



**ERZURUM YÖRESİNDE YETİŞEN ÇAŞIR (*PRANGOS
FERULACEA* (L.) BİTKİSİNDEN ENZİM/MANYETİK
ALAN ÖN İŞLEMLERİYLE ÜÇ FAZLI AYIRMA (TPP)
YÖNTEMİ KULLANILARAK POLİSAKKARİTLERİN
EKSTRAKTE EDİLMESİ, FİZİKOKİMYASAL
ÖZELLİKLERİNİN VE *IN VİTRO* BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Amina İBRAHİMOVA

**Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2025**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**ERZURUM YÖRESİNDE YETİŞEN ÇAŞIR (*Prangos Ferulacea* (L.) BİTKİSİNDEN
ENZİM/MANYETİK ALAN ÖN İŞLEMLERİYLE ÜÇ FAZLI AYIRMA (TPP)
YÖNTEMİ KULLANILARAK POLİSAKKARİTLERİN EKSTRAKTE EDİLMESİ,
FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN ve *In vitro* BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Extraction of Polysaccharides from the Plant of *Prangos Ferulacea* (L.) Growing in Erzurum Region by Using the Triple Phase Separation (TPP) Method with Enzyme/Magnetic Field Pretreatments, Investigation of Their Physicochemical Properties and *In vitro* Biological Activities)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Amina İBRAHİMOVA

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Erzurum
Eylül, 2025



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Erzurum Yöresinde Yetişen Çasır (*Prangos Ferulacea (L.)*) Bitkisinden Enzim/Manyetik Alan Ön İşlemleriyle Üç Fazlı Ayırma (TPP) Yöntemi Kullanılarak Polisakkaritlerin Ekstrakte Edilmesi, Fizikokimyasal Özelliklerinin ve *In vitro* Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında, Amina IBRAHIMOVA tarafından hazırlanan bu çalışma, 27/08/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Erzurum Yöresinde Yetişen Çasır (*Prangos Ferulacea (L.)*) Bitkisinden Enzim/Manyetik Alan Ön İşlemleriyle Üç Fazlı Ayırma (TPP) Yöntemi Kullanılarak Polisakkaritlerin Ekstrakte Edilmesi, Fizikokimyasal Özelliklerinin ve *In vitro* Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması tezi olarak **oybirliği (3/3)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof.Dr. Ömer Faruk KARATAŞ	Aslı Islak İmzalıdır
	Erzurum Teknik Üniversitesi	
Danışman:	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU	Aslı Islak İmzalıdır
	Atatürk Üniversitesi	
Jüri Üyesi:	Doç.Dr Onur ŞENOL	Aslı Islak İmzalıdır
	Atatürk Üniversitesi	

Enstitü Yönetim
Kurulunun 27/08/2025
tarih ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof.Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma BAP ve TÜBİTAK 1002A projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2024-14773/124Z690

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU danışmanlığında sunulan “Erzurum Yöresinde Yetişen Çaşır (*Prangos Ferulacea* (L.) Bitkisinden Enzim/Manyetik Alan Ön İşlemleriyle Üç Fazlı Ayırma (TPP) Yöntemi Kullanılarak Polisakkaritlerin Ekstrakte Edilmesi, Fizikokimyasal Özelliklerinin ve In vitro Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	8	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Metot	25	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	5	20
Sonuçlar	0	20
Tezin Geneli	13	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Amina İBRAHİMOVA	Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU
27.08.2025	27.08.2025
İmza Aslı Islak İmzalıdır	İmza Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☒ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Araştırma Projeleri kapsamında TÜBİTAK1002 programı 124Z690 numaralı "Erzurum Yöresinde Yetişen Çaşır (*Prangos Ferulacea* (L.) Bitkisinden Enzim/Manyetik Alan Ön İşlemleriyle Üç Fazlı Ayırma (TPP) Yöntemi Kullanılarak Polisakkaritlerin Ekstrakte Edilmesi, Fizikokimyasal Özelliklerinin ve *In vitro* Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması" ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından FYL-2024-14773 numaralı " *Prangos Ferulacea* (L.) Bitkisinden saflaştırılan Polisakkarit ve Cisplatin İlacının kombinasyonunun MCF-7 ve A549 Hücre Hatları Üzerinde Antikanser Etkilerinin Gen ve Protein Seviyesinde Araştırılması" başlıklı proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmaya sağladığı finansal desteklerden dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne ve öğrenim sürem boyunca sağladığı burs imkanlarından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 'na (TÜBİTAK1002A) teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilimsel bakış açımı geliştirmemde yardımcı olan her aşamada bilgisi ve önerileriyle yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması yüksek lisansa başladığım günden her aşamada bilgi ve deneyimlerini bana sabırla öğreten, akademik yolculuğuma hep ışık tutan, karşılaştığım her zorlukta çözüm üreten çok değerli arkadaşım Rahime ALTINTAS sayesinde tamamlandı. Bilgisi,sabrı ve dostluğu için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tıkandığım yerlerde yardımını benden esirgemeyen, tecrübe ve yönlendirmeleriyle bana destek olan değerli ekip arkadaşım Selma SAOULA'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana moral ve motivasyon olan sevgili arkadaşlarım Azade ALİYEVA, Kamran MURSALOV, Leman MEMMEDZADE ve Abdullah ÇİÇEK'e teşekkür ederim.

Bu süreçte emeği geçen bütün değerli hocalarıma, laboratuvar ortamını daha verimli ve keyifli hale getiren, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak yanımda olan, sevgi ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli aile üyelerim annem Zarifa İBRAHİMOVA'ya, babam Vugar İBRAHİMOV'a ve kardeşim Kenan İBRAHİMOV'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Amina İBRAHİMOVA

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZURUM YÖRESİNDE YETİŞEN ÇAŞIR (*Prangos Ferulacea* (L.) BİTKİSİNDEN ENZİM/MANYETİK ALAN ÖN İŞLEMLERİYLE ÜÇ FAZLI AYIRMA (TPP) YÖNTEMİ KULLANILARAK POLİSAKKARİTLERİN EKSTRAKTE EDİLMESİ, FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN ve *In vitro* BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amina İBRAHİMOVA

Danışman: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Amaç: Polisakkaritler doğada yaygın olarak bulunan, enerji depolamada ve yapısal bütünlüğün sağlanmasında rolü olan biyopolimerlerdir. Özellikle bitki polisakkaritleri sergiledikleri çeşitli biyolojik aktivitelerden dolayı klinik, gıda, farmasötik ve biyoteknolojik alanlarda yoğun ilgi görmektedir. Bu tez çalışması kapsamında; Erzurum'da yetişen çadır bitkisinden polisakkaritlerin TPP, TPP öncesi enzim ön işlemi (E-TPP), TPP öncesi manyetik alan ön işlemi (M-TPP) ve TPP öncesi enzim/manyetik alan ön işlemi (E/M-TPP) yöntemleri uygulanarak ekstrakte edilmesi, ekstrakte edilen polisakkaritlerin karakterizasyonunun yapılması, fizikokimyasal özelliklerinin ve *in vitro* biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: TPP yöntemi kullanılarak, *Prangos Ferulacea* (L.) bitkisinden polisakkarit ekstrakte etmek için klasik TPP yöntemi ile amonyum sülfat konsantrasyonu (%20-80), süpernatant çözeltisi/t-butanol oranı (1.0:1.0-1.0:2.0) ve pH (6.0-8.0) gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Optimum koşullar kullanılarak enzim, manyetik alan, enzim/manyetik alan ön işlemleriyle ve hiçbir ön işlem uygulanmadan TPP yöntemiyle optimum polisakkarit verimi karşılaştırılmıştır. Optimize edilmiş koşullar ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri (karbohidrat ve protein aktivitesi), karakterizasyonu ve farklı biyolojik aktiviteleri (antioksidan aktivite, hipoglisemik ve hipourisemik aktivite) belirlenmiştir. Ayrıca, enzim (PFP_s-E), manyetik alan (PFP_s-M), enzim/manyetik alan (PFP_s-EM) ön işlemleriyle ve hiçbir ön işlem uygulanmadan (PFP_s-H) ekstrakte edilen polisakkaritlerin antikanser etkileri, gen seviyesinde qPCR ile protein seviyesinde western blot analiziyle araştırılmıştır.

Bulgular: Çadır bitkisinden TPP yöntemiyle ekstrakte edilen polisakkaritlerin optimizasyon çalışmaları sonucunda; 30°C'de pH 7.0, %20 amonyum sülfat konsantrasyonu ve 1.0:1.5 süpernatant çözeltisi/ t-butanol oranı ile E/M-TPP ile elde edilen polisakkarit en yüksek ekstraksiyon verimini (%27), karbohidrat içeriğini (%90) ve en düşük protein içeriğini (%0,82) gösterdi. *In vitro* biyoaktivite testleriyle PFP_s-EM 'nin, PFP_s-E ve PFP_s-M ve PFP_s-H'dan daha güçlü antioksidan, hipoglisemik, hipourisemik ve antitümör aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Sonuç: Polisakkaritler, doğal kaynaklardan elde edilen yapıları sayesinde hem biyomedikal hem de endüstriyel açıdan önemli biyopolimerler arasında yer almaktadır. Sonuç olarak bu tez kapsamında, ilk kez Erzurum yöresinde yetişen çadır bitkisinden polisakkaritlerin; enzim, manyetik alan, enzim ve manyetik alan kombinasyonu ile ön muameleden sonra ekstrakte edildi ve sonra TPP yöntemiyle saflaştırıldı. Ekstrakte edilen polisakkaritler karakterize edilerek biyolojik aktiviteleri belirlendi. Elde edilen PFP_s-EM'in diğer yöntemlere kıyasla verimi ve etkinliği daha yüksek bulundu. Elde edilen sonuçlar, *Prangos Ferulacea* (L.) biyoaktif polisakkaritleri için etkili ve ümit verici bir ekstraksiyon tekniği sunmakta olup, PFPs'lerin fonksiyonel gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında uygulanma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Prangos Ferulacea* (L.), Polisakkarit, TPP, Manyetik alan, Biyolojik aktivite

Eylül 2025, 84 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM THE PLANT OF *Prangos Ferulacea* (L.) GROWING IN ERZURUM REGION BY USING THE TRIPLE PHASE SEPARATION (TPP) METHOD WITH ENZYME/MAGNETIC FIELD PRETREATMENTS, INVESTIGATION OF THEIR PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND *In vitro* BIOLOGICAL ACTIVITIES

Amina IBRAHIMOVA

Supervisor: Prof. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU

Purpose: Polysaccharides are biopolymers found widely in nature and play a role in energy storage and structural integrity. Plant polysaccharides, in particular, have attracted considerable attention in clinical, food, pharmaceutical, and biotechnological fields due to their diverse biological activities. In this thesis, the aim was to extract polysaccharides from the caşır plant grown in Erzurum using TPP, pre-TPP enzyme pretreatment (E-TPP), pre-TPP magnetic field pretreatment (M-TPP), and pre-TPP enzyme/magnetic field pretreatment (E/M-TPP) methods. The aim was to characterize the extracted polysaccharides and determine their physicochemical properties and in vitro biological activities.

Method: Parameters such as ammonium sulfate concentration (20-80%), supernatant/t-butanol ratio (1.0:1.0-1.0:2.0) and pH (6.0-8.0) were optimized using the classical TPP method to extract polysaccharides from *Prangos Ferulacea* (L.). Optimum polysaccharide yield was compared with the TPP method using the optimum conditions with and without enzyme, magnetic field, enzyme/magnetic field pretreatments. The physicochemical and bioactive properties (carbohydrate and protein activities), characterization and different biological activities (antioxidant activity, hypoglycemic and hypouricemic activities) of the polysaccharides extracted under the optimized conditions were determined. Additionally, the anticancer effects of polysaccharides extracted with enzyme (PFPs-E), magnetic field (PFPs-M), enzyme/magnetic field (PFPs-EM) pretreatments and without any pretreatment (PFPs-H) were investigated by qPCR at the gene level and western blot analysis at the protein level.

Findings: Optimization studies of polysaccharides extracted from the Çadır plant using the TPP method revealed that polysaccharides obtained with E/M-TPP at 30°C, pH 7.0, 20% ammonium sulfate concentration, and a supernatant solution/t-butanol ratio of 1.0:1.5 exhibited the highest extraction yield (27%), carbohydrate content (90%), and the lowest protein content (0.82%). In vitro bioactivity tests revealed that PFPs-EM possessed stronger antioxidant, hypoglycemic, hypo-uricemic, and antitumor activity than PFPs-E, PFPs-M, and PFPs-H.

Results: Polysaccharides, thanks to their structures derived from natural sources, are among the biopolymers of both biomedical and industrial importance. In conclusion, within the scope of this thesis, polysaccharides from the caşır plant, grown in the Erzurum region, were extracted for the first time after pretreatment with enzymes, magnetic fields, or a combination of enzymes and magnetic fields, and then purified using the TPP method. The extracted polysaccharides were characterized, and their biological activities were determined. The yield and effectiveness of the obtained PFPs-EM were found to be higher compared to other methods. The obtained results provide an effective and promising extraction technique for bioactive polysaccharides from *Prangos Ferulacea* (L.) and demonstrate the potential application of PFPs in functional foods, pharmaceuticals, and cosmetics.

Keywords: *Prangos Ferulacea* (L.), Polysaccharide, TPP, Magnetic field, Biological activity

September 2025, 84 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
Monosakkaritler	1
Disakkaritler	2
Oligosakkaritler.....	2
Polisakkaritler	2
Polisakkaritlerin kaynakları	3
Mikrobiyal polisakkaritler.....	3
Hayvansal polisakkaritler.....	4
Deniz kaynaklı polisakkaritler	4
Bitkisel polisakkaritler	4
Polisakkaritlerin antikanser aktivitesi	5
Polisakkaritlerin anti-aging etkileri.....	6
Polisakkaritlerin antioksidan aktiviteleri	6
Polisakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri	6
Polisakkaritlerin antiviral etkileri.....	6
Polisakkaritlerin antiinflamatuvar etkileri.....	7
Polisakkaritlerin immünmodülatör etkileri	7
Polisakkaritlerin hipoglisemik / antidiyabetik etkileri	8
Polisakkaritlerin hipolipidemik etkileri.....	8
Polisakkaritlerin hepatoprotektif etkileri	9
Polisakkaritlerin Nöroprotektif Etkileri	9
Polisakkaritlerin Prebiyotik Etkileri.....	9

Polisakkaritlerin Hipoürisemik Etkileri	10
Polisakkaritlerin ekstraksiyonu	10
Üç Fazlı Ayırma Yöntemi (TPP)	12
Prangos Ferulaceae (L.) bitkisi	13
KURAMSAL TEMELLER.....	14
Tezin Amacı.....	19
MATERYAL VE METOT.....	21
Materyal	21
Kullanılan araç-gereç ve cihazlar.....	21
Kullanılan kimyasallar	22
Reaktiflerin hazırlanması	22
Çözeltilerin hazırlanması	23
Yöntem.....	25
Çaşır bitkisinin toplanması.....	25
Polisakkarit ekstraksiyonu ve izolasyonu	25
Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu.....	26
TPP koşullarının yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile optimizasyonu	27
Manyetik alan ön işleminin ardından TPP yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu	27
Enzim ön işleminin ardından TPP yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu	28
Manyetik alan+enzim ön işlemlerinin ardından TPP yöntemi ile polisakkaritlerin	
ekstraksiyonu	28
Polisakkaritlerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	28
Karbohidrat aktivitesi tayini.....	28
Lowry yöntemi ile protein tayini	29
FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopisi) yöntemi ile Polisakkaritlerin	
fonksiyonel grup analizi.....	29
Polisakkaritlerin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	29
DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi tayini.....	30
ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit) radikal katyonu süpürücü	
etki tayini.....	30
Toplam Fenolik İçerik Tayini	30
Hipoglisemik Aktivitenin Belirlenmesi	31
α -amilaz inhibisyon testi	31
α -glukozidaz inhibisyon testi	32
Hipoürisemik Aktivitenin Belirlenmesi	32

Polisakkaritin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
Hücrelerin çözündürülmesi	33
Hücrelerin pasajlanması	33
Hücrelerin stoklanması.....	34
Hücre sayımı	34
Hücre canlılığı (WST-8) testi.....	34
Kantitatif Gen Ekspresyon (Real-Time PCR) Analizi	35
RNA izolasyonu	35
cDNA sentezi	35
Real-Time PCR	36
Kantitatif Protein Ekspresyon (Western Blot) Analizi	37
MCF-7 ve A549 hücrelerinden total proteinin izole edilmesi	37
SDS-PAGE jelinin hazırlanması ve yüklenmesi.....	37
İstatistiksel Analizler.....	38
ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	39
Polisakkarit Ekstraksiyonunun Optimizasyonu	39
FT-IR yöntemi ile PFPs'lerin fonksiyonel grup analizi.....	43
Polisakkaritlerin antioksidan aktivitesi	44
Polisakkaritlerin Hipoglisemik aktivitesinin belirlenmesi	46
Polisakkaritlerin Hipoürisemik aktivitesinin belirlenmesi.....	48
Polisakkaritlerin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi	50
Polisakkaritlerin A549 ve MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi.....	50
Polisakkaritlerin MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarındaki apoptoz ilişkili genlerin kantitatif ekspresyon seviyelerine etkileri.....	52
RNA izolasyonunun spektrofotometrik gösterilmesi.....	52
Polisakkaritlerin MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde apoptoz ilişkili genlerinin (<i>BAX</i> , <i>BCL2</i> ve <i>KASPAZ-3</i>) mRNA ekspresyon seviyeleri.....	53
Polisakkaritlerin A549 kanser hücre hattı üzerinde apoptoz ilişkili genlerinin (<i>BAX</i> , <i>BCL2</i> ve <i>KASPAZ-3</i>) mRNA ekspresyon seviyeleri.....	54
Polisakkaritlerin A549 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerinde <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> ve <i>KASPAZ-3</i> proteinlerinin kantitatif ekspresyon seviyelerine etkileri	56
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	71

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar.....	21
Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar	22
Tablo 3. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri.....	27
Tablo 4. Standart Karbohidrat Çözeltilerinin Hazırlanışı	29
Tablo 5. Standart Akarboz Çözeltilisinin Hazırlanması	31
Tablo 6. Genler, Etki Mekanizmaları ve Beklenen Ekspresyon Seviyeleri.....	35
Tablo 7. cDNA Sentez Kit Protokolünün Önerdiği Bir Tüp İçerisindeki Reaksiyon Karışımı	36
Tablo 8. Gen Ekspresyon Profillerine Bakılan Genler İçin Dizayn Edilen Primerlerin Listesi	36
Tablo 9. Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Deneysel ve Tahmini Değerler (Ekstraksiyon)	39
Tablo 10. Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi.....	41
Tablo 11. Kanseri Hücrelerinde PFP _s 'lerin IC ₅₀ Konsantrasyonu (µg/mL).	51
Tablo 12. Kontrol ve Muamele Gruplarının (PFP _s -EM, PFP _s -E, PFP _s -M, PFP _s -H) 48. Saate ait İnsan Meme Hücre Hattından İzole Edilen RNA Örneklerinin Saflık Dereceleri ve Konsantrasyonları	52
Tablo 13. Kontrol ve Muamele Gruplarının (PFP _s -EM, PFP _s -E, PFP _s -M, PFP _s -H) 48. Saate ait İnsan Akciğer Hücre Hattından İzole Edilen RNA Örneklerinin Saflık Dereceleri ve Konsantrasyonları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Polisakkaritlerin kimyasal yapısı	3
Şekil 2. Ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları açısından karşılaştırılması. ...	11
Şekil 3. Çayır bitkisinden oda sıcaklığında farklı ekstraksiyon teknikleri ile polisakkarit ekstraksiyonu ve ayrıştırılması için şematik prosedür	26
Şekil 4. Manyetik Hipertermi cihazı	28
Şekil 5. MCF-7 ve A549 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü	33
Şekil 6. mRNA dan cDNA nın elde edilmesi.....	36
Şekil 7. TPP ile ekstrakte edilen polisakkarit verimi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafikler	42
Şekil 8. Polisakkaritlerin karbohidrat aktivite sonucu.....	43
Şekil 9. PFPs'nin FTIR sonucu	44
Şekil 10. Polisakkaritlerin <i>in vitro</i> antioksidan testleri	45
Şekil 11. Polisakkaritlerin (PFP _s -EM, PFP _s -M, PFP _s -E, PFP _s -H) hipoglisemik aktivitesinin belirlenmesi	47
Şekil 12. Polisakkaritlerin (PFP _s -EM, PFP _s -M, PFP _s -E, PFP _s -H) hipoureisemik aktivitesinin belirlenmesi	49
Şekil 13. Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen polisakkaritlerin A549 hücre hattı üzerindeki doz bağımlı olarak sitotoksik etkisi (48 saat)	50
Şekil 14. Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen polisakkaritlerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki doz bağımlı olarak sitotoksik etkisi (48. Saat)	51
Şekil 15. Polisakkarit gruplarının (PFP _s -EM, PFP _s -E, PFP _s -M, PFP _s -H) MCF-7kanser hücre hattında <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> , <i>BAX/BCL2</i> ve <i>KASPAZ-3</i> genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi	54
Şekil 16. Polisakkarit gruplarının (PFP _s -EM, PFP _s -E, PFP _s -M, PFP _s -H) A549 kanser hücre hattında <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> , <i>BAX/BCL2</i> ve <i>KASPAZ-3</i> genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi	55
Şekil 17. Polisakkaritin etkin gösterdiği konsantrasyonunda A549 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyon etkisi.....	56
Şekil 18. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ekstrakte edilen polisakkaritin etkin gösterdiği konsantrasyonunda MCF-7 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyon etkisi	57

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

µl	: Mikro Litre
A549	: İnsan akciğer kanseri hücre hattı
ABTS	: 2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiyezolin-6-sülfonik asit)
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FBS	: Fetal Bovine Serum
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
MCF-7	: İnsan meme kanser hücre hattı
mL	: Mililitre
PBS	: Phosphate Buffered Saline
RNA	: Ribonükleik Asit
s	: Saniye
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
TPP	: Üç fazlı ayırma yöntemi

GİRİŞ

Karbohidratlar, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) atomlarından oluşan moleküller olup biyolojik sistemlerde yapısal bileşen ve enerji kaynağı olarak önemli rol oynayan biyopolimerlerdir (Zhang vd., 2015). İçerdiği şeker molekülünün sayısına bağlı olarak basit ve kompleks olmak üzere 2 gruba ayrılan bu bileşikler vücutta glikoz formunda dolaşır ve özellikle beyin, böbrek medullası ve alyuvarlar gibi dokular için ana enerji kaynağıdır (Costa-Pinto vd.,2021). Bu organik bileşikler, monosakkarit birimlerinin glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşur ve yapılarına göre monosakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler olmak üzere üç ana gruba ayrılır (Nelson & Cox, 2017). Yapılan çeşitli araştırmalarda karbohidratların antitümör, antiviral, antioksidan ve diğer biyolojik aktivitelere sahip olduğu belirtilmiştir. Diyetle alınan karbohidratlar, genellikle enerji üretiminde kullanılmadan önce daha basit yapıdaki şeker moleküllerine (örneğin glukozu) parçalanır ya da vücutta glikojen formunda depolanır. Glikojen depolanması başlıca karaciğer ve iskelet kası dokularında gerçekleşmektedir. Karaciğerde biriken glikojen, özellikle açlık gibi durumlarda kan glukoz düzeyinin sabit tutulmasında (normoglisemi) kritik bir enerji kaynağı olarak işlev görür (Costa-Pinto vd.,2020).

Sahip oldukları bu çeşitlilikler karbohidratları yapılarına ve fonksiyonlarına göre gruplandırmayı gerekli kılmıştır. Bu bağlamda, karbohidratları genel olarak aşağıdaki başlıklar altında sınıflandırılmaktadır.

Monosakkaritler

Monosakkaritler, 3-8 arası karbon atomundan oluşup yapılarında aldehit veya keton grubu bulunduran temel karbohidrat birimleridir. Daha kompleks karbohidratların yapı taşlarını oluşturan bu bileşikler hidrolize edilmezler (Pallardy vd., 2010). Formülündeki karbon atomunun sayısına göre triozlar,tetrozlar, pentozlar ve heksozlar olarak bilinirler. D-gliseraldehit ve L-gliseraldehit olarak bilinen monosakkaritler triozlar grubuna aittir. Pentozlar grubunun en sık rastlanılan örnekleri ise arabinozlar ve ksilozlardır. Heksozlar yaygın olarak sebze ve meyvelerde glikoz ve fruktoz şeklinde bulunurlar. Glikolizde enerji kaynağı olarak rol oynayan bu polimerler, nükleik asitlerin sentezinde de hayati bir işleve sahiptirler (F Haghghatjoo vd., 2024).

Disakkaritler

Disakkaritler, farklı monosakkarit çiftlerinin α - veya β -glikozidik bağlar yoluyla birleşmesinden oluşurlar (Moreno vd., 2012). Laktoz, maltoz, selobiyoz, gentobiyoz ve rutinoz yaygın olarak bilinen ve farmasötik öneme sahip olan indirgeyicinin disakkarit türleridir. Genellikle sofrâ şekeri olarak kullanılan disakkaritler, hem bağırsak bakterileri tarafından enerji kullanmak amacıyla hem de sükrâz aracılığıyla monosakkaritlere (özellikle heksozlara) hidrolize edilebilirler (Mukherjee vd., 2019, Selvaraj, C vd., 2023).

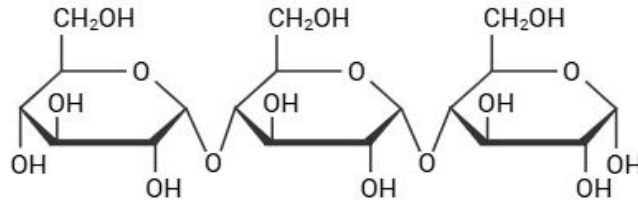
Oligosakkaritler

Oligosakkaritler, 2 ila 10 monosakkarit biriminin glikozidik bağlarla birleşmesi sonucu oluşan antioksidan, antimikrobiyal ve özellikle prebiyotik etkileriyle öne çıkan biyoaktif bileşiklerdir. Ayrıca insan sütünde en çok bulunan bileşenlerden biri olarak da bilinmektedir. Bu biyolojik aktivitelerinden dolayı, gıda endüstrisinde doğal katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeli taşımaktadırlar. Sonuç olarak, oligosakkaritler, doğrudan sağlık yararları sunan doğal bileşikler olmalarının yanı sıra, endüstriyel olarak da stratejik öneme sahiptir. Bu özellikleri ile, gıda endüstrisinde kimyasal katkı maddelerine karşı çevre dostu ve yenilenebilir alternatifler arasında yer almaktadırlar (Mano, M. C. R vd.,2022).

Polisakkaritler

Polisakkaritler, glikozidik bağlarla bağlanmış yüzlerce veya binlerce monosakkarit biriminden oluşan heterojen yapılar olup, hem homojen (homopolisakkarit) hem de heterojen (heteropolisakkarit) yapıda bulunabilirler (Zhao vd., 2022). Bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve deniz yosunu gibi doğal kaynaklardan elde edilen polisakkaritler sadece enerji açısından kullanılmalarıyla değil, aynı zamanda hücreler arasındaki iletişim, sinyal, kan pıhtılaşması gibi görevleri de bulunmaktadır. Yapısal (selüloz, kitin) ve rezerv (nişasta, inülin, glikojen) olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılan bu makromoleküller; biyoyuymululuk, biyoçözünürlük ve toksik olmamaları gibi avantajları sayesinde, son yıllarda farmasötik, gıda, kozmetik ve biyomedikal alanlarda önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Xu vd., 2019).

Polisakkaritler, sahip oldukları çeşitli yapılardan dolayı farklı biyolojik aktiviteler göstermektedirler. Bu sebepten yapı-aktivite ilişkisini anlamak için glikozidik bağlar ve monosakkarit bileşimi gibi fizikokimyasal özellikler üzerine yapılan çalışmalar büyük öneme sahiptir (Meng vd., 2018). Polisakkaritlerin biyolojik aktivitesinin önemli bir yönü antioksidan aktivitesinin olmasıdır. Bu özelliği polisakkaritlerin vücut tarafından üretilen serbest radikalleri temizleme kapasitesini ifade eder. Bu nedenle, gıda ve farmasötik ürünlerde kullanım için doğal olarak oluşan antioksidanlara olan ilgi oldukça fazladır (Taşkın ve Bitiş, 2016).



Şekil 1. Polisakkaritlerin kimyasal yapısı

Polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere diğer makromoleküller arasında yapısal değişkenlik için büyük bir potansiyel sergilemektedirler (Shi, 2016). Gıda endüstrisinde ve tıpta uzun süredir kullanılan polisakkaritler, anti-tümör, immünomodülatör, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral dahil olmak üzere biyolojik aktiviteleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedirler (Yu vd., 2018; Zhu vd., 2021). Bu etkilerin dışında hipoglisemik, yağ düşürücü, kan pıhtılaşmasında, vücut dengesi sağlama ve gıdaları daha uzun saklama gibi birçok etkileri bulunmaktadır. Polisakkaritler bu etkilerinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde ve ilaç taşıyıcı sistem (DDS) olarak kullanılmaktadırlar (Yarley vd., 2021). İlaçların dokuya olan özgüllüğünü, salım oranını ve stabilitesini tahmin etmek zordur. Bu nedenle çok çeşitli kimyasal politikalarla ilacın etkinliğini, toksisitesini ve farmakokinetiğini belirleyen ve hedef bölgeye etkili olan DDS'ler geliştirilmiştir (Zhang, vd., 2011).

