

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Yüksek Lisans Tezi

**BAZI ENDEMİK *Dianthus* TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

İlknur ŞAHİN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2016**

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

İlknur ŞAHİN tarafından hazırlanan “**Bazı Endemik *Dianthus* türlerinin Fitokimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı’nda (YÜKSEK LİSANS TEZİ) olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ :.....

Üye: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ :.....

Üye: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU :.....

Üye: Doç. Dr. Demirhan ÇITAK :.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN
Enstitü Müdürü

.../.../201.
Kontrol edilmiştir.

Yunus Tuğberk SANALP
Bilgisayar İşletmeni

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI ENDEMİK *Dianthus* TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İlknur ŞAHİN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Bu çalışmada, endemik *Dianthus ancyrensis* Hausskn., Bornm., *Dianthus balansea* Boiss. ve *Dianthus zederbaueri* Vierh. (Caryophyllaceae) bitkileri Çankırı ili Yapraklı ilçesindeki ormanlık alandan toplandı. Toplanan materyallerin tür teşhisi gerçekleştirildi. Bu bitkiler oda sıcaklığında kurutuldu ve sıvı azotla parçalandı. Bu materyallerin sırasıyla hekzan, kloroform, etil asetat, aseton ve metanolekstreleri hazırlandı. Hekzan ekstralarının sabit yağları GC-MS ile belirlendi. Diğer ekstraların fenolik bileşikleri ise HPLC-TOF/MS ile belirlendi. Tüm ekstraların antiproliferatif etkileri, HeLa ve C6 hücrelerine karşı BrdU ELISA metoduyla belirlendi. DZ EtOAc ekstresi hariç diğer tüm ekstralar 5-FU'dan daha düşük toksisiteye sahip oldukları gözlemlendi.

2016, 72 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: *Dianthus ancyrensis* Hausskn. Bornm., *Dianthus balansea* Boiss., *Dianthus zederbaueri* Vierh. (Caryophyllaceae), Antiproliferatif etki, Sitotoksik Aktivite, HeLa, C6, GC-MS, HPLC-TOF/MS

ABSTRACT

Master Thesis

PHYTOCHEMICALS ANALYSIS OF SOME ENDEMIC *Dianthus* SPECIES AND INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

İlknur ŞAHİN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Associate Prof. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

In this study, endemic *Dianthus ancyrensis* Hausskn., Bornm., *Dianthus balansea* Boiss. and *Dianthus zederbaueri* Vierh. (Caryophyllaceae) plants were collected forest area from the Yapraklı town of Çankırı. Species identification of the collected materials were performed. The moss was dried at room temperature in the shade and disintegrated with liquid nitrogen. The hexan, chloroform, ethyl acetate, acetone and methanol extracts of these materials were prepared respectively. The fatty acids of hexane extracts were determined with GC-MS. Other extracts' phenolic compounds are determined with HPLC-TOF/MS. All extracts' antiproliferative effects were determined by method of BrdU ELISA against HeLa and C6 cells. All of the extracts have lower toxicity than 5-FU except DZ EtOAc extract.

2016, 72 sayfa

KEYWORDS: *Dianthus ancyrensis* Hausskn. & Bornm., *Dianthus balansa* Boiss., *Dianthus zederbaueri* Vierh., (Caryophyllaceae), Antiproliferative Activity, Cytotoxic Activity, HeLa, C6, GC-MS, HPLC-TOF/MS

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında sonsuz emeği olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Ayşe Şahin YAĞLIOĞLU' na yardımlarından dolayı minnettarım.

Tez projesi kapsamında fikir ve laboratuvar çalışmalarına olan katkısından dolayı sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a şükranlarımı sunarım.

Bitkilerin toplanması ve ayrıştırılması aşamasında emeği geçen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN'a katkılarından dolayı şükranlarımı iletirim.

Uzun saatler boyunca laboratuvar çalışmalarında emeği geçen yüksek lisans öğrencileri Duygu GÜNEŞ, Murat TEMİRTÜRK, Emiç SARAY ve spektroskopik analizlerin gerçekleştirilmesi noktasında yardımcı olan Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ ve Uzman Fatih GÜL' e müteşekkirim.

2014/L12 nolu projeye destek olan Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Üyelerine ve teşekkürlerimi iletirim.

Eğitim hayatım boyunca beni her daim destekleyen değerli aileme ömür boyu minnettarım.

Son olarak, tez çalışmalarım boyunca bana her an moral veren değerli eşim Önder ŞAHİN'e tüm kalbimle şükranlarımı sunarım.

İlknur ŞAHİN
Çankırı, Mayıs 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1 GİRİŞ.....	1
2 KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Kanser Tarihi ve İlk Tedavi Yöntemleri.....	3
2.2 <i>Dianthus</i> sp.Taksonlarına Ait Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	4
2.3 Caryophyllacea Familyasının Özelliği.....	7
2.4 <i>Dianthus</i> sp.....	8
2.4.1 <i>Dianthus ancyrensis</i> HAUSSKN.ET BORNM.(DA).....	9
2.4.2 <i>Dianthus balancae</i> BOISS. (DB).....	11
2.4.3 <i>Dianthus zederbaueri</i> VIERH.(DZ).....	13
3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1 Materyal.....	16
3.1.1 Kullanılan kimyasallar ve araç-gereçler.....	16
3.1.1.1 Kullanılan cihazlar.....	16
3.2 Yöntem.....	17
3.2.1 Bitki materyallerinin toplanması.....	19
3.2.1.1 Bitkinin özütlenmesi (Ekstraksiyon) işlemi.....	20
3.2.1.2 Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (GC/MS) ile sabit yağ bileşenlerinin belirlenmesi.....	21
3.2.1.3 HPLC-TOF/MS cihazı ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi.....	22
3.2.2 Antiproliferatif aktivite testleri.....	25
3.2.3 Hela ve C6 hücrelerinin hücre kültürü.....	25
3.2.4 Hücrelerin sayılması işlemi.....	27
3.2.4.1 Testler İçin Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	27
3.2.4.2 BrdU ELISA Kolorometrik Testlerin Yapılışı.....	28
3.2.5 IC50 Konsantrasyonunun Belirlenmesi	29
3.2.6 Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı.....	29
4 BULGULAR.....	30
4.1 Ekstrelerin Miktarları ve % Verimleri.....	30
4.2 DA, DB ve DZ Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları.....	32
4.3 DA, DB ve DZ Ekstrelerinin HPLC/TOF -MS Analiz Sonuçları.....	36
4.4 Antiproliferatif Aktivite Sonuçları.....	54
4.4.1 C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları.....	54
4.4.2 HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	56
5 TARTIŞMA VE SONUÇ.....	60
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER DİZİNİ

