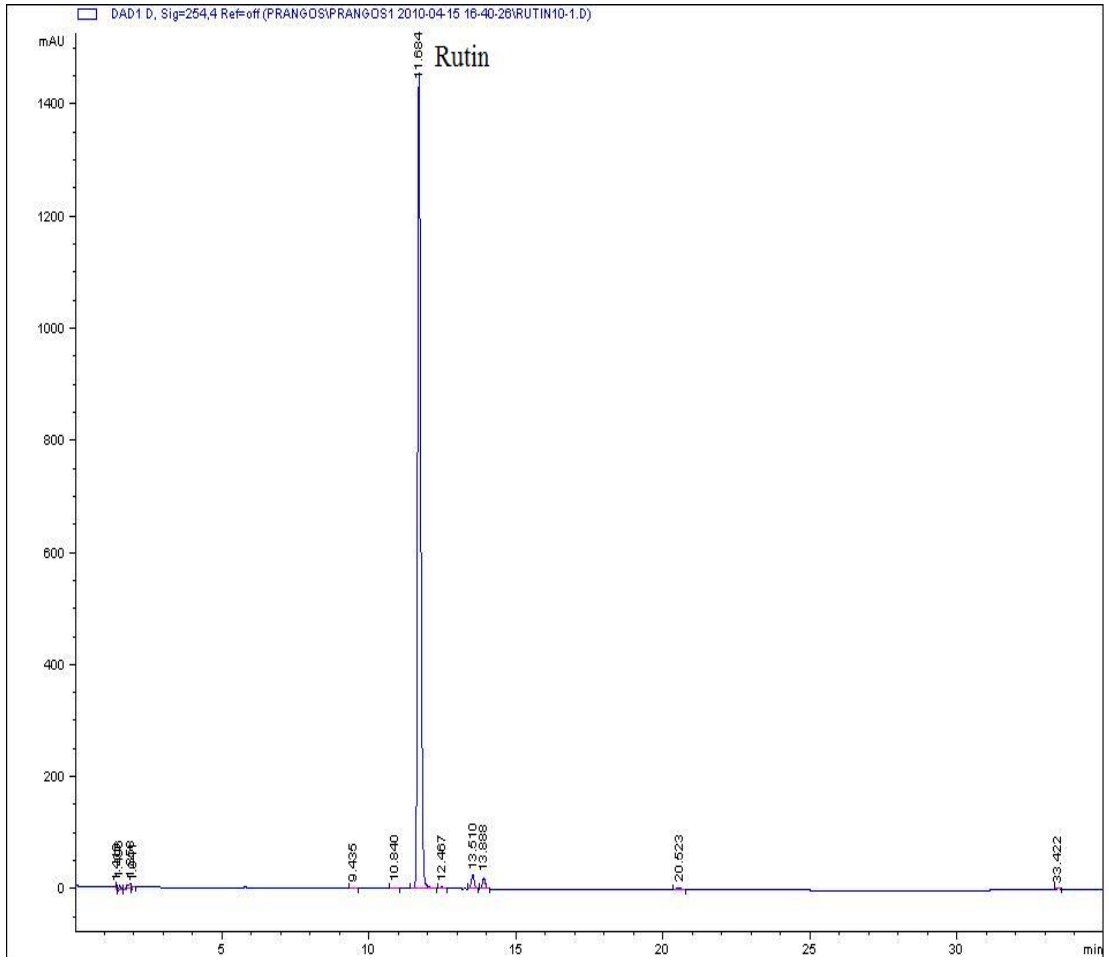
	β -karoten			Likopen		
	Su ekstraktı	Metanol ekstraktı	Aseton ekstraktı	Su ekstraktı	Metanol ekstraktı	Aseton ekstraktı
<i>P. ilanae</i>	-	$0,158 \pm 0,004$	$0,089 \pm 0,002$	-	$0,059 \pm 0,002$	$0,039 \pm 0,002$
<i>P. denticulata</i>	-	$0,139 \pm 0,001$	$0,193 \pm 0,003$	-	$0,032 \pm 0,001$	$0,041 \pm 0,002$
<i>P. platychoena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	-	$0,071 \pm 0,002$	$0,069 \pm 0,003$	-	$0,023 \pm 0,001$	$0,031 \pm 0,001$
<i>P. heyniae</i>	-	$0,098 \pm 0,003$	$0,166 \pm 0,005$	-	$0,025 \pm 0,001$	$0,037 \pm 0,001$

4.5. Endemik *Prangos* Türlerinin HPLC Analizi ile Elde Edilen Klorojenik asit ve Rutin Miktarları

Kalitatif ve kantitatif HPLC çalışması yapılmıştır. Kalitatif çalışmada öncelikle standartlar (klorojenik asit ve rutin) sisteme tek tek verilerek standartların UV spektrumları ve retansiyon (geliş) zamanları belirlenmiştir. Endemik *Prangos* türlerinin meyve ve yaprak ekstraktları da aynı şekilde sisteme verilmiş ve 35 dk. HPLC analizlerinden sonra major pikler tespit edilmiştir. Major pik gösteren maddelerin UV spektrumları ve retansiyon (geliş) zamanları, klorojenik asit ve rutin standartları ile karşılaştırılmış ve maddeler tespit edilmiştir. 254 nm tüm fenolik ve flavonoidler için ortak bir dalga boyudur. 330 nm ise klorojenik asit gibi kafeik asit türevleri için maksimum absorbans sağlamaktadır. Bu sebepten dolayı 254 nm dalga boyunda rutin ve 330 nm dalga boyunda ise klorojenik asit incelenmiştir. Standart maddelerin (klorojenik asit ve rutin) retansiyon zamanlarını gösteren kromatogramları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de verilmiştir.

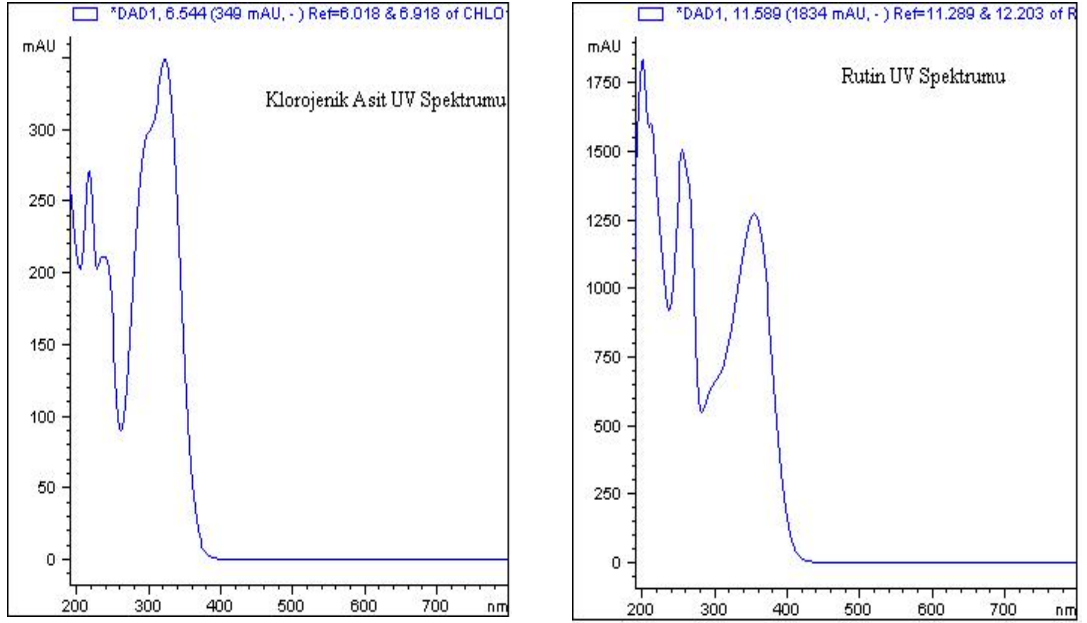


Şekil 4.14. Klorojenik asit maddesinin kromatogramı

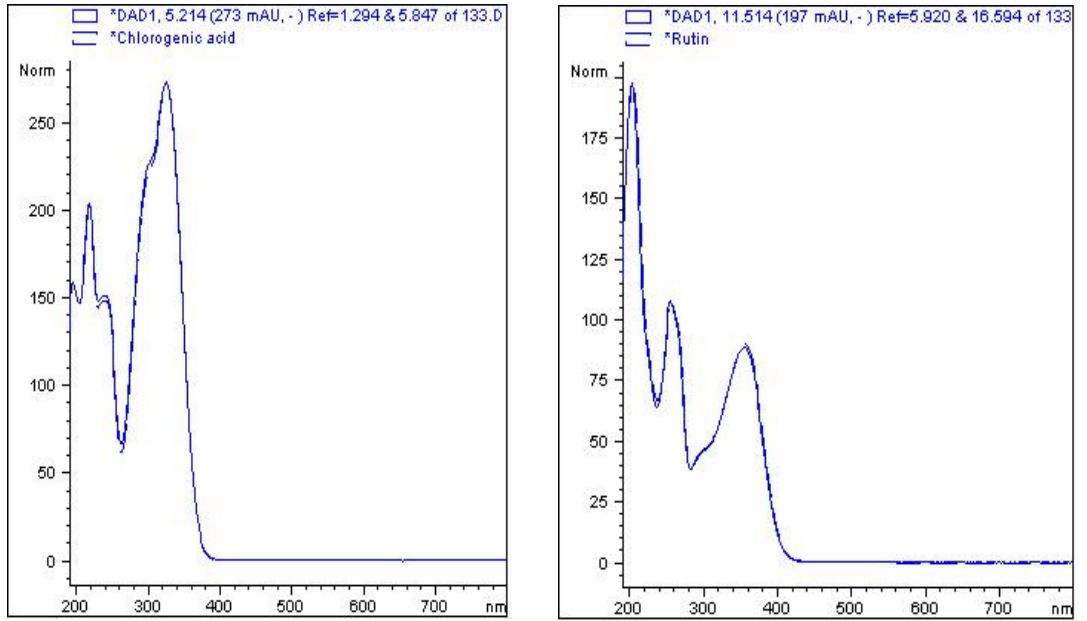


Şekil 4.15. Rutin maddesinin kromatogramı

Maddeleri belirlerken retansiyon zamanları dışında UV spektrumlarından da faydalanılmıştır (Şekil 4.16). Standart maddelerin UV spektrumlarının endemik *Prangos* türüne ait bir ekstraktın (*P.ilanae* yaprak metanol ekstraktı) UV spektrumu ile karşılaştırılmış hali ise Şekil 4.17’de verilmiştir.

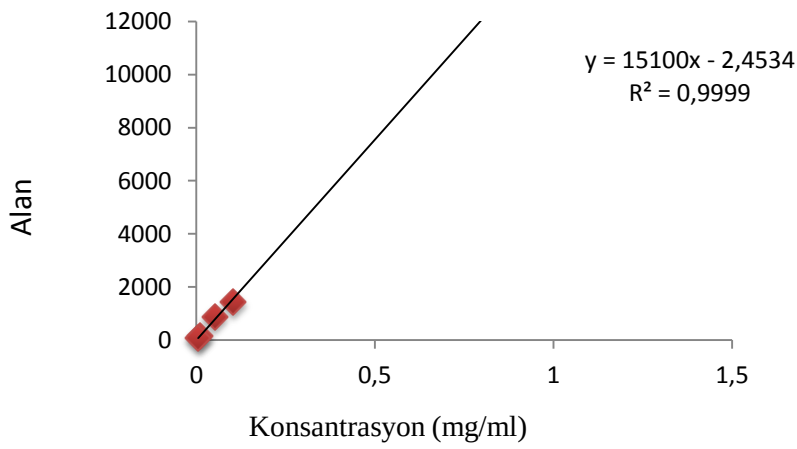


Şekil 4.16. Klorojenik asit ve Rutinin UV spektrumları

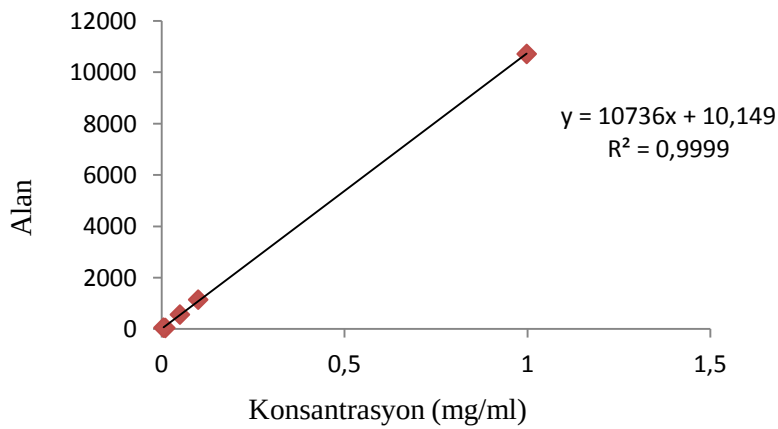


Şekil 4.17. Klorojenik asit ve Rutin UV spektrumlarının *P. ilanae* yaprak metanol ekstraktı UV spektrumu ile karşılaştırılmış hali

Kantitatif çalışmada; eksternal standart metoduna göre klorojenik asit ve rutin miktar tayini yapılmıştır. Hazırlanan standart konsantrasyonları ile kalibrasyon tabloları hazırlanarak eğrileri çizilmiştir (Şekil 4.18-Şekil 4.19). Daha sonra çalışılan türlerin ekstraktlarında bulunan klorojenik asit ve rutin miktarlarına karşı gelen pik alanları tespit edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklemi ile de ekstraktlarda bulunan klorojenik asit ve rutin miktar tayinleri yapılmıştır.



Şekil 4.18. Klorojenik asit kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.19. Rutin kalibrasyon eğrisi

HPLC çalışmaları ile yapılan klorojenik asit ve rutin miktar analizleri sonucu, en yüksek klorojenik asit miktarı *P. denticulata*'nın yaprak metanol ekstraktında bulunmuştur ($33,61 \pm 2,76$ mg/g). En yüksek rutin miktarı ise *P. platychloena* subsp. *engizekensis*'in yaprak metanol ekstraktında bulunmuştur ($25,97 \pm 0,31$ mg/g). Hem klorojenik asit hem de rutin için yaprak ekstraktları meyve ekstraktlarından, metanol ekstraktları da su ekstraktlarından daha yüksek miktarda tespit edilmiştir (Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14. Endemik *Prangos* türlerinin klorojenik asit miktarları (mg klorojenik asit/g ekstrakt)

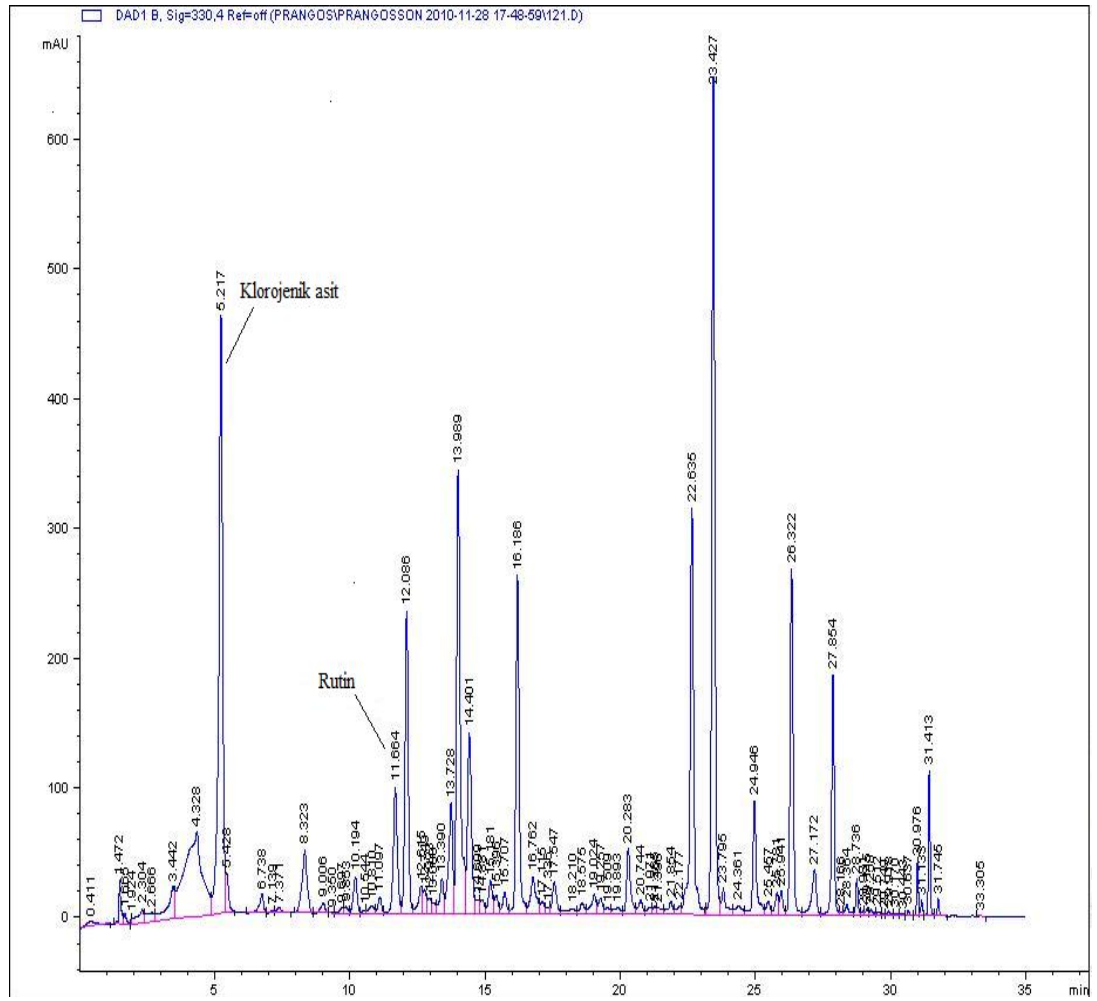
	Yaprak metanol	Yaprak su	Meyve metanol	Meyve su
<i>P. ilanae</i>	$25,45 \pm 0,43$	$11,06 \pm 0,02$	$1,08 \pm 0,01$	$0,71 \pm 0,04$
<i>P. denticulata</i>	$33,61 \pm 2,76$	$13,31 \pm 0,02$	$2,21 \pm 0,05$	$1,91 \pm 0,00$
<i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	$6,29 \pm 0,35$	$2,84 \pm 0,03$	$3,85 \pm 0,21$	$1,28 \pm 0,05$
<i>P. heyniae</i>	$20,50 \pm 0,07$	$15,09 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,01$	$1,27 \pm 0,09$

Çizelge 4.15. Endemik *Prangos* türlerinin rutin miktarları (mg rutin/g ekstrakt)

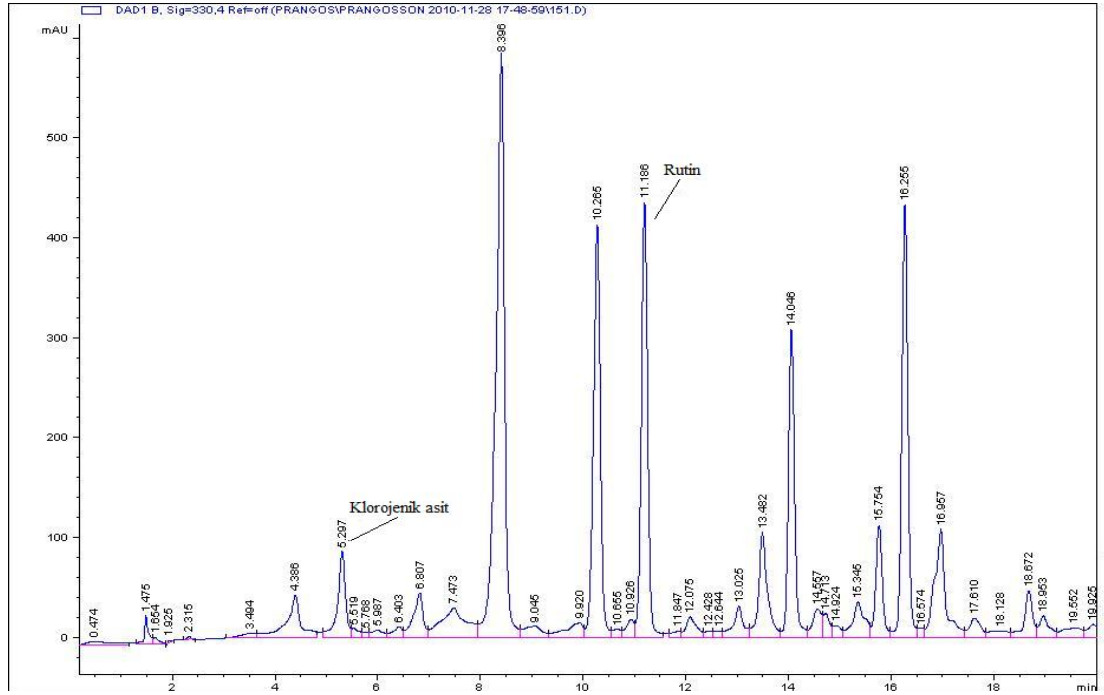
	Yaprak metanol	Yaprak su	Meyve metanol	Meyve su
<i>P. ilanae</i>	$8,86 \pm 0,09$	$0,43 \pm 0,01$	TE ¹	TE ¹
<i>P. denticulata</i>	$15,62 \pm 0,28$	$7,46 \pm 0,01$	TE ¹	TE ¹
<i>P. platychloena</i> subsp. <i>engizekensis</i>	$25,97 \pm 0,31$	TE ¹	$12,97 \pm 0,11$	TE ¹
<i>P. heyniae</i>	$24,81 \pm 0,17$	$6,73 \pm 0,02$	$6,60 \pm 0,07$	$2,47 \pm 0,07$

¹ Tespit edilemedi.