Polisakkaritlerin kaynakları

Doğal polisakkaritler, bitki, hayvan, bakteri ve deniz olmakla birlikte dört temel biyolojik kaynaktan elde edilebilmektedir. Bitkisel kaynaklı polisakkaritler, selüloz, hemiselüloz, pektin, nişasta ve arabinogalaktan gibi hücre duvarı bileşenlerinden elde edilirken, hayvansal kaynaklı polisakkaritler genellikle kitin, kondroitin sülfat ve hyaluronan gibi yapı moleküllerini kapsamaktadır (Necas vd., 2008; Wang vd., 2021). Mikrobiyal polisakkaritler, bakteriler tarafından sentezlenen ksantan gam, dekstran ve levan gibi ekzopolisakkaritleri içerirken, deniz kaynaklı polisakkaritler ise alglerden izole edilen agar, aljinat, fukoidan ve karrajenan gibi sülfonatlı bileşiklerden oluşmaktadır (Freitas vd., 2011; Wijesekara vd., 2011). Bu geniş kaynak çeşitliliği, polisakkaritlerin fonksiyonel özelliklerini ve uygulama alanlarını belirleyen en önemli faktörlerden biridir.

Mikrobiyal polisakkaritler

Mikrobiyal polisakkaritler yüksek molekül ağırlığına sahip olup diğer adıyla ekzopolisakkaritler (EPS) de olarak adlandırılan polimerlerdir. Endüstriyel olarak büyük kullanım alanına sahip olan EPS'ler genellikle bakteriler ve mantarlardan izole edilirler. Örneğin; yaygın olarak bilinen bir mikrobiyal polisakkarit olan dekstran hem biyofilm

alışmalarında hem de hücre koruyucu ajan olarak kullanımıyla bilinmektedir. Diğer bir mikrobiyal polisakkarit olan hyaluronik asit ise yüksek nem tutma kapasitesi sayesinde kozmetik alanda büyük ilgi görmektedir (Yıldız vd.,2018 Wu Xia vd.,2020).

Hayvansal polisakkaritler

Biyofonksiyonel çeşitlilikleriyle ve çok yönlü uygulanabilirlikleri nedeniyle hayvansal polisakkaritler yoğun ilgi görmektedirler. En bilinen örneklerden olan kondroitin sülfat eklem sağlığının korunmasında kritik rolü olduğundan dolayı osteoartrit tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer önemli bir hayvansal polisakkarit olarak bilinen heparin ise, kan pıhtılaşmasını önleyen ilaçlarda temel bileşen görevi görür (Linhardt, 2003 Shen Q vd., 2023). Ancak hayvansal kaynaklardan polisakkarit üretiminde karşılaşılan etik ve ekonomik sınırlamalar nedeniyle yeni alternatiflerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Deniz kaynaklı polisakkaritler

Deniz kaynaklı polisakkaritler denizde yaşayan canlı organizmalardan özellikle, deniz yosunlarından elde edilmektedirler. Bu polimer bileşikler yapısal özelliklerine bağlı olarak antioksidan, antiinflamuar ve antitümör aktivite göstermektedirler (Carrasqueira vd., 2025). Ancak hammadde temininden kaynaklanan bazı zorluklar ve istenmeyen immünolojik tepkilere yol açması deniz kaynaklı polisakkaritlerin sürekli üretimini zorlaştırmaktadır. Bu sebepten kullanım alanlarına göre polisakkaritlerin kaynağı da büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, bitkisel polisakkaritler düşük toksisiteleri, sürdürülebilirlikleri ve biyobozunurlukları sayesinde biyomedikal araştırma ve uygulamalarda daha avantajlı bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (Benalaya vd.,2024).

Bitkisel polisakkaritler

Bitkiler tarih boyunca hem gıda hem de tedavi amacıyla kullanılan en doğal kaynaklardandır. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımına dair kadim bilgiler M.Ö 3000 yılından Sümerler ve Mısır papirüslerine dayanmaktadır. Bu kaynaklardan alınan bilgilere göre bitkiler o zamanlardan beri yara iyileştirici, ağrıkesici ve sindirim sistemi sorunlarında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bu bağlamda, bitkilerden elde edilen bileşikler özellikle de polisakkaritler sürdürülebilirlik, biyolojik erişilebilirlik ve düşük toksisite gibi avantajlarıyla ön plana çıkmaktadır. Bitki hücre duvarı genellikle yapısal polisakkaritlerden oluşur. Bu grupta yer alan selüloz, glukoz monomerlerinden oluşan lineer bir yapıya sahiptir ve bitkisel hücre duvarlarında lifsel destek sağlar. Bitkilerde bulunan bir diğer polisakkarit grubu- depolama polisakkaritleri ise bitkinin enerji gereksinimini karşılamak amacıyla sentezlenir. Depolama polisakkaritlerinin en yaygın örneği nişasta olup, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki ana

fraksiyondan oluşur. Nişasta, kloroplastlarda veya amiloplastlarda sentezlenerek enerji rezervi olarak işlev görür (Wang vd., 2022). Gıda endüstrisinde ve tıpta uzun süredir kullanılan polisakkaritler, antioksidan, immünomodülatör, antitümör, antiinflamatuvar ve hipoglisemik aktiviteleriyle iyi bilinmektedir (Zhao vd., 2021 ; Muszynska vd.,2018 ; Yu vd.,2018).

Bu çeşitli özelliklerinden dolayı bitkisel polisakkaritler geniş kullanım alanına sahip olup biyomedikal, gıda, kozmetik gibi alanlarda yoğun ilgi görmektedir. Bu polisakkaritler arasında yaygın olarak bilinen selüloz, hemiselüloz, pektin ve nişasta gibi temel yapılar yer almakta olup bitkinin türüne ve dokusuna bağlı olarak farklı oranlarda sentezlenmektedir (Zhao vd., 2021). Bitkisel polisakkaritlerin ekstraksiyonu, yapılarının korunması ve biyolojik aktivitelerinin sürdürülebilir şekilde elde edilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir.

Polisakkaritlerin antikanser aktivitesi

Kanser, son yıllarda başarılı ilaçların geliştirilmesinde doğal ürünlerin önemli rol oynadığı tıbbi alanlardan biridir. Kanser, yaşamı en çok tehdit eden hastalıklardan biridir; esas olarak genetik, çevresel ve kimyasal faktörler tarafından yönetilebilen hücre bölünmesindeki düzensizliklerden kaynaklanmaktadır (Torre vd.,2016). Küresel epidemiyolojik araştırmalarda (2018), kansere bağlı morbidite ve mortalitenin kümülatif risklerinin sırasıyla %21,4 ve %17,7 olduğu tahmin edilmiştir (Bray vd., 2018). Günümüzde, farklı evrelerdeki kanser hastalığını hafifletmek ve tedavi etmek için cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hedefli tedavi ve immünoterapi gibi yöntemler geliştirilmiştir. Şu anda piyasada kanser için farklı türde ilaçlar bulunmaktadır. Ancak bunların çoğu doku özgüllüğünden yoksundur, kanserli hastaların yaşamlarını olumsuz etkileyebilecek dezavantajlar ve ciddi yan etkilere sahiptir (Parvathaneni vd.,2014 ;Mun vd., 2018). Bu nedenle, kanser tedavisi için yeni toksik olmayan ilaç molekülleri geliştirmek ve bu amaç doğrultusunda doğal kaynaklardan etkili terapötik maddeler belirlemek araştırmacıların en büyük hedeflerinden birisidir. Sülfat radikali açısından zengin olan polisakkaritler, kanser kemoprevansiyonu için en etkili bileşiklerden biri olarak kabul edilmiştir ve etkili yeni antikanser ajanlarının ana doğal kaynaklarını oluşturmaktadır (Costa vd., 2010; Wijesekara vd., 2011). Biyoaktif bileşiklerin, kemoterapi ilaçlarıyla pleyotropik ve sinerjik etkiler gösteren ve kanserin birden fazla yolunu hedef alan güçlü bir antitümör ajanı olduğu kanıtlanmıştır (Lachance vd., 2018). Bitkisel gıdalarda doğal bileşenler olarak bulunan bu biyoaktif bileşenlerin temel olarak ürünlerin besin değerini sağlamanın yanı sıra sağlık üzerine de birçok yararları bulunmaktadır (Biesalski vd., 2009). Çok sayıda çalışma, tümör karşıtı polisakkaritlerin en yaygın mekanizmalarının, doğrudan kanser hücrelerine uygulandığında hücre döngüsü durması, antianjiyogenez ve apoptozise sebep olduğunu göstermiştir (Khan vd.,2019; Guo vd.,2022).

Polisakkaritlerin anti-aging etkileri

Polisakkaritlerin yaşlanma karşıtı aktivitesi, birden fazla biyolojik hedefi olan temel bir biyolojik fonksiyondur. Modern farmakolojik çalışmalar, farklı bitki polisakkaritlerinin serbest radikalleri temizleyerek, telomeraz aktivitesini artırarak, apoptozu düzenleyerek, bağışıklığı güçlendirerek, glikozilasyonu inhibe ederek, mitokondriyal disfonksiyonu iyileştirerek, gen ekspresyonunu düzenleyerek, otofajiyi aktive ederek ve bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek yaşlanma karşıtı etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur (Deng, vd. 2023).

Polisakkaritlerin antioksidan aktiviteleri

Polisakkaritlerin antioksidan aktivitesinin yapısal özellikleriyle bağlantılı olduğu bilinmektedir. Kimyasal yapı ile fonksiyonel aktivite arasındaki ilişki açısından polisakkaritlerin antioksidan kapasitelerini belirleyen kritik faktörler arasında polisakkaritlerin molekül ağırlığı, dallanma derecesi ve sülfatlanma veya asetillenme gibi yapısal modifikasyonlar yer almaktadır (Bai vd., 2022). Doğal kökenli polisakkaritlerin yüksek antioksidan kapasiteye sahip oldukları özellikle son yıllarda yapılan araştırmalarla ortaya koyulmuştur. Polisakkaritler, yapılarında varolan hidroksil, karboksil ve sülfat grupları aracılığıyla serbest radikalleri nötralize edebilmektedirler (Fernandes vd.,2023).

Polisakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri

Küresel sağlık problemlerinin en önde gelen nedenlerinden biri de mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlardır. Zaman geçtikçe antibiyotiklere karşı gelişen direnç, yeni biyolojik ajanların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu sebepten, doğal kaynaklı bileşikler, alternatif veya destekleyici antimikrobiyal ajanlar olarak yoğun ilgi görmektedir (Ventola, 2015). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bitkisel polisakkaritlerin yalnızca yapısal bileşenler değil, aynı zamanda antimikrobiyal potansiyele sahip biyolojik makromoleküller olduğunu ortaya koymaktadır (Zhao vd., 2021).

Bitkisel kökenli polisakkaritlerin antimikrobiyal aktiviteleri biyofilm oluşumunun engellenmesi, bakteri metabolizmasının etkilenmesi ve hücre membran geçirgenliğinin artırılmasıyla ilişkilendirilmektedir. (Liu vd., 2018). Ayrıca polisakkaritlerin, bakteriyel biyofilmlerin oluşumunu engelleme ve hücre adezyonunu azaltma kapasitesine sahip oldukları da bildirilmiştir (Rendueles vd., 2012).

Polisakkaritlerin antiviral etkileri

Bağışıklık sistemi üzerinde ciddi sağlık sorunlarına yol açabilen nedenlerden biri de viral enfeksiyonlardır. Ayrıca viral enfeksiyonlar, dünya genelinde önemli morbidite ve

mortalite nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, doğal polisakkaritlerin, özellikle bitkisel kökenli olanların, antiviral aktivite göstererek virüslerin çoğalmasını engelleyebileceğini ve enfekte hücrelerde viral yayılımı sınırlandırabileceğini ortaya koymaktadır (Desbonnet vd.,2022).

Bitkisel polisakkaritlerin antiviral etkileri birkaç mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bunlar arasında virüs-konakçı hücre etkileşimlerinin engellenmesi, Virüsün hücreye bağlanması (viral adsorption) veya girişini inhibitör etkisi yer almaktadır. Özellikle bitkisel kaynaklı polisakkaritler farmasötik açıdan yüksek potansiyel taşımaktadır. Bitkisel polisakkaritlerin bağışıklık uyarıcı etkileri sayesinde, semptomların hafifletilmesine ve viral yükün düşürülmesine katkısı olabileceği literatürde belirtilmiştir. Ayrıca, bazı polisakkaritlerin düşük toksisiteye sahip olması avantaj olarak değerlendirilebileceği vurgulanmıştır (Sen vd.,2021). zhaBu bulgular, bitkisel polisakkaritlerin yalnızca besleyici ve yapısal bileşikler değil, aynı zamanda antiviral terapötik ajanlar olarak da değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Polisakkaritlerin antiinflatuvar etkileri

İnflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı veya çevresel stres faktörlerine karşı organizmanın doğal savunma mekanizmasıdır; ancak kronik veya kontrolsüz inflamatuvar yanıt, kanser, diyabet, ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojinin gelişiminde kritik rol oynamaktadır (Medzhitov, 2008). Bu bağlamda, inflamatuvar sürecin düzenlenmesine katkı sağlayabilecek doğal biyomoleküllerin araştırılması, günümüzde giderek artan bilimsel bir ilgi alanı haline gelmiştir. Doğal polisakkaritlerin yalnızca antioksidan ve antimikrobiyal etkilerle sınırlı kalmadığı, aynı zamanda belirgin antiinflatuvar özellikler de sergilediği yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Shen vd.,2024; Yin vd.,2024).

Pro-inflatuvar sitokinler (TNF- α , IL-6, IL-1 β gibi), hastalık ilerlemesini hızlandırıyor. Özellikle NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) yolu, inflamasyonun tetiklenmesinde anahtar sinyal yoludur. Birçok bitkisel polisakkaritin, TNF- α , IL-6, IL-1 β gibi inflamatuvar mediyatörlerin üretimini baskılayarak, hepatosit hasarı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu azalttığı literatürde belirtilmiştir (Wei vd.,2024).

Polisakkaritlerin immünmodülatör etkileri

Bağışıklık sistemi, organizmanın i ve dış tehditlere karşı korunmasında temel rol oynayan kompleks bir savunma mekanizmasıdır. Doğal polisakkaritlerin bağışıklık sistemi üzerindeki en önemli etkilerinden biri de, makrofaj aktivitesini artırmaları ve sitokin üretimini düzenlemeleridir. Moleküler mekanizmaya bakıldığında ise, NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt gibi

sinyal yollarını aktive ederek immün yanıt genlerinin ekspresyonunu artırır. Makrofajlarda sitokin üretimini (TNF- α , IL-1 β , IL-6) artırarak inflamatuvar yanıtı kontrol altına alabilir ve fagositoz aktivitesini uyarabilir (Zhao vd.,2020).

Bitkisel kaynaklı polisakkaritlerin immünmodülatör etkileri farmasötik açıdan büyük önem taşımaktadır. Örneğin, *Ganoderma lucidum* polisakkaritleri ise NK hücre aktivitesini uyarak tümör ve viral enfeksiyonlara karşı savunmayı desteklemiş; *Astragalus membranaceus* polisakkaritleri, T ve B hücre proliferasyonunu artırarak bağışıklık yanıtını güçlendirmiştir (Gao vd., 2005; .Du vd.,2011). Bu etkiler, polisakkaritlerin yalnızca besleyici ve yapısal bileşikler değil, aynı zamanda immün düzenleyici ve farmakolojik potansiyele sahip biyolojik ajanlar olduğunu desteklemektedir.

Polisakkaritlerin hipoglisemik / antidiyabetik etkileri

Diyabet, insülin üretiminde yetersizlik veya insülin direncine bağlı olarak kan glukoz düzeylerinin kronik olarak yükselmesi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, doğal polisakkaritlerin özellikle tip 2 diyabet modellerinde hipoglisemik ve antidiyabetik etkiler sergilediğini göstermektedir .Bu biyomoleküller, glikoz metabolizmasını düzenleyerek kan şekeri seviyelerinin kontrol altına alınmasına katkıda bulunarak, pankreas β -hücre fonksiyonlarını koruyarak insülin üretimini desteklemektedir (Zhang vd., 2019).

Bitkisel polisakkaritlerin hipoglisemik etkileri birkaç mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar arasında glukoz emiliminin bağırsakta yavaşlatılması, insülin sinyal yollarının iyileştirilmesi, glikojen sentezinin artırılması ve glukozun periferik dokular tarafından kullanımının artırılması yer almaktadır (Zhou vd., 2025). Örneğin; *Morus alba* (dut) ve *Opuntia ficus-indica* (çöl inciri) polisakkaritleri, diyabetli hayvan modellerinde kan glukoz düzeylerini anlamlı şekilde düşürmüş ve insülin duyarlılığını artırmıştır (Zhang vd., 2019; Li vd., 2020).

Polisakkaritlerin hipolipidemik etkileri

Hiperlipidemi, kandaki total kolesterol, LDL ve trigliserid düzeylerinin yükselmesi ile karakterize edilen bir metabolik durumdur ve ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar ve inme riskini artırmaktadır (Hill vd., 2020).

Polisakkaritlerin hipolipidemik etkileri çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bunlar arasında bağırsaklarda kolesterol emiliminin azaltılması, hepatik lipogenez yollarının inhibisyonu, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunun engellenmesi ve HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) düzeylerinin artırılması sayılabilir (Wang vd., 2020)..

Bitkisel kaynaklı polisakkaritlerin kardiyoprotektif etkileri hem doğrudan lipid düzenleme hem de antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri ile desteklenmektedir. Örneğin, *Plantago ovata* (psyllium) ve *Salvia miltiorrhiza* polisakkaritlerinin, hiperlipidemik modellerde LDL ve total kolesterol düzeylerini düşürdüğü, HDL seviyelerini artırdığı ve damar sağlığını koruduğu rapor edilmiştir (Luo vd., 2023; Zhu vd., 2024). Bu veriler, bitkisel polisakkaritlerin metabolik ve kardiyovasküler sağlık üzerinde doğal potansiyel ajanlar olduğunu göstermektedir.

Polisakkaritlerin hepatoprotektif etkileri

Karaciğer, metabolizma, detoksifikasyon ve enerji homeostazı açısından merkezi bir organdır. Karaciğerin toksik ajanlar, viral enfeksiyonlar veya oksidatif stresle karşılaşması, hepatositlerde hasara ve kronik karaciğer hastalıklarının gelişimine yol açabilir. Tedavi amaçlı yapılan çalışmalarda , doğal polisakkaritlerin özellikle bitkisel kaynaklı olanlarının karaciğer fonksiyonlarını koruyucu hepatoprotektif etkiler sergilediğini göstermektedir (Qu vd., 2020).

Bitkisel polisakkaritlerin hepatoprotektif etkileri serbest radikallerin nötralizasyonu, lipid peroksidasyonunun azaltılması, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6) baskılanması ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GPx) aktivitesinin artırılması gibi mekanizmalarla gerçekleştirilmektedir (Wei vd., 2024).

Polisakkaritlerin Nöroprotektif Etkileri

Nörodejeneratif hastalıklar, merkezi sinir sisteminde ilerleyici hücre kaybı ve fonksiyon bozukluğu ile karakterize edilir ve Alzheimer, Parkinson gibi hastalıkları içerir. Doğal polisakkaritlerin ,özellikle, bitkisel kökenli olanlarının sinir hücrelerini oksidatif stres, inflamasyon ve apoptotik hasara karşı koruyarak nöroprotektif etki gösterebileceği yapılan araştırmalarla belirtilmiştir (Xu vd., 2022; Peng vd., 2023).

Özellikle bitkisel kaynaklı polisakkaritler farmasötik açıdan önemli potansiyele sahiptir. Örneğin, *Polygonatum sibiricum* polisakkaritleri, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını geliştirdiği ve Alzheimer modelinde sinaptik plastisiteyi koruduğu rapor edilmiştir (Luo vd., 2022). Benzer şekilde, *Lycium barbarum* polisakkaritleri, yaşa bağlı bilişsel gerilemeyi yavaşlatıcı etki göstermektedir (Zhao vd., 2020).

Polisakkaritlerin Prebiyotik Etkileri

Bağırsak mikrobiyotası, insan sağlığında kritik rol oynayan ve metabolik, immün ve nörolojik fonksiyonlarla yakın ilişki içinde olan kompleks bir ekosistemdir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, özellikle bitkisel polisakkaritlerin, sindirilemeyen karbonhidrat bileşikleri

olarak bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde modüle ederek prebiyotik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır (Gibson vd., 2017). Bitkisel polisakkaritler, bağırsakta faydalı bakterilerin (ör. *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri) büyümesini destekleyerek, patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engeller ve bağırsak dengesini korur. Bu süreç, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar; asetat, propiyonat, bütirat) üretimini artırarak bağırsak pH'sını düşürmekte ve metabolik sağlığı olumlu yönde etkilemektedir (Liu vd., 2018).

Özellikle bitkisel kaynaklı polisakkaritler, sadece bağırsak mikrobiyotasını desteklemekle kalmayıp, aynı zamanda immün sistemin düzenlenmesine ve inflamatuvar yanıtların kontrolüne de katkıda bulunmaktadır. Örneğin, inülin ve arabinoksilan gibi bitkisel polisakkaritler, bağırsak bakterileri aracılığıyla SCFA üretimini artırarak inflamasyonun azalmasına ve metabolik fonksiyonların iyileşmesine yardımcı olmaktadır (Gibson vd., 2017; Wang vd., 2020).

Polisakkaritlerin Hipoürisemik Etkileri

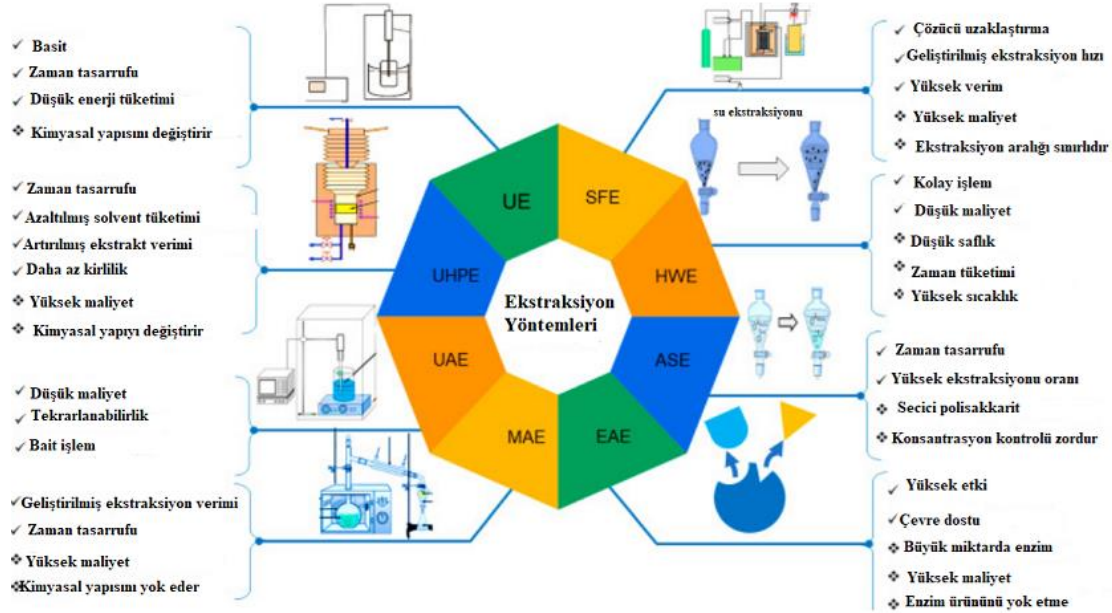
Hiperürisemi, kandaki ürik asit seviyelerinin normalin üzerine çıkması ile karakterize edilen metabolik bir durumdur ve gut hastalığı, böbrek taşı oluşumu ve kardiyovasküler hastalık riskini artırmaktadır (Li vd., 2019). Son yıllarda yapılan araştırmalar, doğal polisakkaritlerin, özellikle bitkisel kökenli olanların, serum ürik asit düzeylerini düzenleyerek hipoürisemik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bitkisel polisakkaritlerin hipoürisemik etkileri, esas olarak ürik asitin üretimini ve atılımını etkileyen metabolik yollar üzerinden gerçekleşmektedir. Bu polisakkaritler, ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek ürik asit üretimini azaltabilmekte ve böbreklerden ürik asit atılımını artırarak hiperürisemi düzeylerini düşürebilmektedir (Wang vd., 2020). Ayrıca antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri, hiperüriseminin neden olduğu oksidatif stres ve inflamatuvar hasarın azaltılmasına katkı sağlamaktadır.

Özellikle bitkisel kaynaklı polisakkaritler farmasötik potansiyel taşımaktadır. Örneğin, *Ganoderma lucidum* ve *Astragalus membranaceus* polisakkaritlerinin, hiperürisemi modellerinde serum ürik asit düzeylerini düşürdüğü ve böbrek histopatolojisini koruduğu rapor edilmiştir (Li vd., 2019; Zhang vd., 2021). Bu bulgular, bitkisel polisakkaritlerin yalnızca besleyici ve yapısal bileşikler olarak değil, aynı zamanda metabolik hastalıkların yönetiminde potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Polisakkaritlerin ekstraksiyonu

Polisakkaritlerin kullanılan ekstraksiyon yöntemleri, yüksek verimde elde edilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Günümüzde doğal polisakkaritleri elde etmek için polisakkarit

denatürasyonunu önleme ve yüksek verim temel prensibi ile sıcak su ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, enzimatik destekli ekstraksiyon, süper kritik sıvı ekstraksiyonu, ultra yüksek basınçlı ekstraksiyon, alkalın solvent ekstraksiyonu gibi farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılmaktadır (Niyigaba vd., 2021) (Şekil 2).



Şekil 2. Ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları açısından karşılaştırılması. Ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), Sıcak su ekstraksiyonu (HWE), Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), Ultrason ekstraksiyonu (UE), Enzimatik destekli ekstraksiyon (EAE), Süper kritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), Ultra yüksek basınçlı ekstraksiyon (UHPE), Alkalın solvent ekstraksiyonu (ASE) Niyigaba vd., (2021)

Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi yüksek frekansta ses dalgaları kullanılarak ortamda kavitasyon oluşumuna dayalı olarak biyoaktif bileşiklerin saflaştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Ancak uzun süreli ultrasonik dalga uygulanması ve uygulama sırasında oluşan sıcaklık elde edilen polisakkaritin yapısının bozulmasına ve verimin düşmesine neden olabilmektedir (Wang vd.,2019). Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi mikrodalga enerjisi kullanılarak biyolojik materyellerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan bir tekniktir. Ancak ekipman maliyeti ve işlem zamanı oluşan enerji göz önünde bulundurulduğunda alternatif bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Enzimatik destekli ekstraksiyon adından da belli olduğu üzere enzimler kullanılarak gerçekleştirilen bir saflaştırma yöntemidir. Saflaştırma zamanı kullanılan enzimin maliyeti ve işlemin süresinin uzun olması yöntemin dezavantajlarındandır (López-Salazar vd., 2023). Süper kritik sıvı ekstraksiyonu çözücüler yardımıyla gerçekleştirilen ekstraksiyon yöntemidir. Genellikle yaygın olarak kullanılan çözücü CO₂'tir. Lipofilik bileşiklerin ekstraksiyonu için daha uygundur. Polisakkarit gibi polar bileşiklerin ekstraksiyonunda CO₂'in apolar olmasından dolayı sınırlı verimin elde edilmesine neden olmaktadır. Ultra yüksek basınçlı ekstraksiyon 100-600 MPA izostatik

basınçla genellikle su veya düşük polar çözücüler kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma metodudur. Sadece polar çözücüler için uygun olması ve endüstride uygulanabilirliğinin pahalı olması yöntemin dezavantajlarından. Alkalın solvent ekstraksiyonu bazik çözücüler yardımıyla yüksek verimde polisakkarit elde edilmesine sebep olsada işlem sonucunda oluşan toksik atık ve işlemden sonra nötralizasyon gerektirdiğinden dolayı alternatif bir yöntem gereklidir. Bütün bu yöntemlerin yanı sıra basit, etkili ve ekonomik bir saflaştırma tekniği olan üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi, polisakkaritleri doğal kaynaklardan ekstrakte etmek ve ayırmak için yaygın olarak uygulanmaktadır (Yan vd., 2018).