DA	<i>Dianthus ancyrensis</i> Hausskn., Bornm.
DB	<i>Dianthus balansea</i> Boiss.
DZ	<i>Dianthus zederbaueri</i> Vierh. (Caryophyllaceae)
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spectrometresi
HPLC-TOF/MS	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi(Kütle Sspekrometresi)
HeLa	İnsan Rahim Kanseri Hücresi
C6	Sıçan Beyin Tümör Hücresi
EtOAc	Etil Asetat
EtOH	Etanol
CHCl ₃	Kloroform
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
5-FU	5-Florourasil
Rpm	Revolutions per minute
μ	Mikron
mg	Miligram
g	Gram
μL	Mikrolitre
L	Litre
°	Derece
nm	Nanometre
%	Yüzde
IC ₅₀	Hücre Bölünmesini %50 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu
IC ₇₅	Hücre Bölünmesini %75 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	<i>Dianthus chinensis</i> L.....	4
Şekil 2.2	<i>Dianthus caryophyllus</i>	5
Şekil 2.3	Protokateşoik asit.....	5
Şekil 2.4	Vanilik asit.....	5
Şekil 2.5	<i>Dianthus superbus</i> L.....	6
Şekil 2.6	<i>Dianthus rupicola</i> Biv.....	7
Şekil 2.7	<i>Dianthus ancyrensis</i> Hausskn. & Bornm.....	9
Şekil 2.8	DA türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı kareler.....	10
Şekil 2.9	DA türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı iller.....	11
Şekil 2.10	<i>Dianthus balansae</i> Boiss.....	11
Şekil 2.11	DB türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı kareler.....	12
Şekil 2.12	DB türünün taksonunun Türkiye’de bulunduğu iller.....	12
Şekil 2.13	<i>Dianthus zederbaueri</i> Vierh.....	13
Şekil 2.14	DZ türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı kareler.....	14
Şekil 2.15	DZ türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı iller.....	14
Şekil 3.1	Çalışma Şeması.....	17
Şekil 3.2	<i>D. ancyrensis</i> Hausskn. & Bornm (DA), <i>D. balansae</i> Boiss., (DB), <i>D. zederbaueri</i> VIERH.(DZ) türlerinin toprak üstü kısımları.....	18
Şekil 3.3	DA, DB, DZ ekstre balonları.....	19
Şekil 3.4	DA, DB, DZ ekstrelerinden çözücülerinin uzaklaştırılması... ..	19
Şekil 3.5	GC-MS.....	20
Şekil 3.6	HPLC/TOF-MS.....	21
Şekil 3.7	HeLa ve C6 kanser hücreleri.....	25
Şekil 3.8	DMEM besi yerinin sterilize edilişi.....	26
Şekil 3.9	Mikroskop.....	27
Şekil 3.10	CO ₂ İnkübatör.....	28
Şekil 4.1	DA ekstrelerinin verimleri (%).....	30
Şekil 4.2	DB ekstrelerinin verimleri (%).....	31
Şekil 4.3	DZ ekstrelerinin verimleri (%).....	32
Şekil 4.4	DA Hekzan ekstresinin GC-MS analizinde bulunan ana bileşenler.....	32
Şekil 4.5	DB Hekzan ekstresinin GC-MS analizinde bulunan ana bileşenler.....	33
Şekil 4.6	DB Hekzan ekstresinin GC-MS analizinde bulunan ana bileşenler.....	34
Şekil 4.7	DA CHCl ₃ ekstresinin fenolik bileşenleri.....	36
Şekil 4.8	DA CHCl ₃ ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	36
Şekil 4.9	DA CHCl ₃ ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	37
Şekil 4.10	DA EtOAc ekstresinin fenolik bileşenleri.....	37
Şekil 4.11	DA EtOAc ekstresinin ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	38
Şekil 4.12	DA EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	38
Şekil 4.13	DA Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri.....	39

Şekil 4.14	DA Aseton ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	39
Şekil 4.15	DA Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	40
Şekil 4.16	DA MeOH ekstresinin fenolik bileşenleri.....	40
Şekil 4.17	DA MeOH ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	41
Şekil 4.18	DA MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	42
Şekil 4.19	DB CHCl ₃ ekstresinin fenolik bileşenleri.....	42
Şekil 4.20	DB CHCl ₃ ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	43
Şekil 4.21	DB CHCl ₃ ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	43
Şekil 4.22	DB EtOAc ekstresinin fenolik bileşenleri.....	43
Şekil 4.23	DB EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	44
Şekil 4.24	DB EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	44
Şekil 4.25	DB Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri.....	45
Şekil 4.26	DB Aseton ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	45
Şekil 4.27	DB Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	46
Şekil 4.28	DB MeOH ekstresinin fenolik bileşenleri.....	46
Şekil 4.29	DB MeOH ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	47
Şekil 4.30	DB MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	47
Şekil 4.31	DZ CHCl ₃ ekstresinin fenolik bileşenleri.....	48
Şekil 4.32	DZ CHCl ₃ ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	48
Şekil 4.33	DZ CHCl ₃ ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	48
Şekil 4.34	DZ EtOAc ekstresinin fenolik bileşenleri.....	49
Şekil 4.35	DZ EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	49
Şekil 4.36	DZ EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	50
Şekil 4.37	DZ Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri.....	50
Şekil 4.38	DZ Aseton ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	51
Şekil 4.39	DZ Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	51
Şekil 4.40	DZ MeOH ekstresinin fenolik bileşenleri.....	51
Şekil 4.41	DZ MeOH ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri.....	52
Şekil 4.42	DZ MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı.....	52
Şekil 4.43	DA ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	54
Şekil 4.44	DB ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	55
Şekil 4.45	DZ ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	56
Şekil 4.46	DA ekstrelerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	57

Şekil 4.47	DB ekstralarının HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	58
Şekil 4.48	DZ ekstralarının HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	59
Şekil 5.1	Çalışmanın Özeti.....	68



TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1	<i>Dianthus ancyrensis</i> HAUSSKN ET BORNm. (DA) Türünün Taksonomisi.....	9
Tablo 2.2	DA Türünün Taksonomi Hiyerarşisi.....	9
Tablo 2.3	DA Türünün Genel Taksonomi Bilgisi.....	10
Tablo 2.4	<i>Dianthus balancae</i> BOISS. (DB) Türünün Taksonomisi.....	11
Tablo 2.5	DB Türünün Taksonomi Hiyerarşisi.....	12
Tablo 2.6	DB Türünün Genel Taksonomi Bilgisi.....	12
Tablo 2.7	<i>Dianthus zederbaueri</i> VIERH. (DZ) Türünün Taksonomisi.....	14
Tablo 2.8	DZ Türünün Taksonomi Hiyerarşisi.....	14
Tablo 2.9	DZ Türünün Genel Taksonomi Bilgisi.....	14
Tablo 3.1	Analizi Gerçekleştirilen Fenolik Bileşenler.....	22
Tablo 4.1	DA Ekstrelerinin Miktarları ve % Verimleri.....	30
Tablo 4.2	DB Ekstrelerinin Miktarları ve % Verimleri.....	31
Tablo 4.3	DZ Ekstrelerinin Miktarları ve % Verimleri.....	31
Tablo 4.4	DA, DB ve DZ Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları.....	35
Tablo 4.5	DA, DB ve DZ Hekzan Ekstrelerinin HPLC/TOF-MS Analiz Sonuçları (mg fenolik/Kg kuru bitki).....	53
Tablo 4.6	DA, DB ve DZ Ekstrelerinin HeLa ve C6 Hüresine Karşı IC ₅₀ Değerleri.....	59
Tablo 5.1	DA, DB ve DZ Ekstrelerinin Antiproliferatif Aktiviteleri (100 µg/mL konsantrasyonda).....	60
Tablo 5.2	DA, DB ve DZ Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivite Sonuçları.....	64

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde tüm dünyada etkili olan ve yaygın bir hastalıktır. Asrın vebası olarak tanımlanan kanser, her bölgeden ve her kesimden insanda görülebilmektedir. Bu hastalık, artan bir hızla gitgide yaygınlaşmaktadır. Pek çok insan, kanserden dolayı hayatlarını kaybetmekte ya da tedavi görmektedir. Dünya genelinde 184 ülke ve 28 kanser tipi için en son kanser istatistikleri GLOBOCAN 2012 verilerine göre, kanser tanısı konulan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler bir önceki tahminlere göre artış göstermektedir. Bu verilere göre; dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası belirlenmiş olup ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olduğu belirtilmektedir (URL-1). Aynı şekilde, GLOBOCAN 2012 verilerine göre, dünya’da en çok görülen kanser türleri, akciğer (%13.0), meme (%11.9) ve kolon (%9.7) kanseri olmakla beraber, ölümlerin en çok görüldüğü kanser türleri, akciğer (%19.4), karaciğer (%9.1) ve mide (%8.8) kanseri olduğu belirtilmektedir. Bu hızla kanser artışı devam ederse, dünya nüfus artışı ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılı itibariyle 19.3 milyon yeni kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir (URL-1).

Tedavi aşamasında kemoterapi ya da radyoterapi gören hastalarda kilo kaybı, bulantı, kusma, ateş, saç dökülmesi ve yorgunluk gibi çeşitli yan etkiler görülmektedir. Bu durum hastaların yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (URL-2). Bu sebeplerden ötürü, günümüzdeki kanser çalışmaları, alternatif tıpa yönelmiştir. Türk Tıbbi Onkoloji Derneği yapmış oldukları bir açıklamada, 20. Yüzyılın sonlarına doğru modern tıp ile alternatif tıp uygulayıcılarının iş birliği içine girme gereksinimleri olduğunu belirtmektedir. Ayrıca, modern tıp ile alternatif tedavi uygulayıcıları özellikle hastanın yaşam kalitesine katkı sağlaması amacıyla klinikte bu iş birliğine başladıklarını belirtmişlerdir (URL-3). Amerika Birleşik Devletleri’nde son yıllarda 40 milyar dolar maliyeti aşan alternatif tedavi yöntemleri (vitaminler, bitkisel ürünler, çeşitli beyin-vücut teknikleri) kullanılmaktadır. ABD’de bu alan için Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute)’ne bağlı kanser tamamlayıcı ve alternatif tıp ofisini (OCCAM) ve ulusal sağlık enstitüsü (National Institute of Health) 'ne bağlı ulusal

tamamlayıcı ve alternatif tıp merkezini (NCCAM) kurmuş ve bu kurumlar pek çok yöntemi incelemişlerdir. Bitkisel ürünler ve vitaminler dünyada en çok kullanılan tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemlerindedir(URL-3).

Bu bağlamda yapılan bu çalışmada, Çankırı ve çevresine ait endemik üç *Dianthus* türü(*Dianthusancyrensis* Hausskn. & Bornm., *Dianthus balansae* Boiss., *Dianthus zederbaueri* Vierh.) ile çalışıldı. Yapmış olduğumuz literatür çalışmaları neticesinde, *Dianthus ancyrensis* Hausskn. & Bornm., *Dianthus balansae* Boiss., *Dianthus zederbaueri* Vierh. türleri ile ilgili bugüne kadar hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, *Dianthus* türlerinin çiçekleri balgam söktürücü, öksürük kesici olarak şurup halinde; infüzyon halinde terletici, idrar arttırıcı, yapıştırıcı ve kalp kuvvetlendirici olarak, çiçeklerinden hazırlanan merhem yüze renk vermek için ve göz hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Baytop, 1999). Ayrıca, bazı *Dianthus* türlerinin antifungal (Curir et al., 2001 ve 2003), antimikrobiyal (Dahiya, 2008), sitotoksik (Martineti et al., 2010; Dahiya, 2008), antihelminitik (Dahiya, 2008) aktivite gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, bu çalışma da *Dianthus ancyrensis* Hausskn. & Bornm., *Dianthus balansae* Boiss., *Dianthus zederbaueri* Vierh. türlerinden elde edilen ekstralarının sekonder metabolitleri ve biyolojik aktiviteleri araştırıldı.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Kanser Tarihi ve İlk Tedavi Yöntemleri

Çağımızın en önemli hastalığı olan kanser, Antik Çağ'dan bu yana insan sağlığını tehdit etmektedir. Eski Mısır'dan kalma 2250 yıllık bir mumyayı inceleyen bilim adamları, mummyada prostat kanseri tespit etti. Discovery News'e göre, Lizbon'daki Ulusal Arkeoloji Müzesi'nde muhafaza edilen "M1" adlı mumya üzerinde radyolojik incelemeler yapan uzmanlar, Eski Mısır'da yaşamış 51-60 yaşları arasındaki bir erkeğin "prostat kanseri" nedeniyle "yavaş ve ağrılı" bir ölüm yaşadığını belirtmektedirler. Sonuçları "International Journal of Paleopathology" dergisinde yayımlanan araştırmada uzmanlar, mummyada boyutları 0,1-1,5 cm arasında değişen ve metastatik prostat kanserine işaret eden tümörler tespit etmişlerdir. M1'in, Mısır'da bilinen en eski ve dünyada ise kayıtlara geçen ikinci en eski prostat kanseri vakası olduğu belirtildi. Bilim adamları, daha önce de bir İskit kralının Sibiryada steplerinde bulunan 2700 yıllık iskeletinde prostat kanserine rastlamışlardır (URL-4).