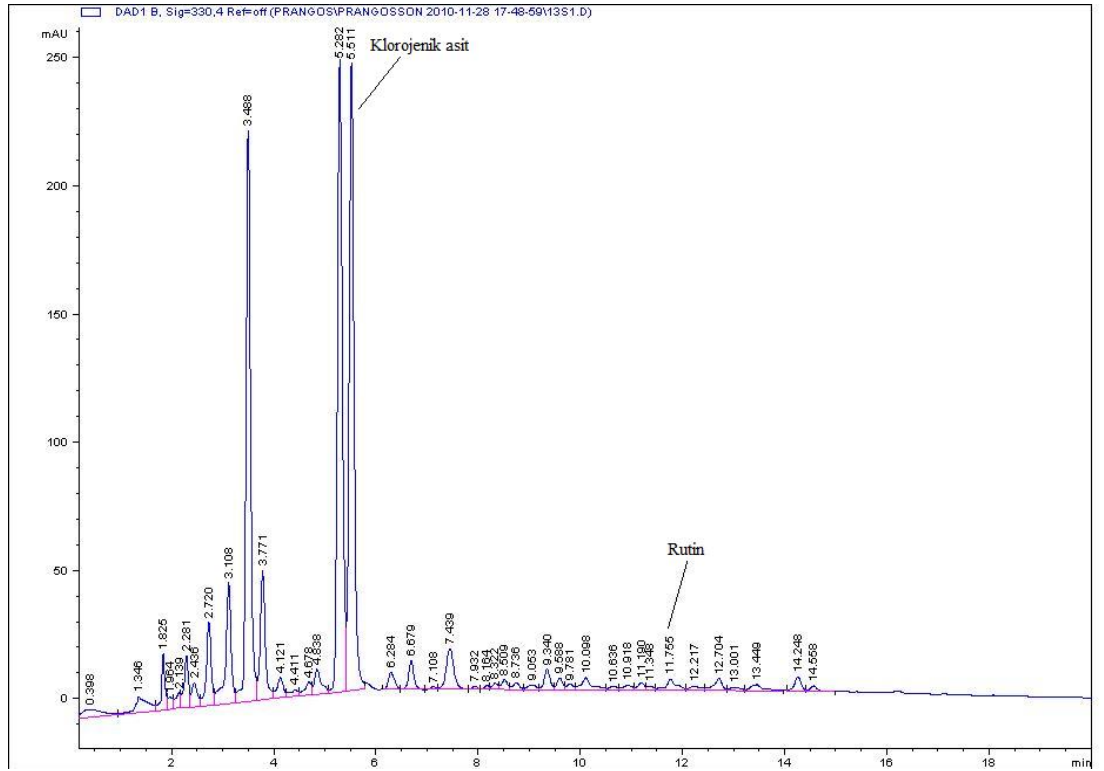
En yüksek klorojenik asit miktarı içeren *P. denticulata* yaprak metanol ekstraktına (Şekil 4.20) ve en yüksek rutin miktarı içeren *P. platychoena* subsp. *engizekensis* yaprak metanol ekstraktına (Şekil 4.21) ait kromatogramlar aşağıda verilmiştir. Bunun dışında, antioksidan aktivitede önemli bir etki gösteren *P. ilanae* yaprak su ekstraktının kromatogramı da Şekil 4.22’de belirtilmiştir. Diğer türlere ait bütün kromatogramlar ise EK-4’de verilmiştir.



Şekil 4.20. *P. denticulata* yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı



Şekil 4.21. *P. platychnoena* subsp. *engizekensis* yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı



Şekil 4.22. *P. ilanae* yaprak su ekstraktının HPLC kromatogramı

4.6. Endemik *Prangos* Türlerinin Genotoksisite ve Antigenotoksisite Sonuçları

Antioksidan aktivite çalışmaları sonucu ön plana çıkan *P. ilanae* türünün yaprak su ve metanol ekstraktlarının insan lenfositlerindeki olası genotoksik ve antigenotoksik etkilerine Comet tekniği ile bakılmıştır. Bu çalışmalar sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.16. *P.ilanae* yaprak su ekstraktının insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı ve H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarına karşı koruyucu etkisi¹

Test maddesi	Konsantrasyonlar (mg/ml)	Kuyruk uzunluğu (μm)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk momenti (%)
PBS [(-)Kontrol]	-	26,8 ± 1,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
H₂O₂ (50μM) [(+)Kontrol]	-	123,0 ± 1,0 ^b	93,0 ± 2,0 ^b	58,3 ± 3,1 ^b
İYS²	0,025	26,5 ± 1,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,050	27,1 ± 1,5 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,100	27,5 ± 2,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,250	28,0 ± 2,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,500	28,8 ± 2,5 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
İYS²+H₂O₂	0,025	99,1 ± 1,2 ^c	77,9 ± 0,6 ^c	36,0 ± 0,4 ^c
	0,050	85,0 ± 2,0 ^d	40,1 ± 2,4 ^d	15,1 ± 0,9 ^d
	0,100	71,8 ± 1,2 ^e	25,6 ± 1,4 ^e	6,6 ± 0,8 ^e
	0,250	52,2 ± 0,7 ^f	9,9 ± 0,5 ^f	2,9 ± 0,1 ^f
	0,500	29,9 ± 1,6 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^a

¹Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p < 0,05$).

²İYS: *P. ilanae* yaprak su ekstraktı

Çizelge 4.17. *P.ilanae* yaprak metanol ekstraktının insan lenfositlerinde oluşturduğu DNA hasarı ve H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarına karşı koruyucu etkisi

Test maddesi	Konsantrasyonlar (mg/ml)	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk momenti (%)
%1 DMSO [(-)Kontrol]	-	27,1 ± 1,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
H ₂ O ₂ (50µM) [(+)Kontrol]	-	123,0 ± 1,0 ^b	93,0 ± 2,0 ^b	58,3 ± 3,1 ^b
İYM ²	0,025	27,7 ± 1,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,050	28,1 ± 2,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,100	29,7 ± 0,8 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,250	30,1 ± 1,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
	0,500	30,4 ± 1,5 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
İYM ² +H ₂ O ₂	0,025	101,3 ± 0,1 ^c	80,0 ± 1,2 ^c	39,0 ± 0,2 ^c
	0,050	95,4 ± 1,8 ^d	45,1 ± 2,5 ^d	18,1 ± 1,1 ^d
	0,100	77,2 ± 1,5 ^e	28,7 ± 1,3 ^e	7,2 ± 0,5 ^e
	0,250	57,4 ± 0,8 ^f	11,2 ± 0,4 ^f	3,3 ± 0,1 ^f
	0,500	31,0 ± 1,6 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^a

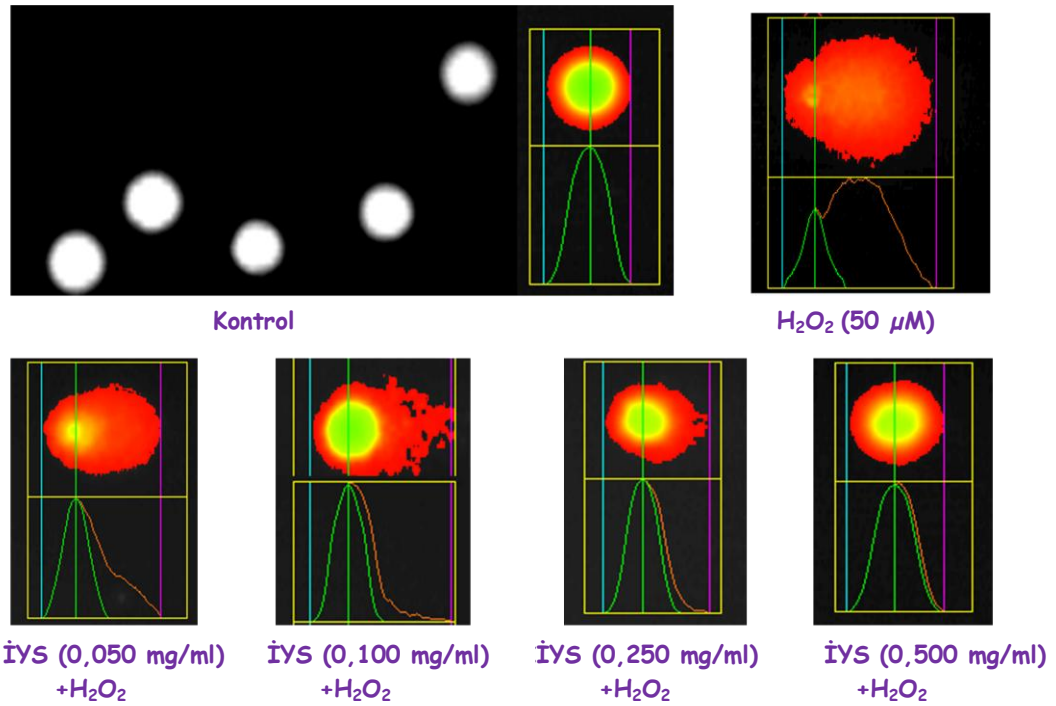
¹Aynı sütun içinde farklı küçük harfle gösterilmiş değerler istatistiksel olarak birbirinden farklı çıkmıştır ($p<0,05$).

²İYM: *P. ilanae* yaprak metanol ekstraktı

P. ilanae yaprak su ve metanol ekstraktlarının genotoksik etkisi incelendiğinde; bu ekstraktların (0,025-0,500 mg/ml) insan lenfosit hücrelerinde herhangi bir DNA hasarına neden olmadıkları belirlenmiştir. *P. ilanae* su ve metanol ekstraktlarının antigenotoksik etkisine incelendiğinde ise; bu ekstraktların (0,025-0,500 mg/ml), H₂O₂ (50 µM) tarafından indüklenmiş DNA hasarını önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti

değerlerine bakıldığında, *P. ilanae* su ve metanol ekstraktlarının birbirine çok yakın bir antigenotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir. H_2O_2 tarafından indüklenmiş kuyruk uzunluğu ($123,0 \pm 1,0 \mu m$), özellikle 0,500 mg/ml konsantrasyondaki *P. ilanae* ekstraktlarının muamelesi ile oldukça etkili bir şekilde azaltılmıştır (İYS; $29,9 \pm 1,6 \mu m$, İYM; $31,0 \pm 1,6 \mu m$).

P.ilanae yaprak su ekstraktının insan lenfosit hücrelerine karşı gösterdiği antigenotoksik etkinin comet görünümü Şekil 4.23’de verilmiştir. Kontrol grubunda hasarsız DNA’lar görünmekte iken, H_2O_2 uygulaması sonucu çok hasarlı DNA’ların olduğu ve bu hasarın *P.ilanae* muamelesi ile azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.23. *P.ilanae* yaprak su ekstraktının insan lenfosit hücrelerinde oluşturulmuş DNA hasarına karşı gösterdiği antigenotoksik etkinin comet görünümü

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de endemik olarak bulunan *Prangos* taksonlarının ilk kez ITS ve *trn* bölgeleri analiz edilmiş ve bu dizilere dayalı akrabalık dereceleri belirlenmiştir. Bu konuda yapılan literatür araştırmasında, *Prangos* cinsinin kloroplast genomunun kodlanmayan *trn* bölgelerinin analizi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen verilere göre ise; Türkiye’de yayılış gösteren endemik *Prangos* türlerinin kloroplast DNA’sının kodlanmayan üç *trn* bölgesinin uzunluğu yaklaşık 1436 baz çifti (bp) (*P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides*’in 1451 bp) olarak bulunmuştur. *Prangos* türlerinin bu aralığı oluşturan *trnV* intron bölgesi 567 bp uzunluğunda tespit edilmiştir. Umbelliferae familyasından diğer cinslere ait türlerinin *trnV* geni ile ilgili yapılan dizi analizi çalışmalarına bakıldığında ise bu türlerin *trnV* intron bölgesinin; *Mackinlaya macrosciadia*’da 577 bp, *Platysace lanceolata*’da 575 bp, *Arctopus dregei*’de 572 bp, *Azorella caespitosa*’da 569 bp, *Heteromorpha arborescens* var. *abyssinica*’da 564 bp, *Angelica sylvestris*’de 563 bp, *Coriandrum sativum*’da 562 bp [Tank ve Donoghue, 2010], *Apium graveolens*’de 559 bp [Bremer ve ark., 2002] uzunluğunda olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında; *trn c* ve *d* primerleri tarafından çoğaltılan bölgenin uzunluğu 540 bp olarak belirlenmiştir. Bu bölge *trnL* intronunun tamamını ve *trnL* ekzonunun çok az bir kısmını içermektedir. Aynı primerler kullanılarak çoğaltılan *trnL* genine ait intron ve ekzonları içeren bu bölgenin uzunluğu *Conioselinum tataricum* ve *Angelica archangelica*’da 536 bp [Soininen ve ark., 2009], *Heracleum sibiricum*’da 536 bp [Hiiesalu ve ark., 2012] olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, sadece *trnL* intron bölgesinin uzunluğu ise 506 bp olarak tespit edilmiştir. Kuzey Batı Amerika’da yayılış gösteren, Apiaceae familyasına ait 27 endemik tür ile yapılan bir çalışmada *trnL* intron bölgesinin uzunluğunun 456-508 bp arasında olduğu belirlenmiştir [Downie ve ark., 2002].

Çalışmamızda, *Trn e* ve *f* primerleri tarafından çoğaltılan bölgenin uzunluğu 405 bp olarak bulunmuş, ancak bu bölgedeki *trnL-F* intergenik bölgesinin uzunluğu 363 bp

olarak tespit edilmiştir. Umbelliferae familyasından diğer cinslere ait türlerle yapılan çalışmalara bakıldığında ise *trnL-F* intergenik bölgesinin uzunluğu; *Aletes anisatus* ve *Musineon tenuifolium*'da 362 bp, *Pteryxia hendersonii* ve *Lomatium californicum*'da 363 bp, *Zizia aurea*, *Thaspium trifoliatum* ve *Zizia aptera*'da 364 bp, *Cymopterus nivalis*'de 358 bp [Downie ve ark., 2002], *Trachydium variabile*'de 355 bp, *Trachydium roylei*'de 343 ve *Sinodielsia thibetica*'da 349 bp [Valiejo-Roman ve ark., 2012] olarak tespit edilmiştir.

ITS bölgesi analizi ile elde edilen sonuçlara bakıldığında ise, endemik *Prangos* türlerinin ITS bölgesinin uzunluğu 602 bp olarak belirlenmiştir. Bu bölgenin ITS-1 bölgesi 216 bp, 5.8S rRNA bölgesi 162 bp, ITS-2 bölgesi ise 224 bp olarak tespit edilmiştir. ITS bölgesinin toplam uzunluğu Angiospermelerde yaklaşık olarak 500-700 bp arasında değişmektedir [Calonje ve ark., 2009]. Ajani ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, *Prangos uloptera*, *Prangos goniocarpa* ve *P. ferulacea* türlerinin ITS bölgesinin (ITS-1+5.8S rRNA+ITS2) uzunluğunu, bu tez çalışmasında olduğu gibi 602 bp olarak elde etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, yine bu çalışmada olduğu gibi, türlerin ITS-1 bölgesi uzunluğunu 216 bp, 5.8S rRNA bölgesi uzunluğunu 162 bp, ITS-2 bölgesi uzunluğunu ise 224 bp olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise, *P. pabularia*'nın ITS-1 bölgesinin uzunluğu 217 bp ve ITS-2 bölgesinin uzunluğu 223 bp olarak belirlenmiştir [Downie ve ark., 1998]. Yapılan başka bir çalışmada ise, *Prangos* cinsine ait *Prangos uloptera*'nın (ITS-1: 217 bp; ITS-2: 222 bp); *Prangos acaulis*'in (ITS-1: 219 bp ; ITS-2: 222 bp) ve *Prangos haussknechtii*'nin (ITS-1: 216 bp; ITS-2:221 bp) nükleer DNA'sının ITS-1 ve ITS-2 bölgelerinin genetik yapısı DNA dizi analizleri çalışmaları sonucunda belirlenmiştir [Valiejo-Roman ve ark., 2006]. Umbelliferae familyasından diğer cinslere ait türlerle yapılan çalışmalara bakıldığında ise, bu bölgenin uzunluğu; *Azilia eryngioides*'de 602 bp (ITS-1: 217 bp; 5.8S rRNA: 162 bp, ITS-2: 223 bp), *Diplotaenia cachrydifolia*'da 603 bp (ITS-1: 217 bp; 5.8S rRNA: 162 bp, ITS-2: 224 bp), *Diplotaenia damavandica*'da 603 bp (ITS-1: 217 bp; 5.8S rRNA: 162 bp, ITS-2: 224 bp) olarak belirlenmiştir [Ajani ve ark., 2008].

Görüldüğü gibi, endemik *Prangos* türlerinin, bu tez çalışması sonucu elde edilen kodlanmayan *trn* bölgeleri ve ITS bölgesi uzunlukları ile ilgili veriler, önceki yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte, bu bölgelerin uzunluğu türler arasında biraz farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılık, bu bölgelerin yüksek mutasyon göstermelerinden (indel (insersiyon–delesyon) gibi) kaynaklanmış olabilir.

Trn bölgesine göre belirlenen gruplar arası genetik uzaklıklar sonucunda; grupların birbirine çok fazla fark göstermediği görülmüştür. Buna rağmen, *trn* analizi sonucu genetik uzaklık bakımından diğerlerine en uzak grubun *P. uechtrizii* olduğu söylenebilir.