Üç Fazlı Ayırma Yöntemi (TPP)

TPP sistemi, t-bütanol ve amonyum sülfattan oluşur. Organik çözügece zengin üst faz, protein bakımından zengin bir ara faz ve tuz bakımından zengin bir alt faz olmak üzere üç fazın oluşumu yoluyla kısa sürede (<60 dakika) süpernatant çözeltisilerden veya süspansiyonlardan biyoaktif moleküller hızlı bir şekilde ekstrakte ve izole edebilmektedir (Rao ve Rathod, 2015). Pigmentler, lipidler, inhibitörler ve hidrofobik bileşikler üst t-bütanol fazında zenginleşirken, polisakkaritler ve hidrofilik bileşikler alt sulu fazda yoğunlaşmaktadır. Ara yüzey fazında ise protein çökeltisi oluşmaktadır. TPP; iyonik güç etkileri, kosmotropi, ozmotik stres, yığılma etkileşimleri ve ara yüzey gerilimi gibi çeşitli faktörlerin etkilediği kompleks bir yapı sergileyen fizikokimya esaslı bir tekniktir. Ayrıca TPP yöntemi oda sıcaklığında 1 saat veya daha kısa sürede gerçekleşir ve kimyasallar geri dönüştürülebilir. TPP kolayca ölçeklendirilebilir ve doğrudan süpernatant çözeltisiler veya süspansiyonlarda kullanılabilir. TPP yöntemi; proteinler, enzimler, enzim inhibitörleri, karbohidratlar, yağlar veya lipidler ve küçük moleküllü organik maddeler gibi çeşitli biyoaktif molekülleri ekstrakte etmek ve ayırmak için yaygın olarak araştırılmış ve başarıyla kullanılmıştır (Yan vd., 2018).

TPP'nin özellikle protein ve fenolik bileşikler gibi istenmeyen safsızlıkları uzaklaştırma kapasitesi, biyolojik aktivite analizlerinin güvenilirliğini artırmaktadır. Saflaştırılan polisakkaritlerin antikanser etkilerinin değerlendirilmesi, bileşiğin doğrudan etkisini gözlemlemek açısından önem arz etmektedir. Nitekim çeşitli bitkisel kaynaklardan izole edilen polisakkaritlerin, bazı tümör hücre hatlarında antiproliferatif aktivite gösterdiği; hücre döngüsü regülasyonunu etkileyerek apoptoz sürecini indükleyebildiği ve oksidatif stres mekanizmalarını modüle edebildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Adewale vd., 2024, Gan vd., 2020). Bu bağlamda, TPP ile elde edilen saf fraksiyonların hücre kültürü modellerinde biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi, bu bileşiklerin potansiyel antikanser ajanlar olarak araştırılmasına yönelik önemli deneysel kanıtlar sunmaktadır (Liu vd.,2019).

Prangos Ferulaceae (L.) bitkisi

Bu tez kapsamında çalışılan *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., Apiaceae familyasına ait, Batı Asya ve Anadolu'da yayılış gösteren ve dünya genelinde 185 farklı türe sahip bir bitkidir. Türkiye'de 17 farklı türü bulunmakta ve bu türlerden 8'i endemiktir (Orrell vd., 2013). Ülkemizde Doğu, Orta, Güney ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yetişmektedir. Etnobotanik olarak geleneksel tıpta antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve sindirimi kolaylaştırıcı etkileriyle bilinen aromatik bir bitkidir (Tosun vd., 2011; Mohammadhosseini, 2017). Mevcut literatürde bu bitkinin uçucu yağları ve fenolik bileşikleri üzerine bazı fitokimyasal araştırmalar bulunsa da, polisakkarit profiline, ekstraksiyon teknolojilerine ve biyolojik aktivitelerine yönelik sistematik çalışmalar oldukça sınırlıdır.

aşır bitkisi ile yapılan bir çalışmada bitkinin tanen, terpen, saponin, nişasta, uçucu yağ, reçine ve alkaloid içerdiği belirlenmiş ve içerdiği bileşimler sayesinde antifungal, antiprotozoal, antibakteriyel ve antioksidan etkisinin olduğu bildirilmiştir (Duru ve Şahin, 2015).

KURAMSAL TEMELLER

Karbohidratlar, biyolojik sistemlerde enerji depolama, yapısal bütünlük sağlama ve hücreler arası iletişim gibi temel fizyolojik süreçlerde görev alan hem yapısal hem de işlevsel yönleriyle en önemli biyomoleküllerden biridir (Berg vd., 2019). Enerji metabolizması için substrat olan karbohidratlar tokluk, kan şekeri kontrolü ve lipit metabolizmasında da rol oynarlar (Gush vd., 2021). Son zamanlarda polisakkaritlere olan ilgi, yalnızca biyolojik aktivitelerinden değil, aynı zamanda gıda, ilaç ve kozmetik gibi birçok endüstride hammadde olarak kullanımlarından kaynaklanmaktadır (Benalaya vd., 2024).

Bitki polisakkaritleri, doğada bol miktarda bulunan ve hücre-hücre iletişimde, bağışıklık sisteminin tanınmasında ve patojen enfeksiyonlarına karşı savunma mekanizmalarının harekete geçirilmesinde rol oynayan bileşenlerden biridir. Biyoaktif bitki polisakkaritleri, toksik olmama avantajına sahiptir ve antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuar, antikoagülan, antibakteriyel ve antikanser aktiviteler gibi çeşitli işlevlere sahiptir. Bitki polisakkaritlerinin biyolojik aktivitesi, şeker bileşimlerine, moleküler boyutlarına, fonksiyonel grupların dağılımına, ekstraksiyon yöntemine, işlem prosedürlerine ve kimyasal modifikasyonlara bağlıdır (Govindarajan, S ; Noor, A 2021).

Geleneksel olarak, en klasik ve iyi bilinen yaklaşım olarak kabul edilen sıcak su ekstraksiyonu, bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan polisakkaritler elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstrakte edilen polisakkaritler, etanol çöktürme, fraksiyonel çöktürme, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyonu ve afinite kromatografisi gibi çeşitli tekniklerin bir kombinasyonu yoluyla daha da saflaştırılabilir (Zhang vd., 2007; Wasser vd., 2010; Zong 2012). Bununla birlikte, bu ekstraksiyon ve saflaştırma protokolleri genellikle düşük verim, çok sayıda çözücü, uzun işlem süresi, yüksek enerji tüketimi, pahalı ve çok adımlı protokollerle ilişkilidir. Gerekli ekipman da yüksek yatırım ve bakım maliyetleri gerektirmektedir. Bu nedenle, polisakkarit ekstraksiyonu için basit, verimli, ekonomik ve çevre dostu teknikler geliştirilmelidir (Niyigaba vd., 2021). Ayrıca, polisakkarit ekstraksiyon yöntemleri, polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerini ve kimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir ve dolayısıyla uygulanabilirliğini de etkilemektedir. Bütün bu sebepler, biyoaktif polisakkaritin doğrudan elde edilmesi için uygun bir ekstraksiyon stratejisinin seçimini özellikle önemli hale getirmektedir. Ekstraksiyon teknolojisinin sürekli inovasyonu ve optimizasyonu ile, polisakkaritler için geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin bazı

dezavantajlarının üstesinden gelmek amacıyla yenilikçi ekstraksiyon stratejileri geliştirilmiştir. Örneğin ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon ve bu yöntemlerin kombinasyonlarının (enzim/ultrason/mikrodalga destekli ekstraksiyon) uygulandığı teknikler kullanılmaktadır. Bu destekli ekstraksiyon stratejileri sadece ekstraksiyon süresini kısaltmak ve doğal kaynaklardan polisakkaritlerin ekstraksiyon verimini artırmakla kalmaz, aynı zamanda polisakkaritlerin biyolojik aktivitelerini de geliştirir (Garcia-Vaquero vd., 2017).

Biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu ve ayrılmasında manyetik alanın da uygulanmasına ilişkin birçok çalışma yapılmıştır (Chu vd. 2009, Zhou vd. 2012; Zhang vd. 2015; Wu vd. 2018). Yeşil teknoloji olarak kullanılan manyetik ayırma yöntemi yenilikçi bir metot olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, çevre dostu ve enerji tasarrufludur ve gelecekte daha çekici ve güçlü olacağı düşünülmektedir. Yaygın olarak kullanılan solventlerle manyetik alanın desteklediği ekstraksiyon işlemlerinde, ayırma verimliliğini belirli bir dereceye kadar artırabildiği ve farklı manyetik alan yoğunluklarının etkisinin farklı olabileceği gösterilmiştir (Feng vd., 2022). Manyetik alan destekli ekstraksiyon teknikleri yavaş yavaş geliştirilip popüler hale gelmeye başlamıştır. Bu tekniklerle flavonoidler (Cai vd., 2020), alkaloidler (Zagula vd., 2017; Wu vd., 2018), bitkisel yağlar (Zhang vd., 2015), polifenoller (Zagula vd., 2017; Cai vd., 2020), proteinler (Upadhyay vd., 2021), polisakkaritler (Zhang vd., 2021) ve mineral bileşenler (Zagula vd., 2017) ekstrakte edilmiştir.

Chen ve arkadaşları tarafından; *Inonotus obliquus*'tan elde edilen polisakkaritlerin verimini ve saflığını en üst düzeye çıkarmak amacıyla, ultrasonik/mikrodalga destekli ekstraksiyon (UMAE) koşullarını optimize etmek için RSM yöntemi kullanılmıştır. UMAE ile optimum koşullar altında ekstraksiyon süresinin 19 dakika olduğu, polisakkaritlerin verimi ve saflığının sırasıyla %3,25 ve %73,16 olup, geleneksel sıcak su ekstraksiyonunun üzerinde ve öngörülen değere yakın olduğu (sırasıyla %3,07 ve %72,54) belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, polisakkaritlerin ultrasonik/mikrodalga destekli ekstraksiyonunda geleneksel sıcak su ekstraksiyonuna kıyasla yüksek verim elde edildiği bildirilmiştir (Chen vd., 2010).

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *Phellinus igniarius* miselinden ultrasonik destekli polisakkarit ekstraksiyonu yapılarak sıcak su ekstraksiyonuna kıyasla daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği, elde edilen verimin yaklaşık %22,64 arttığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2014).

Zhi-Jian Tan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise Aloe polisakariti (APS) ve proteini TPP tekniği kullanılarak tek aşamada aynı anda saflaştırılmış, maksimum ekstraksiyon verimliliği %26,35 tuz konsantrasyonunda elde edilmiş, daha düşük sıcaklığın (35°C'nin

altında) APS ve proteinin ekstraksiyonu için daha uygun olduğu belirtilmiştir. (Zhi-Jian Tan vd., 2015).

Zhu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da, *Cordyceps gunnii* mycelia polisakkaritlerinin ultrasonik ekstraksiyon sırasında optimizasyon koşulları 400 W, 15 dakika ve 1 g/L olarak belirlenmiştir. En yüksek verim %12,6 olarak elde edilmiş ve antitümör aktivitesi ultrasonik gücün artmasıyla önce artmış, ardından azalmış ve optimum koşullar altında sırasıyla %79,7, %70,3 ve %69,8'e ulaşmıştır (Zhu vd., 2016).

Yan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Corbicula fluminea*'dan TPP ile sinerjize edilmiş ultrason kullanılarak ekstrakte edilen polisakkaritlerin veriminin (%11,22), TPP (%9,32) ve ultrason ekstraksiyonundan (%6,05) daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Yan vd., 2018).

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan başka çalışmada ise *Phellinus baumii*'nin kültür sıvısından biyoaktif ekzopolisakkaritleri (EPS) doğrudan ekstrakte etmek için TPP kullanılmıştır. Optimize edilen şartlarda, 30 dakika ve 35°C'de EPS ekstraksiyon veriminin %52,09 olduğu, daha sonra yapılan ultrason destekli TPP ile geleneksel TPP ile karşılaştırıldığında ekstraksiyon veriminde ~%9,12 artış ve ekstraksiyon süresinde ~%80 azalma ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Kısmen saflaştırılmış EPS'nin karbohidrat (%88,21) ve üronik asit (%3,37) içeriklerinin, geleneksel etanol çöktürme ve ayırma yöntemleriyle elde edilen EPS-C'den daha yüksek olduğu, EPS ve EPS-C benzer ön yapısal özellikler ve farklı monosakkarit bileşimleri ve moleküler ağırlıkları sergilediği, EPS'nin antioksidan kapasiteleri, α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitör etkileri ve makrofaj stimülasyon aktivitelerinin de EPS-C'ninkilerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu nedenlerle, basit ve çevreci bir ayırma tekniği olan TPP'nin, diğer mantarların fermantasyon sıvılarından biyoaktif EPS'leri doğrudan ekstrakte ve ayırmak için kullanılabileceği de vurgulanmıştır (Wang vd., 2019).

Wang ve arkadaşları; sıcak su ekstraksiyonu ile *Bletilla ochracea* Schltr. polisakkaritlerinin ekstraksiyon parametrelerini optimize etmek için yanıt yüzey metodolojisi (RSM) kullanmışlardır. Sonuçlar, optimum koşulların 82°C sıcaklık, 85 dakikalık bir süre ve 30 mL/g sıvı/materyal oranını içerdiğini göstermiştir. Bu koşullarda, $26,45 \pm 0,18$ deneysel verim elde edilmiştir (Wang vd., 2020).

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise TPP ve gradyan amonyum sülfat çöktürme (GNP) yöntemi ilk kez taze bamya kabuklarından (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) biyoaktif polisakkaritleri (OPS'ler) ekstrakte etmek ve ayırmak için kullanılmıştır. Sonuçlar, TPP'den sonra %50 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluğunda GNP ile elde edilen OPS-50'nin, sırasıyla %30 ve %40 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ doygunluklarında GNP ile elde edilen OPS-30

ve OPS-40 ile karşılaştırıldığında, aynı monosakkarit bileşimi ve farklı molar oranlarla daha yüksek verim, karbohidrat (%86,82) ve üronik asit (%22,34) içeriği olduğunu göstermiştir. OPS-50'nin, OPS-30 ve OPS-40 ile karşılaştırıldığında daha düşük ortalama moleküler ağırlığa, daha esnek zincire ve nispeten daha gevşek yüzey yapısına sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, OPS-30 ve OPS-40'a kıyasla OPS-50'nin daha güçlü, antioksidan kapasite ve α -amilaz ve α -glukozidaz *in vitro* inhibitör aktivitesi sergilediği belirlenmiştir (Wang vd., 2020).

Yan ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada da ham sarımsaktan (*Allium sativum* L.) polisakkaritleri (GPS'ler) izole etmek için ilk kez gradyan etanol çöktürme (GEP) ile birleştirilmiş TPP yöntemi kullanılmıştır. %80 etanol çöktürme uygulanan grupta daha yüksek karbohidrat ($86,68 \pm 0,90$) ve üronik asit ($12,89 \pm 0,09$) içeriğine, daha düşük moleküler ağırlığına ($8,93 \times 10^3$) sahip olduğu ve diğer gruplara göre daha gevşek yüzey morfolojisine sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, dört grup arasında, %80 etanol çöktürme yapılan grupta en güçlü antioksidan kapasitesi, α -amilaz ve α -glikosidaz üzerinde inhibisyon etkisi ve makrofaj hücreleri üzerinde *in vitro* nitrik oksit uyarıcı aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Yan vd., 2021).

Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, TPP yöntemlerinden olan ultrasonik destekli üç fazlı bölme (UTPP) kullanılarak kabak çekirdeği yağı (PSO), kabak çekirdeği proteini (PSP) ve kabak çekirdeği polisakaritinin (PSPS) eşzamanlı ekstraksiyonu ve ayrılmasının ekstraksiyona etkileri araştırılmıştır. UTPP ile ekstrakte edilen PSO'nun yağ asidi bileşimi ve fizikokimyasal özellikleri, diğer yöntemlerle elde edilen polisakkarit miktarı ile benzer olduğu ve bu nedenle UTPP, kabak çekirdeğinden PSO, PSP ve PSPS'nin aynı anda ekstraksiyonu ve ayrılması için etkili bir teknik olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2021).

Yan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, taze acı kabaktan (*Momordica charantia* L) polisakkaritler (BPS'ler) farklı çözücülerde (distile su, sitrik asit ve 1,25 mol/L NaOH/0,05% NaBH₄) gerçekleştirilen ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve taze acı kabağın suyundan TPP dahil olmak üzere oda sıcaklığında iki farklı ekstraksiyon tekniği ile elde edilmiştir. Sıkma işleminden sonra, elde edilen acı kabak suyu doğrudan TPP sistemine tabi tutulmuş ve %14,36'lık bir ekstraksiyon verimi ile kısmi saflaştırılmış BPS-J elde edilmiştir. UAE ile acı kabak tortularından BPS'leri ekstrakte etmek için üç farklı çözücü kullanılmıştır. Ardından, etanol çökeltme, deproteinizasyon, diyaliz ve liyofilizasyon işlemleri gerçekleştirilerek %3,09, %3,82 ve %4,18 ekstraksiyon verimleriyle BPS-W, BPS-C ve BPS-A olmak üzere üç kısmi saflaştırılmış BPS elde edilmiştir. Bu çalışmada ekstraksiyon yöntemlerinin elde edilen BPS'lerin fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktiviteleri üzerindeki etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi de amaçlamıştır.

Sonuçlar, ekstraksiyon yöntemlerinin ekstraksiyon verimi, kimyasal bileşim, ortalama moleküler ağırlık (Mw), monosakkarit bileşimi, BPS'lerin ön yapısal karakterizasyonu ve mikro yapısı üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Acı kabak kalıntısından distile suda UAE ile elde edilen BPS-W örneği, sitrik asitte UAE ile ekstrakte edilen BPS-C, 1,25 mol/L NaOH/0,05% NaBH₄'te UAE ile ekstrakte edilen BPS-A ve acı kabak suyundan TPP ile ekstrakte edilen BPS-J'den daha yüksek üronik asit içeriğine (%24,22), daha güçlü antioksidan kapasiteye ve α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir (Yan vd., 2021).

Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da *Sanghuangporous vaninii* sporlarından dört polisakkarit, ilk kez sırasıyla TPP, TPP öncesi enzim ön işlemi (E-TPP), TPP öncesi ultrasonik ön işlem (U-TPP) ve TPP öncesi ultrasonik ön işlemi takiben enzim ön işlemi (E/U TPP) yöntemleri ile ekstrakte edilmiş, fizikokimyasal özellikleri, *in vitro* farmakolojik fonksiyonları belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. TPP destekli ekstraksiyon yönteminin polisakkaritlerin ekstraksiyon verimi, kimyasal özellikleri, monosakkarit bileşimleri ve moleküler ağırlıkları üzerinde dikkate değer etkileri olduğu gösterilmiştir. Özellikle, E/U-TPP ile elde edilen polisakkaritlerin en yüksek ekstraksiyon verimini (%25,40), karbohidrat içeriğini (%88,50) ve en düşük protein içeriğini (%0,86) gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile biyoaktif polisakkaritler için etkili ve umut verici bir ekstraksiyon tekniğinin önerildiği ve ayrıca ekstrakte edilen polisakkaritlerin fonksiyonel gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında uygulanma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Jiang vd., 2023).

Zou ve arkadaşları; dut yaprağı polisakkaritlerinin ekstraksiyonu için ultrasonik destekli bir prosedür gerçekleştirerek Box-Behnken tasarımı ile yanıt yüzey metodolojisi kullanmışlar. Dört faktör araştırılmış ve işlemi etkileyen faktörlerin önem sırasına göre, ekstraksiyon sıcaklığı > sıvı-malzeme oranı > ultrasonik güç olduğu bulunmuştur. Parametreler 16:1 mL/g sıvı-malzeme oranına, 58 dakikalık ekstraksiyon süresine, 65 °C ekstraksiyon sıcaklığına ve 500 W ultrasonik güce ayarlanmıştır. Bu koşullar altında, elde edilen polisakkaritlerin verimi %14,47 olmuştur; bu değer öngörülen değere yakın olduğu ve yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile optimize edilmiş ekstraksiyon işleminin uygulanabilir olduğu gösterilmiştir (Zou vd., 2025).

M.Hui ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Angelica sinensis*'ten (AP) elde edilen polisakkaritlerin siklofosamid (CY) ile birlikte uygulandığında, kanserli hastalarda hematopoietik ve gastrointestinal dokular üzerinde sitoprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, daha iyi antitümör aktiviteleri ve daha az yan etkileri olan polisakkaritleri araştırmanın büyük önem taşıdığı vurgulanmaktadır (Hui vd., 2006).

Abbas-Mohammadi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bitkinin içeriğindeki aktif bileşenlerin, AChE (asetilkolinesteraz) inhibitörü etkisi göstermesinden dolayı da Alzheimer hastalığında terapötik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Abbas-Mohammadi vd., 2018). Ayrıca birçok bitkide bulunan doğal polisakkaritlerin insan bağışıklık sistemini uyardığı, viral replikasyonu önlediği, serbest radikalleri temizlediği ve daha az toksisite ve daha az yan etki ile lipid peroksidasyonunu önlediği bilinmektedir (Ke vd, 2011; Tian vd., 2011).

Topdaş tarafından yapılan bir çalışmada ise çasır bitkisinin antioksidan içeriğinin incelendiği bir çalışmada H1N1 virüsüne karşı antiviral aktivitesi olduğu sonucuna varılmıştır. Bir başka çalışmada ise bitkinin esansiyel yağ bileşenlerinin yüksek antioksidan, antimikrobiyal ve *in vitro* nöroprotektif aktiviteleri ile fonksiyonel özelliği olduğu bu nedenle gıda sektöründe ve ilaç katkı maddesi olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu ifade edilmiştir (Topdaş, 2018).

Trametes versicolor'dan izole edilen fukoidan ve sepia polisakkaritlerinin, genellikle düşük toksisite seviyelerine ve yüksek güvenliğe sahip olan kanserin tedavisinde uygulanabileceği gösterilmiştir (Li vd., 2018 ; Hsu vd.,2019).

Liu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Astragalus membranaceus*'tan saflaştırılan polisakkaritlerin meme kanseri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu belirlenmiş, APS inkübasyonundan sonra MCF-7 hücrelerinin çoğalmasında önemli ölçüde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Liu vd.,2019).

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *Glehnia littoralis* bitkisinden elde edilen polisakkaritin A549 hücrelerinde apoptozu tetikleyerek, hücre döngüsünün durmasını indükleyebileceği gösterilmiştir (Wu vd., 2019).

Tezin Amacı

Polisakkaritlerin ekstraksiyonu ve ekstrakte edilen ürünlerin uygulaması önemli bir işlemdir ve bu da son yıllarda bitki veya mantarlardan polisakkaritlerin ekstraksiyon teknolojisi üzerine çok sayıda araştırma yapılmasına yol açmıştır. Genel olarak, polisakkaritlerin klasik ekstraksiyonu için sıcak su işlemi kullanılmaktadır. Ancak, polisakkaritlerin sıcak su ile ekstraksiyonu da dahil olmak üzere kullanılan klasik yöntemlerin uzun ekstraksiyon süresi, maliyet gibi birtakım farklı kısıtlamaları bulunmaktadır (Garcia-Vaquero vd.2017). Polisakkaritleri mevcut ekstraksiyon yöntemlerinin dezavantajlarından kaçınılarak, hızlı ve ekonomik olarak ekstrakte etmek için yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerektiği literatürde vurgulanmaktadır. Bu doğrultuda ultrason veya mikrodalga gibi yeni ekstraksiyon yöntemleri ekstraksiyon sürecine dahil edilerek daha hızlı ve biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunun

iyileştirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca, geleneksel ekstraksiyon ve izolasyon protokollerine alternatif bir teknik olarak TPP ve TPP destekli yöntemlerden elde edilen polisakkaritlerin, polisakkarit ekstraksiyon verimi ve saflığı önemli ölçüde arttırdığı ve ekstraksiyon süresini önemli ölçüde kısalttığı bildirilmiştir (Wang, vd., 2019).

Bu tez çalışmasında, Erzurum yöresinde yetişen çadır (*Prangos ferulacea* (L.)) bitkisinden TPP, TPP öncesi enzim ön işlemi (E-TPP), TPP öncesi manyetik alan ön işlemi (MF-TPP) ve TPP öncesi enzim/manyetik alan ön işlemi (E/MF-TPP) yöntemleri uygulanarak ilk kez polisakkaritlerin ekstrakte edilmesi, ekstrakte edilen polisakkaritlerin karakterizasyonun yapılması, *in vitro* biyolojik aktivitelerinin (antioksidan, hipoürisemik, hipoglisemik) ve antikanser etkilerinin gen ve protein seviyesinde araştırılması hedeflenmiştir.



MATERYAL VE METOT

Materyal

Kullanılan araç-gereç ve cihazlar

Tablo 1. Tez Çalışması Sırasında Kullanılan Araç-Gereç ve Cihazlar

Araç-Gereç ve Cihazlar	Marka-Model
Otoklav	Hmc Hiramaya
Etüv	Thermo Scientific
Steril Kabin	Telstar Bio-II-A
Çeker Ocak	TÜV-SÜD
Saf Su Cihazı	Mp Minipure
Buzdolabı (+4, -20)	Vestel
Hassas Terazî	Ohaus Pioneer
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Heidoph
Isı Bloku	Lab-Line
Agaroz Jel Elektroforez Cihazı	Thermo-EC
SDS-PAGE Elektroforez Cihazı	Bio-Rad
Jel Görüntüleme Cihazı	Quantum Vilber Lourmat
pH Metre	Mettler Toleda
Mikrosantrifüj Cihazı	Hettich
Santrifüj Cihazı	Beckman Coulter
Kuvars Küvetler	Merck
Mikropipet Takımı	Thermo Scientific
Parafilm	Isolab
PCR Cihazı	Thermo-Cycler
Azot Tankı	Taylor- Wharton LS750 Lab System
Karbondioksitli Etüv (İnkübatör)	Nuaire Nu-4750
Ters Işık Mikroskobu	NUAIRE 425-500E ESCO Marka Class 2
T-25 Flask (Filtreli, steril)	Biofil
T-75 Flask (Filtreli, steril)	Biofil
Kriyojenik Tüpler	ISOLAB
96 Kuyucuklu Plaka	SPL
1,5-2 mL'lik Tüpler ve Raklar	Eppendorf
Ultrasonikatör	Marienfeld
Real-Time PCR	Qiagen
Flow (Akım) Sitometri Cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX

Kullanılan kimyasallar

Tablo 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	Marka
(ABTS)2,2'-azino-bis(3etilbenzotiazolin-6-sülfonik Asit	Sigma
Amonyum Sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck
β-merkapttoetanol	Merck
RNA İzolasyon Kiti	Merck
cDNA Sentez Kiti	Sigma-Aldrich
N,N,N'',N''-tetrametilendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich
t-bütanol	Sigma-Aldrich
Amoyum persülfat (APS)	Sigma-Aldrich
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Merck
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich
Polivinilidin Diflorid Membran (PVDF)	Merck
Primer	Sigma-Aldrich
WST-8 Hücre Proliferasyon Analiz Kiti	Merck
Tripsin-EDTA	Merck
Protein Marker	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Medium	Gibco
Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)	Gibco
Fetal Bovin Serum (FBS)	Capricorn
cDNA Sentez Kiti	Bio-Rad

Reaktiflerin hazırlanması

ABTS yöntemi ile antioksidan tayininde kullanılan çözeltiler

Ana stok ABTS •+ Çözeltisi Reaktifinin Hazırlanması: 0,0384 mg ABTS ve 0,0134g Potasyum persulfat 10 mL distile saf su içinde çözülerek elde edilen çözeltiden 10 mL alınıp 100 mL balonjojeye distile saf su ile sulandırıldı (1:9 v/v). Kararlı hale gelmesi için 12 saat karanlıkta bekletildi.

ABTS •+ Çalışma Çözeltinin Hazırlanması: Ana stok çözeltilisinden 1 mL alınıp 60 mL metanol ile seyreltilti. Çözeltinin 734 nm de absorbansı $0,706 \pm 0,001$ olması beklenir. Ancak duruma göre metanol ile seyreltme ya da ana stoktan ilave edilerek absorbansı $0,706 \pm 0,001$ değere ayarlanabilir.

DPPH yöntemi ile antioksidan tayininde kullanılan çözeltiler

Ana stok DPPH (10 mM) Reaktifinin hazırlanması: 39,5 mg DPPH (2,2 diphenyl 1-picpylhdrazyl) 10 mL metanol içinde çözüldü. Elde edilen çözelti daha sonraki kullanımlar için buzdolabında saklandı.

DPPH çalışma çözeltinin hazırlanması: Ana stok çözeltisinden 2,5 ml alınıp 250 mL'ye metanol ile tamamlandı. Tamamlanan çözeltinin absorbansı 517 nm'de $0,980 \pm 0,02$ 'e ayarlandı. Duruma göre seyreltme ya da ana stoktan ilave edilerek absorbansı $0,980 \pm 0,02$ değere ayarlanabilir.(Ahmed vd., 2015).

Toplam fenolik içerik tayininde kullanılan çözeltiler

Toplam polifenolik içerik Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Yöntem, fosfotungstik asitin bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesine dayanır. Oluşan mavi renk absorbansı ortamdaki aromatik fenolik grubu ile doğru orantılıdır. Toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanıldı (Kasangana vd. 2015).

Çözeltilerin hazırlanması

%10'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 10g Na_2CO_3 tartılıp saf su ile çözünüp üzeri 100 mL'ye tamamlandı.