Perdue, JR ve Hartwell "antikanser ilaçların bitkisel kaynakları" adlı yapmış oldukları bir çalışmada, yaklaşık 1200 ham bitki ekstresini laboratuvar hayvanları üzerine denemişler ve kanser hücrelerinin büyümesini azalttığını tespit etmişlerdir (Perdue, JR and Hartwell., 1969).

Bitkilerin kanser ve kanser benzeri hastalıkların tedavisi için kullanıldığını gösteren en eski kayıt yaklaşık M.Ö.1550 yılına ait olan *Ebers papirüs*'tür. Mısırlı grup tarafından yapılan bu çalışmada, üzüm, hurma, sarımsak, arpa, incir başta olmak üzere kırktan fazla bitkinin kanser tedavisi için kullanılabileceğini belirtilmektedir. Ayrıca, çocukluk dönemindeki kan kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlardan en önemlilerinden biri vincristine'dir ve *Vinco rosea* L. bitkisinden elde edilmektedir (Perdue, JR and Hartwell., 1969).

II. Dünya savaşı öncesinde, modern antikanser ilaç araştırmaları başladı ve savaş sırasında antimalaryal ve antibiyotiklerin gelişimindeki başarı ile birlikte antikanser ilaçlar üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır (Perdue, JR and Hartwell., 1969).

2.2 *Dianthus sp.* Taksonlarına Ait Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Dianthus chinensis L. (Caryophyllaceae) bitkisinin hipotensif, antihelminitik, bağırsak peristaltik, antitümör ve antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir (Anonim 1998; Hsu et al., 1986; Kosuge, 1985; Kim et al., 1994).



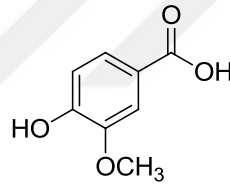
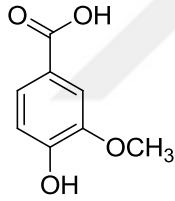
Şekil 2.1 *Dianthus chinensis* L.

Martineti et al., yapmış olduğu bir çalışmada *Dianthus caryophyllus* L.türünün HCT8 İnsan Kolon Kanseri Hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir (Martineti et al., 2010). Aynı tür üzerine yapılan başka bir çalışmada ise bu türün *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* karşı güçlü antifungal aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Curir et al., 2001).



Şekil 2.2 *Dianthus caryophyllus*

Curir et al., bir başka çalışmasında *Dianthus caryophyllus* L.türünün fenolik bileşenlerini incelemişlerdir. Analizler sonucunda, iki benzoik asit türevi olan protokateşoikasit (3,4-dihidroksi benzoik asit) and vanillik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit) ve flavonol glikozit pentatoside (3-[6-O-(alfa-L-arabinopiranosil)-beta-D-glukopiranosil] kuersetin) tespit etmişlerdir. Bu bileşiklerin hafif oranda antifungal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Curir et al., 2003).



Şekil 2.3 Protokateşoik asit Şekil 2.4 Vanillik asit

Dianthus superbus türü sitotoksik lenfoma askit (DLA) ve Ehrlich ascites karsinom (EAC) hücre hatları karşı güçlü sitotoksik etki göstermişlerdir. Ayrıca bu türün, *Candida albicans* karşı potansiyel bir anti mikrobiyal ajan olduğunu belirlemişlerdir. Ek olarak, yine bu türün *Megascoplex konkanensis*, *Pontoscotex corethruses* ve *Eudrilus* sp. türleri üzerine ise ılımlı derecede antihelminitik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Dahiya, 2008).



Şekil 2.5 *Dianthus superbis* L.

Bir başka çalışma da ise *Dianthus superbis* L. türünün etil asetat fraksiyonu biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem sonunda iki adet diantramids, üç adet flavonoid, 2 adet kumarin ve üç adet farklı bileşik izole etmişlerdir. Bileşiklerin yapılarını spektroskopik yöntemlerle belirlemişlerdir. İzole edilen bileşiklerin İnsan karaciğer kanser hücresine (HepG2 cell) karşı sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. En güçlü aktiviteyi diantramids grubu bileşikten elde etmişlerdir (Ding et al., 2013).

Dianthus rupicola Biv. bitkisinin uçucu yağ içeriği incelenmiştir. Su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağların GC ve GC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler sonunda, timol ve karvakrol yüksek oranda tespit edilmiştir. Elde edilen bu yağların *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* karşı yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları, aynı zamanda da oldukça düşük antioksidan aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Casiglia et al., 2014).



Şekil 2.6 *Dianthus rupicola* Biy.

Durucasu ve grubu yapmış oldukları bir çalışmada, batı Anadolu'da yayılış gösteren, dört *Dianthus* L. türünün apolar içeriğini GC-MS ile belirlemişlerdir. Palmitik, linoleik ve oleik asit, ana bileşenler olarak tespit edilmiştir. Çalışılan dört tür içinden *Dianthus elegans* d'Urv. var. *elegans* türünün en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu dört tür *Staphylococcus epidermidis* ve *Candida albicans* a karşı dikkate değer antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir (Durucasu ve ark., 2009).

2.3 Caryophyllacea Familyasının Özelliği

Caryophyllaceae (Karanfilgiller), bir yıllık ve çok yıllık otsu, çalimsı bitkileri kapsayan bir çiçekli bitkiler familyasıdır. 88 cinsi ve yaklaşık 2000 türü bulunan büyük bir familyadır. Kuzey ve Güney yarım kürenin ılgan kesimlerinde ve tropik dağlarda yaygın olarak bulunurlar. Gen merkezinin Akdeniz bölgesi olduğu sanılmaktadır. Gövdelerinde şişkin nodyumlar bulunur. Yapraklar karşılıklı, bazen almaşık, basit ve çoğunlukla şeritsidir. Kulakçıkları genellikle yoktur, olanlarda derimsi yapıdadır. Çiçekler iki eşeyli, nadiren tek eşeyli ve iki evciklidir. Aktinomorf simetriktirler. Çoğunlukla basit veya birleşik dikazyum çiçek durumu halinde, bazen de dalların ucunda tek şeklilde bulunurlar. Kaliks 5 tane ve tabanda birleşmiştir. Çanak yapraklar sayısı bazı türlerde 4'tür. *Diantus*'da kaliks brahte ile çevrilmiştir. Korolla kaliks lobları ile aynı sayıda, taç yapraklardan meydana gelir. Taç yapraklar ayrıdır. Alt

kısmı ince dar, üst kısmı genişcedir. Bununla beraber, bazı cinslerde hayli küçülmüş taç yapraklara da rastlanır. Erkek organ sayısı taçyaprak eşit veya 2 katıdır. Dişi organ tek, üst durumlu yumurtalıktır. Plesentelamma merkezi eksenseldir. Meyve folikül, akendir (URL-5).