ITS bölgesine göre belirlenen gruplar arası genetik uzaklıklar sonucunda ise; grupların birbirine *trn* bölgesindeki göre daha fazla fark gösterdiği belirlenmiştir. ITS analizine göre; birbirine en uzak iki grubun *P. sp. nova* ile *P. turcica* olduğu (0,036); ikinci olarak en uzak iki grubun *P. turcica* ile *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* (0,032) olduğu görülmektedir. *P. turcica*'nın bu iki grup dışındaki gruplara olan genetik uzaklığı, diğer grupların birbirine olan uzaklığına göre daha fazladır. Bu durumda, genetik olarak en farklı tür *P.turcica* olarak dikkati çekmektedir. İkinci olarak genetik uzaklık bakımından diğerlerinden en farklı grubun *P. sp. nova* olduğu söylenebilir. Diğer taraftan, *P. platychloena* subsp. *engizekensis* ve *P. uechtrizii* genetik uzaklık bakımından birbirine en yakın türler olarak belirlenmiştir (0,000). İkinci olarak genetik uzaklık bakımından birbirine yakın olan türler ise *P. heyniae* ile *P. denticulata* (0,002) olmuştur.

Filogenetik analiz, karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri seçilerek yapılmıştır. Maksimum parsimoni (farklılıkları en aza indirme) yöntemi en sık kullanılan filogenetik ağaç oluşturma metotlarından birisidir. Parsimonisi en yüksek olan ağaç, en tutumlu olan, genetik ilişkiyi en gerçekçi yansıtan ağaçtır [Freeman ve Herron, 1999]. Parsinomi kriteri kullanılarak oluşturulan ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir. Bu nedenle, yapılan maksimum parsimoni analizinde bootstrap testi uygulanmıştır. Bootstrap araştırması

(Seç-Bağla Testi) belli bir ağaç üzerindeki dallardan hangilerinin diğerlerine göre daha iyi desteklendiklerini değerlendiren bir tekniktir [Felsenstein, 1985]. Bootstrap değeri % 0 ile % 100 arasında değişir. Bootstrap destek değerleri $> \% 85$ çok güçlü, $\% 70-85$ arası güçlü, $\%50-70$ arası zayıf ve $< \% 50$ çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır [Kress ve ark., 2005]. Bootstrap desteğinin $\% 70$ ya da daha büyük oluşu genellikle doğru filogeninin tanımlanması ile ilişkilendirilir. Eğer, belli bir dal için bootstrap desteği $\% 50$ 'nin altında ise; araştırmacı aradaki ilişkinin tam netleştirilemediği ve dallanma modelini belirleyemediği sonucuna vararak ve bunun sonucunda yayınladığı ağaçta, bu dalı tek düğümden çok çatallı (politomi = belirsizlik noktası) olarak verecektir [Freeman ve Herron, 1999].

ITS ve *trn* bölgelerinin analizi sonucu oluşan dendrogramların her ikisinde de *P. uechtritzi* ve *P. platychloena* subsp. *engizekensis*'in birbirlerine diğer türlere göre çok daha yakın çıktığı görülmektedir. ITS bölgesinin analizi sonucu oluşan dendrogramda bu iki türün bulunduğu dal $\% 75$ desteklenmiştir. *Trn* bölgesinin analizi sonucu oluşan dendrogramda ise bu iki türün bulunduğu dal $\% 76$ desteklenmiştir. Bu bulgular morfoloji ile uyushmaktadır. Çünkü *P. uechtritzi* türünün normalde yakın türü *P. ferulacea*'dir. *P. ferulacea* endemik olmadığı için çalışmada yer almamıştır. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* de *P. ferulacea*'ye yakın olması nedeniyle çalışma sonucu bu iki türün benzer çıkması normaldir. Bu iki tür gerek meyve yapısı gerekse yaprak loblarının uzunluğu açısından benzerdir. Aynı şekilde, yine her iki dendrogramda *P. heyniae* ve *P. denticulata*'nın birbirlerine diğer türlere nazaran daha yakın çıktığı dikkati çekmektedir. ITS bölgesinin analizinde, *P. denticulata* ve *P. heyniae*'nin olduğu dal $\% 76$ desteklenmiştir.

ITS bölgesinde parsimonik bilgi içeren karakter sayısı 32 adettir. Bu, çalışılan bölgelerde mevcut populasyonlardaki polimorfizmin boyutlarını ortaya koyması yönünden önemlidir. Buna rağmen, *trn* bölgesinde bu sayı 5 adet olarak belirlenmiştir. *Trn* bölgesinde bilgi verici karakterlerin sayısının az olması nedeniyle çıkan dendrogramda; *P. heyniae*, *P. denticulata*, *P. ilanae* ve *P. sp nova* aynı grupta yer almış ve birbirlerinden farklılaşamamıştır. Bu taksonların bulunduğu dallarda güvenilirlik değeri $\% 50$ 'nin altında olduğundan çökme meydana gelmiş ve politomi

gözlenmiştir. Çöken dallarda dallanma modeli belirlenemediğinden taksonlar arası ilişki hakkında yorum yapılamamaktadır.

Bu tez kapsamında çalışılan konulardan biri ise endemik *Prangos* türlerinin tohum depo proteinlerinin SDS-PAGE analizleri olmuştur. Bu çalışma ile Türkiye’de doğal olarak yetişen endemik *Prangos* türlerinin genetik akrabalığı protein analizleri ile ilk kez araştırılmıştır. Literatür araştırmasında, bu konuda endemik *Prangos* türleri ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez kapsamında endemik *Prangos* türlerinin protein profilleri sonucu elde edilen dendrogramda, özellikle *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* taksonunun, diğer endemik türlere genetik olarak daha uzak olduğu dikkat çekmektedir (0,612). Bu sonuç normaldir çünkü morfolojik olarak da *P. meliocarpoides* türü Türkiye’de yayılış gösteren diğer *Prangos* türlerinden farklıdır. *P. meliocarpoides* türünün armutsu meyve tipi onu diğer türlerden ayırır. Dendrogramda, *P. uechtritzi* türünün de diğer türlerden ayrı bir grup oluşturduğu görülmektedir (0,458). Bununla birlikte, *P. denticulata* ile *P. heyniae* (0,333) ve *P. ilanae* ile *P. turcica* (0,400) türlerinin genetik uzaklık bakımından birbirlerine daha yakın olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular da morfolojik açıdan uyumludur. Özellikle, *P. turcica* ve *P. ilanae* türleri morfolojik açıdan *Prangos* türleri arasında birbirine en yakın iki türdür. Bu iki türün meyveleri diğer türlerden farklı olarak kanatsızdır. Tohum protein profilleri sonucu, yeni tür *P. sp. nova*’ya endemik *Prangos* türleri arasında genetik uzaklık bakımından en yakın tür *P. platychloena* subsp. *engizekensis* olmuştur (0,333).

Diğer taraftan, bu tez kapsamında, Türkiye’de endemik olarak bulunan *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) türlerinin çeşitli *in vitro* testler ile antioksidan aktiviteleri ve *Prangos* türlerinde doğal olarak bulunan; polifenol, β -karoten ve likopen bileşiklerinin toplam miktarları belirlenmiştir. HPLC analizi ile de ekstraktlardaki rutin ve klorojenik asit maddelerinin miktar tayinleri yapılmıştır. Antioksidan aktivite çalışmaları sonucu önemli antioksidan etki gösteren *P. ilanae* türünün ise genotoksik ve antigenotoksik etkisi araştırılmıştır.

Antioksidanlar eylem modlarındaki farklılıklar nedeniyle farklı değişik aşamalarda lipit oksidasyon işlemini etkilerler. Oksidasyon işleminin kendisinin başlı başına kompleks bir olay olması, substratların çeşitliliği ve içerisinde aktif türlerin bulunması antioksidanların değerlendirilmesi için farklı test metotlarının uygulanmasını gerektirmektedir [Koleva ve ark., 2003]. Bu nedenle, bu tez çalışmasında antioksidan aktivite DPPH radikali giderimi, plazma lipit peroksidasyon inhibisyonu ve metal iyonlarını şelatlama testleri gibi birbirini tamamlayan farklı *in vitro* testler ile değerlendirilmiştir.

Literatür araştırmasında, Türkiye’de yayılış gösteren endemik *Prangos* türlerinin antioksidan aktivitesi ile ilgili yapılmış sadece tek bir çalışmaya rastlanılmıştır. Konya çevresinden toplanan 3’ü endemik 4 *Prangos* türünün (*P. ferulacea*, *P. heyntiae*, *P. meliocarpoides* var. *meliocarpoides* ve *P. uechtritzi*) total fenolik madde miktarlarının ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırıldığı çalışmada, serbest radikal süpürücü aktivite kalitatif DPPH yöntemi ile, lipozom lipit peroksidasyonu ise tiyobarbitürik asit yöntemi ile çalışılmıştır. Araştırmacılar, DPPH testinde bütün ekstraktlarda zayıf bir antioksidan aktivite belirlemişlerdir [Ahmed ve ark., 2011]. Hâlbuki, bu tez çalışmasında endemik *Prangos* türleri DPPH testinde oldukça etkili çıkmıştır. *P. heyntiae* dışında çalışılan türlerin farklı olması sonuçların farklı çıkmasının en büyük etkeni olabilir. Bununla birlikte, Ahmed ve arkadaşlarının (2011) kullandıkları yöntem, bu tez çalışmasında yapılan kantitatif DPPH testinden farklı olarak İTK üzerinde yapılan kalitatif DPPH testidir. Kullanılan yöntemlerin farklılığının yanında örneklerin farklı lokalitelerden değişik zamanlarda toplanması, farklı bitki kısımlarının ve ekstraktlarının çalışılmış olması gibi nedenler de farklı antioksidan etki gösterilmesinde etkili olabilir.

Endemik olmayan türlerle yapılan çalışmalara bakıldığında ise *Prangos* türleri yapılan testlerde oldukça etkili bulunmuştur. Endemik olmayan *P. ferulacea* ile yapılan bir çalışmada, *P. ferulacea*’nin toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktının antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi, lipit peroksidasyon inhibisyonu ve glutatyon S transferaz üzerindeki etki yöntemleri ile incelenmiştir. Araştırmacılar, yapılan bütün yöntemlerde *P. ferulacea*’nin iyi bir antioksidan olduğunu belirtmişlerdir [Çoruh ve

ark., 2007]. *P. ferulacea* ile yapılan başka bir çalışmada ise yine bu türün antioksidan aktivite yönünden etkili bir bitki olduğu belirtilmiştir [Mavi ve ark., 2004].

Çoruh ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada, antioksidan aktivitesine göre elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, *P. ferulacea*'nin pozitif kontrol olarak kullanılan α -tokoferol'e göre aktif olduğu belirtilmiştir. Ahmed ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları çalışmada ise pozitif kontrol olarak kullanılan propil galata kıyasla *P. heyniae*, *P. ferulacea* ve *P. uechritzii* meyvelerinin metanol ekstraktlarının orta, diğer ekstraktlarının ise ya zayıf aktiviteye sahip olduğu ya da herhangi bir aktivitesinin olmadığı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise pozitif kontrol olarak DPPH aktivitesinde; BHA, BHT ve α -tokoferol, şelatlamada ise EDTA kullanılmıştır. Pozitif kontrollere göre değerlendirme yapıldığında, *P. ilanae* türünün önemli bir antioksidan etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Biyolojik olarak aktif bileşenler olan fenolik bileşikler, hidrojeni serbest radikallere verebilen temel ajanlardır ve bu şekilde başlangıç aşamasında lipid oksidasyonunun zincir reaksiyonunu kırarlar. Fenolik bileşiklerin radikalleri gidermedeki bu yüksek potansiyeli, onların fenolik hidroksil gruplarıyla açıklanabilir [Sawa ve ark., 1999]. Bu tez çalışmasında, endemik *Prangos* türlerinin antioksidan aktivitesi ile toplam fenol miktarları arasında önemli oranda korelasyon bulunmuştur ($p<0,05$). Bu durum gösterilen antioksidan aktivitede fenolik bileşik içeriğinin önemli derecede etkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, Ahmed ve arkadaşları da (2011) yaptıkları çalışmada endemik *Prangos* türlerinin toplam fenol içeriği ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek oranda korelasyon bulmuşlardır.

Prangos türlerinin üzerinde yapılan kimyasal araştırmalar sonucunda kumarin, alkaloid, flavonoid ve terpen yapısında bileşikler izole edilmiştir [Sajjadi ve Mehregan, 2003]. Ancak, klorojenik asit ve rutin ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Klorojenik asit, kafeik asit ve quinic asit arasında şekillenen bir ester formu olup çok sayıda bitkide en doğal olarak bulunan fenolik bileşiklerden biridir. Klorojenik asit ve ilişkili bileşiklerin iyi bilinen antioksidanlar olduğu rapor edilmiştir [Kono ve ark., 1997; Ohnishi ve ark., 1994]. Bu nedenle, bu çalışmada

klorojenik asit içeriğinin antioksidan aktivitede önemli bir katkısının olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. HPLC çalışmaları sonucu elde edilen klorojenik asit miktarlarına bakıldığında, bu bileşiğin yaprak ekstraktlarında meyve ekstraktlarına oranla çok daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak, DPPH radikali giderim testi ve plazma lipid peroksidasyon testinde yaprak ekstraktların antioksidan aktivitesi, meyve ekstraktlarından daha yüksek olarak belirlenmiştir. *P. platychoena* subsp. *engizekensis* meyve metanol ekstraktında klorojenik asit miktarı diğer meyve ekstraktlarına göre oldukça yüksek bulunmuştur. DPPH radikali giderim aktivitesine bakıldığında ise meyve metanol ekstraktları arasında en yüksek etkiyi *P. platychoena* subsp. *engizekensis*'in gösterdiği dikkat çekmektedir. Yapılan bir çalışmada, klorojenik asit içeriğinin *Flos lonicerae* ekstraktlarının antioksidan aktivitesinde önemli oranda katkısının olduğu belirtilmiştir [Lan, 2007]. Bu tez çalışmasında belirlenen klorojenik asit miktarı genel olarak antioksidan aktiviteyle paralellik göstermesine rağmen, bazı örneklerde bu durum birebir örtüşmemiştir. Örneğin, en yüksek antioksidan etki *P. ilanae* türünde tespit edilmesine rağmen, klorojenik asit miktarı bu türde en yüksek çıkmamıştır. Bu çalışmada, türlerin ekstrakt bazında biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Ekstraktlar, klorojenik asit maddesinin dışında biyolojik aktiviteden sorumlu olan başka fenolik bileşikler de içermektedirler. Bu durumda, diğer maddeler yüksek etki gösteren türlerde daha yüksek oranda bulunuyor olabilir. Bu nedenle, doğru bilgiye ulaşabilmek için bu türlerin içerdikleri diğer fenolik bileşiklerin de miktar analizlerinin ve buna göre karşılaştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, ekstraktların içerdiği rutin içeriğinin, klorojenik asit maddesinin aksine, antioksidan aktivite ile çok ilişkili olmadığı söylenebilir. *P. platychoena* subsp. *engizekensis* ve *P. heyniae*'nın yaprak metanol ekstraktlarında rutin miktarları diğer iki türe göre oldukça yüksek bulunmuştur. Ancak, antioksidan aktiviteleri diğer iki türden daha zayıf tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Kanada'da yetişen buğday kültürlerinin gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin rutin içeriği ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir [Oomah ve Mazza, 1996]. Bununla birlikte, yapılan başka bir çalışmada ise bitki ekstraktının gösterdiği antioksidan aktivitenin saf rutin

gösterdiği antioksidan aktiviteden daha etkili olduğu belirtilmiştir [Hinneburg ve ark., 2006]. Bu durumda belki fenolik bileşiklerin tek tek değil de birlikte daha yüksek etki gösterdiği söylenebilir.

Bu tez kapsamında yapılan genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmaları sonucunda, *Prangos ilanae* türünün su ve metanol ekstraktlarının test edilen konsantrasyonlarda (0,025-0,500 mg/ml) insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etki göstermedikleri ve H₂O₂ (50 µM) ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarını ise önemli oranda azalttıkları görülmüştür ($p<0,05$). Literatür araştırmasında, bu konuda endemik *Prangos* türleri ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Başka türlerle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında ise; yapılan bir çalışmada, *Aegle marmelos* meyve metanol ekstraktının test edilen konsantrasyonlarda (5-100 µg/ml) tek başlarına insan lenfositlerinde herhangi bir genotoksik etki göstermediği, bununla birlikte hidrojen peroksit (9 µM) ile indüklenmiş kuyruk momentini önemli oranda azalttığı belirtilmiştir [Kaur ve ark., 2009]. Başka bir çalışmada ise, *Prunus persica*’nın çiçek etanol ekstraktının (50–200 µg/ml) deri fibroblast hücrelerindeki ultraviyole B ve C ile indüklenmiş DNA hasarını inhibe ettiği comet tekniği ile belirlenmiştir [Heo ve ark., 2001]. Çalışmalara bakıldığında, bu tez çalışmasında olduğu gibi, bazı bitki ekstraktlarının çeşitli ajanlarla indüklenmiş DNA hasarını önemli oranda azalttıkları görülmektedir. Bitki ekstraktlarının bu etkisi (oksidatif DNA hasarını inhibe eden muhtemel mekanizması) içerdikleri fenolik bileşiklerinin kimyasal yapısından kaynaklanmış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında yapılan endemik *Prangos* türlerinin moleküler sistematik çalışmaları sonucunda;

- ✓ Kodlanmayan *trn* bölgelerinin ve ITS bölgesinin uzunlukları önceki yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında oldukça anlamlı çıkmıştır.
- ✓ ITS bölgesinin analizi ile belirlenen genetik uzaklıklara göre; *P. turcica* ve *P. sp. nova* endemik *Prangos* türleri arasında diğer türlere en uzak iki tür olarak belirlenmiştir.
- ✓ *Trn* bölgesinin analizi ile oluşturulan dendrogramda türler arası çok fazla farklılaşma görülmemiştir. Buna karşılık az da olsa çıkan farklılaşma, ITS bölgesinin analizi ile oluşturulan dendrogramla uyum göstermiştir.
- ✓ *P. platychloena* subsp. *engizekensis* ve *P. uechtritzi* yapılan iki analizde (ITS ve *trn*) birbirine oldukça yakın türler olarak belirlenmiştir.
- ✓ *P. heyntiae* ve *P. denticulata* yapılan üç analizde (ITS, *trn* ve protein) birbirine yakın türler olarak belirlenmiştir.
- ✓ Tohum protein profilleri sonucu elde edilen dendrogramda; *P. ilanae* ve *P. turcica* birbirine çok yakın türler, *P. meliocarpoides* ise diğer türlere en uzak tür olarak belirlenmiştir.
- ✓ Tohum protein profilleri ile elde edilen dendrogram morfolojik açıdan en uyumlu sonucu vermiştir.

Bu tez kapsamında yapılan endemik *Prangos* türlerinin biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda;

- ✓ Yaprak ekstraktları meyve ekstraktlarına göre daha yüksek antioksidan etki göstermiştir.
- ✓ Tüm testlerde aseton ekstraktları, su ve metanol ekstraktlarından çok daha zayıf bir etki göstermiştir.
- ✓ Yaprak ekstraktlarında *P. ilanae* tüm testlerde ön plana çıkarken, meyve ekstraktlarında çalışılan testlerde farklı türler ön plana çıkmıştır.
- ✓ Total fenol içeriği ile antioksidan aktivite arasında önemli oranda korelasyon bulunmuştur ($p<0,05$).

- ✓ Çalışılan tüm türler için toplam fenol bileşik miktarları, toplam β -karoten ve likopen miktarlarından daha yüksek oranda tespit edilmiştir.
- ✓ HPLC çalışmaları sonucu elde edilen klorojenik asit ve rutin miktarlarına bakıldığında; bu iki bileşiğin yaprak ekstraktlarında meyve ekstraktlarına oranla çok daha yüksek miktarda olduğu dikkati çekmektedir.
- ✓ Türlerin içerdiği klorojenik asit miktarı ile antioksidan aktiviteleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğu, buna rağmen türlerin içerdikleri rutin miktarı ile antioksidan aktivite arasında ilişki olmadığı görülmüştür.
- ✓ *P. ilanae* türü test edilen konsantrasyonlarda (0,025-500 mg/ml) herhangi bir DNA hasarı göstermemiştir. Aksine, H_2O_2 (50 μ M) ile indüklenmiş DNA hasarını önemli oranda azaltmıştır ($p<0,05$).