Standartlar: 25 mg gallik asit tartılarak 25 mLsaf su ile çözülerek 10.000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak 20, 40, 60, 80, 120, 160 ve 320 $\mu\text{g/mL}$ 'lik gallik asit standartları hazırlandı.

Lowry yöntemi ile protein tayininde kullanılan çözeltiler

A Reaktifinin Hazırlanması: %2'lik Na_2CO_3 tartılmış ve 0,1 M NaOH içinde çözülmüştür.

B Reaktifinin Hazırlanması: %0,5'lik CuSO_4 tartılmış ve NaK-tartarat tamponu içinde çözülmüştür.

C Reaktifinin Hazırlanması: A ve B reaktifleri 1/1 oranında karıştırılmış ve C reaktifi hazırlanmıştır.

D Reaktifinin Hazırlanması: 1 M Folin ayırıcı distile su ile hazırlanmıştır.

SDS-PAGE tayininde kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması (1 M, pH: 8,8): 27,23 g Tris tartılmış ve 90 ml distile su içinde çözülmüştür. pH: 8,8'e ayarlanmış ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Tris-HCl Tamponunun Hazırlanması (1 M, pH: 6,8): 6 g Tris tartılmış ve 90 mL distile su içinde çözülmüştür. pH: 6,8'e ayarlanmış ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%30'luk Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisinin Hazırlanması: 6 g akrilamid ve 0,16 g bisakrilamid tartılmış ve 13,84 ml distile su içinde çözülmüştür.

%10'luk SDS Çözeltisinin Hazırlanması: 1 g SDS tartılmış ve 4,5 mL distile su içinde çözülmüştür. Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

%10'lu PER Çözeltisinin Hazırlanması: 1 g amonyum per sülfat tartılmış ve 4,5 mL distile su içinde çözülmüştür. Son hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Numune Tamponunun Hazırlanması: 1 mL gliserin, 1 mL %10 SDS, 0,65 mL 1 M pH: 8,8 Tris-HCl ve 0,03 %1 brom timol mavisi üzerine distile su eklenmiş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanmadan hemen önce hazırlanmış tampon üzerine 500 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.

Yürütme Tamponunun Hazırlanması (10X SDS-PAGE): 14,4 g glisin ve 3 g Tris tartılmış, üzerine 10 mL %10'luk SDS eklenmiştir. Son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Ayırma Jelinin Hazırlanması: 4,4 %30 akrilamid ve %0,8 bisakrilamid, 5 mL 1 M pH 8,8 Tris-HCl, 0,2 mL %10 SDS, 0,1 mL %1,5 PER, 0,13 mL %5 TEMED ve 3,15 mL distile su ile hazırlanmıştır.

Yığma Jelinin Hazırlanması: 0,44 mL %30 akrilamid ve %0,8 bisakrilamid, 0,41 mL 1M pH 6,8 Tris-HCl, 0,03 mL %10 SDS, 0,1 mL %1,5 PER, 0,03 mL %5 TEMED ve 2,450 mL distile su ile hazırlandı.

Coomassie blue boyama için kullanılan çözelti ve tamponlar

Sabitleştirme Çözeltisinin Hazırlanması: 50 mL izo-propanol, 10 g TCA ve 40 mL distile su ile hazırlanmıştır.

Boyama Çözeltisinin Hazırlanması: 0,1 g Coomassie Blue G-250 tartılmış ve üzerine 50 mL etanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL distile su eklenerek hazırlanmıştır.

Yıkama Çözeltisi: 50 mL etanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL distile su ile hazırlanmıştır.

Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tampon ve çözeltiler

Sodyum Fosfat Tamponu (10 mM): 1,15 g sodyum fosfat tartılarak, 90 mL distile su içerisinde çözöldü. pH değeri 6'ya ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum Fosfat (pH 8.0): 2,4 g sodyum fosfat tartılarak 900 mL distile su içinde çözöldü. pH 8'e ayarlanarak son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Bradford Çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi üzerine 50 mL %95'lik etanol ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözöndüröldü. Ardından üzerine 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edilerek son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Hücre kültüründe kullanılan besiyerler ve çözeltiler

DMEM- Bazal F-12K besiyeri içerisinde hazırlanarak besiyeri miktarının %10'u kadar FBS, % 1'i kadar penisilin/streptomisin eklendi, +4 °C'de saklandı.

RPMI- RPMI 1640 besiyeri içerisinde hazırlanacak besiyeri miktarının %10'u kadar FBS, % 1'i kadar penisilin/streptomisin eklendi, +4 °C'de saklandı.

Dondurma (Freezing) Besiyeri- 2 mL kriyo tüp için, 100 µL DMSO 1900 µL besiyeri içerisine eklenerek hazırlandı

%70'lik Etil Alkol- 30 mL saf su üzerine 70 mL etil alkol eklenerek hazırlandı.

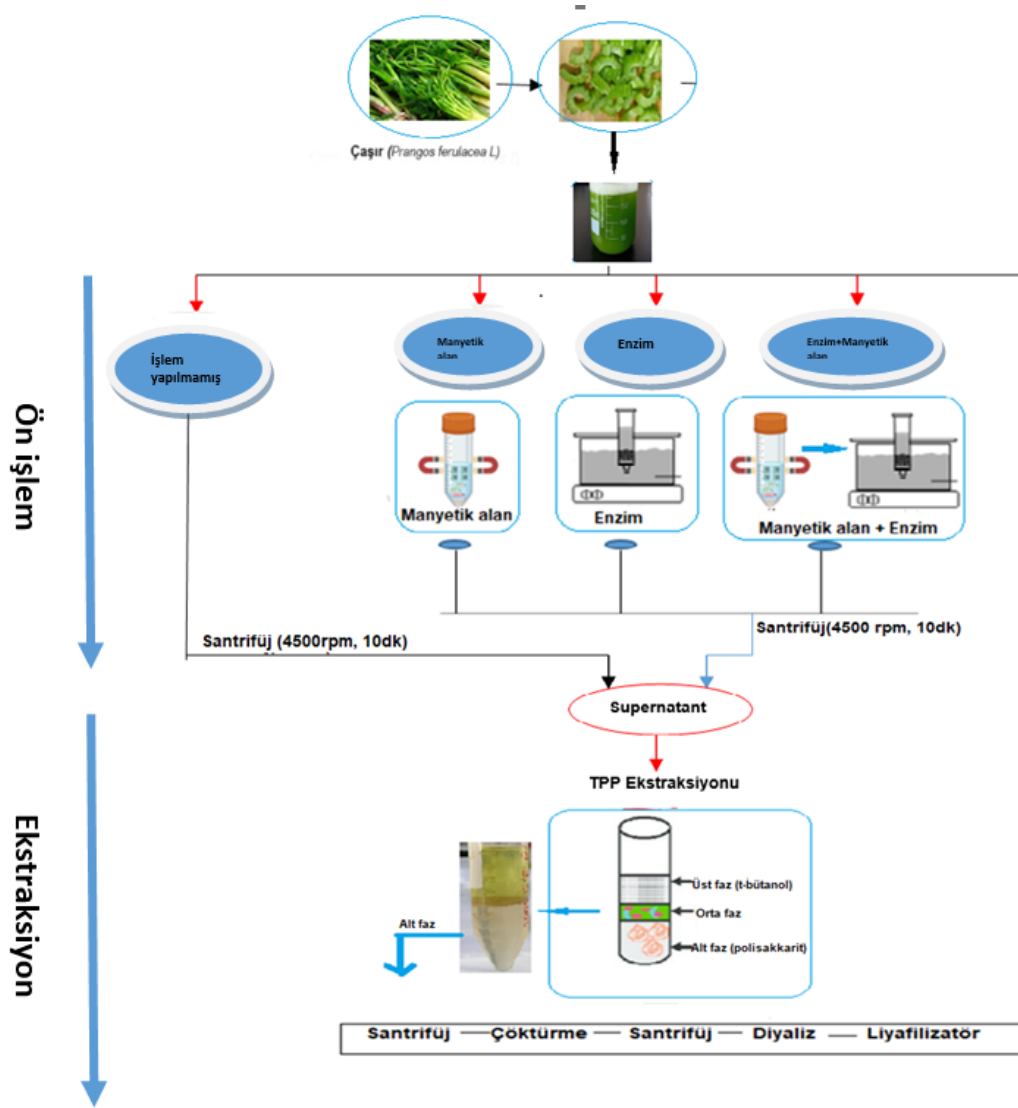
Yöntem

Çaşır bitkisinin toplanması

Yapılan tez çalışmasında kullanılan bitkiler Eruzurum ilinde doğal yayılım alanından toplanarak laboratuvara getirildi, kuru ve serin ortamda kurutuldu. Kurutulan bitkiler çalışma yapılcaya kadar -20°C'de muhafaza edildi. Çaşır bitkisi (1.0 kg) distile su ile yıkandı. Daha sonra 1 kg çaşır bitkisi 1000 mL saf su ile blenderdan geçirildi ve uygulama sonunda 10 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra bitki süpernetantı toplandı ve diğer işlemler yapılcaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Polisakkarit ekstraksiyonu ve izolasyonu

Bu tez kapsamında polisakkaritlerin ekstraksiyonu için yapılan işlemler Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 3. Çadır bitkisinden oda sıcaklığında farklı ekstraksiyon teknikleri ile polisakkarit ekstraksiyonu ve ayrıştırılması için şematik prosedür

Üç fazlı ayırma (TPP) yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu

Polisakkaritin ekstraksiyonunda ilk olarak geleneksel TPP yöntemi uygulanarak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu yöntem, ham bitki ekstraktına sırasıyla uygun tuz ve uygun organik çözücü eklendikten sonra belirli bir süre inkübasyona bırakılarak üç faz oluşması esasına dayanır. Çalışma boyunca literatürde yaygın olarak kullanılan amonyum sülfat tuzu ve t-bütanol organik çözücüsü kullanılarak işlem gerçekleştirildi.

Ön işlem uygulanmadan ve üç farklı ekstraksiyon yöntemi (enzim ön işlemi, manyetik alan ön işlemi ve enzim/manyetik alan ön işlemi) ile ön işlem uygulanarak gerçekleştirilen TPP yönteminde en yüksek verim elde edilen parametre konsantrasyonları kullanılarak polisakkarit ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen karışım 5 dk 6000 rpm'de santrifüj edildi. Sonrasında alt sulu faz 1 gece boyunca soğuk etanolla çöktürüldü. Daha sonra karışım santrifüj edilerek sıvı kısmı

atıldı ve dipte kalan pellet distile suda 48 saat boyunca diyalize (MW cut-off 3000 Da) bırakıldı ve ardından 4000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Diyaliz yapılarak elde edilen polisakkarit fraksiyonu son olarak liyofilize edildi.

TPP koşullarının yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile optimizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında, polisakkarit ekstraksiyon verimi üzerine bazı TPP parametrelerinin etkisinin ve maksimum polisakkarit ekstraksiyonu sağlayan parametrelerin kombinasyonunun belirlenmesi için Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi (BBD) kullanıldı. BBD ile 3 farklı faktörün -1, 0 ve +1 seviyelerinde yanıt yüzey tasarımı oluşturuldu ve araştırılan her bir faktörün seviyeleri ve kodlanmış değerleri verildi. Polisakkarit ekstraksiyon verimi için önemli TPP parametrelerinden olan amonyum sülfat konsantrasyonu (%20-80), süpernatant çözeltisi:t-bütanol oranı (1.0-0.5- 1.0-2.0), pH (6.0-9.0) ve sıcaklık (30-50°C) bağımsız değişkenler olarak, polisakkarit ekstraksiyon verimi bağımlı değişken olarak belirlendi (Tablo 3). Tasarımda toplam 27 deney oluşturuldu ve tekrarlanabilirliğini test etmek için merkez noktası birkaç kez tekrarlandı. Tüm deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirildi. Deneysel tasarımda, katsayıların belirlenmesinde, veri analizi ve grafiklerin çizilmesinde minitab 18 deneme sürümü kullanıldı.

Tablo 3. Box-Behnken Tasarım İle Test Edilen Faktörlerin Düzeyleri

Sembol	Bağımsız değişkenler	Birim	Derecelerin Kodlanmış değerleri		
			-1	0	1
A	Amonyum sülfat konsantrasyonu	%	20	50	80
B	Süpernatant çözeltisi:t-bütanol oranı	mL	0.5	1.5	2
C	pH	-	6	7	8
D	Sıcaklık	°C	30	40	50

Manyetik alan ön işleminin ardından TPP yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu

Bu yöntemde çadır bitkisinden polisakkaritlerin ekstrakte edilmesi için MSI Automation Hyper-5 cihazı kullanıldı ve elde edilen bitki homojenatı manyetik alana maruz bırakılarak TPP öncesi bitki ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Manyetik alan ile ekstraksiyon işleminde sistem parametre koşulları (manyetik alan uygulama süresi (10dk), görev döngüsü (%100) ve manyetik güç (100W)) sağlanarak bitki ekstraksiyonu yapıldı. Uygulama süresi sonunda karışım 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant TPP yönteminde kullanılmak üzere filtre kağıdından geçirilerek ayrı tüpe kaldırıldı.



Şekil 4. Manyetik Hipertermi cihazı

Enzim ön işleminin ardından TPP yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu

Enzim ekstraksiyonunun mekanizması, seçiciliği nedeniyle hedeflenen bileşiklerin ekstraksiyon çözücüsüne salınmasına yardımcı olmak için enzimatik hidroliz işlemlerine dayanır. Elde edilen bitki homojenatı %4 (w/w) (1 kg çadır bitkisi için) selüloz içeren 1000 mL fosfat tamponuna (0,1 M, pH 6.0) eklenerek 30°C’de su banyosunda 1 saat boyunca inkübe edildi. Enzimolizden sonra karışım 10 dakika boyunca karıştırılarak kaynar suda 90°C’ye ısıtıldı. Daha sonra karışım 6000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant toplanarak TPP işlemi yapıldı.

Manyetik alan+enzim ön işlemlerinin ardından TPP yöntemi ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu

Bu yöntemde enzim destekli ekstraksiyon yöntemindeki prosedür manyetik alanda yapılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bitki homojenatının üzerine %4 selüloz enzimi ilave edilerek 1 saat boyunca 30°C’de su banyosunda karıştırıldı ve ardından manyetik alan gücüne 10 dk maruz bırakılarak TPP öncesi ekstraksiyon gerçekleştirildi. İşlem sonunda ekstrakt 5 dakika boyunca 6000 rpm’de santrifüje tabi tutularak süpernatantı toplandı ve ardından TPP işlemi gerçekleştirildi.

Polisakkaritlerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Karbohidrat aktivitesi tayini

Çadır bitkisinden ekstrakte edilen polisakkaritlerin karbohidrat içeriği tayini için karbohidrat standart grafiği oluşturuldu. Bunun için öncelikle 1 mg/mL glukoz stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan 1 mg/mL glukoz çözeltisinden tüplere 10-100 µL olacak şekilde eklendi ve distile su kullanılarak son hacim 100 µL’ye tamamlandı. Her örneğin üzerine 1 mL fenol (%0,6) ve 5 mL sülfirik asit eklenerek 90 °C’de 5 dk bekletildi. Spektrofotometrede 490 nm’de köre karşı absorbans ölçümü yapılarak standart grafik elde edildi. Oluşturulan standart grafiğin doğru denkleminde yararlanılarak karbohidrat miktarı belirlendi.

Tablo 4. Standart Karbohidrat Çözeltilerinin Hazırlanışı

	Kör	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glukoz (mg/mL)	-	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
dH₂O (µL)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	-

Lowry yöntemi ile protein tayini

Tez çalışmasında kantitatif protein miktarını belirlemek için Lowry yöntemi (Lowry et. al., 1951) kullanıldı. Protein miktarlarını belirlemek amacıyla öncelikle standart grafik aşağıdaki gibi hazırlandı;

- 1 mg /mL standart BSA çözeltisi hazırlanmış ve 10 ayrı tüpe sırayla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alınarak, tüplerin son hacmi distile su ile 100 µl'ye tamamlandı.
- Her bir tüpün üzerine 200 µl C reaktifi eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda 20 µl D reaktifinden eklenerek vortekslendi ve karanlık ortamda 45 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda 620 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı ve elde edilen verilere göre standart grafik hazırlandı.

Protein tayini yapılacak örneklerden 50 µl üzerine 200 µl C reaktifi eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üzerine 20 µl D reaktifi konularak vortekslendikten sonra karanlık ortamda 45 dk inkübasyona bırakıldı ve süre sonunda 620 nm'de spektrofotometrik ölçümü yapıldı. Oluşturulan standart grafik kullanılarak örneklerin protein miktarları belirlendi.

FT-IR (Fourier transform infrared spektroskopisi) yöntemi ile Polisakkaritlerin fonksiyonel grup analizi

Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak çadır bitkisinden ekstrakte edilen polisakkaritlerin yapısı FTIR kullanılarak analiz edildi. Polisakkaritlerin kimyasal fonksiyonel grupları, 4000–500 cm⁻¹ absorpsiyon aralığında FTIR spektral ölçümleri (Nicolet AntarisII, ABD) kullanılarak belirlendi.

Polisakkaritlerin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

TPP işleminin sonunda üst fazların içindeki biyomoleküllerin ve ekstrakte edilen polisakkaritlerin antioksidan aktivitelerini belirlemek için aşağıdaki antioksidan testleri yapıldı.

DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi tayini

Polisakkaritlerin DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesi Marka-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanıldı (Brand-Williams vd., 1995). DPPH radikali 517 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine karşılık gelir. Antioksidan madde veya maddelerle muamele edildiğinde, DPPH 'den kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbans değerlerinin düşmesine neden olur.

Polisakkaritlerin ve üst fazların DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesini belirlemek için öncelikle standart grafik oluşturuldu. Bunun için 10 mg trolaks tartılarak, 10 mL metanol ile çözüldü ve 10,000 µg/mL'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak; askorbik asit standart çözeltisi için 25, 50, 100, 200 400 µg/mL dilüsyonları hazırlandı. Antioksidan aktivitesi belirlenecek örneklerden 10 µl alınarak üzerine 300 µl DPPH çözeltisi eklenerek vortekslenildi. Karıştırıldıktan sonra örnekler 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 517 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Oluşturulan standart grafik kullanılarak örneklerin antioksidan aktiviteleri belirlendi.

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit) radikal katyonu süpürücü etki tayini

ABTS antioksidan tayinini belirlemek için ilk önce standart grafik oluşturuldu. Bunun için 25 mg askorbik asit tartıldı ve 25 mL metanol ile çözülerek 10.000 µg/mL'lik stok elde edilmiştir. Stok çözeltiden 1000 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak; askorbik çalışma çözeltisinde 20, 50, 100, 150 ve 200 µg/mL standartları hazırlandı.

Toplam Fenolik İçerik Tayini

Bu çalışmada polisakkaritlerin toplam polifenolik içerik tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Fosfotungstik asit bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesine dayanır. Oluşan mavi renk absorbansı ortamdaki aromatik fenolik grubu ile doğru orantılıdır. Toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanıldı (Kasangana vd. 2015).

Ekstrakte edilen polisakkaritlerin toplam fenolik içeriklerini belirlemek için öncelikle standart grafik oluşturuldu. Bunun için 25 mg gallik asit tartılarak 25 mL saf su ile çözüldü ve 10.000 µg/mL'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlanarak seri dilüsyon yapıldı ve 20, 40, 60, 80, 120, 160 ve 320 µg/mL'lik gallik asit standartları hazırlandı.

%10'luk Na₂CO₃ çözeltisi: 10g Na₂CO₃ tartılıp saf su ile çözünüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı. Polisakkarit örnekleri saf suda çözünerek 1 mg/mL'lik çözeltiler hazırlandı ve dilüsyon yapılarak farklı konsantrasyonlarda örnekleri hazırlandı. Ardından her tüpe 500 µL örnek çözeltisi ve 2,5 mL %10'luk Folin–Ciocalteu reaktifi eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 2,0 mL %10'lik sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek örnekler homojen hale getirildi ve karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 765 nm'de spektrofotometrik ölçüm alındı. Gallik asit standart eğrisine göre örneklerin toplam fenolik içerikleri hesaplandı ve mg GAE/g örnek cinsinden verildi.

Hipoglisemik Aktivitenin Belirlenmesi

TPP yöntemi ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin *in vitro* anti-hiperglisemik aktiviteleri, Yan vd. tarafından geliştirilen yönteme göre α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri ölçülerek değerlendirildi. Polisakkaritler farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 mg/mL) distile suda çözöldü ve kontrol grubu olarak akarboz kullanıldı. Çalışmayı optimize etmek amacıyla öncelikle standart grafik oluşturuldu (Tablo 5).

Tablo 5. Standart Akarboz Çözeltisinin Hazırlanması

Tüp No	Akarboz Hacmi(µL)	Distile Su (µL)	Nihai Konsantrasyon (µg/mL)
Blank	0	1000	0
1	100	900	100
2	200	800	200
3	300	700	300
4	400	600	400
5	500	500	500
6	600	400	600
7	700	300	700
8	800	200	800
9	900	100	900

α -amilaz inhibisyon testi

Bu çalışmada polisakkaritlerin α -amilaz inhibisyonu üzerinde etkisini belirlemek için ilk olarak polisakkaritler farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 mg/mL) distile suda çözöldü ve kontrol grubu olarak akarboz kullanıldı. 100 µL polisakkarit ekstraktları üzerine 200 µL 12 uL/ml amilaz enzimi (PBS içinde çözöldü pH=6.8) karıştırıldı ve ardından 37°C' de 5 dk inkübe edilerek inkübasyon sonunda 500 mL %1 nişasta çözeltisi eklendi ve tekrardan 37°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 500 µL DNS reaktifi eklendi ve

100°C'de 5 dk ısıtıldı. Karışım soğumaya bırakıldı ve ardından son hacim PBS ile 10 mL' ye tamamlandı. Deney sonunda spektrofotometrik olarak 540 nm' de ölçüm alındı.

α -glükozidaz inhibisyon testi

Çalışma esnasında polisakkaritlerin α -glükozidaz inhibisyonu üzerinde etkisini belirlemek için ilk olarak polisakkaritler farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 ve 5,0 mg/mL) distile suda çözüldü ve kontrol grubu olarak akarboz kullanıldı. Farklı konsantrasyonlardaki 100 μ L polisakkarit örneklerinin üzerine 3 mL PBS ve 20 μ L α -glükozidaz eklenerek karıştırıldı ve 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra karışımın üzerine 100 μ L PNPG (2,5mM PBS ile çözüldü) substratı eklendi ve tekrardan 37°C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.2M Na₂CO₃ eklendi. Deney sonunda spektrofotometrik olarak 400 nm dalga boyunda ölçüm alındı.

Hipoürisemik Aktivitenin Belirlenmesi

TPP yöntemi ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin hipourisemik aktivitesi, ksantin oksidaz (XO) inhibitör aktivitesi ölçüm esasına dayanarak geliştirilen yöntemle belirlendi. (Song vd., 2023). İlk olarak, polisakkaritler farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 ve 3,0 mg/mL) 10,0 μ L, 20,0 μ L XO (200 U/L) ve 70 μ L Tris-HCl (50 mM) ile 96 kuyucuklu plakalarda karıştırıldı. Reaktif karışım 37°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra absorbans 290 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Allopurinol pozitif referans olarak kullanıldı ve XO inhibitör aktivitesi şu formülle hesaplandı:

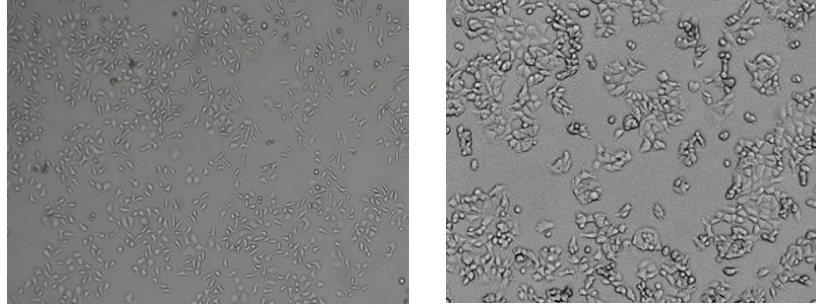
$$\text{Inhibitör oranı (\%)} = (A_{\text{örnek}} - A_{\text{referans}}) / (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{referans}})$$

Polisakkaritin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi

Antikanser ilaç araştırmalarında, insan tümörlerine ait hücre hatları, biyolojik aktivitenin ilk etapta değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan MCF-7 ve A549 hücre hatları, farklı doku tiplerine ait tümör modellerini temsil etmeleri nedeniyle yeni bileşiklerin antikanser etkinliklerinin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen hücre sistemleridir. Söz konusu hücre hatlarında, doğal kökenli ajanların antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi, potansiyel kemoterapötik ajan geliştirme süreçlerinde önemli bir basamak oluşturmaktadır.

Tez çalışmasında insan meme kanser (MCF-7) ve insan akciğer kanser (A549) hücre hatları kullanıldı. Çalışma esnasında kullanılan MCF-7 insan meme kanser hücre hattı 69 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan izole edilmiştir. Diğer hücre hattı olan A549 1972 yılında D.Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki bir erkeğin akciğer dokusundan izole

edilmiştir. Çalışma boyunca MCF-7 ve A549 hücre hatları , %5 CO₂, %95 hava ve 37°C olan nemli bir ortamda %0,5 antibiyotik çözeltisi (100µg/mL (streptomisin) + 100IU/mL (penisilin)) ve %10 fetal bovin serumu (FBS) ile oluşturulan DMEM-Ham's F12(1:1) besiyerinde kültüre edilerek çoğaltılmıştır Çalışma esnasında steril kabin ve kabin içerisine alınan bütün malzemeler %70'lik etanol ile sterilize edildi.



Şekil 5. MCF-7 ve A549 hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü (sol 10X, Ölçek= 50 µm; sağ 5X, Ölçek= 10 µm)

Hücrelerin çözündürülmesi

Sıvı azot tankında (-196 °C'de) stokta bulunan MCF-7 ve A549 stok hücreleri çıkarılarak el ısısıyla çözündürüldü ve içerisinde 5 mL F-12K (%10 FBS, %1 PEN-STR) besiyeri bulunan falkon tüp içine aktarıldı. Hücre süspansiyonunun 1300 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmesi sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve dibe çöken hücrelerin olduğu pellete F-12K komplet besiyeri eklenip, hücreler çözündürülerek flasklara ekildi ve flasklar 37 °C ve %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde büyümeleri için bekletildi. Bu aşamada her 2-3 günde bir hücrelerin besiyeri değiştirildi

Hücrelerin pasajlanması

Hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştığında (%70-80 konfluensiye) yapılan deneysel işlemlere bağlı olarak kullanılabilmesi ve çoğaltılması için hücre bölme ve sayım işlemleri gerçekleştirildi. Çalışma yapılacak olan kabin sterilize edildikten sonra hücreler kabine alındı ve eski besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Flask içerisindeki saflılıkları uzaklaştırmak için DPBS ile yıkama yapıldı. Hücreleri zeminden ayırmak için Tripsin-EDTA (%0,025) eklenerek 3-5 dakika boyunca inkübatöre bırakıldı. Mikroskopla hücrelerin zeminden ayrıldığı gözlemlendikten sonra hücreler yeniden kabine alındı. Ortamdaki tripsini inaktif hale getirmek için, tripsinin miktarının 3 katı kadar besiyer eklendi. Daha sonra hücreler 5 dakika boyunca 1500 rpm' de santrifüj edildi Üzerine hücre hattı, tarih ve pasaj numarası yazılan flasklara hücrelerin ekimi yapıldı ve büyümeleri için 37 °C ve %5'lik CO₂ ayarlı inkübatöre alındı.

Hücrelerin stoklanması

Hücrelerin stoğa kaldırılması için 2mL'lik kriyo tüpler kullanıldı. Kriyo tüplerin üzerine hücre hattı,tarih ve stoklama yapan kişinin ismi yazıldı. Büyümüş olan hücreler flasktan kaldırıldıktan sonra çöktürme işlemi yapıldı. Daha sonra %5lik DMSO içeren yeni besiyer üzerine hücrelerin pelleti eklendi ve homojen hale gelene kadar pipetaj işlemi yapıldı.İşlem sonunda hücreler kriyotüplere alındı ve iki saat -20°C'de bekletildikten sonra -86°C'ye sonra da -196°C'deki sıvı azota kaldırıldı.