2.4 *Dianthus Ssp.*

Karanfil, karanfilgiller (Caryophyllaceae) familyasının *Dianthus* cinsinden karşılıklı, ensiz, sivri yapraklara sahip otsu bitkilerin ortak adıdır. Dalcıkların ucunda tek tek ya da topluca bulunan çiçekleri beyaz, pembe ya da kırmızı renklidir. Her çiçek bir çanakçık oluşturan dört burgu yaprakçığıyla belirgindir. Bahçe karanfili en ünlüsüdür. Bu karanfilin katmerli, yarı katmerli, alacalı ve hoş kokulu pek çok çeşidi vardır.

Çok yıllık bir bitki olan bu karanfil türü kesme çiçek elde etmek için özellikle seralarda yetiştirilir ve çelikle üremesi sağlanır. Bahçe çeşitleri genellikle fideyle çoğaltılır ve iki yıllık ya da çok yıllık bitkiler gibi yetiştirilir. Kır karanfili (*Dianthus plumarius*) çim gibi sık biten, çok zarif küçük çiçekli ve ince saçaklı taç yapraklıdır. İki yıllık ya da bir yıllık olan Çin karanfili (*Diantus sinensis*) çok değişik çiçekli bir bitkidir. İki yıllık ya da çok yıllık bir karanfil türü olan hüsnüyusuf olarak da bilinen (*Diantus barbatus*) sap ucunda şemsiye biçimde toplu küçük çiçekler açan bir türdür. Karanfil çiçekleri balgam söktürücü ve öksürük kesici olarak infüzyon ya da şurup halinde kullanılır. Karanfiller çoğunlukla kuzey yarı kürenin ılıman bölgelerinde, özellikle Akdeniz havzasında yetişen bitkilerdir. 80 kadar cinsi 2000'den fazla türü vardır (URL – 5).

2.4.1 *Dianthus ancyrensis* HAUSSKN. ET BORNM.(DA)



Şekil 2.7 *Dianthus ancyrensis* Hausskn. & Bornm

Tablo 2.1 *Dianthus ancyrensis* HAUSSKN ET BORNM. (DA) Türünün Taksonomisi

Familya	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i> L.
Taxon	<i>Dianthus ancyrensis</i> HAUSSKN ET BORNM.

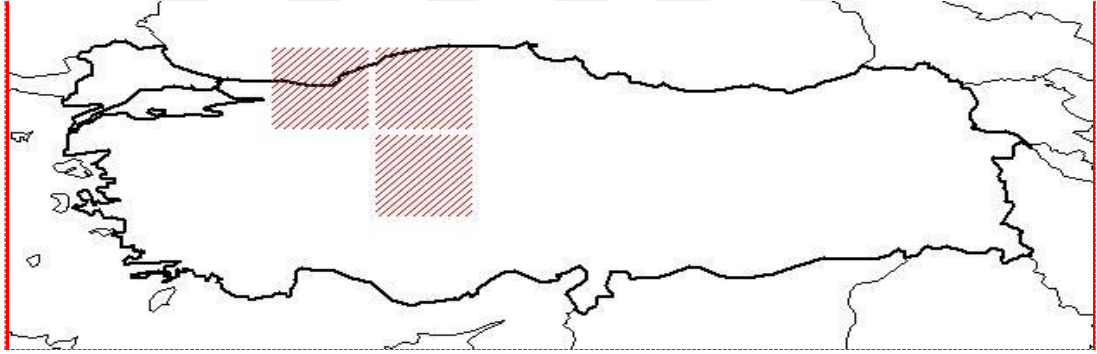
Tablo 2.2 DA Türünün Taksonomi Hiyerarşisi

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Caryophyllidae
Order	Caryophyllales
Family	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i>
Species	<i>Dianthus ancyrensis</i> HAUSSKN. ET BORNM.

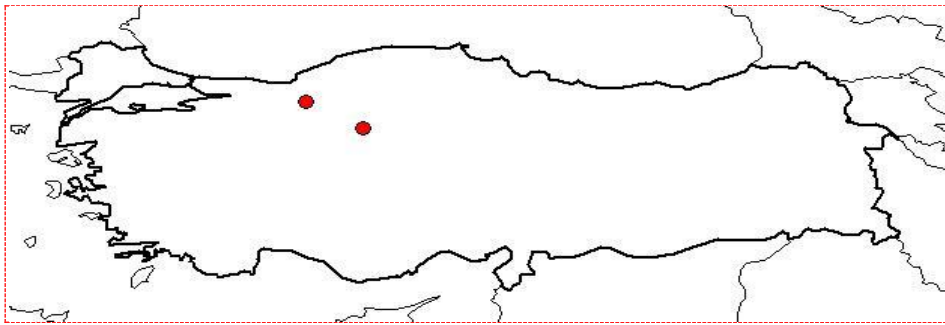
Tablo 2.3 DATürünün Genel Taksonomi Bilgisi

Ömür	Çok Yıllık
Yapı	Ot
Hayat Formu	
Çiçeklenme	6-8
Habitat	Step, Taşlı Yerler
Yükseklik	1700-1800
Endemik	Endemik
Element	İran- Türkiye
Türkiye Dağılımı	O. Anadolu
Genel Dağılımı	Türkiye

Dianthus ancyrensis HAUSSKN ET BORNM. (DA) türünün taksonunun Türkiye’de A3, A4, B4 karelerinde dağıldığı Şekil 2.8’ de görülmektedir. Türkiye’de bulunduğu iller (Şekil 2.9) Bolu ve Ankara’dır (URL-6).



Şekil 2.8 DA türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı kareler



Şekil 2.9 DA türünün taksonunun Türkiye’de bulunduğu iller

2.4.2 *Dianthus balancae* BOISS. (DB)



Şekil 2.10 *Dianthus balancae* Boiss.

Tablo 2.4 *Dianthus balancae* BOISS. (DB) Türünün Taksonomisi

Familiya	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i> L.
Taxon	<i>Dianthus balancae</i> BOISS.

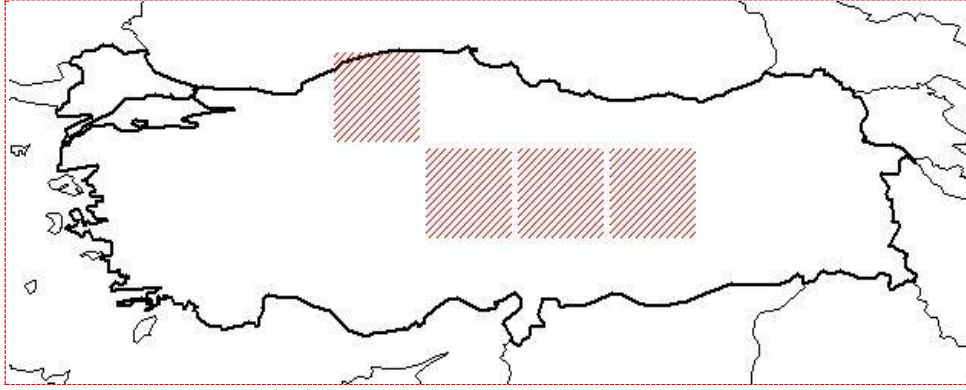
Tablo 2.5 DB Türünün Taksonomi Hiyerarşisi

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Caryophyllidae
Order	Caryophyllales
Family	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i>
Species	<i>Dianthus balancae</i> BOISS.