Sonuç olarak; bu tez kapsamında ilk kez endemik *Prangos* türleri moleküler açıdan çok yönlü bir şekilde incelenmiş ve literatürde olan bu eksiklik giderilmeye çalışılmıştır. *Prangos* türlerinin kloroplast genomunun kodlanmayan *trn* bölgeleri ilk kez bu tez kapsamında analiz edilmiştir. Çalışmalar sonucunda; moleküler analizler ve protein profilleri elde edilen genetik akrabalık morfolojik özelliklere göre yapılan sistematik ilişki ile benzerlik göstermiş ve *Prangos* Lindl. cinsinin taksonomik problemlerin çözümünde kullanılabilecek sonuçlar vermiştir. Bununla birlikte, Türkiye'deki *Prangos* türlerinin filogenetik ilişkisini tam anlamıyla ortaya koyabilmek için endemik olmayan türlerin de moleküler çalışmalarının yapılmasına ve tüm türlerin birlikte değerlendirilmesine gerek vardır. Yine bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar, Türkiye'de endemik olarak bulunan *Prangos* türlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi açısından da önemli olmuştur. Bu çalışmaların sonucunda, kanserojenik ve toksik olduğu belirtilen sentetik antioksidanların yerine, gıda endüstrisinde kullanılabilecek özellikle *Prangos ilanae* gibi doğal ve güvenilir yeni ürünlerin ortaya çıkarılması ve yine bu türlerin oksidan hasar ile ilişkili hastalıklarda önleyici ve tedavi edici amaçla kullanılması önerilmektedir. Ancak, bu tez kapsamında *in vitro* şartlarda yapılan test sistemlerinde etkili görülen türlerin, daha sonraki araştırmalarda *in vivo* yapılan testlerle de değerlendirilmesine ve ayrıca, bu aktivitelerden sorumlu diğer bileşenlerin de ortaya çıkarılarak tüm bu bileşiklerin insan sağlığına olası yan etkilerinin aydınlatılmasına gerek vardır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, J., Güvenç, A., Küçükboyacı, N., Baldemir, A., Coşkun, M., “Total phenolic contents and antioxidant activities of *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) species growing in Konya province (Turkey)”, ***Turkish Journal of Biology***, 35: 353-360 (2011).
- Ajani, Y., Ajani, A., Cordes, J.M., Watson, M.F., Downie, S.R., “Phylogenetic analysis of nrDNA ITS sequences reveals relationships within five groups of Iranian Apiaceae subfamily Apioideae”, ***Taxon***, 57(2): 383-401 (2008).
- Akpoyraz, M., Durak, İ., “Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri”, ***Ankara Tıp Mecmuası (The Journal of the Faculty of Medicine)***, 48: 253-262 (1995).
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., “Molecular biology of the cell 3rd ed.”, ***Garland Publishing Inc.***, New York, 1294 (1994).
- Allan, G.J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E.A., “Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae)”, ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 32: 123-138 (2004).
- Aruoma, I. O., “Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease”, ***Journal of the American Oil Chemists Society***, 75: 199-212 (1998).
- Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V., “Genetik toksisite testleri”, ***Tübbav Bilim Dergisi***, 4(3): 221-229 (2011).
- Azqueta, A., Shaposhnikov, S., Collins, A.R., “DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay”, ***Mutation Research***, 674(1-2): 101-108 (2009).
- Badr, A., “Electrophoretic studies of seed proteins in relation to chromosomal criteria and the relationships evolution of some taxa of *Trifolium*”, ***Taxon***, 44: 183-191 (1995).
- Baldwin, B.G., “Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae”, ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 1: 3-16 (1992).
- Barros, L., Ferreira, M., Queirós, B., Ferreira, G.C.F.R., Baptista, P., “Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities”, ***Food Chemistry***, 103: 413-419 (2007).
- Baser, K.H.C., Ozek, T., Demirci, B., Duman, H., “Composition of the essential oil of *Prangos heyndiae* H. Duman et M. F. Watson, a new endemic from Turkey”, ***Flavour and Fragrance Journal***, 15: 47-49 (2000).

Baytop, T., “Türkiye’de tıbbi bitkiler ile tedavi”, 2.baskı, **İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları**, İstanbul, 146-350 (1999).

Beier, B.A., Nylander, J.A.A., Chase, M.W., Thulin, M., “Phylogenetic relationships and biogeography of the desert plant genus *Fagonia* (Zygophyllaceae), inferred by parsimony and bayesian model averaging”, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33: 91-108 (2004).

Bellarosa, R., Simeone, M.C., Papini, A., Schirone, B., “Utility of Its sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp.”, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 34: 355-370 (2005).

Bianchi-Hall, C.M., Keys, R.D., Stalker, H.T., Murphy, J.P., “Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (*Arachis*, *Fabaceae*) species”, **Plant Systematics and Evolution**, 186: 1-15 (1993).

Bohle, U.R., Hilger, H. Cerff, R., Martin, W. F., “Noncoding chloroplast DNA for plant molecular systematics at the infrageneric level”, *Molecular ecology and evolution: approaches and applications*, Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and DeSalle, R. [eds.], **Birkhauser Verlag**, Basel, 391-403 (1994).

Bradford, M.M., “A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, **Analytical Biochemistry**, 72: 248-254 (1976).

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologies**, 28: 25-30 (1995).

Bremer, B., Bremer, K., Heidari, N., Erixon, P., Olmstead, R.G., Anderberg, A.A., Kallersjo, M., Barkhordarian, E., “Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels”, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 24 (2): 274-301 (2002).

Brinegar, C., “Assessing evolution and biodiversity in plants at the molecular level”, **Kathmandu University Journal of Science, Engineering And Technology**, 5(2): 149-159 (2009).

Burçak, G., Andican, G. “Oxidative DNA damage and aging”, **Cerrahpaşa Journal of Medicine**, 35: 159-169 (2004).

Bushuk, W., Hay, R.L., Larsen, N.G., Simmons, L.D., Sutton, K.H., “Effect of mechanical dough development on the extractability of wheat storage proteins from bread dough”, **Cereal Chemistry**, 74: 389-395 (1997).

Calonje, M., Martin-Bravo, S., Dobes, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R., Koch, M.A., “Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction”, *Plant Systematics and Evolution*, 282: 257-280 (2009).

Carpenter, K.L., Veen, C., Hird, R., Dennis, I. F., Ding, T., Mitchinson, M.J., “The carotenoids beta-carotene, canthaxanthin and zeaxanthin inhibit macrophage-mediated LDL oxidation”, *FEBS Letter*, 401: 262-266 (1997).

Cemeli, E., Baumgartner, A., Anderson, D., “Antioxidants and the comet assay”, *Mutation Research*, 681: 51-67 (2009).

Cerbah, M., Souza-Chies, T., Jubier, M.F., Lejeune, B., Siljak-Yakovlev, S., “Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: Inference for chromosomal evolution”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15: 345-354 (1998).

Chen, S.Y., Xia, T., Wang, Y.J., Liu, J.Q., Chen, S.L., “Molecular systematics and biogeography of *Crawfordia*, *Metagentiana* and *Tripterispermum* (Gentianaceae) based on nuclear ribosomal and plastid DNA sequences”, *Annals of Botany*, 96: 413-424 (2005).

Cho, Y.G., Blair, M.W., Panaud, O., McCouch, S.R., “Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels”, *Genome*, 39: 373-378 (1996).

Clegg, M.T., “Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 363-367 (1993).

Cohen, B.L., Weydmann, A., “Molecular evidence that Phoronids are a subtaxon of Brachiopods (Brachiopoda: Phoronata) and that genetic divergence of metazoan phyla began long before the early cambrian”, *Organisms Diversity & Evolution*, 5: 253-273 (2005).

Collins, A.R. “The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations”, *Molecular Biotechnology*, 26 (3): 249-261 (2004).

Collins, A.R., “The Comet Assay: Principles, applications, and limitations”, In *Situ Detection of DNA damage: Methods and Protocols* 1st ed, vol: 203, Vladimir V. Didenko (ed.), Methods in Molecular Biology Series, *Humana Press*, Totowa, New Jersey, 163-177 (2002).

Collins, A.R., Harrington, V., Drew, J., Melvin, R., “Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study”, *Carcinogenesis*, 24: 511-515 (2003).

Commoner, B., Townsend, J., Pake, G.E., “Free radicals in biological materials”, *Nature*, 174: 689-691 (1954).

Cook, P., Brazell, I., Jost, E., “Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA”, *Journal of Cell Science*, 22: 303-324 (1976).

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J., “Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease”, *FASEB Journal*, 17(10): 1195-214 (2003).

Coşkun, H., Tunçtürk, Y., “The effect of *Allium* sp. on the extension of lipolysis and proteolysis in Van Herby cheese during maturation”, *Nahrung*, 44: 52-55 (2000).

Coşkun, M., Gülşen, N., Umucalılar, H.D., “The nutritive value of *Prangos ferulacea*”, *Grass and Forage Science*, 59: 15-19 (2004).

Cotelle, S., Fèrard, J.F., “Comet assay in genetic ecotoxicology: A review”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255 (1999).

Cross, C.E., Halliwell, B., Borisch, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman, D., “Oxygen radicals and human disease”, *Annals of Internal Medicine*, 107(4): 526-545 (1987).

Çakatay, U., “Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi”, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37: 162-167 (2006).

Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T., “Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma”, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 3-4: 92-95 (1997).

Çoruh, N., Sağdıoğlu, A.G., Özgökçe, F., “Antioxidant properties of *Prangos ferulaceae* L., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. And *Heracleum persicum* Desf. from *Apiaceae* family used as food in eastern anatolia and their inhibitory effects on Glutathione-S-Transferase”, *Food Chemistry*, 100: 1237-1242 (2007).

Das, S., Rajagabol, J., Bhatia, S., “Assesment of genetic variation within *Brassica campestris* cultivars using fragment lenght polymorphism and random amplification of polymorphic DNA markers”, *Journal of Biosciences*, 24(4): 101-108 (1999).

Davies, M.J., “The Oxidative Enviroment and Protein Damage”, *Biochimica & Biophysica Acta*, 1703: 93-109 (2004).

Davies, R.W., Waring, R.B., Ray, J.A., Brown, T.A., Scazzocchio, C., “Making ends meet—a model for RNA splicing in fungal mitochondria”, *Nature*, 300: 719-724 (1982).

Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., “Flora of the Turkey and the East Aegean Islands”, Vol. 10: (Supplement 1), Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. (ed.), *Edinburg University Press*, Edinburg, 151 (1988).

Decker, E. A., Welch, B., “Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674-677 (1990).

Demiralp, H., Çelik, S., Köksel, H., “Effects of oxidizing agents and defatting on the electrophoretic patterns of flour proteins during dough mixing”, *European Food Research and Technology*, 211: 322-325 (2000).

Dhar, M.K., Friebe B., Kaul S., Gill B., “Characterization and physical mapping of ribosomal RNA gene families in *Plantago*”, *Annals of Botany*, 97: 541-548 (2006).

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., “Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): Comet analiz yöntemi”, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2): 77- 89 (2010).

Dinelli, G., Lucchese, C., “Comparison between capillary and polyacrylamide gel electrophoresis for identification of *Lolium* species and cultivars”, *Electrophoresis*, 20: 2524-2532 (1999).

Diplock, A., “Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients”, *ILSI Europe Concise Monograph Series*, Belgium, 59 (1998).

Dowidar, A.E., Kamel, E.A., Ahamed, A.M., Loutfy, M.H.A., Hafez, H.H.L., “Studies on the *Rosaceae* II- SDS-PAGE seed protein electrophoresis and its significance in the taxonomy of the family”, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6 (21): 1820-1829 (2003).

Downie, S.R. Ramanath, S., Katzdownie, D.S., Llanas, E., “Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoC1* intron sequences” *American Journal of Botany*, 85(4): 563-591 (1998).

Downie, S.R., Hartman, R.L., Sun, F.-J., Katz-Downie, D.S., “Polyphyly of the spring-parsleys (*Cymopterus*): molecular and morphological evidence suggests complex relationships among the perennial endemic genera of western North American Apiaceae”, *Can. J. Bot.*, 80: 1295-1324 (2002).

Doyle, J.J., Doyle. J.L. “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue”, *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15 (1987).

Duman, H., “Flora of the Turkey and the East Aegean Islands”, Vol 11: (Supplement 2), Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., Başer, K.H.C. (ed.), *Edinburg University Press*, Edinburg, 141- 143 (2000).

Duman, H., Watson, M.F. “*Ekimia*, a new genus of Umbelliferae, and two new taxa of *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) from Southern Turkey”, *Edinburg Journal of Botany*, 56: 199-209 (1999).

Duran, A., Sağıroğlu, M., Duman, H., “*Prangos turcica* (Apiaceae): a new species from South Anatolia, Turkey”, ***Annales Botanici Fennici***, 42: 67-72 (2005).

Durmaz, H., Sagun, E., Tarakci, Z., Ozgokce F., “Antibacterial activities of *Allium vineale*, *Chaerophyllum macropodium* and *Prangos ferulacea*”, ***African Journal of Biotechnology***, 5: 1795-1798 (2006).

Duthie, G.G., Wahle, K.W., James, W.P.T., “Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease”, ***Nutrition Research Reviews***, 2(1): 51-62 (1989).

Duthie, S.J., Dobson, V.L., “Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro”, ***European Journal of Nutrition***, 38(1): 28-34 (1999).

Evans, M.D., Cooke, M.S., “Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids”, ***BioEssays***, 26(5): 533-542 (2004).

Fairbain, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., “The comet Assay: a comprehensive review”, ***Mutation Research***, 339: 37-59 (1995).

Faivre-Rampant, P., Jeandroz, S., Lefevre, F.D., Lmoine, M., “Ribosomal DNA studies in poplars”, ***Genome***, 35: 733-740 (1992).

Felsenstein, J., "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap", ***Evolution***, 39: 783-791 (1985).

Fenton, H.J.H. “On a new reaction of tartaric acid”, ***Chemistry News***, 33: 190 (1876).

Fischer, H., Jensen, U., “Utilization of proteins to estimate relationships in plants: Serology a discussion based on the *Asteraceae-Cichorioideae*”, ***Belgian Journal of Botany***, 125(2): 243-255 (1992).

Freeman, B.A., Crapo, J.D., “Biology of disease: Free radicals and tissue injury”, ***Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology***, 47: 412-426 (1982).

Freeman, S., Herron, J.C., “Evrimsel Analiz”, Çıplak, B., Başbüyük, H.H., Karaytuğ, S. ve Gündüz, İ. (ed.), ***Palme Yayıncılık***, 28-29, 438-449 (1999).

Frei, B. “Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action”, ***The American Journal of Medicine***, 97(Suppl 3A): 5-13 (1994).

Gao, X., Zhu, Y.P., Wu, B.C., Zhao, Y.M., Chen, J.Q., et al., “Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast *matK*, *rbcL* and *trnL-F* sequences”, ***Journal of Systematics and Evolution***, 46: 315–321 (2008).

Gedik, C.M., Ewen, S.W., Collins, A.R., “Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells”, ***International Journal of Radiation Biology***, 62 (3): 313-320 (1992).

Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H., “Food and cancer: State of the art about the protective effect of fruits and vegetables”, ***Bulletin Du Cancer***, 89(3): 293-312 (2002).

Gielly, L., Taberlet, P., “A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences”, ***Botanical Journal of the Linnean Society***, 120: 57-75 (1996).

Gielly, L., Taberlet, P., “The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences”, ***Molecular Biology and Evolution***, 11: 769-777 (1994).

Gomberg, M., “An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl”, ***Journal of the American Chemical Society***, 22(11): 757-771 (1900).

Graham, S.W., Olmstead, R.G., “Systematics - utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the basal Angiosperms”, ***American Journal of Botany***, 87: 1712-1730 (2000).

Gulpinar, A.R., Orhan, I.E , Kan, A., Senol, F.S. Celik, S.A., Kartal, M., “Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey”, ***Food Research International***, 46: 536-543 (2012).

Guzman, B., Vargas, P., “Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *TrnL-TrnF*, and *MatK* sequences”, ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 37: 644-660 (2005).

Halliwell, B. “Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?”, ***Drugs***, 42 (4): 569-605 (1991).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. “Free radicals in biology and medicine, 4th ed.”, ***Oxford: Clarendon Press***, New York, 79-81 (2006).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., “Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview”, ***Methods in Enzymology***, 186: 1-85 (1990).

Halliwell, B., Clement M.V., Long, L.H., “Hydrogen peroxida in the human body”, ***FEBS Letter***, 486: 10-13 (2000).

Hames, B.D., Rickwood, D., “Gel electrophoresis of proteins: A pratical approach 2nd ed.”, ***Oxford University Press***, Oxford, 1-149 (1990).

Harborne, J.B., Williams, C.A. "Flavonoid patterns in the fruits of the Umbelliferae", ***Phytochemistry***, 11: 1741-1750 (1972).

Harman, D., "Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry", ***Journal of Gerontology***, 2: 298-300 (1957).

Havey, M. J., "Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of chloroplast genome", ***Theoretical and Applied Genetics***, 81: 752-757 (1991).

Heo, M.Y., Kim, S.H., Yang, H.E., Lee, S.H., Jo, B.K., Kim, H.P., "Protection against ultraviolet B- and C-induced DNA damage and skin carcinogenesis by the flowers of *Prunus persica* extract. ***Mutation Research***, 496:47–59 (2001).

Herrnstadt, I., Heyn, C.C., "Amonographic study of the genus *Prangos*", Vol. 26, ***Boissiera***, Geneve, 11 (1977).

Herrnstadt, I., Heyn, C.C., "Flora of the Turkey and the East Aegean Islands", Vol. 4, Davis, P.H. (ed.), ***Edinburg University Press***, Edinburg, 382-388 (1972).

Heywood, V.H., "Flowering Plants of the World", ***Oxford University Press***, Oxford, UK, 219-221(1979).

Hiiesalu, I., Opik, M., Metsis, M., Lilje, L., Davison, J., Vasar, M., Moora, M., Zobel, M., Wilson, S.D., Partel, M., "Plant species richness belowground: higher richness and new patterns revealed by next-generation sequencing", ***Molecular Ecology***, 21 (8): 2004-2016 (2012).

Hinneburg, I., Kempe, S., Rüttinger, H.H., Neubert, R.H., "Antioxidant and photoprotective properties of an extract from buckwheat herb (*Fagopyrum esculentum* MOENCH)", ***Pharmazie***, 61 (3): 237-240 (2006).

Hwang, U.W., Kim, W., "General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics", ***The Korean Journal of Parasitology***, 37: 215-228 (1999).

Ito, Y., Suzuki, K., Ishii, J., Hishida, H., Tamakoshi, A., Hamajima, N., and Aoki, K., "A population-based follow-up study on mortality from cancer or cardiovascular disease and serum carotenoids, retinol and tocopherols in Japanese inhabitants", ***Asian Pacific Journal of Cancer Prevention***, 7(4): 533-546 (2006).

İnternet: Tübives, <http://turkherb.ibu.edu.tr> (2012).

Jialal, I., Fuller, C.J. "Effect of Vitamin E, Vitamin C and Beta-carotene on LDL Oxidation and Atherosclerosis", ***Canadian Journal of Cardiology***, 11: 97-103 (1995).

Johnson, L.A., Soltis, D.E., “*matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae sensu stricto”, **Systematic Botany**, 19: 143-156 (1994).

Johnson, M.K., Loo, G., “Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA”, **Mutation Research**, 459: 211-218 (2000).

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A. “The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols”, **Lipids**, 31(7): 671-701 (1996).

Kamel, E.A., Loutfy, M.H.A., “The significance of cuticular features, petiole anatomy and SDS-PAGE in the taxonomy of the *Lauraceae*”, **Pakistan Journal of Biology Sciences**, 4(9): 1094-1100 (2001).