Hücre sayımı

Hücre sayımı için lam kullanıldı. Öncelikle steril bir eppendorf içerisine 10 µl hücre süspansiyonu ve 10µl trypan blue boyası eklenerek pipetaj yapıldı. Sonra bu karışımdan 10µl hücre sayımı kitine eklenerek hemositometre cihazı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

Hücre canlılığı (WST-8) testi

İlk olarak hücreler 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde 100 µL besiyeri içerisine ekildi ve hücrelerin kuyucuklara tutunabilmesi için 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonrasında plak içerisindeki kültür mediumu uzaklaştırılarak DPBS tamponu ile her bir kuyucuk yıkandı. farklı konsantrasyonlarda (25-1000µg/mL) polisakkarit ve farklı konsantrasyonlarda (2-40µM) cisplatin olacak şekilde komplet besiyeri ortamında hazırlandı. Hazırlanan bu polisakkaritlerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan cisplatinin her bir doz uygulaması 4 tekrür olacak şekilde 96'lık plak içerisine 24. saat için 100 µL, 48. saat için 150 µL eklendi. Kontrol grubu olarak sadece komplet besiyeri ve negatif kontrol olarak su kullanıldı. Ardından 37 °C'de %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde zaman bağımlı olarak (24 ve 48 saat) inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinden sonra her kuyucuk 100 µL DPBS tampon ile yıkandı. Ardından WST-8 solüsyonundan her bir kuyucuğa 50'şer µL ilave edildi. %5'lik CO₂ ayarlı inkübatörde 4 saat inkübe edildi. WST-8 solüsyonu ile inkübasyon sonrası her bir kuyunun absorbansı 450 nm'de mikropate okuyucu spektrofotometre ile ölçüldü ve mikroskop görüntüleri alındı.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre her bir polisakkarit ve cisplatinin IC₅₀ değeri (hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken konsantrasyon) GraphPad Prism Software 8.00 (La Jolla California USA) istatistik programı kullanılarak hesaplandı. Unpaired t-testi uygulandı ve mean ± standard hata (SEM) değerleri analiz edildi. Hücre proliferasyondaki azalmayı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \left(\frac{\text{polisakkaritle muamele görmüş hücreler (Abs)} - \text{hücresiz ortam (Abs)}}{\text{kontrol grup(Abs)} - \text{hücresiz ortam (Abs)}} \right) * 100$$

Kantitatif Gen Ekspresyon (Real-Time PCR) Analizi

Bu çalışmada, apoptotik *BAX*, *KASPAZ-3* ve anti-apoptotik *BCL2* genlerinin ekspresyon profillerini araştırmak için kantitatif gen ekspresyon (Real-Time PCR) analizi yapıldı ve kontrol olarak β -aktin kullanıldı.

Tablo 6. Genler, Etki Mekanizmaları ve Beklenen Ekspresyon Seviyeleri

Gen adı	Etki Mekanizması	Ekspresyon seviyesi (Tedavi grubu)
<i>BAX</i>	Pro-apoptotik	↑
<i>BCL2</i>	Antiapoptotik	↓
<i>KASPAZ-3</i>	Efektör kaspaz	↑

RNA izolasyonu

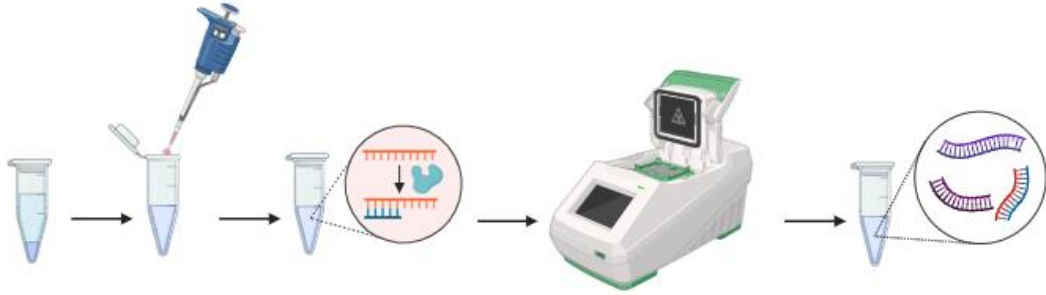
MCF-7 ve A549 hücreleri 6 kuyuluk plaklara her kuyuda 1×10^6 olacak şekilde 1 mL kültür besiyerine ekildi ve sonra 24 saat (%5 CO₂, 37°C) inkübe edilip besiyeri aspire edilerek PBS ile yıkama yapıldı. Ardından hücreler plak tabanından kazınıp PBS ile eppendorf reaksiyon tüplerine alınarak 1000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra PBS uzaklaştırılarak RLT Buffer (350ul) eklendi. Tissue Lyser homojenizasyon cihazı ile 30Hz’de 20 saniye homojenize edilerek 14000 rpm’de 4 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantlar QIAcube RNA İzolasyon Robotuna (Qiagen) konularak kit içerisindeki diğer solüsyonlar eklenip deneysel aşamanın bundan sonraki kısmı cihaz tarafından gerçekleştirildi. Elde edilen RNA’lar cDNA izolasyonuna kadar -86°C’de saklandı.

cDNA sentezi

cDNA sentezinden önce izole edilen RNA’ların konsantrasyonları eşitlendi. cDNA sentezi için BİO-RAD kit sistemi kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre yapıldı.

Çalışmada ilk olarak kit bileşenleri buz üzerinde çözündürüldü ve steril bir mikrosantrifüj tüpüne kit bileşenleri Tablo 7’de belirtilen hacimlerde konuldu. Kontrol ve muamele grubunun her birinden 10 μ L RNA (RNA konsantrasyonu 10 μ L total hacimde olacak şekilde eşitlendikten sonra) PCR tüplerine koyuldu ve üzerlerine kit bileşenleri ilave edildi. Son hacmi 16 μ L olan tüpler, 42°C’de 120 dk; 85 °C’de 5 dk ve son olarak 4 °C’de ∞ olacak şekilde PCR

atıldı. Elde edilen cDNA'ların saflık ve konsantrasyonları nanodrop cihazında spektroskopik olarak ölçüldükten sonra Real Time PCR analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 6. mRNA dan cDNA nın elde edilmesi

Tablo 7. cDNA Sentez Kit Protokolünün Önerdiği Bir Tüp İçerisindeki Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	Hacim
25XdNTP Mix (100 mM)	4 µL
Revers Transkriptaz	1 µL
Nuclease-free water	12 µL
mRNA	3 µL
Total Hacim	20 µL

Tablo 8. Gen Ekspresyon Profillerine Bakılan Genler İçin Dizayn Edilen Primerlerin Listesi

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi (5'→3')	TmSıcaklığı (°C)	%GC Oranı
BAX	Forward	CAGGAAGTGGAAAGGTGGAG	62	55
	Reverse	CTCAGGATGAAGACCCGAAG	61.2	55
BCL2	Forward	TTGTAGTGTGTATGCCCTGCTT	59.7	45
	Reverse	TCCTCTGTGATGCTGAAAGGT	60.7	48
CASP3	Forward	AAAGCACTGGAATGACATCT	55.4	40
	Reverse	TTCAGGTCAACAGGTCCATT	59.1	45
β-Actin	Forward	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	62.2	55
	Reverse	CTCCTTAATGTCACGCACGA	59.1	50

Real-Time PCR

Bu tez çalışmasında uygulama grupları arasındaki gen ekspresyon düzeylerinde farklılıkları belirlemek için Real-Time PCR yapılmıştır. Genetik materyal olarak; MCF-7 ve A549 hücrelerinden izole edilen total RNA'dan hazırlanan cDNA'lar kullanılarak, floresan işaretli SYBR Green kullanılarak oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülmüştür. Bu yöntem; gerçek zamanlı PCR, ilgili bölgenin amplifikasyonu sırasında kantitatif olarak üretilen ürüne bir SYBR Green probunun eklenmesi ve belirli bir dalga boyunda aydınlatma ile elde

edilen absorbansa göre genin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu projede kullanılan PCR protokolü şu şekildedir: 50 °C 2 dakika, 95 °C 10 dakika, 50 döngü 95 °C 15 saniye ve 60 °C 1 dakika (Koçpınar, 2015). Real-time PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde veri analizi için matematiksel model olarak Pfaffl 2001'e ait modelleme kullanılmıştır. Bu matematiksel modelin temelinde geçiş noktası (crossing point - CP) ve primer etkinlik oranı (E - efficiency) gibi önemli parametreler bulunmaktadır. Geçiş noktası anlamlı ışıma görülen CT değeri olarak kabul edilmektedir. Primer etkinlik oranı (E) ise kullanılan primerin hedefe spesifik olup olmadığının göstergesidir. Bu modellemede E sabiti etkinlik oranına göre değişim göstermektedir. Bu nedenle etkinlik oranı ile amplifiye edilen DNA miktarı arasında doğrudan bir korelasyon söz konusudur.

Hedef gen oran

$$= \left(E_{(hedef\ gen)} \Delta CP_{(hedef(kontrol-örnek))} \div E_{(referans\ gen)} \Delta CP_{(referans(kontrol-örnek))} \right)$$

$E_{hedef\ gen}$: Hedef gene ait primerin etkinlik oranı.

$E_{referans\ gen}$: Referans gene ait primerin etkinlik oranı.

ΔCP : Ürün miktarının anlamlı düzeyde artış gösterdiği geçiş noktası (CT)

Kantitatif Protein Ekspresyon (Western Blot) Analizi

Bu çalışmada. Real-time PCR sonuçlarına göre *BAX*, *BCL2*, kaspaz 3 ve kontrol olarak β aktin için Western Blot analizi (Budak *et al.* 2014) yapılmıştır. Böylece gen seviyesinde görülen değişikliklerin protein ekspresyonu üzerine etkisi kantitatif olarak gösterilmiştir.

MCF-7 ve A549 hücrelerinden total proteinin izole edilmesi

MCF-7 ve A549 hücreleri 6 kuyuluk plaklara her kuyuda 1×10^6 olacak şekilde 1 mL kültür besiyerine ekilerek 24 saat (%5 CO₂, 37°C) inkübe edildikten sonra besiyeri aspire edilip PBS ile yıkama yapılmış ve hücreler plak tabanından kazınarak PBS ile eppendorf reaksiyon tüplerine alınmıştır. Tüp üzerine hücrelerin 2 katı hacimde homojenat tamponu (137 mM NaCl, 2 mM EDTA, %10 gliserol, %1 TritonX-100, 1 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptin ve 10 µg/mL pepstatin A içeren 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) ilave edilerek Tissue Lyser homojenizasyon cihazı ile 30Hz'de 20 saniye homojenize edilip parçalanmıştır.

SDS-PAGE jelinin hazırlanması ve yüklenmesi

Çalışmanın amacına göre jelin yüzde kaçının hazırlanması gerektiğini belirlenir ve belirlenen çözeltiyi SDS jelini hazırlamak için kullanıldı. SDS jeli; şarj jeli ve ayırıcı jel olmak üzere iki kısımdan oluşur. Proteinleri yüklemeye önce konsantrasyonu Bradford yöntemi

kullanılarak belirlenmiştir. 10-100 µg proteine 1xSDS yükleme tamponu ekleyerek ve bir ısıtma bloğunda 95 °C'de 10 dakika kaynatarak proteini denatüre edilir. Daha sonra numuneleri buza aktarılarak yüklemeden önce en az 10 dakika bekletildi. Bunlar daha sonra yüklü bir jel üzerine yüklenerek 30 dakika boyunca 50 voltta elektroforezlendi. Numuneler ayırma jeline girmeye başladığında voltaj 120 volta getirilerek 90 dakika boyunca yürütüldü. Bir SDS jelinde moleküler ağırlığa göre ayrılan proteinler, Semidry Blotter cihazı aracılığıyla bir PVDF membranına aktarıldı. Kullanımdan önce membranlar 5 dakika boyunca metanol ile ve ardından 1X transfer tamponunda geçirildi. Semidry Blotter cihazıda önce 2 parça blot kağıdı, membran, tekrardan 2 parça blot kağıdı yerleştirilerek cihaz kapatıldı ve 1 Watt'lık elektrik alanında 75 dakika süreyle blotlama işlemi gerçekleştirildi. Blotlamanın ardından proteinler jelden membrana aktarıldı. Membran daha sonra 10 dakika boyunca TBST ile yıkanarak , oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloke edici çözelti (%5 skim milk powder veya BSA) ile işleme tabi tutulmuştur. İlk antikoru bir gecede 4°C boyuya inkübe edildi. Membran altı kez 5 dk süreyle TBST ile yıkandı ve ikinci HRP-konjuge antikorla oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi. Antikoru, membranı TBST ile 5 dakika boyunca altı kez yıkaması yapılarak femto ve piko substratları (ECL reaktifleri) kullanarak kemilüminesan bir sinyal ürettirildi. Ortaya çıkan sinyal, yük bağlantılı dedektör (CCD) görüntüleme cihazıyla gözlemlenmesi sağlayarak Kantitatif analiz için β-aktin proteini kullanıldı. Membranın kemilüminesans görüntüsü ChemiDoc™ Touch Imaging System cihazı kullanılarak elde edildi. Western blot metodu ile analizi gerçekleştirilen proteinlerin kemilüminesans sinyal yoğunluğu ImageJ software programı kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Hedef protein, housekeeping proteine karşı normalize edilecek ve deneyler 3'er kez tekrarlandı. GraphPad Prism 8 Software istatistik programı kullanılarak sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır.

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego California USA) istatistik programı kullanıldı. Analizler, Student's two-tailed t-test kullanılarak yapıldı. ns- anlamlı değil, önemsiz ($p > 0.05$), *- düşük düzeyde anlamlı, önemli ($p < 0.05$),**-orta düzeyde anlamlı, çok önemli ($p < 0.01$), ***-yüksek düzeyde anlamlı, yüksek derecede önemli ($p < 0.001$), ****-çok yüksek düzeyde anlamlı, çok yüksek derecede önemli ($p < 0.0001$) olarak değerlendirildi ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, Erzurum yöresinde yetişen çadır bitkisinden enzim, manyetik alan, enzim +manyetik alan ön işlemleri ve hiçbir ön işlem yapılmadan 4 farklı yöntemle bitkinin ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon işlemi ardından TPP yöntemi ile polisakkaritler saflaştırıldı ve ekstrakte edilen polisakkaritlerin karakterizasyonu, antioksidan, hipoglisemik, hipöüremik ve antikanser etkileri araştırıldı.

Polisakkarit Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

Çadır bitkisinden polisakkaritleri yüksek verimle ekstrakte etmek amacıyla polisakkarit verimi üzerine bazı TPP parametrelerinin etkisinin belirlenmesi için Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanıldı. Optimizasyon için pH, amonyum sülfat konsantrasyonu ve süpernatant:t-bütanol oranı parametreleri bağımsız değişkenler olarak seçildi. En yüksek verim tuz doygunluğunun %20, pH değerinin 7.0 ve ekstraksiyon sıcaklığının 30°C olduğu koşullarda elde edildi.

Bir modelin uygunluğunu gösteren önemli bir faktör, uyum eksiklik değerinin olmamasıdır. Anlamlı olmayan ($p>0.05$) bir model uyum değerinin bulunmaması, hatanın önemsiz olduğunu ve tepkilerin regresyon denklemi ile açıklanabileceğini gösterir. Bu bağlamda model uyumu açısından uyumsuzluğun istatistiksel olarak anlamlı olmaması gerekir (0,05'ten büyük olmalı). Çalışmamızda elde edilen veriler sonucunda uyumsuzluk değerinin anlamsız olduğu ($p>0,05$) bulundu ve modelin uygunluğu doğrulandı (Tablo 8).

Tablo 9. Box-Behnken Deney Tasarımına Göre Elde Edilen Deneysel ve Tahmini Değerler (Ekstraksiyon)

Sıra no	Ammonyum sülfat konsantrasyonu	Süpernatant/t-bütanol	pH	Sıcaklık	Deneysel Verim
1	80	1,5	8.0	30	160,263
2	50	0,5	7.0	25	234,763
3	50	1,5	7.0	30	210,684
4	20	1,5	7.0	40	252,526
5	20	2,0	7.0	30	247,132
6	50	0,5	8.0	30	188,053
7	50	2,0	7.0	25	206,079
8	20	1,5	6.0	30	253,184

Tablo 9. (devamı)

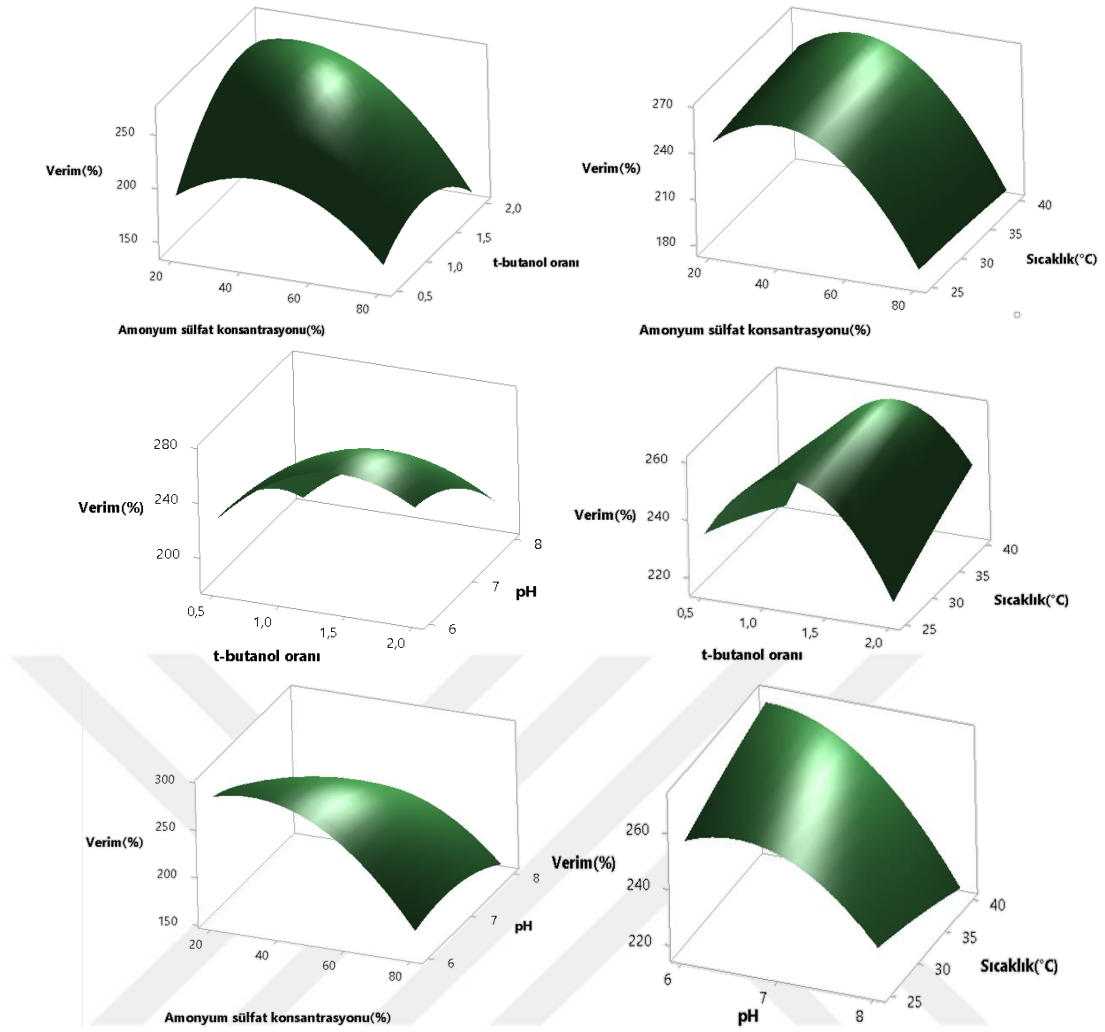
9	50	1,5	7.0	30	262,395
10	80	1,5	6.0	30	138,974
11	50	2,0	6.0	30	251,474
12	20	0,5	7.0	30	208,053
13	50	2,0	8.0	30	183,974
14	50	0,5	6.0	30	227,263
15	80	1,5	7.0	30	181,079
16	20	1,5	8.0	25	204,895
17	80	1,5	7.0	30	193,711
18	50	1,5	6.0	40	279,947
19	50	1,5	8.0	25	228,842
20	80	0,5	7.0	40	155,158
21	50	2,0	7.0	30	236,868
22	80	2,0	7.0	40	131,737
23	50	0,5	7.0	30	235,974
24	50	1,5	8.0	40	228,000
25	20	1,5	7.0	25	250,684
26	50	1,5	7.0	25	252,658
27	50	1,5	6.0	30	280,658

Box–Behnken deney tasarımı kullanılarak elde edilen polisakkarit verimi, yanıt yüzey yöntemi ile optimize edilmiş olup çalışmaya ait ANOVA analizlerine ait sonuçlar Tablo 8’de verili. Ayrıca, çalışmada modelin uygunluğu R^2 (regresyon katsayısı), $Adj-R^2$ (düzeltilmiş regresyon katsayısı), öngörülen çoklu belirleme katsayısı ($Pre-R^2$) kullanılarak değerlendirildi. Polisakkarit verimi için $Pre-R^2$ (0.99) ve $Adj-R^2$ (0.99) değerleri, R^2 (0.99) ile makul bir uyum içindedir. İdeal olarak $Adj-R^2$, R^2 değerine yakın olmalıdır. R^2 değerinin 1’e yakın olması modelin uygunluğunu yani deneysel ve tahmin edilen değerler arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu da deneylerin yüksek oranda güvenilir olduğu anlamına gelir (Garai & Kumar, 2013). Optimizasyon çalışmasında elde edilen R^2 değeri oldukça yüksek bulundu. Bu yüksek R^2 değeri deneysel sonuçlar ile seçilen model tahminlerinin oldukça uyumlu olduğunu göstermektedir. Tablo 9 incelendiğinde, regresyon modelinin uyumsuzluk değerinin önemsiz bulunduğu görüldü ($P>0.05$).

Tablo 10. Box–Behnken Planda Bağımsız Değişkenlerin Varyans Analizi

Kaynak	Adj SS	Adj MS	F-Değer	P-değer
Model	37881,8	2705,84	6,21	0,002
Linear	5646,2	1411,55	3,24	0,031
Ammonyum sülfat konsantrasyonu	3092,4	3092,42	7,10	0,021
t-butanol oranı	227,7	227,70	0,52	0,004
pH	1484,5	1484,48	3,41	0,040
Sıcaklık	1,2	1,22	0,00	0,59
Square	10208,2	2552,06	5,86	0,007
Ammonyum sülfat*Ammonyum sülfat	8848,0	8847,99	20,31	0,001
t-butanol*t-butanol	3147,7	3147,66	7,23	0,020
pH*pH	1030,5	1030,49	2,37	0,0430
Sıcaklık*Sıcaklık	2,2	2,16	0,00	0,45
2-Way Interaction	2354,9	392,48	0,90	0,025
Ammonyumsülfat*t-butanol	934,0	934,01	2,14	0,016
Ammonyum sülfat*pH	1096,8	1096,77	2,52	0,039
Ammonyum sülfat*Sıcaklık	30,7	30,66	0,07	0,05
T-butanol*pH	67,9	67,91	0,16	0,010
T-butanol*Sıcaklık	233,1	233,11	0,54	0,047
pH*Sıcaklık	182,6	182,59	0,42	0,0530
Error	5227,8	435,65		
Lack-of-Fit	3811,0	381,10	0,54	0,794
Pure Error	1416,8	708,38		
Total	43109,6			

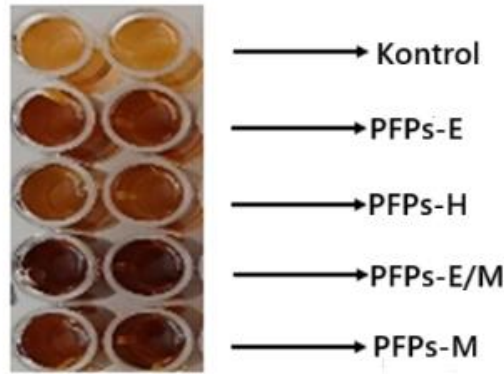
Yapılan bu tez çalışmasında TPP optimizasyonu yüzey yanıt yöntemi (RSM) ile sonuçlar desteklenmiştir. Polisakkarit ekstraksiyonu için kullanılan TPP’de tuz, süpernatant çözeltisi/t-bütanol ve sıcaklık parametrelerinin polisakkarit verimi üzerinde önemli derecede etkili olduğu gözlenmiştir ($P<0,05$). Optimizasyon koşulları tuz (%20), süpernatant çözeltisi/t-bütanol (1.0:1.5) ve 30°C sıcaklıkta %90 oranda bir verim elde edilmiştir. Polisakkarit verimi ve karbohidrat aktivitesi deneysel ve tahminen yapılan işlemde birbirini desteklemektedir. Şekil 1’de gösterildiği üzere yanıt yüzey yöntemi %95 güven aralığında gerçekleştirilen model seçiminde doğrusal ve karesel modelin P-değeri anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).



Şekil 7. TPP ile ekstrakte edilen polisakkarit verimi üzerine üç değişkenin kombine etkilerine ait 3D grafikler

Bu çalışmada, ilk kez çasır (*P.Ferulacea (L.)*) bitkisinden ön işlem yapılmadan TPP, TPP'den önce enzim ön işlemi , TPP'den önce manyetik alan ön işlem ve TPP'den önce enzim ve manyetik alan ön işlemleri olmak üzere dört farklı yöntemle polisakkarit ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen polisakkaritlerin fizikokimyasal özellikleri ve *in vitro* farmakolojik fonksiyonları belirlendi ve karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, TPP bazlı dört ekstraksiyon yönteminin PFPS'lerin ekstraksiyon verimi ve kimyasal özellikleri üzerinde dikkate değer etkileri olduğu tespit edildi. Bu dört farklı ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen polisakkarit verimleri sırasıyla PFP_s- E/M (%27), PFP_s-M (%20), PFP_s-E (%19) ve H(%17) olarak bulundu. Bu da TPP ile polisakkaritleri ekstrakte etmeden önce enzim/manyetik alan ön işleminin polisakkarit için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir. TPP ayırımından önce çasır bitkisinin enzim veya manyetik alanla ön işleme tabi tutulmasının; polisakkaritlerin ekstraksiyon verimini önemli ölçüde iyileştirmesinin sebebinin enzim ve manyetik alan etkisinin ikili kombinasyonu ile polisakkaritlerin ayrılmasını kolaylaştırdığı ve bitki duvarı matrisinden polisakkarit olmayan bileşenlerin uzaklaştırabilmesinden kaynaklanıyor

olabileceği düşünülmektedir. Çarşır bitkisinden E-TPP, M-TPP ve E/M-TPP ile ekstrakte edilen polisakkaritlerin verimlerinin, yalnızca TPP sistemiyle izole edilenlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, E/M-TPP yönteminin, E-TPP veya M-TPP'den daha iyi polisakkarit ekstraksiyonu ile sonuçlandığı belirlendi. Bununla birlikte PFPs- E/M polisakkaritinin en yüksek ekstraksiyon verimiyle (%27) birlikte en yüksek karbonhidrat (%90) ve en düşük protein içeriğine (%0,82) sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 8). Çalışmadan elde edilen sonuçların literatürle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Sanghuangporous vaninii* sporlarından dört polisakkarit (SVSPs-C, SVSPs-E, SVSPs-U ve SVSPs-E/U) ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. TPP, TPP'den önce enzim ön işlemi (E-TPP), TPP'den önce ultrasonik ön işlem (U-TPP) ve TPP'den önce enzim ön işleminin ardından ultrasonik ön işlem (E/U-TPP) yöntemleriyle elde edilen polisakkaritlerin fizikokimyasal özellikleri ve in vitro farmakolojik fonksiyonları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, E/U-TPP ile elde edilen SVSPs-E/U'nun en yüksek ekstraksiyon verimine (%25,40), karbonhidrat içeriğine (%88,50) ve en düşük protein içeriğine (%0,86) sahip olduğunu göstermiştir.