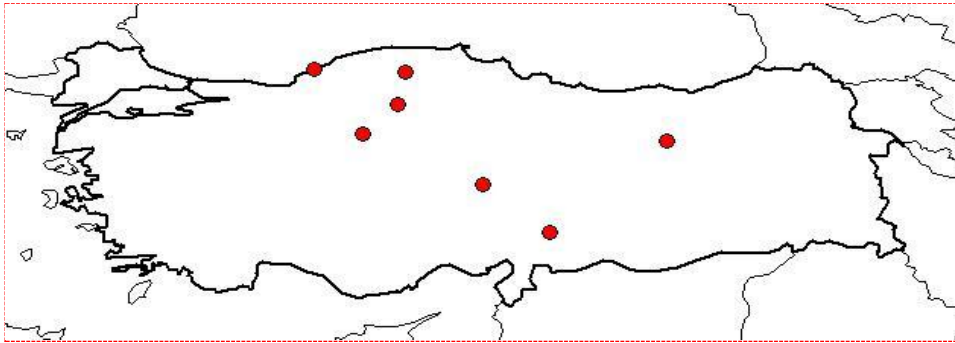
Tablo 2.6 DB Türünün Genel Taksonomi Bilgisi

Ömür	Çok Yıllık
Yapı	Ot
Hayat Formu	
Çiçeklenme	7-9
Habitat	Kireçtaşı yamaçlar
Yükseklik	1800-2900
Endemik	Endemik
Element	Bilinmiyor
Türkiye Dağılımı	K., O. ve D. Anadolu
Genel Dağılımı	Türkiye

Dianthus balancae BOISS.(DB) türünün taksonunun Türkiye’de A4, B5, B6, B7 karelerinde dağıldığı görülmektedir(Şekil 2.11). Ayrıca Türkiye’de bulunduğu iller (Şekil 2.12) Zonguldak, Çankırı, Kastamonu, Ankara, Erzinan, Kayseri, Kahramanmaraş’ tır (URL-7).

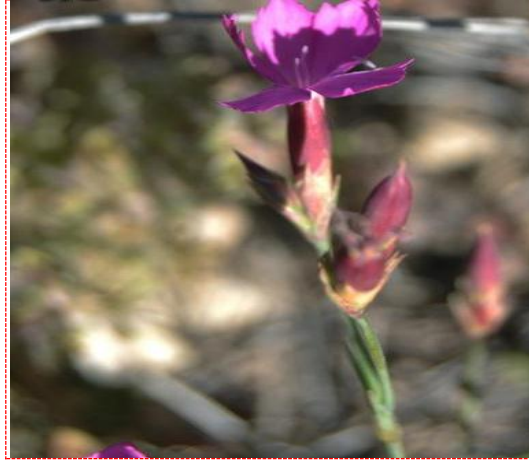


Şekil 2.11 DB türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı kareler



Şekil 2.12 DB türünün taksonunun Türkiye’de bulunduğu iller

2.4.3 *Dianthus zederbaueri* VIERH.(DZ)



Şekil 2.13 *Dianthus zederbaueri*Vierh.

Tablo 2.7 *Dianthus zederbaueri*VIERH.(DZ) Türünün Taksonomisi

Familya	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i> L.
Taxon	<i>Dianthus zederbaueri</i> VIERH.

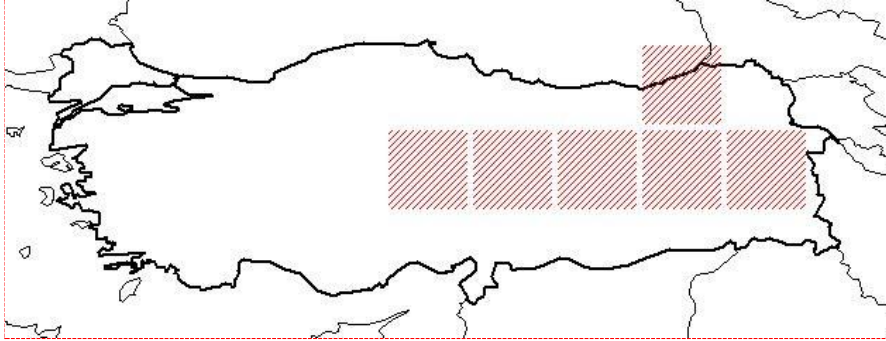
Tablo 2.8 DZ Türünün Taksonomi Hiyerarşisi

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Subclass	Caryophyllidae
Order	Caryophyllales
Family	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i>
Species	<i>Dianthus zederbaueri</i> VIERH.

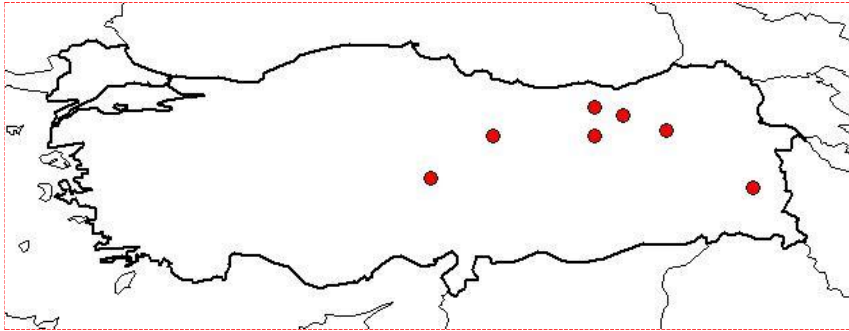
Tablo 2.9 DZ Türünün Genel Taksonomi Bilgisi

Ömür	Çok Yıllık
Yapı	Ot
Hayat Formu	
Çiçeklenme	7-7
Habitat	Yamaçlar
Yükseklik	1500-2300
Endemik	Endemik
Element	İran-Turan
Türkiye Dağılımı	O. ve D. Anadolu
Genel Dağılımı	Türkiye

Dianthus zederbaueri VIERH. (DZ) türünün taksonu Türkiye’de A8, B5, B6, B7, B8, B9 karelerinde dağıldığı görülmektedir(Şekil 2.14). Ayrıca Türkiye’de bulunduğu iller(Şekil 2.15). Erzincan, Erzurum, Gümüşhane, Kayseri, Sivas, Van, Bayburt’tur (URL-8).