Kandaswami, C., Middleton, E. Jr., “Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids”, **Advances In Experimental Medicine and Biology**, 366: 351-376 (1994).

Kargın, F., Fidancı, U.R., “Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif hasar”, **Türk Veteriner Hekimliği Dergisi**, 9 (2): 26-28 (1997).

Kaur, P., Walia, A., Kumar, S., Kaur, S., “Antigenotoxic activity of polyphenolic rich extracts from *Aegle marmelos* (L.) Correa in human blood lymphocytes and E.coli PQ 37”, **Records of Natural Products**, 3(1): 68-75 (2009).

Kazeroni, T., Mousavizadeh., K., Abdollahee, A., Sarkarian, M. and Satar, A. “Abortifacient effect of *Prangos ferulacae* on pregnant rats”, **Contraception**, 37: 554-556 (2006).

Kelchner, S.A., “The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics”, **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 87: 482-498 (2000).

Kelly, F.J., “Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects”, **Occupational Environmental Medicine**, 60: 612-616 (2003).

Khalifa, S.F., Badr, A., Aboel-Atta, A.I., Abou-El-Enain, M.M., “Electrophoretic studies of seed proteins and their impact on the taxonomic relationships in the *Solanaceae*”, **Journal of Union of Arab Biol.**, 5: 171-180 (1998).

Kimura, M., “A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences”, **Journal of Molecular Evolution**, 16: 111-120 (1980).

Kizilian, N., Wilkins, R.C, Reinhardt, P., Ferrarotto, C., McLean, J.R.N., McNamee, J.P., “Silver-stained comet assay for detection of apoptosis”, **Biotechniques**, 27: 926-930 (1999).

Koleva, I.I., Linssen, J.P.H., van Beek, T.A., Evstatieva, L.N., Kortenska, V., Handjieva, N., "Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (Labiatae) grown in Bulgaria", ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 83: 809-819 (2003).

Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H., "Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen", ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects***, 1335 (3): 335-342 (1997).

Kress, W.J., Liu, A.-Z., Newman, M., Li, Q.-J., "The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers", ***American Journal of Botany***, 92(1): 167-178 (2005).

Krinsky, N.I., Johnson, E. J., "Carotenoid actions and their relation to health and disease", ***Molecular Aspects of Medicine***, 26(6): 459-516 (2005).

Laemmli, U.K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4", ***Nature***, 227: 680-684 (1970).

Lan, W., "Effect of chlorogenic acid on antioxidant activity of *Flos lonicerae* extracts" ***Journal of Zhejiang University Science B***, 8(9): 673-679 (2007).

Lavelli, V., Peri, C., Rizzola, A., "Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 48(5): 1442-1448 (2000).

Lebailly, P., Devaux, A., Pottier, D., De Meo, M., Andre, V., Baldi, I., Severin, F., Bernaud, J., Durand, B., Henry-Amar, M., Gauduchon, P., "Urine mutagenicity and lymphocyte DNA damage in fruit growers occupationally exposed to the fungicide captan" ***Occupational Environmental Medicine***, 60: 910-917 (2003).

Lee, C., Wen J., "Phylogeny of *Panax* using chloroplast *Trnc-Trnd* intergenic region and the Utility of *Trnc-Trnd* in interspecific studies of plants", ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 31: 894-903 (2004).

Levin, R.A., "Phylogenetic relationships within Nyctaginaceae Tribe Nyctagineae: evidence from nuclear and chloroplast genomes", ***Systematic Botany***, 25(4): 738-750 (2000).

Li, J.H., "Phylogeny of *Catalpa* (Bignoniaceae) inferred from sequences of chloroplast *ndhF* and nuclear ribosomal DNA", ***Journal of Systematics and Evolution***, 46: 341-348 (2008).

Lin, T., Lin, Y., Ishiki, K., "Genetic diversity of *Dimocarpus longan* in China revealed by AFLP markers and partial rbcL gene sequences", ***Scientia Horticulturae***, 103(4): 489-498 (2005).

Lu, Y., Takeshita, T., Morimoto, K., "Single-Cell Gel Electrophoresis (SCG)-A Review and Discussion", ***Environmental Health and Preventive Medicine***, 2: 53-58 (1997).

Maner, J.F., Natali, A., Ehrendorfer, F. "Phylogeny of Rubiaceae-Rubieae inferred from the sequence of a cpDNA intergene region", ***Plant Systematics and Evolution***, 190: 195-212 (1994).

Mavi, A., Terzi, Z., Özgen, U., Yıldırım, A. and Coşkun, M., "Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae)", ***Biological and Pharmaceutical Bulletin***, 27: 702-705 (2004).

McCord, J.M., Fridovich I., "The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase", ***Journal of Biological Chemistry***, 243: 5753-5760 (1968).

McDade, L.A., Daniel, T.F., Kiel, C.A., Vollesen, K., "Phylogenetic relationships among *Acantheae* (Acanthaceae): major lineages present contrasting patterns of molecular evolution and morphological differentiation", ***Systematic Botany***, 30: 834-862 (2005).

Mead, J.F., "Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins", *Free Radicals in Molecular Biology, Aging, and Disease*, Armstrong, D., Sohal, R.S., Cutler, R.G. and Slater, T.F. (eds.), ***Raven Press***, New York, 2253 (1984).

Meena, S., Sabir, A.W. Chaudhary, F.M., Bhatti, M.K., "Antimicrobial activity of essential oils of Umbelliferae family." Part VII. *Heracleum candicans*, *Prangos pabularia* and *Peucedanum ferulaefolium* fruit oil, ***Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research***, 31: 557-560 (1988).

Meerow, A.W., "Phylogeny of the American Amaryllidaceae", ***Systematic Botany***, 25: 708-726 (2000).

Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., Foyer, C.H., "Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases?", ***FEBS letters***, 378: 203-206 (1996).

Meydani, M., "Antioxidants and cognitive function", ***Nutrition Reviews***, 59(8): 75-82 (2001).

Milbury, P.E., Richer, A.C., "Understanding the antioxidant controversy: Scrutinizing the fountain of youth 1st ed", ***Praeger***, London, 32-77 (2008).

Miller, D.D., "Minerals", In: Food Chemistry 3rd edn, Fennema, O.R. (Ed), **Marcel Dekker**, New York, 617-649 (1996).

Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A., "Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls", **FEBS Letters**, 384: 240-242 (1996).

Moller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H., "The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA damaging agents and effects of confounding factors", **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 9 (10): 1005-1015 (2000).

Moller, P., Loft, S., Alfthan, G., Freese, R., "Oxidative DNA damage in circulating mononuclear blood cells after ingestion of blackcurrant juice or anthocyanin-rich drink", **Mutation Research**, 551: 119-126 (2004).

Nagata, M., Yamashita, I. "Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit", **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish**, 39: 925-928 (1992).

Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R., "Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis", **Phytochemistry**, 36 (3): 579-583 (1994).

Olive, P.L. "Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids", **Radiation Research**, 117: 79-92 (1989).

Olive, P.L., Banath, J.B. and Durand, R.E., "Heterogenicity in radiation induced DNA damage and repair and tumor and normal cells measured using the "Comet" Assay", **Radiation Research**, 122: 86-94 (1990).

Olmstead, R.G., Palmer, J.D., "Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis", **American Journal of Botany**, 81: 1205-1224 (1994).

Olmstead, R.G., Kim, K.-J., Jansen, R.K., Wagstaff, S.J., "The phylogeny of the Asteridae sensu lato based on chloroplast *ndhF* gene sequences", **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 16(1): 96-112 (2000).

Oomah, B.D., Mazza, G., "Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat", **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44: 1746-1750 (1996).

Ostling, O., Johanson, K.J. "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 123(1): 291-298 (1984).

Özcan, M., “Antifungal effects of *Micromeria myrtifolia* Boiss. & Hohen. in Boiss. and *Prangos uechtritzii* Boiss. Hawsskn decoctions”, ***Acta Alimentaria***, 28(4): 355-360 (1999).

Palmer, J., “Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae”, *Molecular Evolutionary Genetics*, **Plenum Press**, New York, 131-240, (1985).

Palmer, J.D. “Plastid chromosomes: structure and evolution”, *Cell Culture and Somatic Genetics of Plant*, Vol. 7A, *Molecular Biology of Plastids*, Bogorad, L. and Vasil, I.K. (ed.), **Academic Press**, San Diego, 5-53 (1991).

Park., E., Jeon, K., Byun, B., “Ethanol extract of *Inonotus obliquus* shows antigenotoxic effect on hydrogen peroxide induced DNA damage in human lymphocytes”, ***Cancer Prevention Research***, 10: 54-58 (2005).

Pillay, M., Mazzella, C., “Chloroplast genome differences between *Paspalum dilatatum* poir and the related species *P. notatum* flugge”, ***Theoretical and Applied Genetics***, 95: 696-701 (1997).

Pimenov, M.G., Akalin, E., Kuljuvkov, E., “*Prangos ilanae* (Umbelliferae) a new species from Western Turkey”, ***Candollea***, 60(2): 379-385 (2005).

Pimenov, M.G., Leonov, M.V., “The Genera of the Umbelliferae, Whitstable Litho, Whitstable, Kent-Great Britain, 1-3 (1993).

Piperakis, S.M., “Comet assay: A brief history”, ***Cell Biology and Toxicology***, 25(1): 1-3 (2009).

Pryor, W.A., “Organic Free Radicals”, ***Chemical Engineering News***, 24: 70-89 (1968).

Punchard, N.A., Kelly, F.G., “Free radicals: A Pratical Approach”, **Academic press**, London, 149-221 (1996).

Quandt, D., Stech, M., “Molecular evolution of the *trnL* (UAA) intron in bryophytes”, ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 36: 429-443 (2005).

Quandt, D., Müller, K., Stech, M., Frahm, J.P., Frey, W., Hilu, K.W. and Borsch, T., “Molecular evolution of the chloroplast *trnL*-F region in land plants”, ***Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden***, 98: 13-37 (2004).

Qui, Y.L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zanis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Savolainen, V., Chase, M.W., “The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes”, ***Nature***, 402(6760): 404-407 (1999).

Rodriguez-Martinez, M.A., Ruiz-Torres, A. "Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging", ***Mechanisms of Ageing and Development***, 66: 213-222 (1992).

Ronning, S.B., Rudi, K., Berdal, K.G., Holst-Jensen, A. "Differentiation of important and closely related cereal plant species (Poaceae) in food by hybridization to an oligonucleotide array", ***Journal of Agriculture and Food Chemistry***, 53: 8874-8880 (2005).

Rydberg, B. and Johanson, K.J., "Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells", DNA Repair mechanisms, Hanawalt, P.C., Friedberg, E.C., Fox, C.F. (ed.), ***Academic Press***, New York, 465-468 (1978).

Sagun, E., Durmaz, H., Tarakci, Z., Sagdic, O., "Antibacterial activities of the extracts of some herbs used in Turkish herby cheese against *Listeria monocytogenes* serovars", ***International Journal of Food Properties***, 9: 255-260 (2006).

Saitou, N., Imanishi, T. "Relative efficienciens of the Ficth-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution and Neighbour-Joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree", ***Molecular Biology and Evolution***, 6(5): 514-525 (1989).

Sajjadi, S.E., Mehregan, I., "Chemical composition of the essential oil of *Prangos asperula* Boiss. subsp. *haussknechtii* (Boiss.) Herrnst. et Heyn fruits", ***DARU Journal of Pharmaceutical Sciences***, 11(2): 79-81 (2003).

Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F., "Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae)", ***American Journal of Botany*** 84(9): 1120-1136 (1997).

Saraswati, R., Matoh, T., Sasai, T., Phupaibul, P., Lumpkin, T.A., Kobayashi, M., Sekiya, J., "Identification of *Sesbania* species from electrophoretic patterns of seed proteins", ***Tropical Agriculture***, 70 (3): 282-285 (1993).

Savolainen, V., Chase, M.W., Hoot, S.B., Morton, C.M., Soltis, D.E., Bayer, C., "Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid Atpb and Rbcl Gene Sequences", ***Systematic Biology***, 49: 306-362 (2000).

Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., Maeda, H., "Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables", ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 47: 397-402 (1999).

Scalbert, A., Williamson, G., "Dietary intake and bioavailability of polyphenols", ***Journal of Nutrition***, 130 (11): 2073-2085 (2000).

Scandalios, J. G., Guan, L., Polidoros, A. N. "Catalases in plants: Gene structure, properties, regulation and expression", *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Scandalios, J.G. (ed.), **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Plainview, NY, USA, 343-406 (1997).

Scharaschkin, T., Doyle, J.A., "Phylogeny and historical biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) using morphology and noncoding chloroplast sequence data", **Systematic Botany**, 30: 712-735 (2005).

Schmit, V., Debouck, S.G., Baudoin, J.P., "Biogeographical and molecular observations of *Phaseolus glabellus* (Fabaceae: Phaseolinae) and its taxonomic status", **Taxon**, 45: 493-501 (1996).

Schneider, C., "Review: Chemistry and biology of vitamin E", **Molecular Nutrition & Food Research**, 49(1): 7-30 (2005).

Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., Small, R.L., "The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis", **American Journal of Botany**, 92: 142-166 (2005).

Shen, J., Ding, X.Y., He, J., Chu, B.H., Liu, D.Y., Ding, G., "Studies on characteristics of rDNA ITS sequences and population authentication of *Alisma orientale*", **Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)**, 28(3): 86-88 (2005).

Sherwin, E.R., "Antioxidants", *Food Additives*, Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. (ed.), **Marcel Dekker**, New York, 139-193 (1990).

Shikishima, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K., Ashurmetov, O., Lee, K., "Chemical constituents of *Prangos tschimganica*; structure elucidation and absolute configuration of coumarin and furanocoumarin derivatives with anti-HIV activity", **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 49: 877-880 (2001).

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. et al., "The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression", **EMBO Journal**, 5(9): 2043-2049 (1986).

Singh, A.K., Mengesha, H.M., Ramaiah, C.D., "Phylogenetic relations in section *Arachis* based on seed protein profile", **Theoretical and Applied Genetics**, 82: 593-597 (1991).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", **Experimental Cell Research** 175(1): 184-191 (1988).

Singh, N.P., Stephens, R.E., Schneider, E.L., “Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage”, ***International Journal of Radiation Biology***, 66(1): 23-28 (1994).

Singleton, V.L., Rossi, J.A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents”, ***American Journal of Enology and Viticulture***, 16: 144-158 (1965).

Sneath, P.H.A., Sokal, R.R., “Numerical Taxonomy”, ***W.H. Freeman***, San Francisco, USA, 230-234 (1973).

Soininen, E. M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., Brysting, A.K., Sonstebo, J.H., Ims, R.A., Yoccoz, N.G. and Taberlet, P., “Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixture”, ***Frontiers in Zoology***, 6: 16 (2009).

Steele, K.P., Vilgalys, R., “Phylogenetic analyses of *Polemoniaceae* using nucleotide sequences of the plastid gene *matK*”, ***Systematic Botany***, 19: 126-142 (1994).

Sugiura, M., “The chloroplast genome”, ***Plant Molecular Biology***, 19: 149-168 (1992).

Şenol, S.G., Yıldırım, H., Seçmen, Ö., “*Prangos hulusii* sp. nov. (Apiaceae) from west Anatolia, Turkey”, ***Nordic Journal of Botany***, 29: 1-6 (2011).

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., Willerslev, E., “Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding”, ***Nucleic Acids Research***, 35(3): 1-8 (2007).

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., “Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA”, ***Plant Molecular Biology***, 17: 1105-1109 (1991).

Tada, Y., Shikishima, Y., Takaishi, Y., Shibata, H., Higuti, T., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K. Ashurmetov, O., Ohmoto, Y., “Coumarins and γ -pyrone derivatives from *Prangos pabularia*: antibacterial activity and inhibition of cytokine release”, ***Phytochemistry***, 59: 649-654 (2002).

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar S., “MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods”, ***Molecular Biology and Evolution***, 28: 2731-2739 (2011).

Tank, D.C., Donoghue, M.J., "Phylogeny and phylogenetic nomenclature of the Campanulidae based on an expanded sample of genes and taxa", ***Systematic Botany***, 35 (2): 425-441 (2010).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki Y. F., "Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing", ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, 35: 206-221 (2000).

Tice, R.R., Andrews, P.W., Hirai, O., Singh, N.P. "The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells", Biological reactive intermediates IV. Molecular and cellular effects and their impact on human health, Witmer, C.R., Snyder, R.R., Jollow, D.J., Kalf, G.F., Kocsis, J.J., Sipes, I.G. (ed.), ***Plenum Press***, New York, 157-164 (1991).

Tice, R.R., Furedi-Machacek, M., Satterfield, D., Udumudi, A., Vasquez, M., Dunnick, J.K. "Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the *p53* gene", ***Environmental and Molecular Mutagenesis***, 31(2):113-124 (1998).

Tsetlin, A.L., Vermel, E.M., Kuznetsova, G.A., Kuzmina, L.V., Shvarev, I.F., "Cytotoxic activity of phenolic and coumarin derivatives from plants of the genus *Prangos*", ***Trudy Botanicheskogo Akademiyi Nauk SSSR***, 16: 7-9 (1972).

Ulubelen, A., Topcu, G., Tan, N., Olcal, S., Johansson, C., Ucer, M., Birman, H., Tamer, S., "Biological activities of a Turkish medicinal plant, *Prangos platychlaena*", ***Journal of Ethnopharmacology***, 45: 193-197 (1995).

Urbatsch, E.L., B.G.B., Donoghue, M.J., "Phylogeny of the coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences and chloroplast DNA restriction site data", ***Systematic Botany***, 25: 539-565 (2000).

Uzel, A., Dirmenci, T., Celik, A., Arabaci, T., "Composition and antimicrobial activity of *Prangos platychlaena* and *P. uechtrizii*", ***Chemistry of Natural Compounds***, 42: 169-171 (2006).

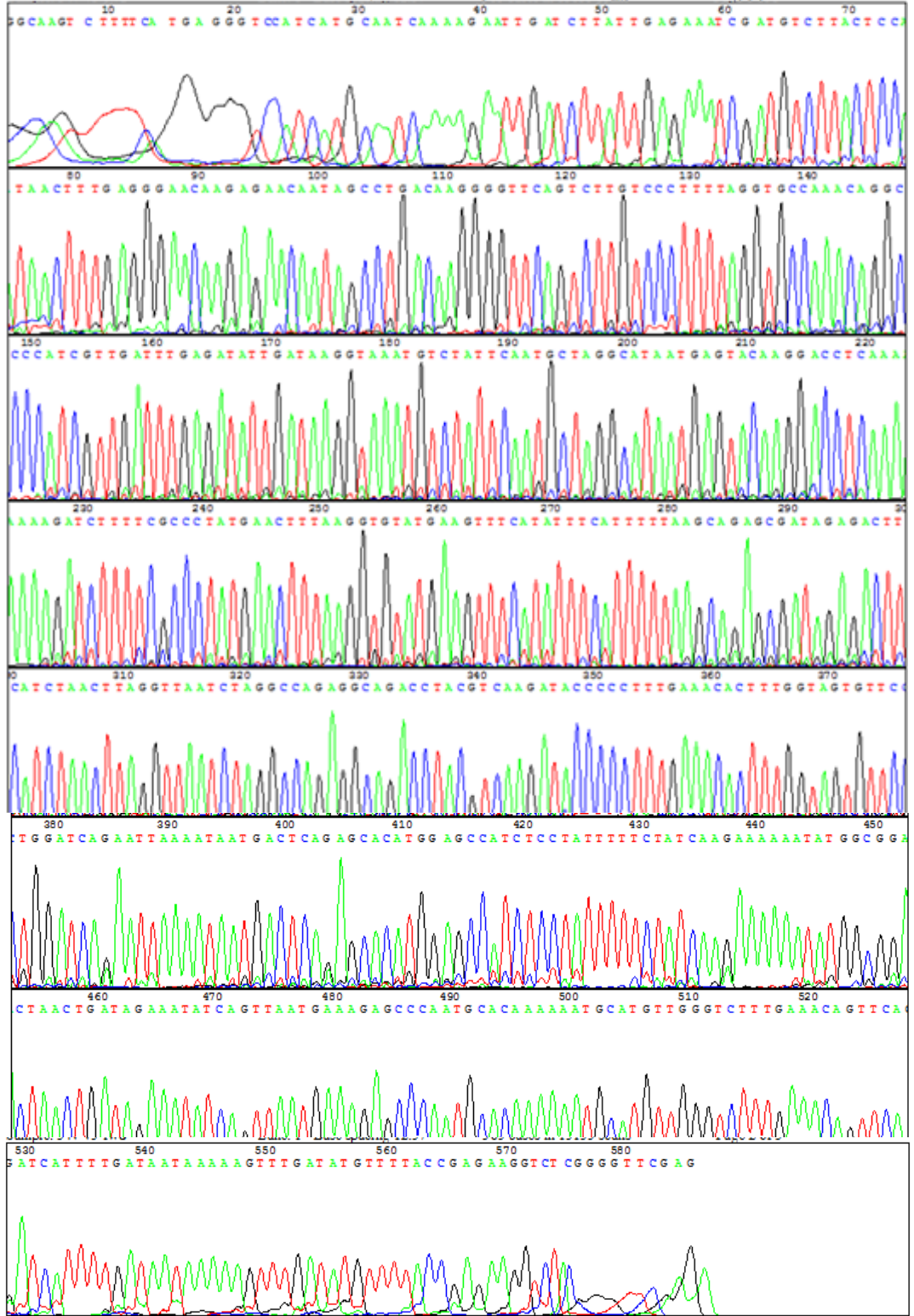
Valiejo-Roman, C.M., Terentieva, E.I., Pimenov, M.G., Kljuykov, E.V., Samigullin, T.H., Tilney, P.M., "Broad Polyphyly in *Pleurospermum* s. l. (Umbelliferae-Apioideae) as Inferred from nrDNA ITS and Chloroplast Sequences", ***Systematic Botany***, 37 (2): 573-581 (2012).