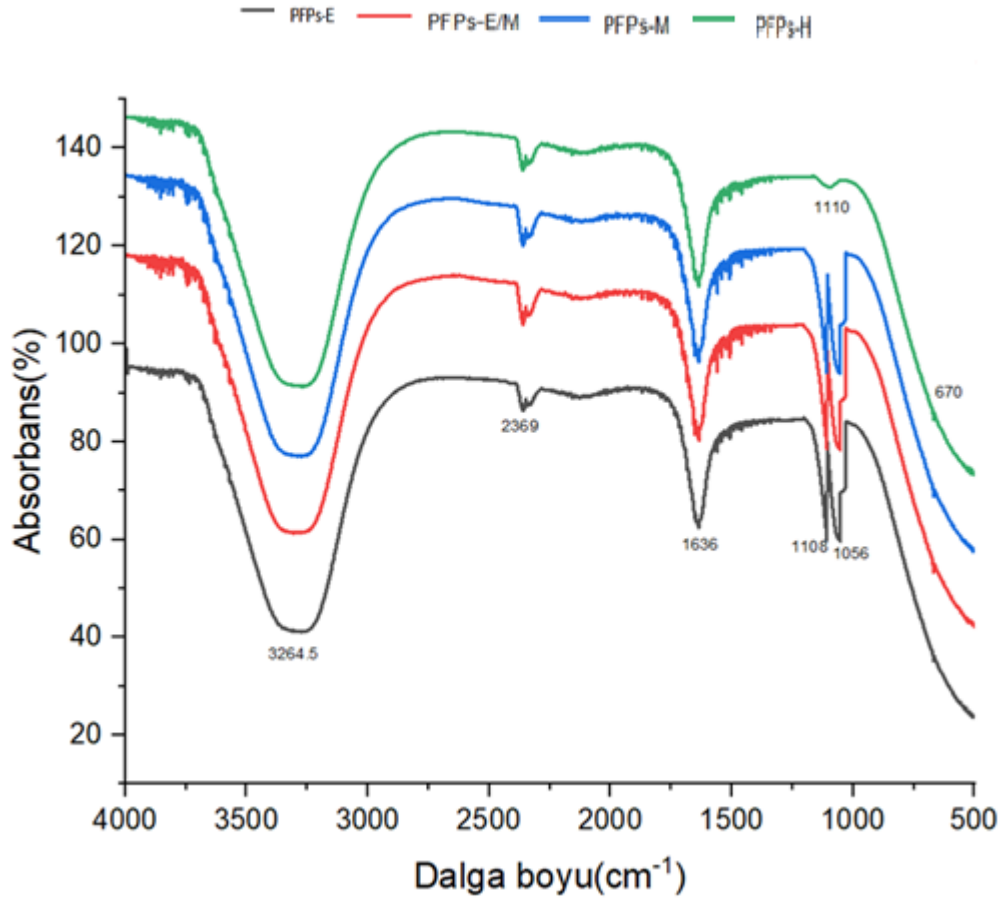


Şekil 8. Polisakkaritlerin karbohidrat aktivite sonucu

FT-IR yöntemi ile PFPs'lerin fonksiyonel grup analizi

Çarşır bitkisinden farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstrakte edilen polisakkaritlerin fonksiyonel gruplarını belirlemek için FT-IR spektroskopisi kullanılmıştır. Şekil 11.' de gösterildiği gibi $\sim 3264\text{ cm}^{-1}$ geniş bir pik polisakkaritlerin yapısına özgü olan hidroksil (-OH) gruplarının varlığını gözlenmiştir. $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ arası: Güçlü C-O, C-O-C (glikozidik bağ) ve C-O-H gerilmeleri—polisakkaritlerde belirleyici ve güçlü bantlar (parmak izi bölgesi) gözlenir. Bununla birlikte en önemli pik olan 1056 ve 1108 cm^{-1} 'deki belirgin pik, glikozidik bağları (C-O-C) ve alkol gruplarının (C-O) gerilme titreşimini temsil etmesi ile polisakkaritin yapısının ana iskeletini oluşturmaktadır. 1645 cm^{-1} 'deki pik ise, numunenin adsorbe edilmiş su

içerdiğini gösterir ki bu hidrofilik polisakkaritler için yaygındır. Literatürde farklı ekstraksiyon yöntemleriyle saflaştırılan polisakkaritlerin yapısı bu çalışmada TPP yöntemi ile saflaştırılan polisakkaritin FTIR sonuçları benzer bulunmuştur (Gagaoua vd., 2018; Pan vd., 2019; Wu vd., 2019). Elde edilen bu veriler, izole edilen maddenin başarılı bir şekilde saflaştırılmış bir polisakkarit olduğunu kanıtlamaktadır.

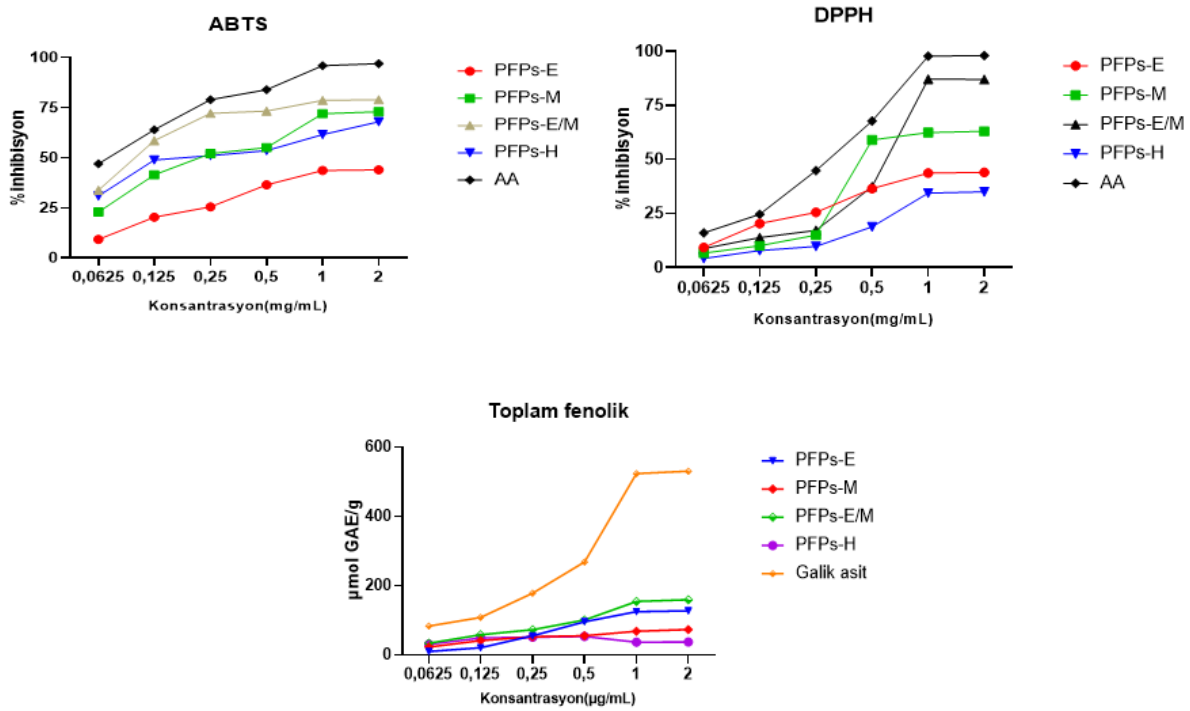


Şekil 9. PFPs'nin FTIR sonucu

Polisakkaritlerin antioksidan aktivitesi

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek bu zararlı moleküllerin aktivitesini azaltma veya nötralize etme kapasitesine sahip olan doğal bileşiklerdir (Halliwell vd., 2015). Literatür çalışmalarında bitkilerden ekstrakte edilen polisakkaritlerin önemli bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu (Chen & Zhang 2018) ve polisakkaritlerin fonksiyonel gıda, ilaç ve kozmetikler için önemli adaylar olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Zhang vd., 2022). Bu çalışmada, dört farklı yöntemle ekstrakte edilen polisakkaritlerin antioksidan aktiviteleri, DPPH ve hidroksil radikal temizleme aktivitesini tespit ederek, ABTS ve toplam fenolik analizleri yapılarak araştırılmıştır. Kararlı bir lipofilik serbest radikal olarak DPPH, ABTS ve toplam fenolik testleri, bitki polisakkaritlerinin serbest radikal temizleme aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Dudonne vd.,2009). PFPs'in, doza bağlı

bir şekilde 0,1 ila 2,0 mg/mL konsantrasyon aralığında DPPH radikal temizleme aktivitelerine sahip olduğu belirlendi (Şekil 2). Elde edilen veriler incelendiğinde, PFPs-E/M için, ABTS analizinde (%79), DPPH analizinde (%87) ve toplam fenolik madde içeriğinin 159 mg GAE/g olduğu tespit edildi. PFPs-E/M'nin ABTS (IC₅₀) 417.9 ±0,11 mg Askorbik asit (AA)/g ve DPPH analizi ise (IC₅₀) 819.1 ±0,10 mg Askorbik asit (AA)/g olarak belirlendi. PFPs- E/M'in diğer örneklerden istatistiksel olarak maksimum DPPH ve ABTS yüksek inhibisyonuna ulaştığı görüldü. PFPs-E grubu en düşük inhibisyon değeri gösterirken, FPs-M ve PFPs-H orta düzeyde inhibisyon gösterdiği belirlendi.



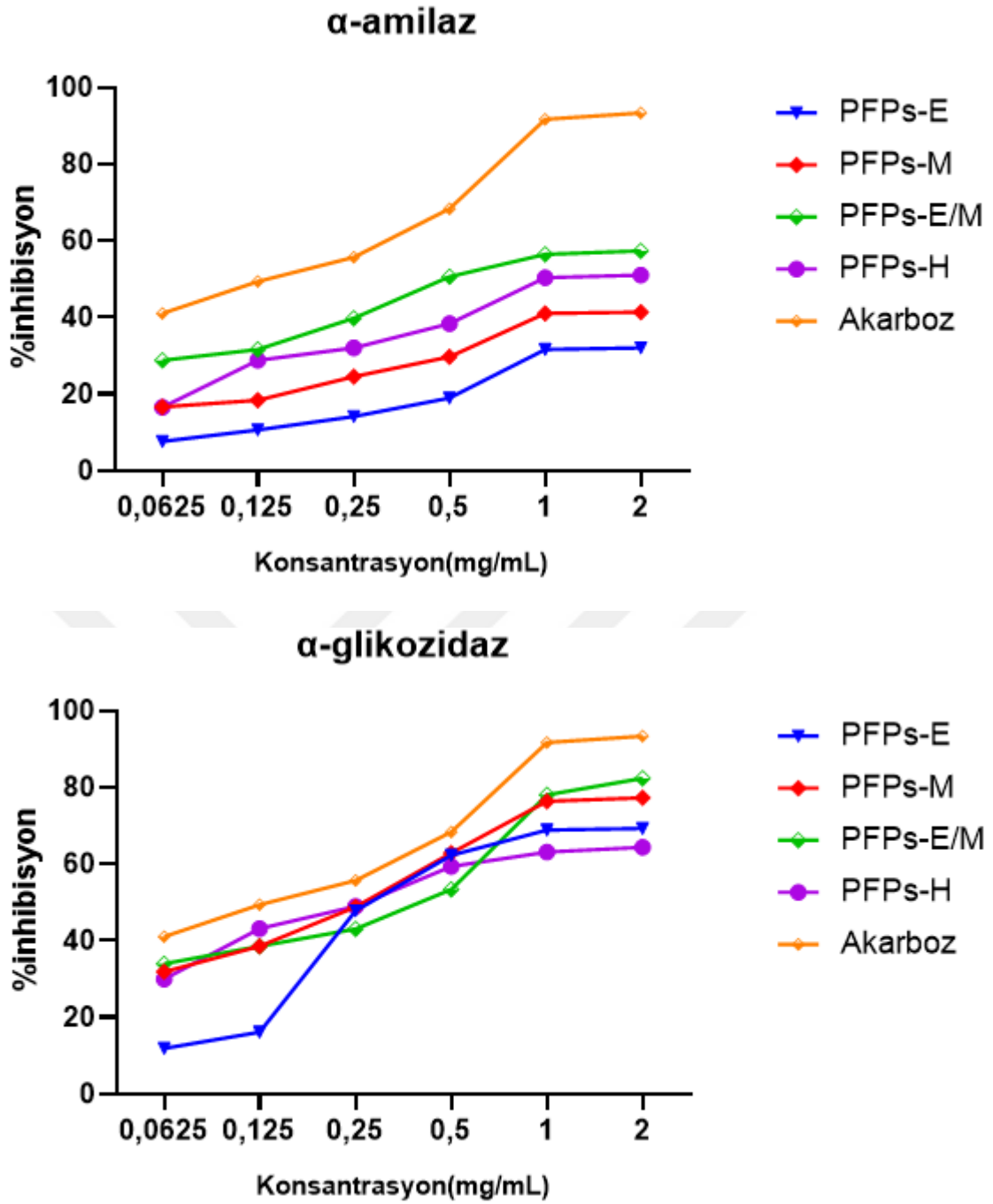
Şekil 10. Polisakkaritlerin *in vitro* antioksidan testleri

Elde edilen antioksidan testi sonuçları literatürdeki doğal kökenli ekstraktların antioksidan testi sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Asraoui ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Globularia alypum* L. yapraklarından Soxhlet yöntemiyle, iki farklı çözücü (etilasetat ve kloroform) kullanılarak ekstrakt elde edilmiş polisakkaritin, fenolik ve flavonoid bileşenlerini tanımlanarak bu ekstraktların antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre etil asetat ekstresinin DPPH testi sonucu IC₅₀ değerinin 12.3 ± 3.83 µg/mL, ABTS testi sonucu ise IC₅₀ değeri 37.0 ± 2.45 µg/mL olarak belirlenmiş olup her iki test sonucunda da yaklaşık %50 inhibisyon sağladığı gösterilmiştir. Bu bulgular sonucunda *Globularia alypum* L. etilasetat ekstraktının güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Asraoui vd.,2021). Sarghaleh ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, çadır otu (*Prangos ferulacea*) ekstraktının antioksidan değerleri belirlenmiş ve fenolik

bileşikleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre toplam fenolik içerik $48,6 \pm 1,2$ mg olarak bildirilmiştir. Antioksidan test sonuçlarındaysa ABTS testinde IC_{50} değeri $85,4 \mu\text{g/mL}$ olarak belirtilmiş, DPPH testindeyse DPPH radikalini $\%72,3 \pm 1,5$ oranında süpürme kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir (Sarghaleh vd., 2023). Elde edilen bu veriler karşılaştırıldığında, çadır bitkisinin serbest radikal gideriminde güçlü bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Polisakkaritlerin Hipoglisemik aktivitesinin belirlenmesi

Hiperglisemi T2DM (tip 2 diabetes mellitus) oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bitki polisakkaritlerinin T2DM üzerindeki adjuvan terapötik etkisi *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda belirlenmiştir (Yan vd., 2023). Bu tez çalışması kapsamında, hiperglisemi ve T2DM'yi değerlendirmenin önemli yöntemlerinden biri olan α -amilaz ve α -glukozidaz aktiviteleri üzerinde dört farklı yöntemle ekstrakte edilen PFPs'nin etkisi belirlendi (48,49). Şekil 3a'da görüldüğü gibi, dört farklı PFPs konsantrasyona bağlı bir şekilde α -amilaz aktivitesi üzerinde güçlü inhibitör etkisi gösterdiği ($P < 0,5$), ancak pozitif kontrol akarbozundan daha düşük olduğu belirlendi. Bu arada, PFPs-H, PFPs-E, PFPs-M ve PFPs-E/M'nun α -amilaz inhibisyonu için yüzdeleri sırasıyla 50, 31, 41 ve 58 % idi; bu değerler akarbozun ($0,125 \text{ mg/mL}$) değerinden çok daha yüksekti, Ayrıca dört PFPs'nin hepsi α -glukozidaz aktivitesini $0,0625 \text{ mg/mL}$ 'den 2 mg/mL 'ye artan konsantrasyonla önemli ölçüde inhibe etti ($P < 0,05$, Şekil 3b) ve PFPs-H < PFPs-E < PFPs-M < PFPs-E/M sırasını izledi. Diğer üç PFPs'ye (PFPs-H, PFPs-E, ve PFPs-M) kıyasla, PFPs-E/M'nun α -amilaz ve α -glukozidaz üzerinde daha güçlü inhibitör etkisi gösterdiği tespit edildi. Bu durumun mevcut literatürle de karşılaştırıldığında muhtemelen yüksek karbonhidrat ve polifenol içeriğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Jiang vd., 2020)



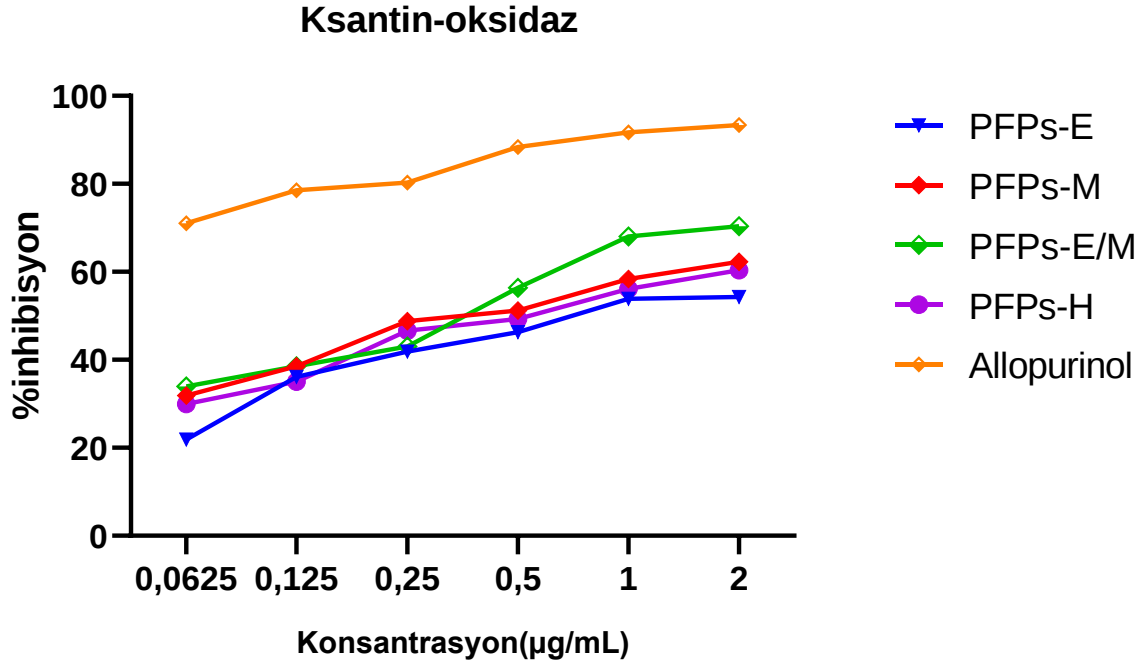
Şekil 11. Polisakkaritlerin (PFP_s-EM, PFP_s-M, PFP_s-E, PFP_s-H) hipoglisemik aktivitesinin belirlenmesi

Bu çalışmada elde edilen veriler literatürde bildirilen bazı bitkisel ekstraktlarla yapılan inhibisyon testleri sonucuyla karşılaştırılabilir düzeydedir . Örnek olarak Sabiu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mısır püskülü (*Zea Mays* L.) bitkisinin su ekstraksiyonunun elde edilen polisakkaritin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyeli değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, α -amilaz için 5,89 mg/mL , α -glukozidaz için ise 0,93 mg/mL IC₅₀ değerleri bulunmuştur. Ayrıca ekstraktın doz bağımlı etki gösterdiği gözlemlenmiş, yani her iki enzime karşı inhibisyonun konsantrasyona bağlı olarak arttığı

belirtilmiştir. Yapılan testler sonucu mısır püskülü ekstresinin nişasta hidrolizinin yavaşlamasına yardımcı olarak postprandiyal glukoz düzeyini dengelemekte potansiyel taşıdığı, dolayısıyla hipoglisemik bir aday olarak değerlendirilebilirliği fikri öne sürülmüştür (S.Sabiu vd., 2016). Son yıllarda polisakkaritler üzerine yapılan çalışmalarda, bitkilerden ekstrakte edilen polisakkaritlerin diyabet tedavisinde umut verici biyolojik ajanlar olduğunu göstermektedir (Sharma vd., 2022). Ekstrakte edilen bu polisakkaritlerin hipoglisemik etkileri bağırsakta α -glukozidaz ve α -amilaz gibi sindirim enzimlerinin inhibisyonu, oksidatif stresin azaltılması ve periferik dokularda glukoz alımının artırılması gibi farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır. *Momordica charantia* bitkisinden elde edilen polisakkaritlerin fare modellerinde açlık kan şekerini %32 oranında düşürdüğü ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği bildirilmiştir (Cortez-Navarrete vd., 2018). Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada ise *Dioscorea opposita*'dan elde edilen polisakkaritlerin tip 2 diyabetik sıçanlarda HbA1c seviyelerini %18 azaltarak uzun vadeli glisemik kontrol sağladığı bildirilmiştir (D.He vd., 2025).

Polisakkaritlerin Hipoürisemik aktivitesinin belirlenmesi

Epidemiyolojik çalışmalar hiperüriseminin purin metabolik bozukluğu ve serum ürik asit içeriğini artırması ile karakterize edilen bir sendrom olduğunu bildirilmiştir. Hipoürisemik aktivite testlerinde, ksantin oksidaz inhibisyonunun (XO) test edilmesi, XO kaynaklı hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak yararlı olabileceğinden, örneklerde XO inhibisyonunu incelemek amacıyla *in vitro* biyolojik deneyler kullanılır (Zain vd., 2024). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre PFP-EM örneği en yüksek inhibisyonu göstermiştir. PFP-H ve PFP-M , α -amilaz testinde orta düzeyde aktivite gösterirken PFP-E örneğinde en düşük inhibisyon gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 12. Polisakkaritlerin (PFP_s-EM, PFP_s-M, PFP_s-E, PFP_s-H) hipourisemik aktivitesinin belirlenmesi

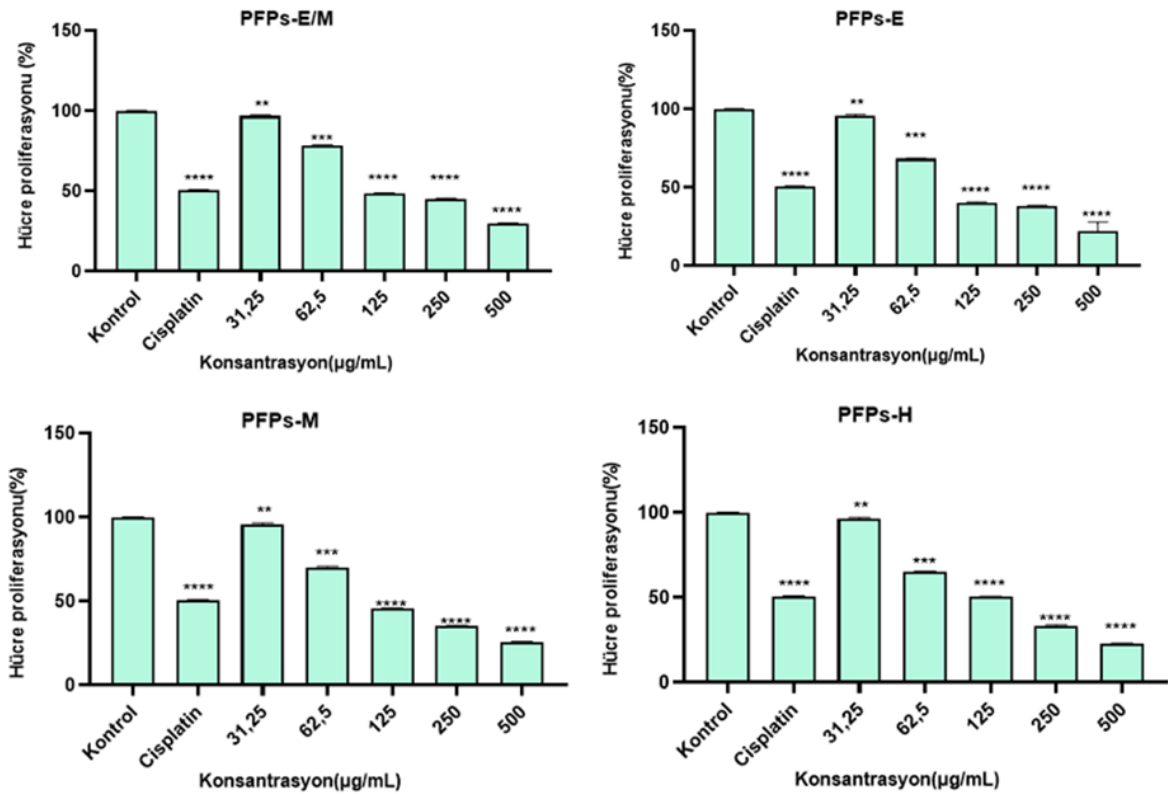
Elde edilen sonuçlar literatürdeki bazı sonuçlarla karşılaştırıldığında bitkisel polisakkaritlerin hipourisemik potansiyeline ait çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Örnek olarak Du ve arkadaşları tarafından *Porphyra* (nori) polisakkaridi (PP) üzerine yapılan bir çalışmada, PP'nin XO'yu geri dönüşümlü ve “mixed-competitive” mekanizma ile inhibe ettiği ve IC₅₀ değerinin 10.53 ± 0.69 mg/mL olduğu bildirilmiştir (Du vd., 2022). Lin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Ganoderma lucidum* bitkisinden ekstrakte edilen polisakkarit peptid (GLPP), hiperurisemi fare modelinde serum ürik asit düzeyini %40,6 oranında düşürdüğü, bu etkiyi hem adenzin deaminaz (ADA) inhibitör aktivitesiyle ürik asit üretimini azalttığı rapor edilmiştir (Lin vd., 2022). Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Lonicera japonica*'dan elde edilen polisakkaritlerin, orta ve yüksek dozlarda serum ürik asidi sırasıyla %43–%48 oranında azaltırken, XOD aktivitesini de %55'e kadar inhibe ettiği bildirilmiştir (Jiang vd., 2020).

Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçların da bu literatürler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlar, polisakkaritlerin ksantin oksidaz inhibisyon kapasitesinin mevcut standart inhibitörlere kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir. 2 mg/mL gibi görece yüksek konsantrasyonlarda dahi inhibisyon oranı %55–60 seviyesini aşmamaktadır. Bu bulgular, literatürde bildirilen polisakkaritlerin XO inhibisyon gücüyle uyumludur.

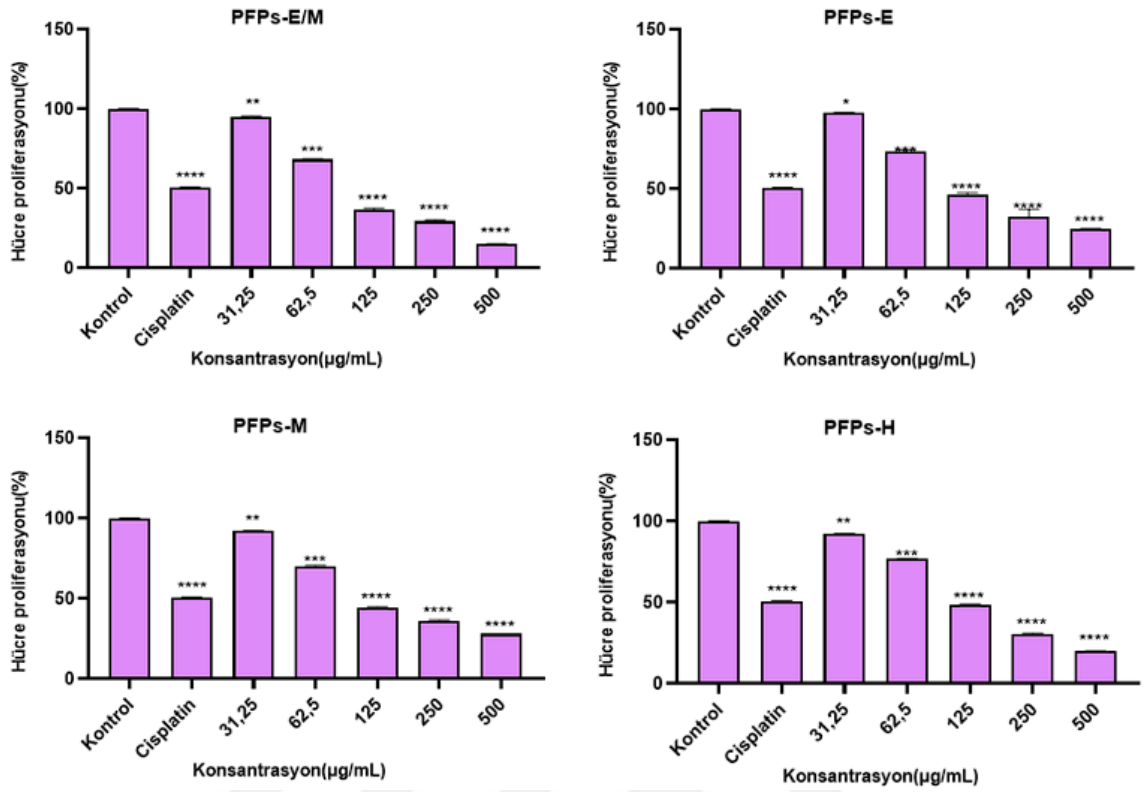
Polisakkaritlerin Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi

Polisakkaritlerin A549 ve MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

Kanser, insanlarda ikinci en büyük ölüm nedeni ve önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Doğal ürünler, kayda değer tümör karşıtı etkileri, zengin kaynakları ve düşük sitotoksisite nedeniyle yeni anti-kanser ilaçlar olarak kabul edilmektedir. Tüm doğal ürün çeşitleri arasında, bitki, mantar, deniz kaynakları ve mikroorganizma polisakkaritleri, kanserin önlenmesi ve tedavisi için geliştirilebilecek tatmin edici ürünlerdir (B.Sanjeev vd., 2015; R.Nidesha vd.,2024; Y.Li vd., 2025). Bu çalışmada, dört farklı yöntemle ekstrakte edilen PFPs'nin iki kanser hücre hattı (MCF-7 ve A549 hücreleri) üzerindeki sitotoksik etkisi, 48 saat boyunca 5-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında WST-8 testi ile değerlendirilmiştir. WST-8 testinin sonuçları, PFPs'lerin üç kanser hücresinin çoğalma kapasitesi üzerinde güçlü bir inhibitör etki gösterdiğini ve IC₅₀ değerlerinin Tablo 10'da gösterildiğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda, MCF-7 ve A549 hücrelerinin dört farklı PFPs (<500 µg/mL) muamale sonrası çoğalmalarını, PFPs-H < PFPs-M < PFPs-E < PFPs-E/M sırasıyla inhibe ettiği tespit edildi (Şekil 13 ve 14). Ancak inhibitör etkisinin pozitif kontrol olan cisplatinden daha düşük olduğu belirlendi. Sonuç olarak, PFPs'ler, kanser hücrelerinin çoğalmalarını ve istilasını engelleyerek etkili antitümör terapötik ajanlar olabileceği , PFPs'lerin potansiyel antitümör mekanizmalarını daha fazla aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir.