Şekil 2.14 DZ türünün taksonunun Türkiye’de dağıldığı kareler



Şekil 2.15 DZ türünün taksonunun Türkiye’de bulunduğu iller

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan kimyasallar ve araç-gereçler

DMEM (Dulbecco Modified Eagles Medium)

Penicillin Streptomisine

Fetal Bovine Serum

Tripsin EDTA

5-FloroUrasil

BrdU ELISA Kolorometric Kit

Trypan Blue

Hekzan

Etıl asetat

Aseton

Kloroform

Etanol

Balon

Beher

Huni

Süzgeç kağıtları

3.1.1.1 Kullanılan cihazlar

HPLC-TOF/MS: Agilent Technologies 1200 Infinity Series LC-6200 Series Accurate-Mass Time-of-Flight (TOF)

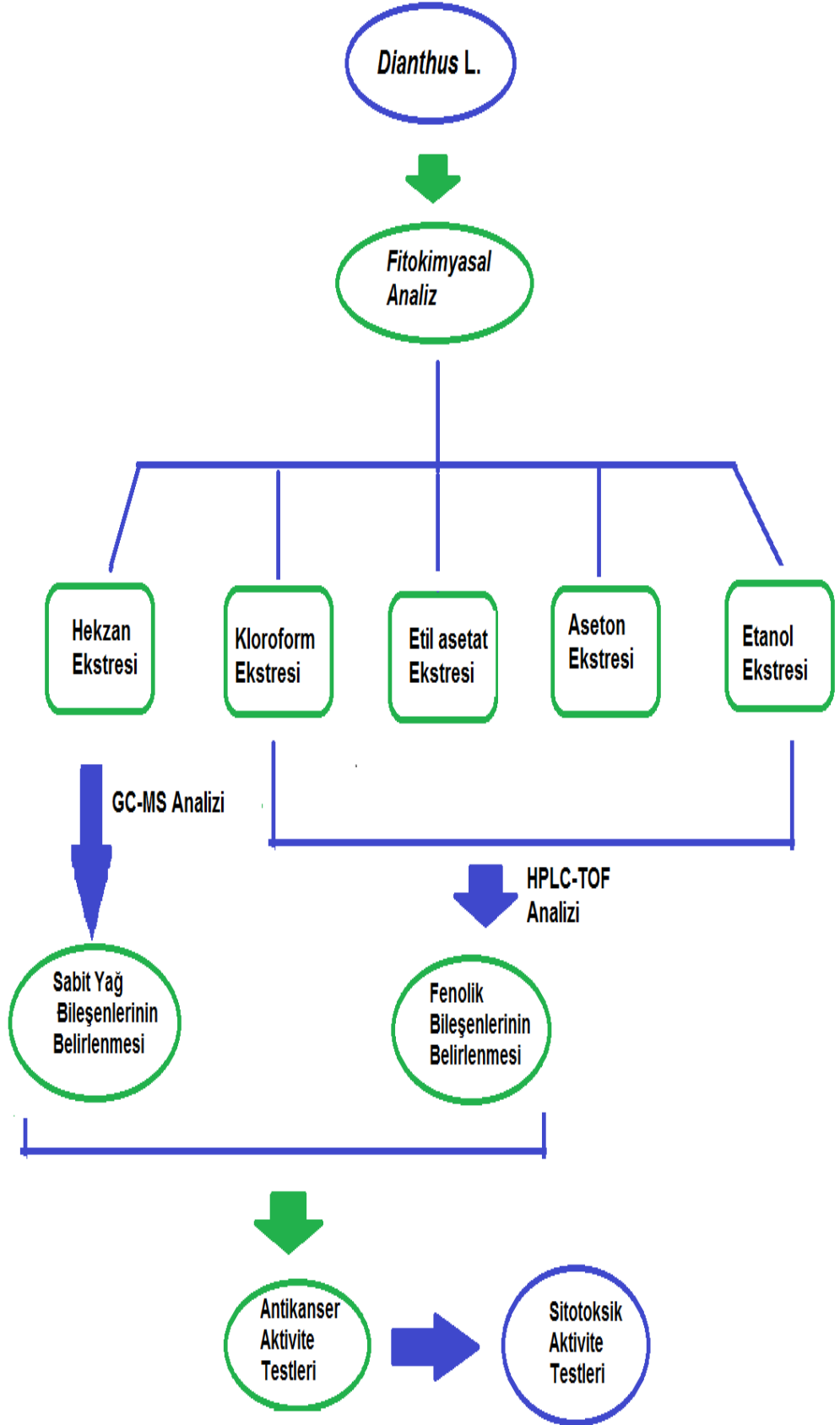
GC-MS: Agilent 7890A gas chromatography and 5975C inert MSD, with Triple-Axisdetector (Agilent Technology)

ELISA Mikroplate Okuyucu(Awareness Chromate, USA)

Manyetik Karıştırıcı (IKA)
Vakum Pompası
Etüv(Panasonic)
İnkübatör CO₂ Water-Jacketed(Nuaire US Autoflow)
Steril Kabin (Esco class II type A2)
PH metre
Evaporatör
Ultrasonik Banyo
Mikroskop(Olympus CX21)
İnverted Mikroskop
Vorteks
Santrifüj(Hettich EBA20)
Otoklav (Panasonic)

3.2 Yöntem

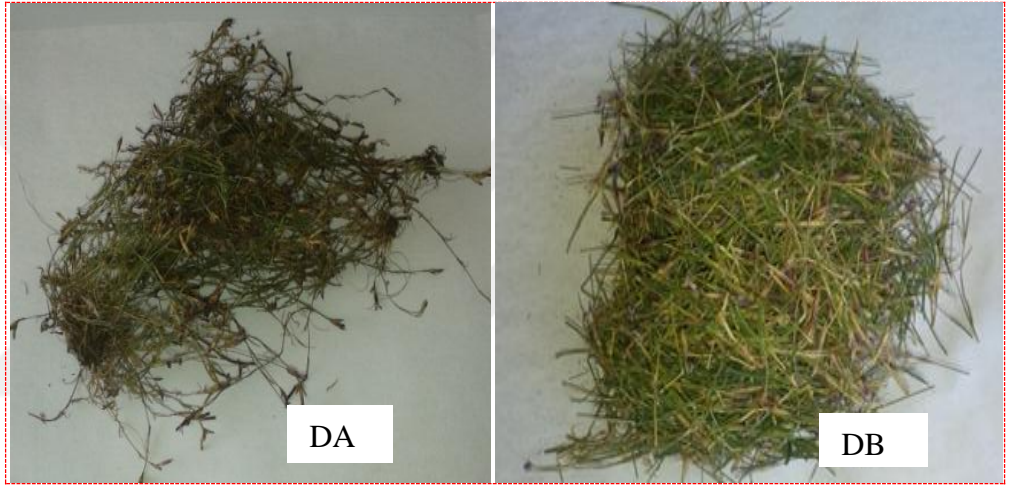
Doğal ortamdan toplanan bitkiler (DA, DB, DZ) uygun ortamda kurutuldu. Kurutulan bitkiler içlerindeki sekonder metabolitlerin elde edilmesi amacıyla farklı polaritedeki çözücüler ile ekstrakte edildi. Ekstrelerdeki bileşenler, HPLC-TOF ve GC-MS cihazları kullanılarak karakterize edildi. Aynı ekstrelerin, insan rahim kanseri (HeLa) ve sıçan beyin tümörü (C6) hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. Son olarak, yüksek aktivite sergilediği belirlenen ekstrelerin sitotoksik aktivite testleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.1 Çalışma Şeması