Valiejo-Roman, C.M., Terentieva, E.I., Samigullin, T.H., Pimenov, M.G., Ghahremani-Nejad, F., Mozaffarian, V., "Molecular data (nrITS-sequencing) reveal relationships among Iranian endemic taxa of the Umbelliferae", ***Feddes Repertorium***, 117: 367-388 (2006).

- Wang, X.R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., Szmidt A.E. "Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcL*, *MATK*, *RPL20-RPS18* spacer, and *TRNV* intron sequences", ***American Journal of Botany*** 86(12):1742-1753 (1999).
- Wanke, S., Jaramillo, M.A., Borsch, T., Samain, M.-S., Quandt, D., Neinhuis, C., "Evolution of Piperales-*mat K* gene and *trnK* intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast", ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 42: 477-497 (2007).
- Ward, J., Peakall, R., Gilmore, S.R., Robertson, J., "A molecular identification system for grasses: a novel technology for forensic botany", ***Forensic Science International***, 152(2-3): 121-131 (2005).
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (ed.), ***Academic Press***, San Diego, 315-322 (1990).
- Wilson, C.A., "Phylogenetic relationships among the recognized series in Iris Section Limniris", ***Systematic Botany***, 34: 277-284 (2009).
- Wojciechowski, M.F., Sanderson, M.J., Hu J.M., "Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA *trnL* intron data", ***Systematic Botany*** 24: 409-437 (1999).
- Xu, H., Wang, Z., Ding, X., Zhou, K., Xu, L., "Differentiation of *Dendrobium* species used as "Huangcao Shihu" by rDNA ITS sequence analysis", ***Planta Medica***, 72(1): 89-92 (2006).
- Yang, X., Quiros, C., "Identification and classification of celery cultivars with of RAPD markers, ***Theoretical and Applied Genetics***, 86: 205-212 (1993).
- Yokoyama, J., Suzuki, M., Iwatsuki K., Hasebe M., "Molecular Phylogeny of Coriaria with Special Emphasis on the Disjunct Distribution", ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 14: 11-19 (2000).
- Yokoyoma, M., "Oxidant Stress and Atherosclerosis", ***Current Opinion in Pharmacology***, 4: 110-115 (2004).
- Yu, Y.B., Qin, M.J., Liang, Z.T., Yu, G.D., Tan, N.H. "Ribosomal DNA ITS sequence comparisons of *Pseudostellaria heterophylla* from different geographical regions", ***Journal of Plant Resources and Environment***, 12(4): 1-5 (2003).
- Zijp, I.M. Korver, O., Tijburg, L.B.M., "Effect of Tea and other dietary factors on iron absorption", ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 40: 371-398 (2000).

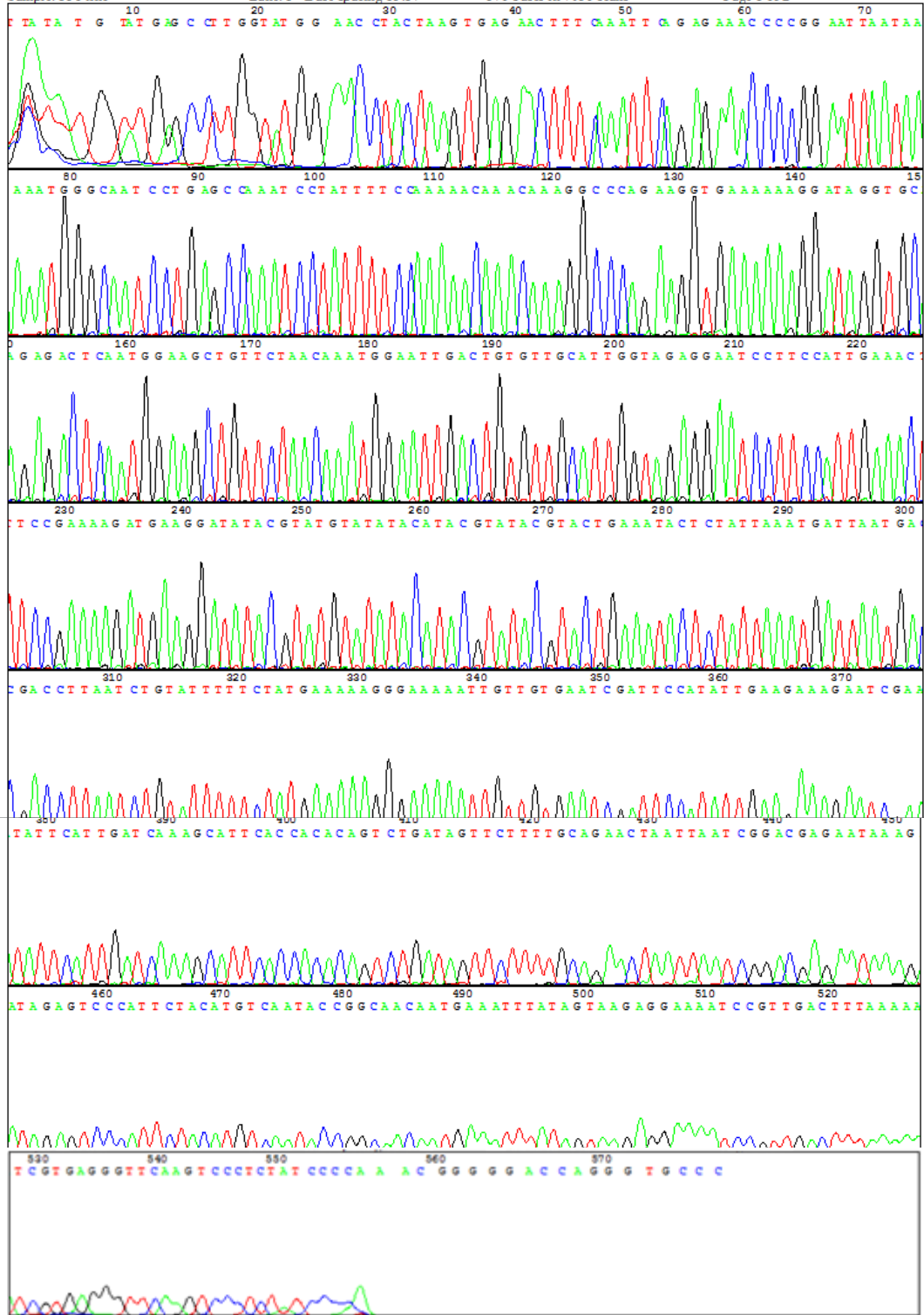
EKLER

EK-1. DNA dizi analizi kromatogramları



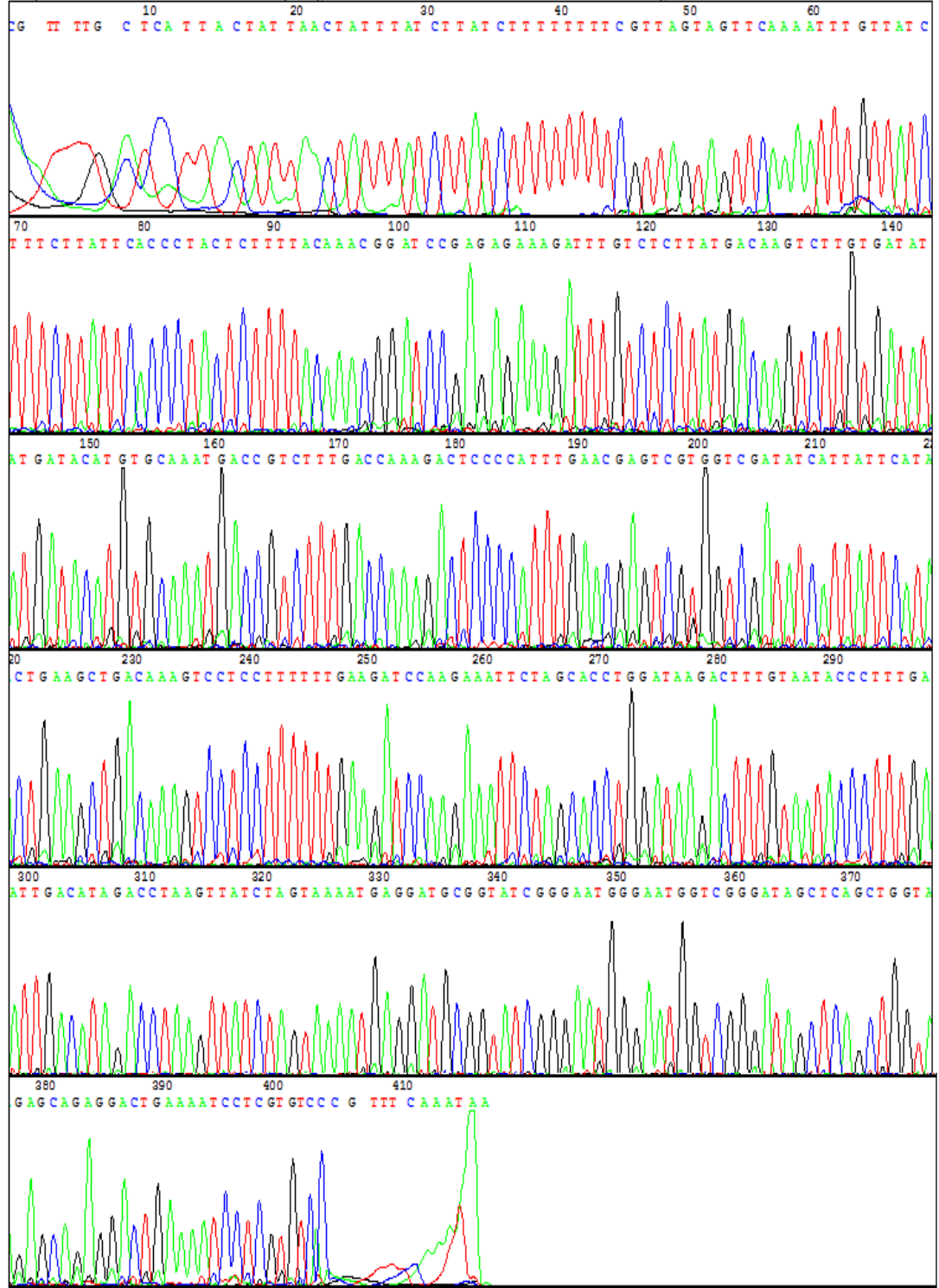
Şekil 1.1. *trnV* bölgesi kromatogram örneği

EK-1. (Devam) DNA dizi analizi kromatogramları



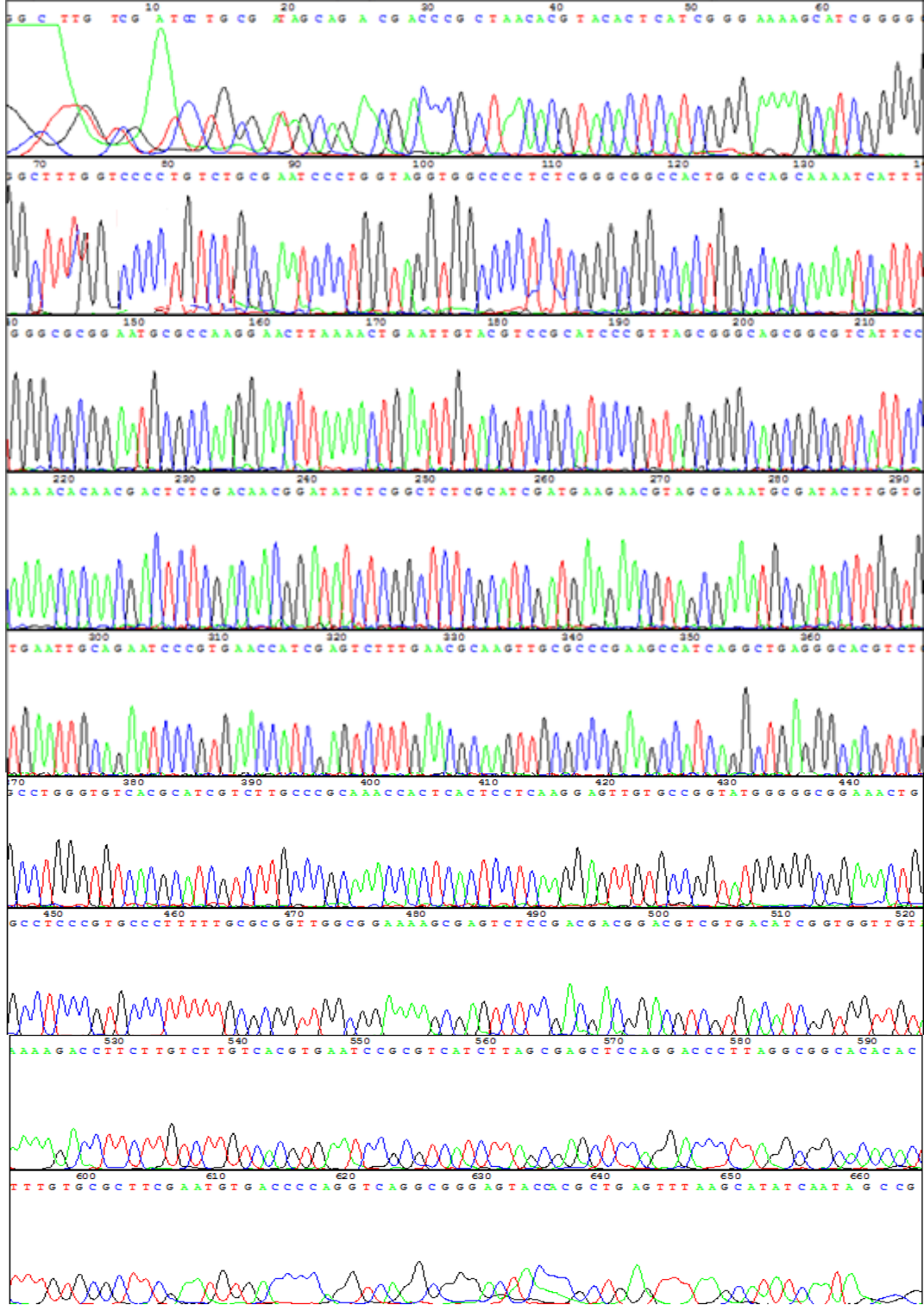
Şekil 1.2. *trnL* bölgesi kromatogram örneği

EK-1. (Devam). DNA dizi analizi kromatogramları



Şekil 1.3. *trnL*-F bölgesi kromatogram örneği

EK-1. (Devam). DNA dizi analizi kromatogramları



Şekil 1.4. ITS bölgesi kromatogram örneği

EK-2. Kloroplast DNA'sı kodlanmayan *trn* bölgelerinin sekans analizi sonucu örneği

#*P. denticulata* (*trnV* intron)

GCGCGCCAATGTTTTTCAGGGGGGTCCATCATGCAATCAAAAGAATTGAT
CTTATTGAGAAATCGATGTCTTACTCCATAACTTTGAGGGAACAAGAGAA
CAATAGCCTGACAAGGGGTTTCAAGTCTTGTCCCTTTTAGGTGCCAAACAGG
ACCCATCGTTGATTTGAGATATTGATAAGGTAAATGTCTATTCAATGCTA
GGCATAATGAGTACAAGGACCTCAAAAAAAGATCTTTTCGCCCTATGAA
CTTTAAGGTGTATGAAGTTTCATATTTTCATTTTTTAAGCAGAGCGATAGAG
ACTTCATCTAACTTAGGTTAATCTAGGCCAGAGGCAGACCTACGTCAAGA
TACCCCTTTGAAACACTTTGGTAGTGTTCCTGGATCAGAATTAAAATAA
TGACTCAGAGCACATGGAGCCATCTCCTATTTTTCTATCAAAAAAATA
TGGCGGACTAACTGATAGAAATATCAGTTAATGAAAGAGCCCAATGCAC
AAAAAATGCATGTTGGGTCTTTGAAACAGTTCAGATCATTTTGATAATAA
AAAGTTTGATATGTTTTAC

#*P. denticulata* (*trnL* intron)

AATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGAGAACTTTCAAAT
TCAGAGAAACCCCGGAATTAATAAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCC
TATTTTCCAAAAACAAACAAAGGCCCAGAAGGTGAAAAAAGGATAGGTG
CAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAATTGACTGTGTTGCAT
TGGTAGAGGAATCCTTCCATTGAAACTTCCGAAAAGATGAAGGATATAC
GTATGTATATACATACGTATACGTACTGAAATACTCTATTAAATGATTAA
TGACGACCTTAATCTGTATTTTTCTATGAAAAAGGGAAAAAATTGTTGTGA
ATCGATTCCATATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGATCAAAGCATTC
ACCACACAGTCTGATAGTTCTTTTGCAGAACTAATTAATCGGACGAGAAT
AAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTAT
AGTAAGAGG

#*P. denticulata* (*trnL-F* intergenik bölgesi)