Şekil 13. Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen polisakkaritlerin A549 hücre hattı üzerindeki doz bağımlı olarak sitotoksik etkisi (48 saat)



Şekil 14. Farklı yöntemlerle ekstrakte edilen polisakkaritlerin MCF-7 hücre hattı üzerindeki doz bağımlı olarak sitotoksik etkisi (48. Saat)

Tablo 11. Kanser Hücrelerinde PFP_s'lerin IC₅₀ Konsantrasyonu (µg/mL).

Hücre Hattı	PFPs-E/M	PFPs-M	PFPs-E	PFPs-H	Cisplatin
A549	105	110	108	125	7 µM
MCF-7	78	90	85	120	10 µM

Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında da uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Örnek olarak Zhongbing ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Carthamus tinctorius* bitkisinden ekstrakte edilen polisakkaritlerin (SPS), özellikle MCF-7 meme kanseri hücre hattında belirgin sitotoksik etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada, SPS'nin hücre canlılığı üzerine etkileri doz-bağımlı olarak değerlendirilerek; 100–400 µg/mL konsantrasyon aralığında MCF-7 hücrelerinde anlamlı proliferasyon baskılanması gözlenmiştir. Sonuç olarak SPS'nin normal hücreler üzerinde düşük toksisite göstermesinin, seçici antikanser potansiyel ajan olmasının bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Zhongbing vd., 2015).

Polisakkaritlerin MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarındaki apoptoz ilişkili genlerin kantitatif ekspresyon seviyelerine etkileri

PFP_s-EM, PFP_s-E, PFP_s-M, PFP_s-H yöntemleri elde edilen polisakkaritleri için belirlenen en iyi IC₅₀ konsantrasyonunda ve uygulama süresinde MCF-7 ve A549 kanser hücre hattı ile muamele edildikten sonra mRNA izolasyonu, cDNA sentezi yapıldı ve konsantrasyonları ölçüldü. Daha önce dizilimi yapılan primerleri kullanılarak ve SYBR Green Real-Time PCR protokolü takip edilerek BAX, BCL2, KASPAZ-3 ve β -aktin için kantitatif gen ekspresyon analizi yapıldı. Deneyler üçer tekrarlı ve her bir tekrar 3 tekerrürlü olarak ölçüldü. Real-Time PCR sonrası kontrol ve muamele gruplarına ait CT değerlerine göre standart sapmalarıyla Livak Metodu (2- $\Delta\Delta$ Ct) ile analiz edildi. GraphPad Prism Software 8.00 istatistik programı kullanılarak sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

RNA izolasyonunun spektrofotometrik gösterilmesi

MCF-7 ve A549 hücre hattından izole edilen RNA örneklerine ait saflık dereceleri ve konsantrasyonları nanodrop cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. RNA'ların konsantrasyonları 260 nm dalga boyunda ölçülerek, saflık dereceleri ise 260/280 oranı ile belirlendi. Kontrol ve muamele gruplarının (PFP_s-EM, PFP_s-E, PFP_s-M, PFP_s-H) 48. saatlere ait insan meme ve akciğer kanser hücre hatlarından izole edilen RNA örneklerinin ve sentezi yapılan cDNA'ların saflık dereceleri ve konsantrasyonları Tablo 12 ve 13'te da verilmiştir.

Tablo 12. Kontrol ve Muamele Gruplarının (PFP_s-EM, PFP_s-E, PFP_s-M, PFP_s-H) 48. Saate ait İnsan Meme Hücre Hattından İzole Edilen RNA Örneklerinin Saflık Dereceleri ve Konsantrasyonları

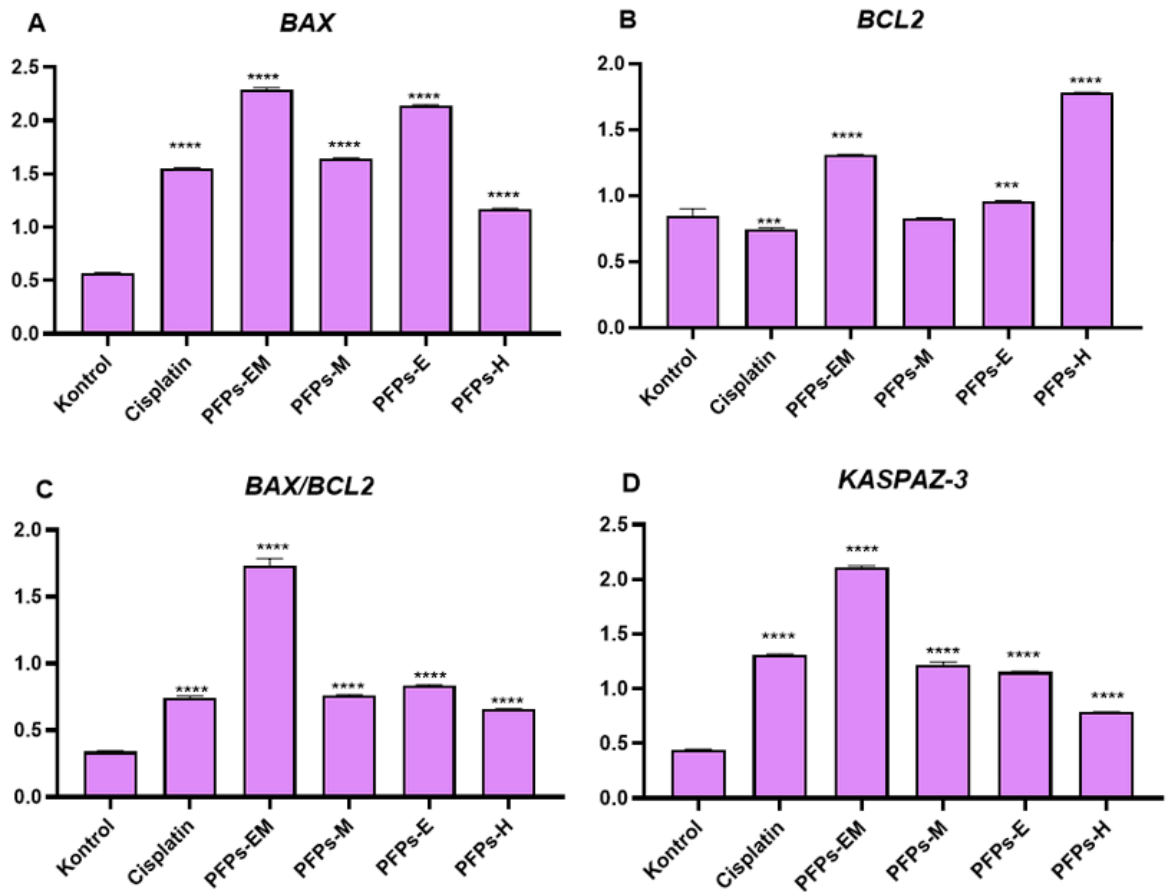
Zaman	Deney Grupları	RNA Saflık Derecesi (A260/A280)	RNA Konsantrasyon (ng/ μ L)
48 saat	Kontrol	2.3	26.5
	Cisplatin	2.28	25.7
	PFP _s -EM	2.37	8.72
	PFP _s -E	2.22	31.4
	PFP _s -M	2.2	624
	PFP _s -H	2.13	18.1

Tablo 13. Kontrol ve Muamele Gruplarının (PFPs-EM, PFPs-E, PFPs-M, PFPs-H) 48. Saate ait İnsan Akciğer Hücre Hattından İzole Edilen RNA Örneklerinin Saflık Dereceleri ve Konsantrasyonları

Zaman	Deney Grupları	RNA Saflık Derecesi (A260/A280)	RNA Konsantrasyon (ng/ μ L)
48 saat	Kontrol	2.18	154
	Cisplatin	2.02	26.9
	PFP _s -EM	2.19	22.6
	PFP _s -E	2.19	348
	PFP _s -M	1.97	24.3
	PFP _s -H	2.08	31.8

Polisakkaritlerin MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde apoptoz ilişkili genlerinin (BAX, BCL2 ve KASPAZ-3) mRNA ekspresyon seviyeleri

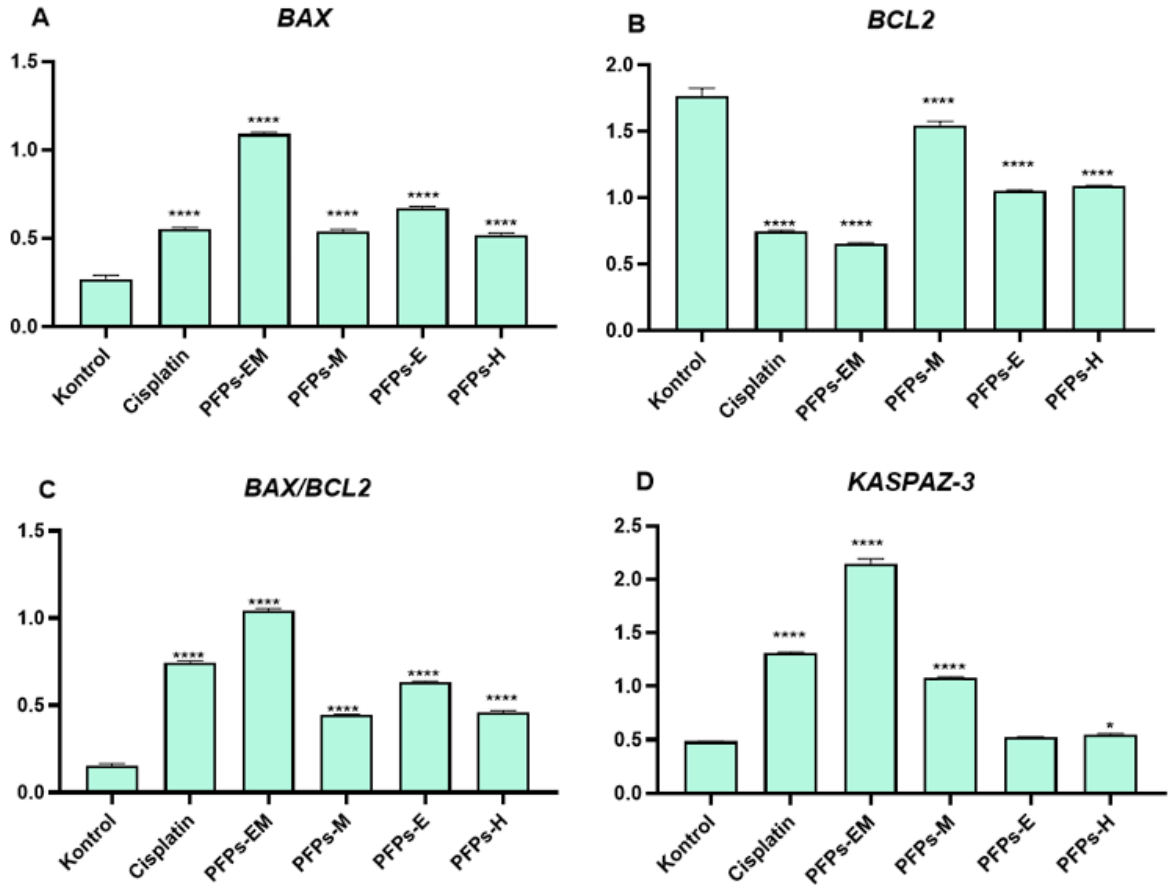
Polisakkarit gruplarıyla (PFP_s-EM, PFP_s-E, PFP_s-M, PFP_s-H) 48 saat muamele edilen MCF-7 hücrelerinde, bütün uygulama gruplarında *BAX*, *BCL2*, *KASPAZ-3* ($p < 0.0001$) genlerinin ve *BAX/BCL2* ($p < 0.0005$) oranının mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. . Cisplatin grubunda ise, ilacın bilinen apoptotik etkileriyle uyumlu artış tespit edildi. Polisakkarit muamele incelendiğinde ise özellikle **PFPs-EM** grubunun en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiş olup, bu durum söz konusu PFP_s ekstraksiyonlarının güçlü apoptotik etki potansiyeline işaret etmektedir. Bu bulgular, PFP ekstraktlarının apoptotik yolak genlerini aktive ederek hücre ölümünü uyarabildiğini ve özellikle PFPs-EM'in potansiyel bir antikanser ajan olarak dikkate alınabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 15. Polisakkarit gruplarının (PFPs-EM, PFPs-E, PFPs-M, PFPs-H) MCF-7kanser hücre hattında *BAX*, *BCL2*, *BAX/BCL2* ve *KASPAZ-3* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

Polisakkaritlerin A549 kanser hücre hattı üzerinde apoptoz ilişkili genlerinin (*BAX*, *BCL2* ve *KASPAZ-3*) mRNA ekspresyon seviyeleri

Polisakkarit gruplarıyla (PFPs-EM, PFPs-E, PFPs-M, PFPs-H) 48 saat muamele edilen A549 hücrelerinde, bütün uygulama gruplarında *BAX*, *BCL2*, *BAX/BCL2* ve *KASPAZ-3* ($p < 0.0001$) genlerinin ve *BAX/BCL2* ($p < 0.0005$) oranının mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlendi. Cisplatin grubunda ise, ilacın bilinen apoptotik etkileriyle uyumlu artış tespit edildi. Polisakkarit muamele incelendiğinde ise özellikle **PFPs-EM** grubunun en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiş olup, bu durum söz konusu PFPs ekstraksiyonlarının güçlü apoptotik etki potansiyeline işaret etmektedir. Bu bulgular, PFP ekstraktlarının apoptotik yolak genlerini aktive ederek hücre ölümünü uyarabildiğini ve özellikle PFPs-EM'in potansiyel bir antikanser ajan olarak dikkate alınabileceğini ortaya koymaktadır.

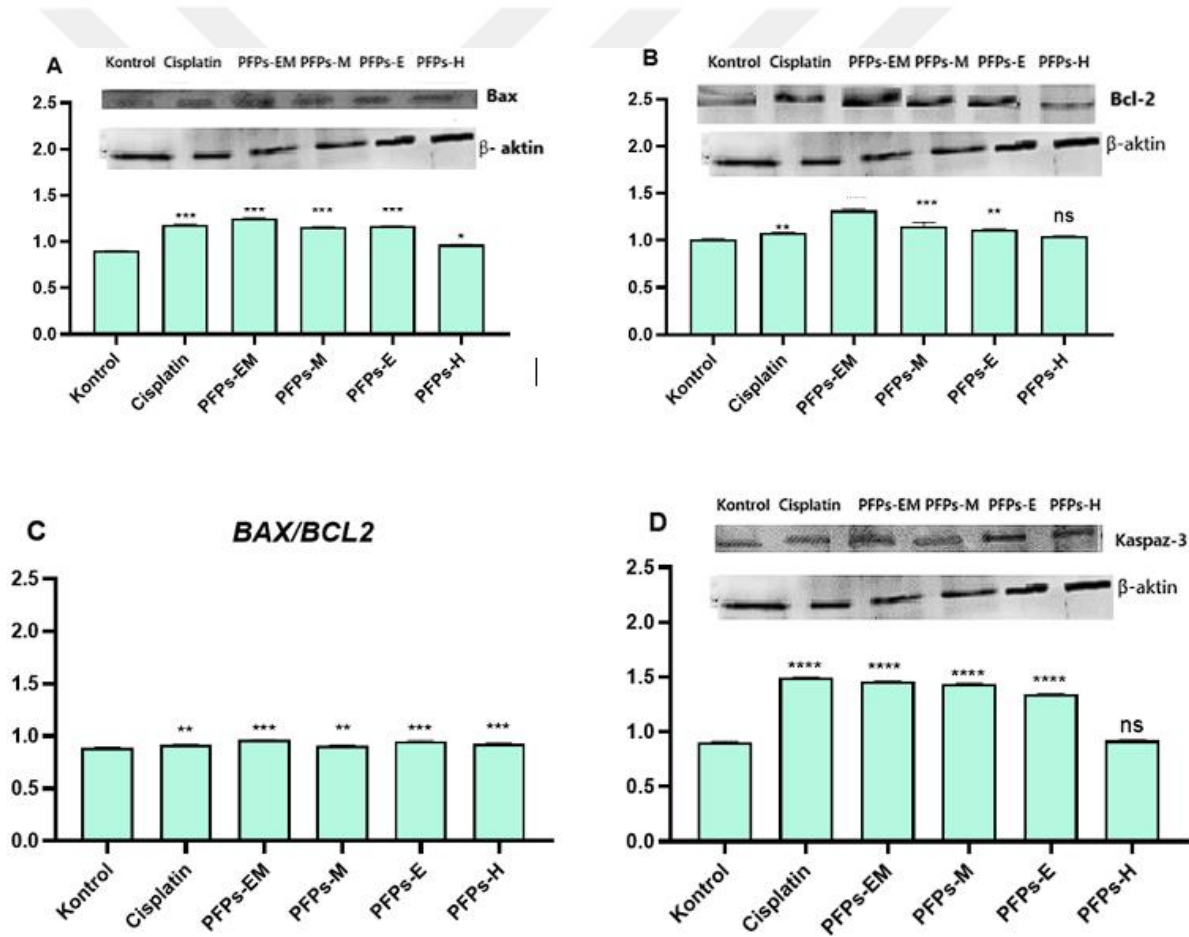


Şekil 16. Polisakkarit gruplarının (PFPs-EM, PFPs-E, PFPs-M, PFPs-H) A549 kanser hücre hattında *BAX*, *BCL2*, *BAX/BCL2* ve *KASPAZ-3* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi

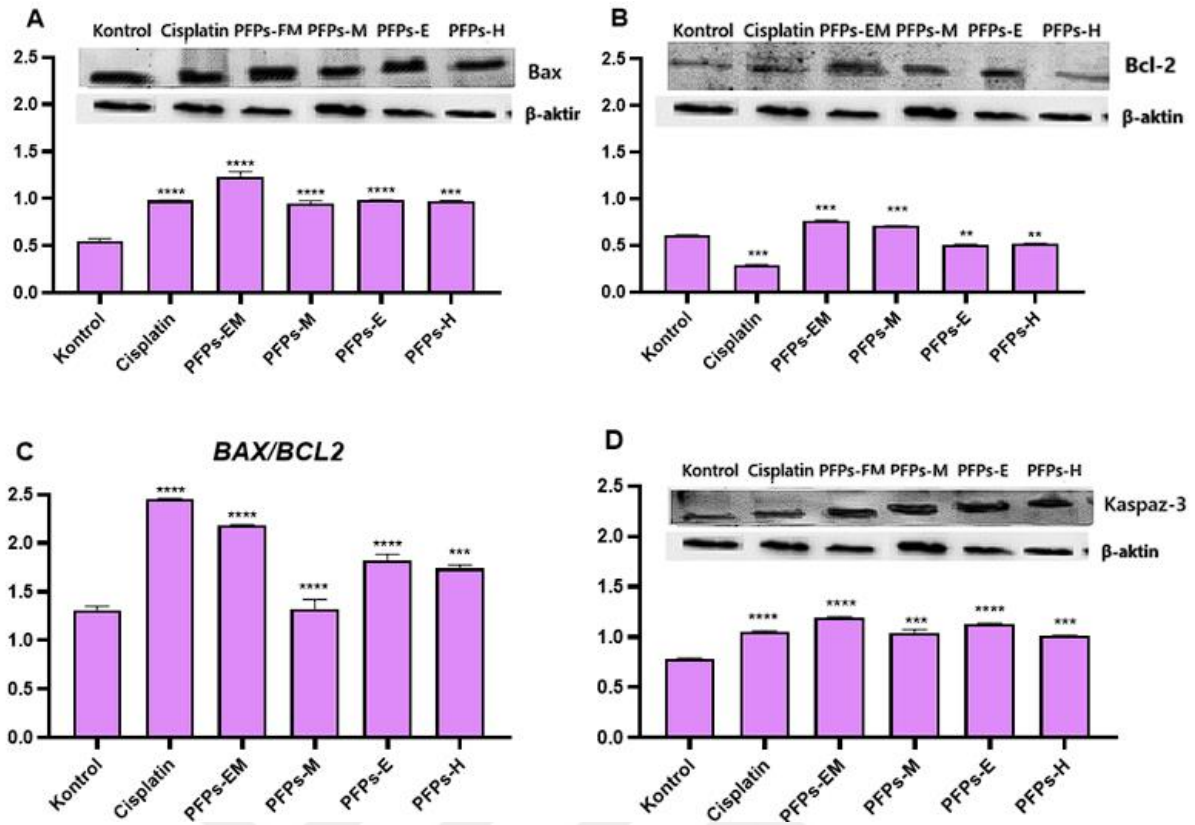
Literatüre bakıldığında, Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da *Flammulina velutipes*'den ekstrakte edilen polisakkaritlerin A549 akciğer adenokarsinom hücrelerinde mitokondriyal yol aracılığıyla apoptozu uyardığını göstermektedir. *BAX* gen ekspresyonundaki artış ve *BCL2* düzeylerindeki azalma sonucunda *BAX/BCL2* oranında belirgin bir yükseliş gözlenmiş, özellikle *KASPAZ-3* ve *KASPAZ-9* gen ekspresyon düzeylerindeki artış, apoptotik yolun aktive edildiğine işaret etmektedir (Zhao vd.,2024). Bir diğer Lin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise Guava (*Psidium guajava* L.) tohumundan elde edilen polisakkaritlerinin (GSF3) MCF-7 meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ederek potansiyel bir antikanser ajanı olduğunu belirtmektedir. Yapılan çalışmada gen ekspresyonu analizleri için iki aşamalı ters transkripsiyon kuantitatif PCR (RT-qPCR) yöntemi kullanılmış, analiz sonucunda GSF3 polisakkaritinin pro-apoptotik *BAX* ve anti-apoptotik *BCL2* genlerinin ekspresyon seviyesini artırarak apoptozu desteklediği ve Fas geninin ekspresyonunu artırarak ekstrinsik apoptoz yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (Lin et al. 2020).

Polisakkaritlerin A549 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerinde *BAX*, *BCL2* ve *KASPAZ-3* proteinlerinin kantitatif ekspresyon seviyelerine etkileri

PFPs-EM, PFPs-E, PFPs-M, PFPs-H polisakkaritleri için belirlenen en iyi IC₅₀ konsantrasyonunda ve uygulama süresinde A549 ve MCF-7 kanser hücre hatlarında muamele işleminden sonra total proteinin izole edilmesi kısmında açıklandığı gibi hücre lizatı hazırlandı. Hücre lizatlarından 30 µg kullanılarak belirtilen polisakkaritlerle muamelesi sonrası A549 ve MCF-7 kanser hücre hatlarında *BAX*, *BCL2* ve *KASPAZ-3* kantitatif protein ekspresyonundaki değişiklik western blot yöntemiyle araştırıldı. Şekil 17 ve 18’de görüldüğü gibi, farklı yöntemlerle ekstrakte edilen polisakkaritlerin A549 ve MCF-7 kanser hücre hatlarında muamelesi sonrasında *BAX* ve *KASPAZ-3* ve *BAX/BCL2* proteinlerinde ekspresyonunda artış gösterdiği ve aynı zamanda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldüğü ($p<0,05$) belirlendi.



Şekil 17. Polisakkaritin etkin gösterdiği konsantrasyonunda A549 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyon etkisi



Şekil 18. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ekstrakte edilen polisakkaritin etkin gösterdiği konsantrasyonunda MCF-7 hücreleri üzerinde kantitatif protein ekspresyon etkisi

Elde edilen sonuçlar literatürle karşılaştırıldığında da uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Örneğin, Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da *Flammulina velutipes*'den ekstrakte edilen polisakkaritlerin A549 hücrelerinde KASPAZ-3, Kaspaz-9 ve BAX proteinlerinin ekspresyonunu artırarak hücre içi protein seviyelerinde anlamlı değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (F.Zhao vd.,2024). Başka bir benzer çalışmada ise, Li ve arkadaşları Safflower polisakkaritlerinin (SPS) A549 hücrelerinde BAX ve KASPAZ-3 protein seviyelerini artırdığı ve bu artışların apoptoz ile ilişkili olduğunu bildirmişler. Bu bulgular, polisakkaritlerin kanser hücrelerinde apoptoz yollarını aktive ederek hücre ölümünü teşvik edebileceğini ve potansiyel bir antikanser ajan olabileceğini göstermektedir (Li vd., 2016).

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Yapılan bu tez çalışmasında Erzurum'da yetişen çasır bitkisinden (*Prangos Ferula* (L.)) TPP, TPP öncesi enzim ön işlemi (E-TPP), TPP öncesi manyetik alan ön işlemi (M-TPP) ve TPP öncesi enzim/manyetik alan ön işlemi (E/M-TPP) yöntemleri uygulanarak polisakkaritler ekstrakte edildi. Daha iyi verim alabilmek için 4 farklı yöntem (manyetik alan ön işlem, enzim ön işlem, enzim manyetik ön işlem, TPP karşılaştırılarak, ekstraksiyon koşulları optimize edildi. Optimizasyon çalışmaları sonucunda; 30°C'de pH 7.0, %20 amonyum sülfat konsantrasyonu ve 1.0:1.5 süpernatant çözeltisi/ t-butanol oranı ile E/M-TPP ile elde edilen polisakkaritin en yüksek ekstraksiyon verimini (%27), karbohidrat içeriğini (%90) ve en düşük protein içeriğini (%0,82) gösterdiği tespit edildi.
2. Ekstrakte edilen polisakkaritlerin fonksiyonel gruplarını belirlemek için FTIR analizi yapıldı. FTIR analizi sonucunda $\sim 3264\text{ cm}^{-1}$ geniş bir pik polisakkaritlerin yapısına özgü olan hidroksil (-OH) gruplarının varlığını ve en önemli pik olan $1056\text{ ve }1108\text{ cm}^{-1}$ deki belirgin pik, glikozidik bağları (C-O-C) ve alkol gruplarının (C-O) gerilme titreşimini temsil etmesi ile polisakkaritin yapısının ana iskeletini oluşturduğu gözlemlendi.
3. Farklı yöntemlerle ekstrakte (PFPs-EM, PFPs-M, PFPs-E, PFPs-H) elde edilen polisakkaritlerinin antioksidan aktivitesinin belirlemek için DPPH, ABTS ve toplam fenolik içerik analizleri yapıldı. PFPs-E/M için, ABTS analizinde (%79), DPPH analizinde (%87) ve toplam fenolik madde içeriğinin 159 mg GAE/g olduğu tespit edildi. PFPs-E/M'nin ABTS (IC_{50}) $417.9 \pm 0,11$ mg Askorbik asit (AA)/g ve DPPH analizi ise (IC_{50}) $819.1 \pm 0,10$ mg Askorbik asit (AA)/g olarak belirlendi.
4. Hipoglisemik aktivitelerin belirlenmesi sonucunda ise PFPs-H, PFPs-E, PFPs-M ve PFPs-E/M'nun α -amilaz inhibisyonu için yüzdeleri sırasıyla 50, 31, 41 ve 58 % olduğu belirlendi.
5. Gen ekspresyonu ve Western blot analizleri sonucunda, farklı yöntemlerle ekstrakte edilen polisakkaritler arasında özellikle PFPs-E/M fraksiyonunun, pro-apoptotik BAX gen ve protein ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdığı belirlendi. Ayrıca, bu fraksiyonun KASPAZ-3 aktivitesinde ve BAX/BCL-2 oranında belirgin bir yükselmeye yol açtığı saptanmıştır. Bu bulgular, PFPs-E/M polisakkaritlerinin apoptozu indükleyerek antikanser etki gösterdiğini güçlü biçimde desteklemektedir.

Sonuç olarak; bu tez çalışması kapsamında yöresel çadır bitkisinden ilk kez polisakkarit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve böylece literatürde belirtilen bitkiler dışında yeni bir tür bitkiden ekstrakte edilen polisakkaritler literatüre kazandırılmıştır. Ayrıca ilk kez manyetik alan ön işlemiyle ve manyetik alan-TPP kombinasyonu ile polisakkaritlerin ekstraksiyonu başarılı bir şekilde yapılmıştır. Özellikle polisakkaritlerin ekstraksiyon yöntemlerinin onların fizikokimyasal, yapısal özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini etkileyebileceği de göz önüne alındığında bu çalışmayla polisakkaritlerin yüksek verimle ve düşük maliyetle ekstraksiyonu için alternatif bir çözüm yaklaşımı ve imkânı sunduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda elde edilen biyoaktif PFPs'lerin gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde uygulama için fonksiyonel bileşenler olarak iyi bir aday olabilecekleri düşünülmekte, bununla birlikte bu uygulamalarda kullanımları için bu polisakkaritlerin ileri düzeyde fizikokimyasal ve karakterizasyon çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas-Mohammadi, M., Farimani, M. M., Salehi, P., Ebrahimi, S. N., Sonboli, A., Kelso, C., & Skropeta, D. (2018). Acetylcholines- terase-inhibitory activity of Iranian plants: Combined HPLC/bio- assay-guided fractionation, molecular networking and docking strategies for the dereplication of active compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 158, 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.026>
- Adewale, O. O., Wińska, P., Krawczyk, H., Grzechnik, E., & Cieśla, J. (2024). Screening of antioxidative and antiproliferative activities of crude polysaccharides extracted from six different plants. *Applied Sciences*, 14(9), 3683. <https://doi.org/10.3390/app14093683>
- Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032>
- Asraoui, F., Kounnoun, A., Cadi, H. E., Cacciola, F., Majdoub, Y. O. E., Alibrando, F., ... & Louajri, A. (2021). Phytochemical investigation and antioxidant activity of *Globularia alypum* L. *Molecules*, 26(3), 759. <https://doi.org/10.3390/molecules26030759>
- Bai, L., Xu, D., Zhou, Y. M., Zhang, Y. B., Zhang, H., Chen, Y. B., & Cui, Y. L. (2022). Antioxidant activities of natural polysaccharides and their derivatives for biomedical and medicinal applications. *Antioxidants*, 11(12), 2491. doi: 10.3390/antiox11122491.
- Banerjee, S., Parasramka, M., & Paruthy, S. B. (2015). Polysaccharides in cancer prevention: from bench to bedside. *Polysaccharides*, 1-30.
- Benalaya, I., Alves, G., Lopes, J., & Silva, L. R. (2024). A review of natural polysaccharides: sources, characteristics, properties, food, and pharmaceutical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1322. <https://doi.org/10.3390/ijms25021322>
- Bernhoft, A., Siem, H., Bjertness, E., Meltzer, M., Flaten, T., & Holmsen, E. (2010). Bioactive compounds in plants—benefits and risks for man and animals. The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo.
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., ... & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Birge, A., Alcicek, E. A., Baltaci, M. O., Sisecioglu, M., & Adiguzel, A. (2022). Purification and biochemical characterization of a new thermostable laccase from *Enterococcus faecium* A2 by a three-phase partitioning method and investigation of its decolorization potential. *Archives of Microbiology*, 204(8), 533. DOI: 10.22541/au.170668531.14174516/v1
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Chen, J., & Zhang, W. (2018). A Review of Plant Polysaccharides as Antioxidants" Carbohydrate Polymers. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.06.027
- Chen, Y., Gu, X., Huang, S. Q., Li, J., Wang, X., & Tang, J. (2010). Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities. *International journal of biological macromolecules*, 46(4), 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.02.003>
- Claus-Desbonnet, H., Nikly, E., Nalbantova, V., Karcheva-Bahchevanska, D., Ivanova, S., Pierre, G., ... & Delattre, C. (2022). Polysaccharides and their derivatives as potential antiviral molecules. *Viruses*, 14(2), 426. doi: 10.3390/v14020426
- Costa, L. S., Fidelis, G. P., Cordeiro, S. L., Oliveira, R. M., Sabry, D. A., Câmara, R. B. G., ... & Rocha, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.03.005>
- Deng, R., Wang, F., Wang, L., Xiong, L., Shen, X., & Song, H. (2023). Advances in plant polysaccharides as antiaging agents: effects and signaling mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(19), 7175-7191.
- Duru, M. ve Şahin, A. (2015). Erkek ve Dişi Çakşır (Ferula (Ferula eleaocytris) Kökü) Tozunun Yumurtacı Tavuklarda Verim ve Yumurta Kalitesi Üzerine Etkisi. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 5(2): 99-109.
- Fernandes, P. A. R., & Coimbra, M. A. (2023). *The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-activity relationship overview*. *Carbohydrate Polymers*, 314, 120965. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120965>
- Gagaoua, M. (2018). Aqueous methods for extraction/recovery of macromolecules from microorganisms of atypical environments: A focus on three phase partitioning. *Methods in Microbiology*, 45, 203–242. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2018.07.007>
- Pan, X., Wu, S., Yan, Y., Chen, X., Guan, J., Bao, Y., ... & Liu, L. (2019). Rice bran polysaccharide-metal complexes showed safe antioxidant activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 934-940. 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.265 review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.
- Wu, S., Ni, D., Yan, Y., Pan, X., Chen, X., Guan, J., ... & Liu, L. (2019). Safe and efficient gene delivery based on rice bran polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 1041-1049. 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.049
- Gan, Q. X., Wang, J., Hu, J., Lou, G. H., Xiong, H. J., Peng, C. Y., & Huang, Q. W. (2020). Modulation of apoptosis by plant polysaccharides for exerting anti-cancer effects: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 792. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00792>
- García-Vaquero, M., Rajauria, G., O'Doherty, J. V., & Sweeney, T. (2017). Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food research international*, 99, 1011-1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.016>
- Gullón, P., González-Muñoz, M. J., & Parajó, J. C. (2011). Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. *Bioresource Technology*, 102(10), 6112-6119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.059>
- Guo, R., Chen, M., Ding, Y., Yang, P., Wang, M., Zhang, H., ... & Ma, H. (2022). Polysaccharides as potential anti-tumor biomacromolecules—a review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 838179. doi: 10.3389/fnut.2022.838179
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5th ed.). Oxford University Press.

- He, D., & Cui, C. (2025). Plant Heteropolysaccharides as Potential Anti-Diabetic Agents: A Review. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(7), 533. <https://doi.org/10.3390/cimb47070533>
- Jafari, F., Khodaiyan, F., Kiani, H., & Hosseini, S. S. (2017). Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and properties. *Carbohydrate polymers*, 157, 1315-1322. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.013>
- Jalil Sarghaleh, S., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M., Vasiee, A., & Noshad, M. (2023). Evaluation of the constituent compounds, antioxidant, anticancer, and antimicrobial potential of Prangos ferulacea plant extract and its effect on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *Frontiers in microbiology*, 14, 1202228. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1202228>
- Jiang, F., Chen, R., Tang, C., Li, L. Q., Yan, J. K., & Zhang, H. (2023). Polysaccharide extracted from cultivated Sanghuangporous vaninii spores using three-phase partitioning with enzyme/ultrasound pretreatment: Physicochemical characteristics and its biological activity *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126622 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126622>
- Jiang, L. L., Gong, X., Ji, M. Y., Wang, C. C., Wang, J. H., & Li, M. H. (2020). Bioactive compounds from plant-based functional foods: a promising choice for the prevention and management of hyperuricemia. *Foods*, 9(8), 973. <https://doi.org/10.3390/foods9080973>
- Jin,H.,Li,M.,Tian,F,Yu,F.,& Zhao,W. (2022).An overview of antitumour activity of polysaccharides. *Molecules*, 27(22), 8083. <https://doi.org/10.3390/molecules27228083>
- Jing, Y., Yan, M., Zhang, H., Liu, D., Qiu, X., Hu, B., ... & Wu, L. (2023). Effects of extraction methods on the physicochemical properties and biological activities of polysaccharides from Polygonatum sibiricum. *Foods*, 12(10), 2088. <https://doi.org/10.3390/foods12102088>
- Kasangana, P. B., Haddad, P. S., & Stevanovic, T. (2015). Study of polyphenol content and antioxidant capacity of Myrianthus arboreus (Cecropiaceae) root bark extracts. *Antioxidants*, 4(2), 410-426. <https://doi.org/10.3390/antiox4020410>
- Ke, M., Zhang, X. J., Han, Z. H., Yu, H. Y., Lin, Y., Zhang, W. G., ... & Wang, T. J. (2011). Extraction, purification of Lycium barbarum polysaccharides and bioactivity of purified fraction. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.023>
- Khan, T., Date, A., Chawda, H., & Patel, K. (2019). Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. *Carbohydrate polymers*, 210, 412-428. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.01.064
- Khedmat, L., Izadi, A., Mofid, V., & Mojtahedi, S. Y. (2020). Recent advances in extracting pectin by single and combined ultrasound techniques: A review of techno-functional and bioactive health-promoting aspects. *Carbohydrate polymers*, 229, 115474. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115474>
- Kozuch P, Grossbard ML, Barzdins A, Araneo M, Robin A, Frager D, Homel P, Marino J, DeGregorio P, Bruckner HW. Irinotecan combined with gemcitabine, 5-fluorouracil, leucovorin, and cisplatin (G-FLIP) is an effective and noncrossresistant treatment for chemotherapy refractory metastatic pancreatic cancer. *Oncologist*, 2001, 6: 488-495. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.6-6-488>
- Krishna, R., & Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the

- pharmacokinetics of anticancer drugs. *European journal of pharmaceutical sciences*, 11(4), 265-283. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00114-7)
- Lachance JC, Radhakrishnan S, Madiwale G, Guerrier S, Vanamala JKP. Targeting hallmarks of cancer with a food-system-based approach. *Nutrition*. (2020) 69:110563. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110563>
- Li F, Luo P, Liu H. A potential adjuvant agent of chemotherapy sepia ink polysaccharides. *Mar Drugs*. (2018) 16:106. doi: 10.3390/md16040106
- Li, J. Y., Yu, J., Du, X. S., Zhang, H. M., Wang, B., Guo, H., ... & Wang, Y. L. (2016). Safflower polysaccharide induces NSCLC cell apoptosis by inhibition of the Akt pathway. *Oncology Reports*, 36(1), 147-154. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4784>
- Li, N., Wang, C., Georgiev, M. I., Bajpai, V. K., Tundis, R., Simal-Gandara, J., ... & Qiao, X. (2021). Advances in dietary polysaccharides as anticancer agents: Structure-activity relationship. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 360-377. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.008>
- Li, W. Y., Li, P., Li, X. Q., Huang, H., Yan, H., Zhang, Y., & Cao, W. (2015). Simultaneous quantification of uronic acid, amino sugar, and neutral sugar in the acidic polysaccharides extracted from the roots of *Angelica sinensis* (Oliv.) diels by HPLC. *Food analytical methods*, 8, 2087-2093.
- Li, Y., Sun, Y., Chen, G. E., Yuan, X., & Cai, D. (2025). Plant Polysaccharides in the Regulation of the Tumor Microenvironment: A Review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 100952. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2025.100952>
- Lin, H. C., & Lin, J. Y. (2020). GSF3, a polysaccharide from guava (*Psidium guajava* L.) seeds, inhibits MCF-7 breast cancer cell growth via increasing BAX/BCL2 ratio or Fas mRNA expression levels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1261-1271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.057>
- Linhardt, R. J. (2003). 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *Journal of medicinal chemistry*, 46(13), 2551-2564.
- Liu, C., *et al.* (2021). Neuroprotective effects of *Polygonatum sibiricum* polysaccharides on cognitive impairment. *Journal of Ethnopharmacology*, 268, 113590.
- Liu, C., Li, H., Wang, K., Zhuang, J., Chu, F., Gao, C., ... & Sun, C. (2019). Identifying the antiproliferative effect of *Astragalus* polysaccharides on breast cancer: coupling network pharmacology with targetable screening from the cancer genome atlas. *Frontiers in oncology*, 9, 368. doi: 10.3389/fonc.2019.00368
- Liu, Z., Yu, D., Li, L., Liu, X., Zhang, H., Sun, W., ... & Jia, W. (2019). Three-phase partitioning for the extraction and purification of polysaccharides from the immunomodulatory medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Molecules*, 24(3), 403. <https://doi.org/10.3390/molecules24030403>
- López-Salazar, H., Camacho-Díaz, B. H., Ocampo, M. A., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2023). Microwave-assisted extraction of functional compounds from plants: A Review. *Bioresources*, 18(3), 6614.
- Mano, M. C. R., dos Santos, P. N., Paulino, B. N., & Molina, G. (2022). Enzyme technology applied to biomolecule synthesis for the food industry. In *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology* (pp. 57-69). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00018-4>
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate

- format. *Analytical biochemistry*, 339(1), 69-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.
- Meng, F., Li, Q., Qi, Y., He, C., Wang, C., & Zhang, Q. (2018). Characterization and immunoregulatory activity of two polysaccharides from the root of *Ilex asprella*. *Carbohydrate Polymers*, 197, 9-16.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.066>
- Mohammed, A. S. A., Naveed, M., & Jost, N. (2021). Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 2359-2371 <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02052-2>
- Moreno, J., & Peinado, R. (2012). *Enological chemistry*. Academic Press.
- Mukherjee, P. K. (2019). Bioactive phytocomponents and their analysis. Quality control and evaluation of herbal drugs. Elsevier, 237-328.
- Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Hoff DDV. Tumor treating fields: a fourth modality in cancer treatment. *Clin Cancer Re.* (2018) 24:266– 75. doi: 10.1158/1078-0432.CCR17-1117
- Mun, E. J., Babiker, H. M., Weinberg, U., Kirson, E. D., & Von Hoff, D. D. (2018). Tumor-treating fields: a fourth modality in cancer treatment. *Clinical Cancer Research*, 24(2), 266-275. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1117>
- Muszynska B, Grzywacz-Kisielewska A, Kała K, Gdula-Argasińska J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: a review. *Food Chem.* (2018) 243:373–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.149>
- Nahar, L., & Sarker, S. D. (2020). Medicinal natural products—An introduction. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Vol. 55, pp. 1-44). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.armc.2020.02.008>
- Niyigaba, T., Liu, D., & Habimana, J. D. D. (2021). The extraction, functionalities and applications of plant polysaccharides in fermented foods: A review. *Foods*, 10(12), 3004. <https://doi.org/10.3390/foods10123004>
- Pallardy, S. G. (2010). *Physiology of woody plants*. academic press.
- Parvathaneni, M., Battu, G. R., Gray, A. I., & Gummalla, P. (2014). Investigation of anticancer potential of hypophyllanthin and phyllanthin against breast cancer by *in vitro* and *in vivo* methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S71-S76.
[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60417-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60417-5)
- Parvathaneni, M., Battu, G. R., Gray, A. I., & Gummalla, P. (2014). Investigation of anticancer potential of hypophyllanthin and phyllanthin against breast cancer by *in vitro* and *in vivo* methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S71-S76.
[https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60417-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60417-5)
- Polat S. (2015). Kolorektal kanser hücrelerinde melatonin ve cisplatin uygulamasının otofaji ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması, (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum
- Randeni, N., & Xu, B. (2024). New insights into signaling pathways of cancer prevention effects of polysaccharides from edible and medicinal mushrooms. *Phytomedicine*, 132, 155875. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155875>

- Rao, P. R., & Rathod, V. K. (2015). Rapid extraction of andrographolide from *Andrographis paniculata* Nees by three phase partitioning and determination of its antioxidant activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 586-593. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.016>
- Ren, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Cai, W., & Del Rio Flores, A. (2019). The preparation and structure analysis methods of natural polysaccharides of plants and fungi: A review of recent development. *Molecules*, 24(17), 3122. <https://doi.org/10.3390/molecules24173122>
- Rendueles, O., Kaplan, J. B., & Ghigo, J. M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environmental microbiology*, 15(2), 334-346. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x
- Sabiu, S., O'Neill, F. H., & Ashafa, A. O. T. (2016). Kinetics of α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential of *Zea mays* Linnaeus (Poaceae), *Stigma maydis* aqueous extract: An *in vitro* assessment. *Journal of ethnopharmacology*, 183, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.024>
- Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International immunopharmacology*, 6(3), 317-333. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.10.005>
- Selvaraj, C., Dinesh, D. C., Rajaram, K., Sundaresan, S., & Singh, S. K. (2023). Macromolecular chemistry: An introduction. In *In silico approaches to macromolecular chemistry* (pp. 71-128). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90995-2.00007-2>
- Sen, I. K., Chakraborty, I., Mandal, A. K., Bhanja, S. K., Patra, S., & Maity, P. (2021). A review on antiviral and immunomodulatory polysaccharides from Indian medicinal plants, which may be beneficial to COVID-19 infected patients. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 462-470. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.162
- Shen, Q., Guo, Y., Wang, K., Zhang, C., & Ma, Y. (2023). A review of chondroitin sulfate's preparation, properties, functions, and applications. *Molecules*, 28(20), 7093. <https://doi.org/10.3390/molecules28207093>
- Shen, Y., Wu, S., Song, M., Zhang, H., Zhao, H., Wu, L., ... & Zhang, Y. (2024). The Isolation, Structural Characterization and Anti-Inflammatory Potentials of Neutral Polysaccharides from the Roots of *Isatis indigotica* Fort. *Molecules*, 29(11), 2683. <https://doi.org/10.3390/molecules29112683>
- Shi, L. (2016). Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 92 (2016) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100>
- Shi, L. (2016). Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 92 (2016) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.100>
- Song, J., Wang, Z., Chi, Y., Zhang, Y., Fang, C., Shu, Y., ... & Wang, J. (2023). Anti-gout activity and the interaction mechanisms between *Sanghuangporus vaninii* active components and xanthine oxidase. *Bioorganic Chemistry*, 133, 106394. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106394>
- Steimbach L, Borgmann AV, Gomar GG, Hoffmann LV, Rutkevski R, Andrade D, *et al.* Fungal beta-glucans as adjuvants for treating cancer patients -a systematic review of clinical trials Clin Nutr. (2021) 40:3104– 13. doi: 10.1016/j.clnu.2020.11.029 <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.11.029>
- Sun, L. X., Lin, Z. B., Duan, X. S., Qi, H. H., Yang, N., Li, M., ... & Lu, J. (2014). Suppression of the production of transforming growth factor β 1, interleukin-10, and vascular

- endothelial growth factor in the B16F10 cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(9), 667-675. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0101>
- Sun, Y., Hou, S., Song, S., Zhang, B., Ai, C., Chen, X., & Liu, N. (2018). Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 985-995. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.066>
- Tan, Z. J., Wang, C. Y., Yi, Y. J., Wang, H. Y., Zhou, W. L., Tan, S. Y., & Li, F. F. (2015). Three phase partitioning for simultaneous purification of aloe polysaccharide and protein using a single-step extraction. *Process Biochemistry*, 50(3), 482-486. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.004>
- Taskin, T., & Bitis, L. (2016). In vitro antioxidant activity of eight wild edible plants in Bursa province of Turkey. *medicine*, 6, 25.
- Tian, T., Li, X., & Zhang, J. (2019). mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 755. <https://doi.org/10.3390/ijms20030755>
- Topdaş, E.F. (2018). Çasıрын (Ferula orientalis L.) Esansiyel Yağı ile Farklı Ekstraktlarının Antioksidan, Antimikrobiyal ve In-Vitro Nöroprotektif Aktivitelerinin Araştırılması, (Doktora Tezi). Atatürk Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Erzurum.
- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends— an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2016) 25:16–27. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-1 50578 <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0578>
- Ullah, Z., Yue, P., Mao, G., Zhang, M., Liu, P., Wu, X., ... & Yang, L. (2024). A comprehensive review on recent xanthine oxidase inhibitors of dietary based bioactive substances for the treatment of hyperuricemia and gout: Molecular mechanisms and perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 278, 134832. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134832>
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T*, 40(4), 277–283.
- Wang, B., Xu, Y., Chen, L., Zhao, G., Mi, Z., Lv, D., & Niu, J. (2020). Optimizing the extraction of polysaccharides from *Bletilla ochracea* Schltr. using response surface methodology (RSM) and evaluating their antioxidant activity. *Processes*, 8(3), 341. <https://doi.org/10.3390/pr8030341>
- Wang, C., Yu, Y. B., Chen, T. T., Wang, Z. W., & Yan, J. K. (2020). Innovative preparation, physicochemical characteristics and functional properties of bioactive polysaccharides from fresh okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Food chemistry*, 320, 126647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126647>
- Wang, H., Chen, K., Cheng, J., Jiang, L., Yu, D., Dai, Y., & Wang, L. (2021). Ultrasound-assisted three phase partitioning for simultaneous extraction of oil, protein and polysaccharide from pumpkin seeds. *LWT*, 151, 112200. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112200>
- Wang, T., Zou, X., Zhang, H., Li, J., Peng, X., Ju, R., ... & Li, C. (2025). Ultrasound-Assisted Extraction of Polysaccharides from Mulberry Leaves Using Response Surface Methodology: Purification and Component Identification of Extract. *Molecules*, 30(8), 1747. <https://doi.org/10.3390/molecules30081747>
- Wang, Y. Y., Ma, H., Ding, Z. C., Yang, Y., Wang, W. H., Zhang, H. N., & Yan, J. K. (2019). Three-phase partitioning for the direct extraction and separation of bioactive

- exopolysaccharides from the cultured broth of *Phellinus baumii*. *International journal of biological macromolecules*, 123, 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.065>
- Wang, Y., Wang, C., & Guo, M. (2019). Effects of ultrasound treatment on extraction and rheological properties of polysaccharides from *Auricularia cornea* var. *Li*. *Molecules*, 24(5), 939. <https://doi.org/10.3390/molecules24050939>
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International journal of medicinal mushrooms*, 12(1). DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.10
- Wei, X., Luo, D., Li, H., Li, Y., Cen, S., Huang, M., ... & Zeng, W. (2024). The roles and potential mechanisms of plant polysaccharides in liver diseases: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1400958. doi: 10.3389/fphar.2024.1400958
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate polymers*, 84(1), 1421 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate polymers*, 84(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
- Wu, J., Gao, W., Song, Z., Xiong, Q., Xu, Y., Han, Y., ... & Wang, Q. I. (2018). Anticancer activity of polysaccharide from *Glehnia littoralis* on human lung cancer cell line A549. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 464-472. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.033>
- Wu, Xia, Jian Zha, and Mattheos AG Koffas. "Microbial production of bioactive chemicals for human health." *Current Opinion in Food Science* 32 (2020): 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.007>
- Xie L, Hong MSY. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities. *Carbohydr Polym*. (2020) 229:115436. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115436
- Yan, C., Deng, W., Peng, Y., Yu, J., & Shi, J. (2023). Plant polysaccharides: sources, structures, and anti-diabetic effects" *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101013>
- Yan, J. K., Wang, C., Yu, Y. B., Wang, Z. W., Chen, X., Zhu, J., & Li, L. (2022). Preparation, physicochemical and structural characterizations, and bioactivities of polysaccharides from *Corbicula fluminea* industrial distillate. *Food Bioscience*, 47, 101708. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101708>
- Yan, J. K., Wang, C., Yu, Y. B., Wu, L. X., Chen, T. T., & Wang, Z. W. (2021). Physicochemical characteristics and in vitro biological activities of polysaccharides derived from raw garlic (*Allium sativum* L.) bulbs via three-phase partitioning combined with gradient ethanol precipitation method. *Food Chemistry*, 339, 128081. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128081>
- Yan, J. K., Wang, Y. Y., Qiu, W. Y., Wang, Z. B., & Ma, H. (2018). Ultrasound synergized with three-phase partitioning for extraction and separation of *Corbicula fluminea* polysaccharides and possible relevant mechanisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.07.007>
- Yan, J. K., Wu, L. X., Qiao, Z. R., Cai, W. D., & Ma, H. (2019). Effect of different drying methods on the product quality and bioactive polysaccharides of bitter melon (*Momordica charantia* L.) slices. *Food chemistry*, 271, 588-596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.012>

- Yan, J. K., Yu, Y. B., Wang, C., Cai, W. D., Wu, L. X., Yang, Y., & Zhang, H. N. (2021). Production, physicochemical characteristics, and *in vitro* biological activities of polysaccharides obtained from fresh bitter melon (*Momordica charantia* L.) via room temperature extraction techniques. *Food Chemistry*, 337, 127798. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127798>
- Yan, S., Yuan, S., Zhang, Q., Luo, M., Qiao, D., Jiang, F., & Qian, H. (2023). Improved sample preparation method on the morphology observation of hydrophilic polysaccharides for atomic force microscopy (AFM). *Food Hydrocolloids*, 144, 109048. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109048>
- Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, 72, 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.009>
- Yin, Z., Zhang, J., Qin, J., Guo, L., Guo, Q., Kang, W., ... & Chen, L. (2024). Anti-inflammatory properties of polysaccharides from edible fungi on health-promotion: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1447677. doi: 10.3389/fphar.2024.1447677
- Yu, Y., Shen, M., Song, Q., & Xie, J. (2018). Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydrate polymers*, 183, 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>
- Zhang, H., Jiang, F., Li, L., Liu, X., & Yan, J. K. (2022). Recent advances in the bioactive polysaccharides and other key components from *Phellinus* spp. and their pharmacological effects: A review. *International journal of biological macromolecules*, 222, 3108-3128. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.085>
- Zhang, H., Ma, H., Liu, W., Pei, J., Wang, Z., Zhou, H., & Yan, J. (2014). Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*. *Carbohydrate polymers*, 113, 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.027>
- Zhang, H., Ma, H., Liu, W., Pei, J., Wang, Z., Zhou, H., & Yan, J. (2014). Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*. *Carbohydrate polymers*, 113, 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.027>
- Zhang, H., Wang, G., & Yang, H. (2011). Drug delivery systems for differential release in combination therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 8(2), 171-190. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.547470>
- Zhang, J., Wen, C., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: Isolation, structure, and bioactivities: A review. *International journal of biological macromolecules*, 132, 906-914. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.020>
- Zhang, Z., Zhou, L., Xie, N., Nice, E. C., Zhang, T., Cui, Y., & Huang, C. (2020). Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 113. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00213-8>
- Zhao X, Lin F, Li H, Li H, Wu D, Geng F. *et al.* Recent advances in bioactive compounds, health functions, and safety concerns of Onion (*Allium cepa* L.). *Front Nutr.* (2021) 8:669805. doi: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.669805>
- Zhao, F., Chen, D. Y., Jing, B., Jiang, Y., Liu, L. Y., & Song, H. (2024). Effect of *Flammulina velutipes* polysaccharide on mitochondrial apoptosis in lung adenocarcinoma A549 cells. *Scientific Reports*, 14(1), 16102. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57211-x>

- Zhou, H., Ma, H., Guo, D., & Wang, Z. (2015). Effect of extraction method on the physicochemical properties of intracellular polysaccharides from *Phellinus igniarius* mycelium. *Acta Edulis Fungi*, 22(1), 47-50.
- Zhu Z., Han Y., Ding Y., Zhu B., Song S., Xiao H. Health effects of dietary sulfated polysaccharides from seafoods and their interaction with gut microbiota. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(3):2882–2913. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12754>
- Zhao, Y., Yan, B., Wang, Z., Li, M., & Zhao, W. (2020). Natural polysaccharides with immunomodulatory activities. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 20(2), 96-106. DOI: 10.2174/1389557519666190913151632
- Du, X., Chen, X., Zhao, B., Lv, Y., Zhang, H., Liu, H., ... & Zeng, X. (2011). Astragalus polysaccharides enhance the humoral and cellular immune responses of hepatitis B surface antigen vaccination through inhibiting the expression of transforming growth factor β and the frequency of regulatory T cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(2), 228-235. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00845.x.
- Gao, Y., Tang, W., Dai, X., Gao, H., Chen, G., Ye, J., ... & Zhou, S. (2005). Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer. *Journal of medicinal food*, 8(2), 159-168. doi: 10.1089/jmf.2005.8.159.
- Zhou, L., Li, J., Ding, C., Zhou, Y., & Xiao, Z. (2025). Mechanistic Advances in Hypoglycemic Effects of Natural Polysaccharides: Multi-Target Regulation of Glycometabolism and Gut Microbiota Crosstalk. *Molecules*, 30(9), 1980. doi: 10.3390/molecules30091980.
- Hill, M. F., & Bordonni, B. (2020). Hyperlipidemia.
- Zhu, R., Lei, Y., Wang, S., Zhang, J., Lv, M., Jiang, R., ... & Guo, L. (2024). Plantago consumption significantly reduces total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol in adults: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Research*, 126, 123-137. doi: 10.1016/j.nutres.2024.03.013.
- Luo, L., Xue, J., Shao, Z., Zhou, Z., Tang, W., Liu, J., ... & Yang, F. (2023). Recent developments in *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides: Isolation, purification, structural characteristics and biological activities. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1139201. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1139201>
- Qu, J., Huang, P., Zhang, L., Qiu, Y., Qi, H., Leng, A., & Shang, D. (2020). Hepatoprotective effect of plant polysaccharides from natural resources: A review of the mechanisms and structure-activity relationship. *International journal of biological macromolecules*, 161, 24-34. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.196.
- Wei, X., Luo, D., Li, H., Li, Y., Cen, S., Huang, M., ... & Zeng, W. (2024). The roles and potential mechanisms of plant polysaccharides in liver diseases: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1400958. doi: 10.3389/fphar.2024.1400958
- Peng, G., Li, M., & Meng, Z. (2023). Polysaccharides: Potential bioactive macromolecules for Alzheimer's disease. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1249018. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1249018>
- Xu, X. L., Li, S., Zhang, R., & Le, W. D. (2022). Neuroprotective effects of naturally sourced bioactive polysaccharides: An update. *Neural Regeneration Research*, 17(9), 1907-1912. doi: 10.4103/1673-5374.335142.
- Luo, S., Zhang, X., Huang, S., Feng, X., Zhang, X., & Xiang, D. (2022). A monomeric polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* improves cognitive functions in a model

of Alzheimer's disease by reshaping the gut microbiota. *International journal of biological macromolecules*, 213, 404-415. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.05.185.

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774. doi: 10.1021/jf803011r.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

Cortez-Navarrete, M., Martínez-Abundis, E., Pérez-Rubio, K. G., González-Ortiz, M., & Méndez-del Villar, M. (2018). Momordica charantia administration improves insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. *Journal of medicinal food*, 21(7), 672-677.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Amina IBRAHIMOVA
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	Bakü Devlet Üniversitesi
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	İyi