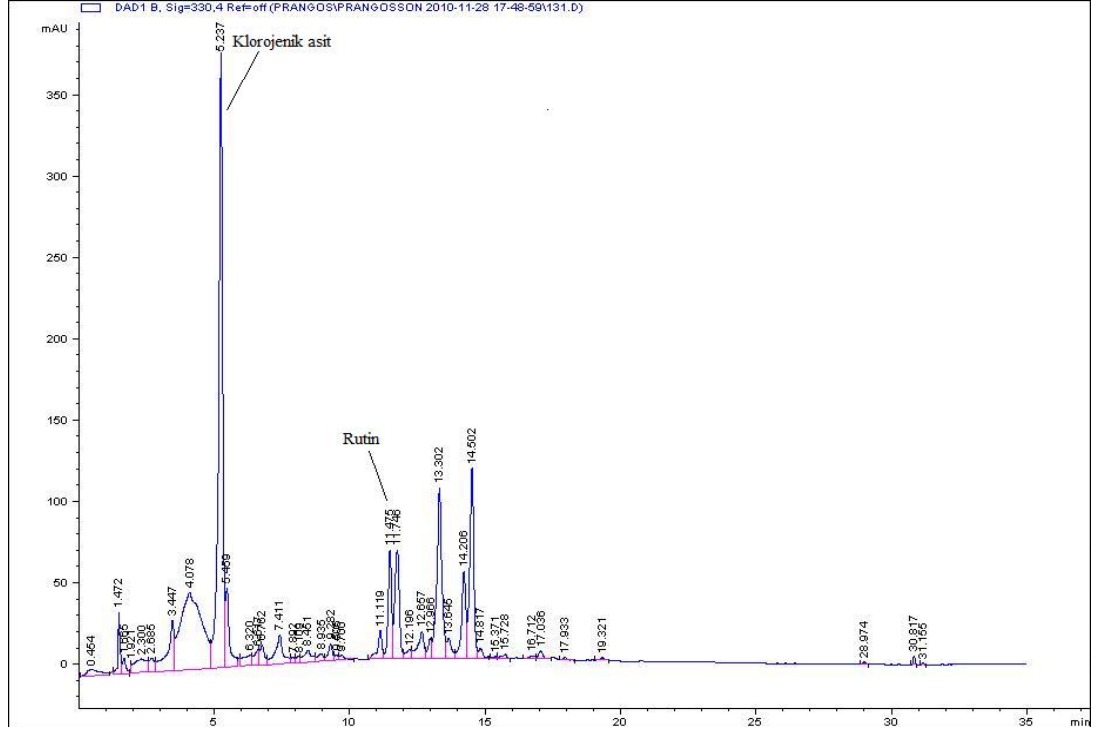
AAAAGCCCATTGACTCCTTAACCTAATTAATTTATCTTATCTTTTTTTTC
GTTAGTAGTTCAAAATTTGTTATCTTTCTTATTCACCCTACTCTTTTACAA
ACGGATCCGAGAGAAAGATTTGTCTCTTATGACAAGTCTTGTGATATATG
ATACATGTGCAAATGACCGTCTTTGACCAAAGACTCCCCATTTGAACGAG
TCGTGGTCGATATCATTATTCATACTGAAGCTGACAAAGTCCTCCTTTTTT
GAAGATCCAAGAAATTCTAGCACCTGGATAAGACTTTGTAATACCCTTTG
AATTGACATAGACCTAAGTTATCTAGTAAAATGAGGATGCGGTATCGGG
AATGGGAATG

EK-3. nrDNA ITS bölgesinin sekans analizi sonucu örneği

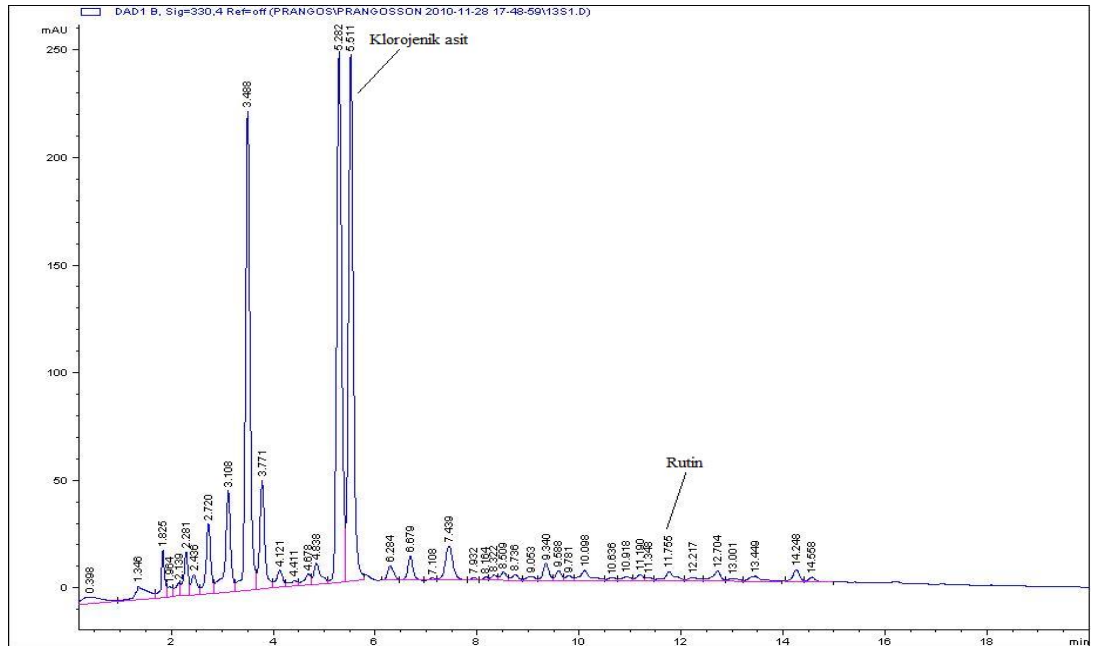
#*P. denticulata*

TCGAATCCTGCGATAGCAGAATGACCCGCTAACACGTAAACACATCGGG
AAAAGCATCGGGGGGCTTGGTCCCTTGTCTGCGAATCCCTGGTAGGTGGC
CCCTCTCGGGCGGCCACTGGCCAGCAAAATCATTTGGGCGCGGAATGCG
CCAAGGAACCTAAAACCTGAATTGTACGTCCGCATCCCGTTAGCGGGCAGC
GGCGTCATTCCAAACCACAACGACTCTCGACAACGGATATCTCGGCTCTC
GCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGA
ATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCA
GGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTCACGCATCGTCTTGCCCACAAACC
ACTCACTCCTCATGGAGCTGTGCCGGTGTGGGGGCGGAAACTGGCCTCCC
GTGCCCTTTTTGCGCGGTTGGCGGAAAAGCGAGTCTCCGACGACGGACGT
CGTGACATCGGTGGTTGTAAAAGACCCTCTTGTCTTGTCGCGTGAATCCG
CGTCATCTTAGCGAGCTCCAGGACCCTTAGGCAGCACACACTTTGTGCGC
TTCGA

EK-4. HPLC analizi kromatogramları

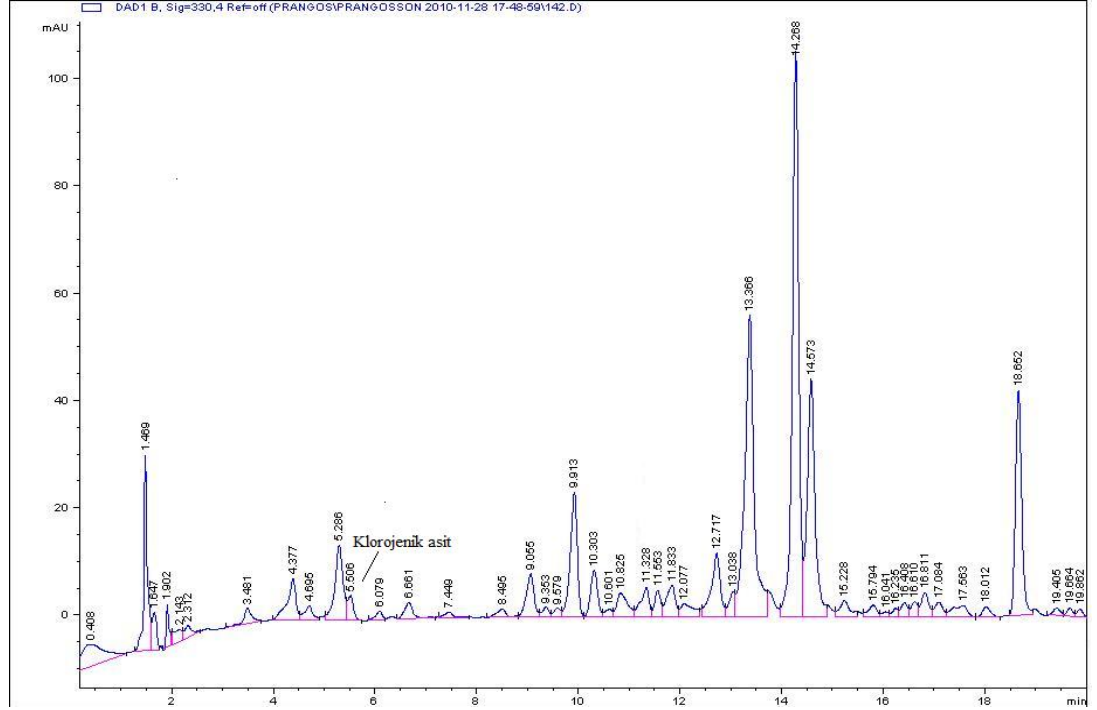


Şekil 4.1. *P. ilanae* yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı

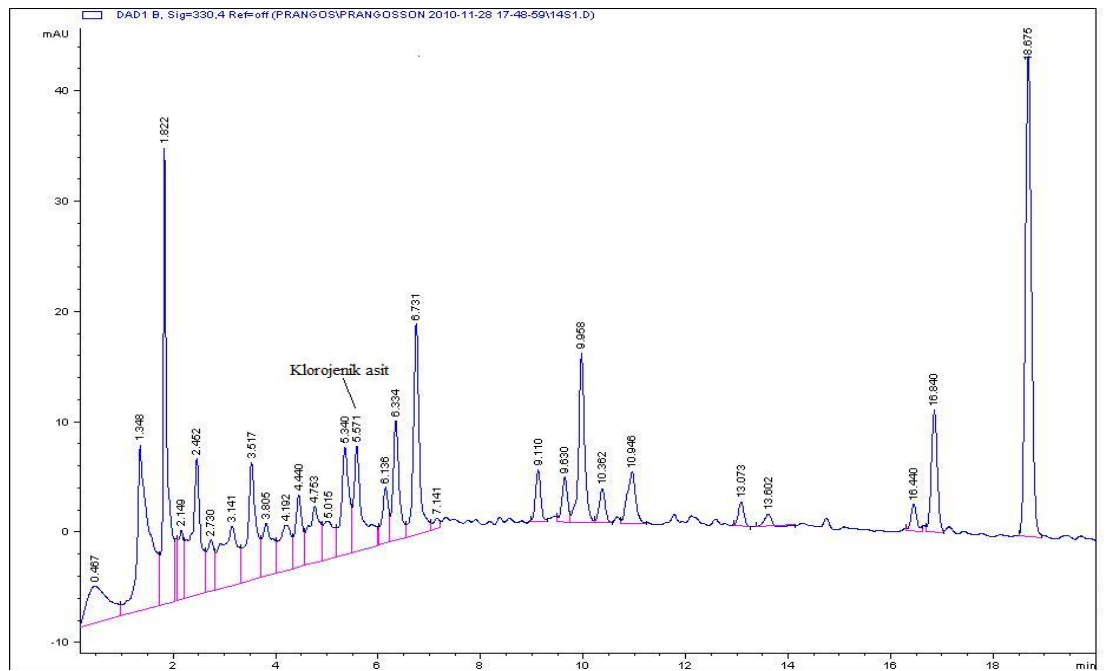


Şekil 4.2. *P. ilanae* yaprak su ekstraktının HPLC kromatogramı

EK-4. (Devam) HPLC analizi kromatogramları

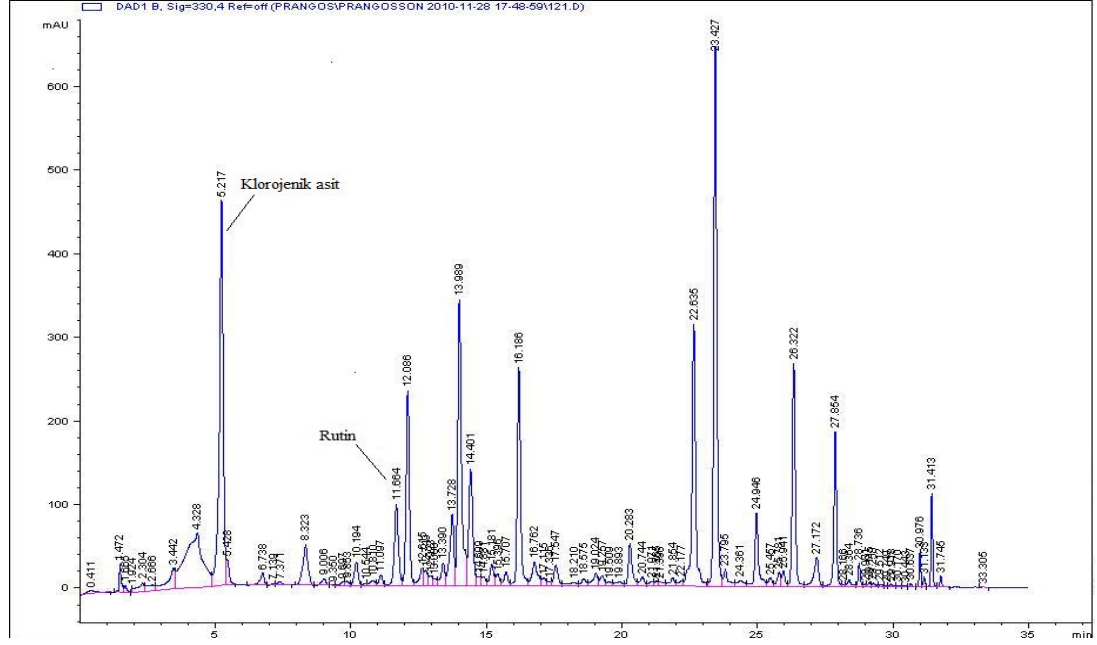


Şekil 4.3. *P.ilanae* meyve metanol ekstraktının HPLC kromatogramı

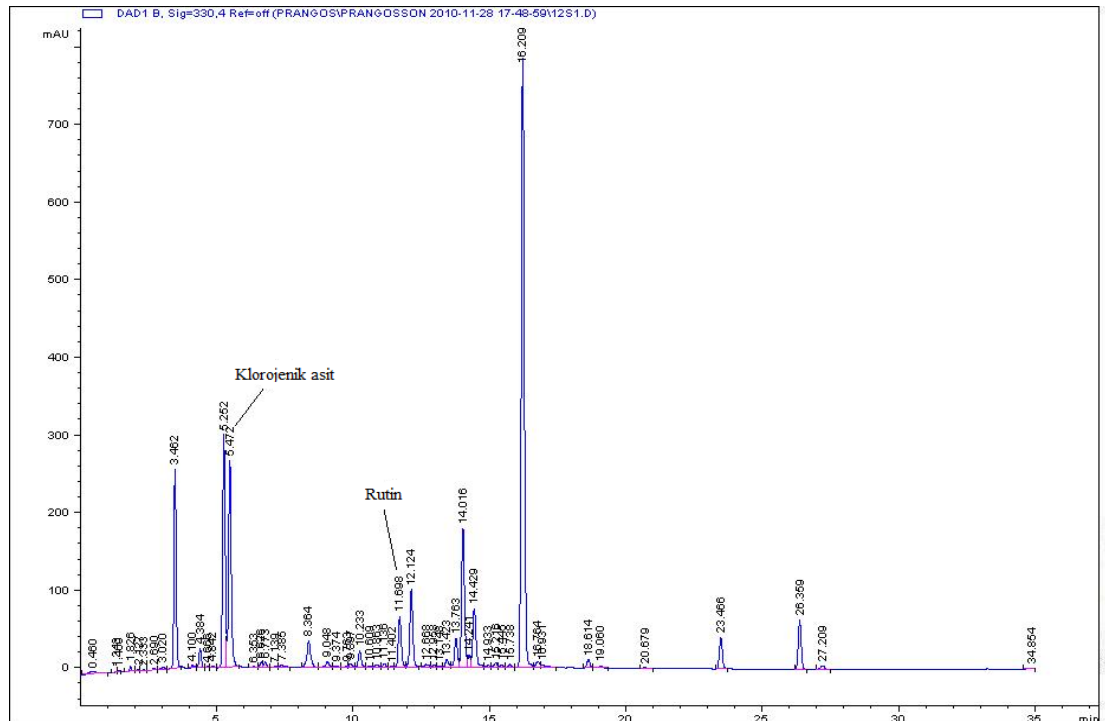


Şekil 4.4. *P.ilanae* meyve su ekstraktının HPLC kromatogramı

EK-4. (Devam) HPLC analizi kromatogramları

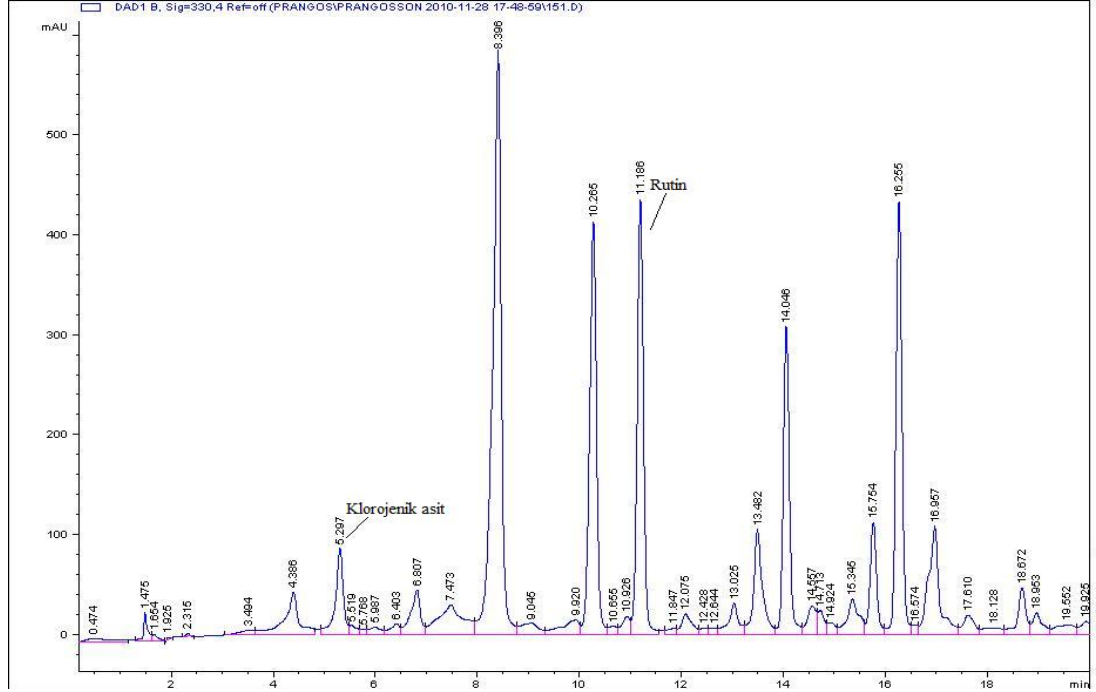


Şekil 4.5. *P. denticulata* yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı

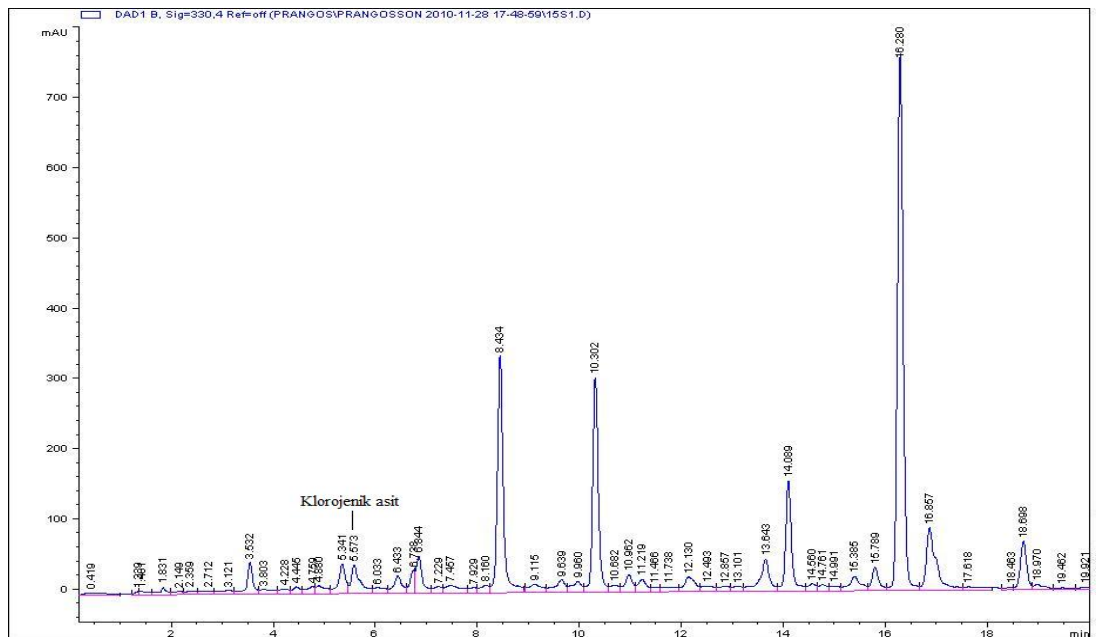


Şekil 4.6. *P. denticulata* yaprak su ekstraktının HPLC kromatogramı

EK-4. (Devam) HPLC analizi kromatogramları

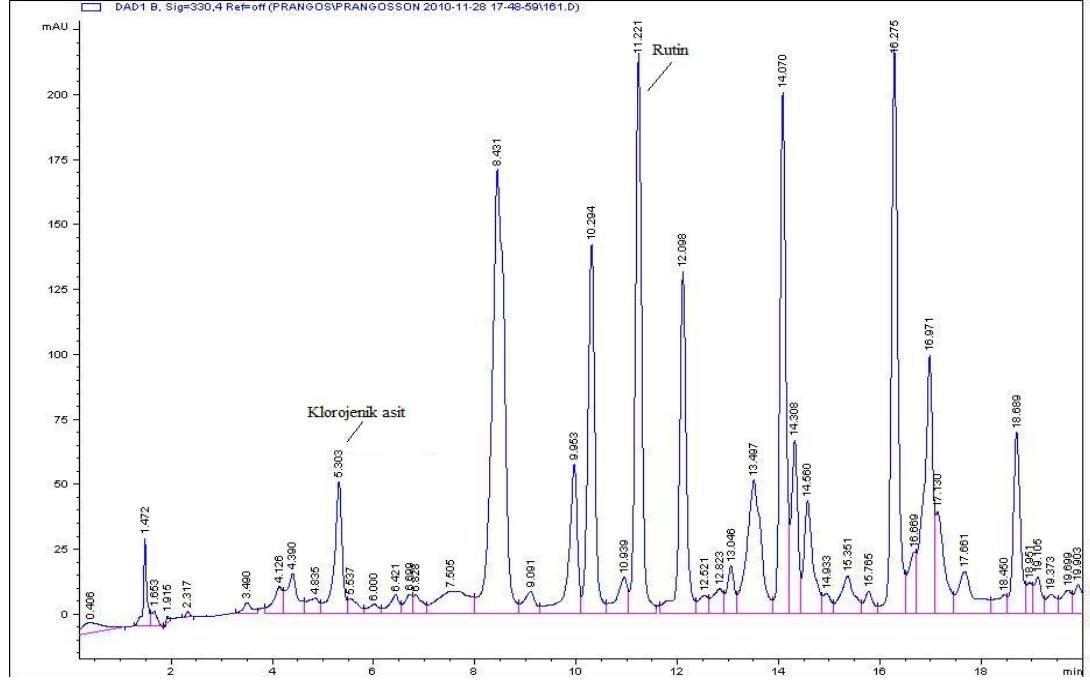


Şekil 4.9. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı

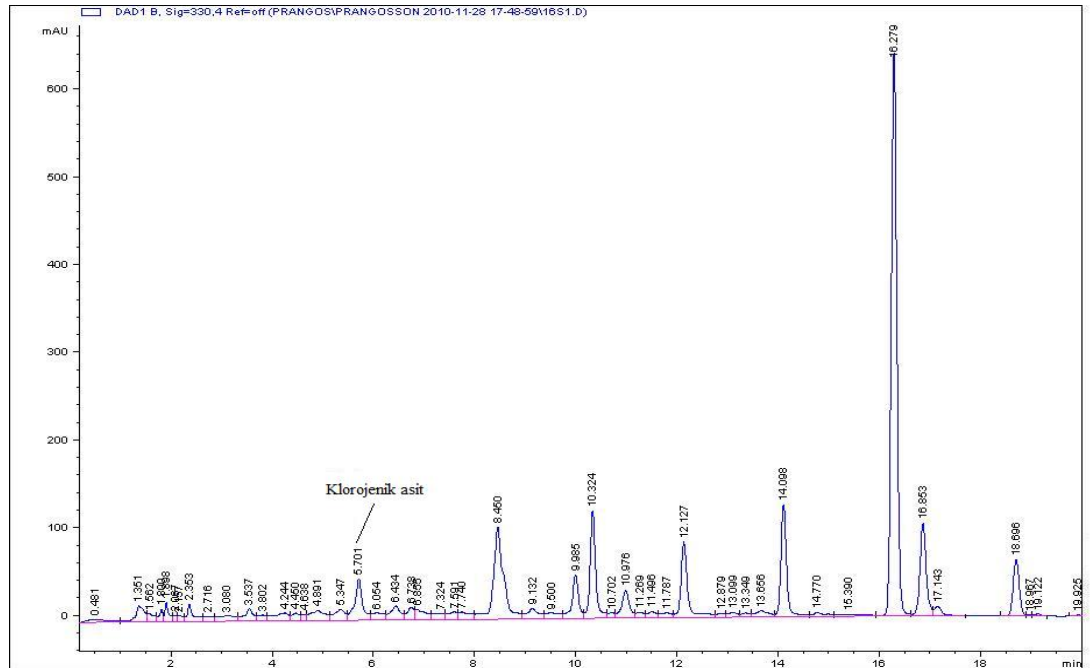


Şekil 4.10. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* yaprak su ekstraktının HPLC kromatogramı

EK-4. (Devam) HPLC analizi kromatogramları

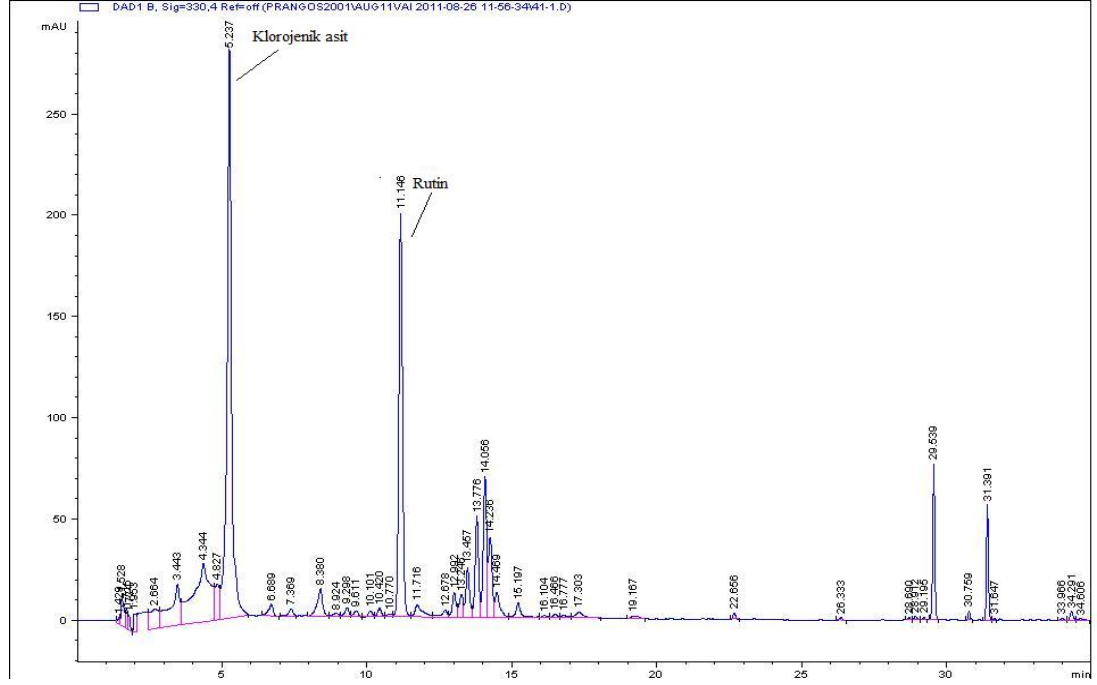


Şekil 4.11. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve metanol ekstraktının HPLC kromatogramı

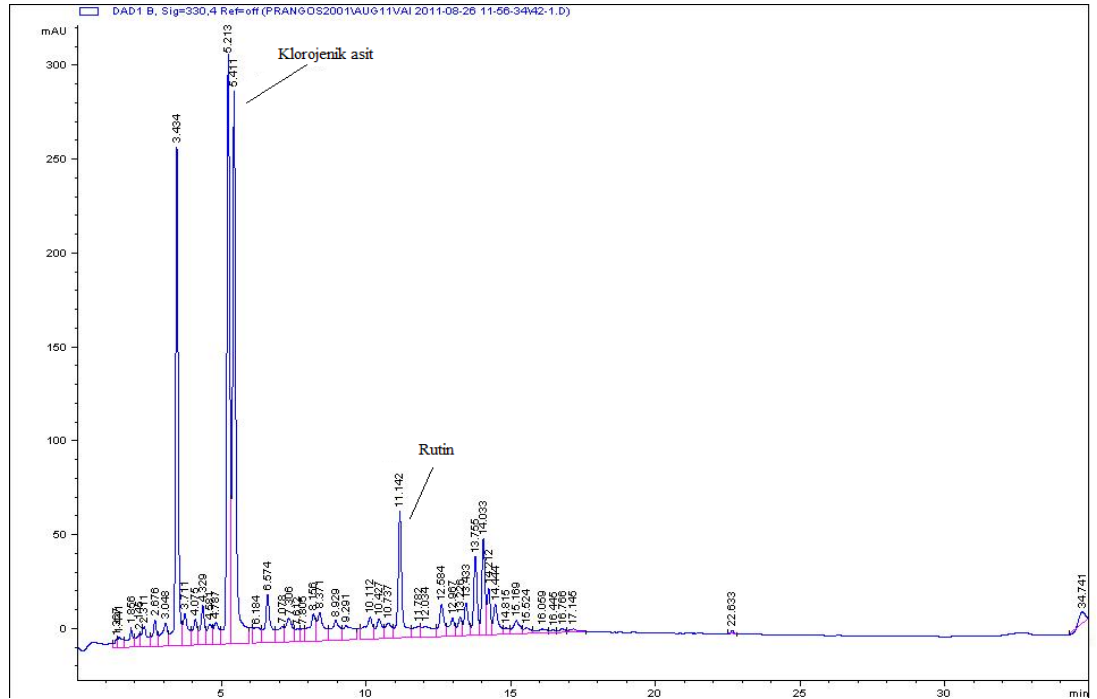


Şekil 4.12. *P. platychloena* subsp. *engizekensis* meyve su ekstraktının HPLC kromatogramı

EK-4. (Devam) HPLC analizi kromatogramları

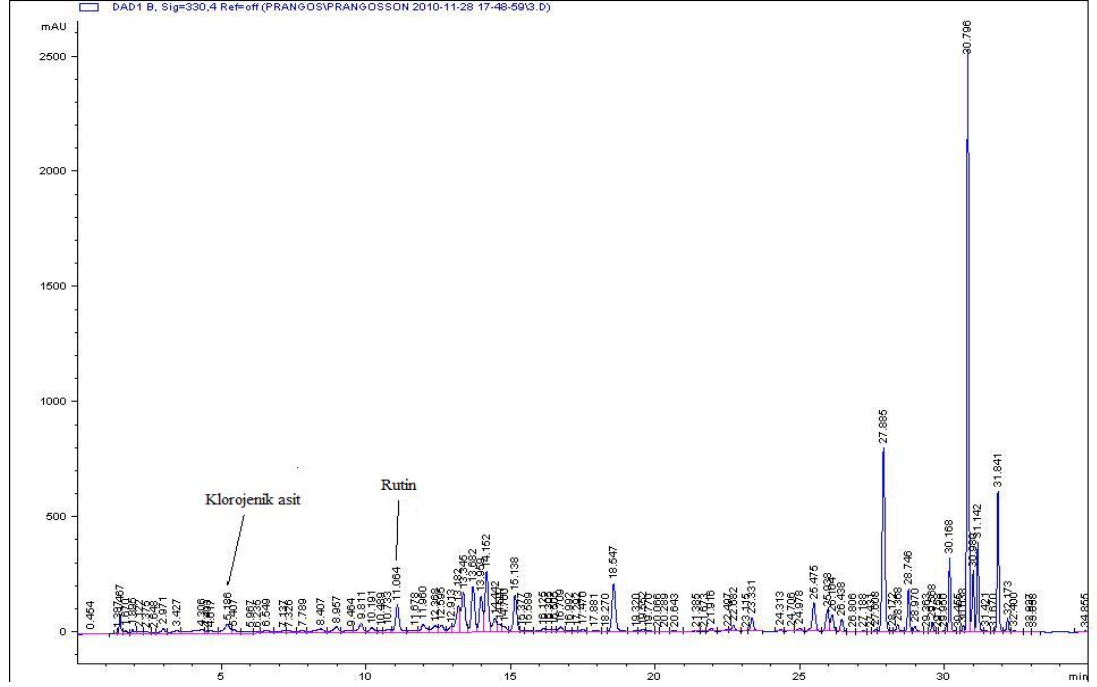


Şekil 4.13. *P. heyneae* yaprak metanol ekstraktının HPLC kromatogramı



Şekil 4.14. *P. heyneae* yaprak su ekstraktının HPLC kromatogramı

EK-4. (Devam) HPLC analizi kromatogramları



EK-5. Etik kurul belgesi



GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Türkiye’de endemik olarak bulunan Prangos Lindl. (<i>Umbelliferae</i>) türlerinin moleküler sistematigi ve biyolojik aktiviteleri		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Hayri DUMAN		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DİĞER ☐	☒	Doktora Tezi ☐ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL ☒ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSSEL OLMAYAN 5-Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak in-vitro çalışmalar

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SİGORTA	☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 295	Toplantı tarihi: 27.06.2012
	Üniversitemiz Fen Fakültesinde Prof.Dr.Hayri Duman’ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, <i>Doktora Tezi olan</i> klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖKE ALTUNTAŞ, Feyza
 Uyuğu : T.C.
 Doğum Tarihi : 04.01.1981
 Medeni Hali : Evli
 e-posta : feyzaoke@gazi.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2012
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2006
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Biyoloji Öğretmenliği (Tezsiz)	2005
Lisans	Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme Bölümü	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Akademik Çalışmalar

A) SCI Tarafından Taranan Bilimsel Dergilerde Yapılan Yayınlar

1. **Oke, F.**, Aslim B. (2011). Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chemistry*, 128: 613-619.
2. Yegenoglu, H., Aslim, B., **Oke, F.** (2011). Comparison of antioxidant capacities of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer by using different *in vitro* methods. *Journal of Medicinal Food*, 14(5): 512-516.
3. **Oke, F.**, Aslim, B. (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & P. H. Davis. *Food and Chemical Toxicology*, 48:1728-1733.
4. **Oke, F.**, Aslim, B., Ozturk, S., Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112:874-879.

B) Uluslararası Kongrelerde Yer Alan Bildiriler

1. **Oke-Altuntas, F.**, Aslim, B. (2012). The influence of total phenol, beta-carotene, and lycopene contents on antioxidant capacity in *Stachys obliqua* extracts. International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF. Jul 28-Aug 01 2012, New York, USA. *Planta Medica*, 78 (11): 1236.
2. **Oke-Altuntas, F.**, Aslim, B., Duman, H. (2012). The inhibitory effects of Turkish endemic *Prangos* species against some food borne pathogens commonly found in milk and cheese. International Congress on Natural Products Research on Global Change, Natural Products and Human Health/8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE and SIF. Jul 28-Aug 01 2012, New York, USA. *Planta Medica*, 78 (11): 1235.

3. **Oke-Altuntas, F.,** Aslim, B., Duman, H. (2011). Inhibitory effect of *Prangos meliocarpoides* Boiss var. *meliocarpoides* on lipid peroxidation and hydrogen peroxide-induced cell damage. European Biotechnology Congress. Sep 28-Oct 01 2011, Istanbul, Turkey, *Current Opinion In Biotechnology*, 22 (1): 99-100.
4. **Oke-Altuntas, F.,** Duman, H., Aslim, B. (2011). Metal chelating, radical-scavenging and anti-lipid peroxidative activities of various extracts from two endemic species belonging to *Prangos* Lindl (Umbelliferae). 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 4th-9th September 2011, Antalya, Turkey. *Planta Medica*, 77: 1414.
5. Rostami, S., **Oke-Altuntas, F.,** Aslim, B, Duman, H. (2011). Anticarcinogenic effect of *Cyclotrichium organifolium* on human colorectal cancer cell line and associating with its antioxidative properties. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 4th-9th September 2011, Antalya, Turkey. *Planta Medica*, 77: 1372.
6. **Oke-Altuntas, F.,** Aslim, B. (2011). High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in two edible mushrooms extracts and their protective effect against oxidative damage in BHK-21 cell line. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. 4th-9th September 2011, Antalya, Turkey. *Planta Medica*, 77: 1368.
7. **Oke-Altuntas, F.,** Duman, H. Aslim., B. (2011). Protective effect of *Prangos ilanae* on lipid peroxidation and DNA damage in human lymphocytes. 15th International Congress Phytopharm. 25-27 July 2011, Nuremberg, Germany.

C) Ulusal Kongrelerde Yer Alan Bildiriler

1. **Öke, F.,** Aslım, B., Duman, H. (2010). *Prangos platychloena* Boiss. ex Tchihat. subsp. *platychloena*'nın antioksidan, antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi. XX. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 21-25 Haziran 2010, Denizli.

2. **Öke, F., Aslım, B. (2009).** *Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet'in antioksidan özelliğinin belirlenmesi. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, 28-31 Ekim 2009, İstanbul, *Turk J. Biochem.*, 34: 114.
3. **Öke, F., Aslım, B. (2009).** *Auricularia auricula-judae*'nin *in vitro* antioksidan potansiyeli. VII. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 30 Mayıs-1 Haziran 2009, Ankara.
4. **Öke, F., Aslım, B. (2008).** *Origanum minutiflorum*'a ait çeşitli ekstraktların antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri. XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, 25 Ekim-1 Kasım 2008, Nevşehir, *Turk J. Biochem.*, 33: 137.
5. **Öke, F., Aslım, B., Öztürk, Ş., Altundağ, Ş. (2008).** *Satureja cuneifolia* Ten'in uçucu yağ bileşimi, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi. XX. Ulusal Biyokimya Kongresi, 25 Ekim-1 Kasım 2008, Nevşehir, *Turk J. Biochem.*, 33: 138-139.
6. **Öke, F., Duman, H., Açık, L., (2005).** Türkiye *Sideritis* L. Türlerinin SDS-PAGE Analizleri, XIX. Ulusal Biyokimya Kongresi, 22-25 Nisan 2005, Antalya, *Turk J. Biochem.*, 30: (1) 133-134.

D) Projeler

1. Türkiye'de endemik olarak bulunan *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) Türlerinin Moleküler Sistematiği ve Biyolojik Aktiviteleri. Gazi Üniversitesi Araştırma Projesi, Proje no; 05/2009-09. Proje tamamlanmıştır. (2011). Araştırmacı.
2. *Lamiaceae* Familyasına Ait Tıbbi Önemi Olan Bazı Bitki Türlerinin Antioksidan, Antimikrobiyal ve Sitotoksik Aktiviteleri Açısından İncelenmesi. Gazi Üniversitesi Araştırma Projesi, Proje no; 46/2010-01. Proje tamamlanmıştır. (2011). Araştırmacı.