3.2.1 Bitki materyallerinin toplanması

Çalışılacak olan Endemik *Dianthus ancyrensis* Hausskn. & Bornm., *Dianthus balansae* Boiss., *Dianthus zederbaueri* VIERH.(Caryophyllaceae) türleri Mayıs-Eylül 2015 tarihleri arasında Çankırı' nın Yapraklı mevkiinden toplandı. Toplanan bitkiler kök ve toprak üstü olmak üzere iki kısma ayrıldı. Ayrılan kısımlar kuru ve güneş ışığının girmediği depolarda kurutuldu ve karton kutularda saklandı.



Şekil 3.2 *D. ancyrensis* Hausskn. & Bornm (DA), *D. balansae* Boiss., (DB), *D. zederbaueri* VIERH.(DZ) türlerinin toprak üstü kısımları

3.2.1.1 Bitkinin özütlenmesi (Ekstraksiyon) işlemi

Kurutulan bitkiler sıvı azot ile parçalandı ve tartıldı. Daha sonra artan polariteye göre sırası ile hekzan, kloroform, etilasetat, aseton ve metanol çözücülerinde 2 gün aralıklarla maserasyon yöntemi ile ekstraksiyona bırakıldı. Elde edilen çözeltilerin çözücülerini evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı ve ekstratlar elde edildi.



Şekil 3.3 DA, DB ve DZ ekstrat balonları



Şekil 3.4 DA, DB ve DZ ekstratlarının çözücülerinin uzaklaştırılması

3.2.1.2 Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (GC-MS) ile sabit yağ bileşenlerinin belirlenmesi

GC-MS analizleri BPX-20 kolonu (30 m x 0.25 mm x 0,25 µm filmi) kullanılarak dahili-Autosampler ile Perkin Elmer kütle spektrometresinde elde edildi. GC-MS tespiti için, iyonizasyon enerjisi 70 eV olan bir elektron iyonizasyon sistemi kullanıldı. Taşıyıcı gaz helyumun akış hızı 1,3 ml/dk ve kolon sıcaklığı aşağıda tarif edilen koşullarda oldu (Demirtas ve Sahin, 2013).



Şekil 3.5 GC-MS

Gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi (GC-MS) analizleri için; 70 eV' luk iyonizasyon voltajında bir FID detektörü ile donatılmış, % 5 fenil polysilphenylene-siloksan BPX-20 kılcal kolonu (30 m x 0,25 mm, 0,25 mikron film kalınlığında) ile Perkin Elmer Clarus 500 gaz kromatografisinde (GC) kullanıldı. Fırın sıcaklığı; 50'den 120 °C' ye 5 °C/dk ve 120 °C'den 240 °C' ye 10 °C/dk olarak programlandı ve son sıcaklık 5 dakika boyunca sabit tutuldu. 1,0 µL' ye seyreltilmiş numuneler; 300:1 split modunda enjekte edildi. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 220 °C ve 290 °C olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olan Helyum 1 mL/dk akış oranında ve seyreltilmiş numune (1/1000) kullanıldı.

3.2.1.3 HPLC-TOF/MS cihazı ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi

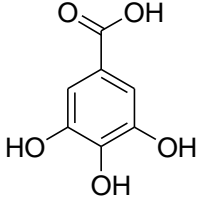
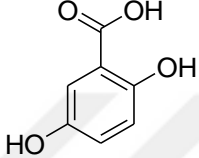
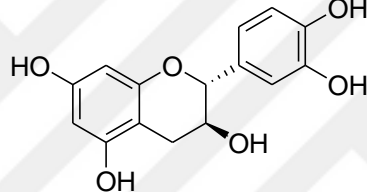
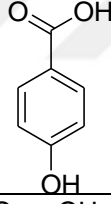
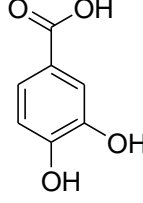
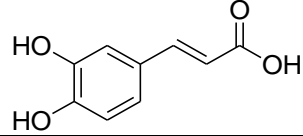
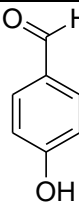
Bitki ekstralarının fenolik içeriği, Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 mm, 4,0 x 50 mm) kolon, 6210 (TOF) LC/MS dedektör ile birlikte Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC Sistemi kullanılarak belirlendi. Mobil faz A ve B, sırasıyla, ultra saf su çözeltisi ile % 0,1 formik asit ve asetonytrildir.

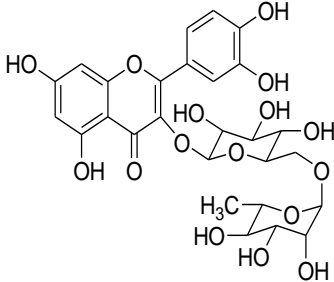
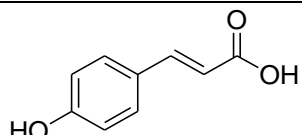
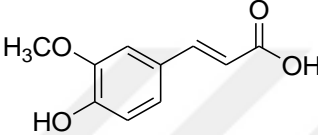
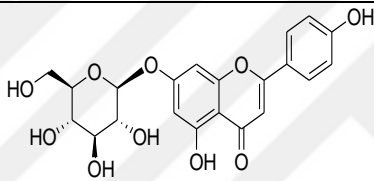
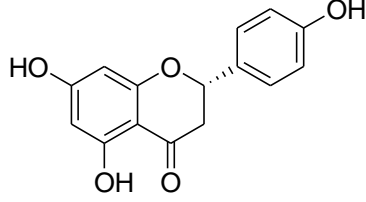
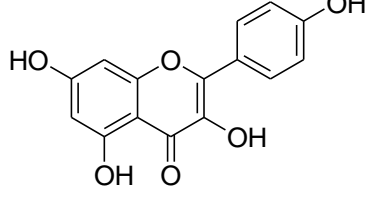


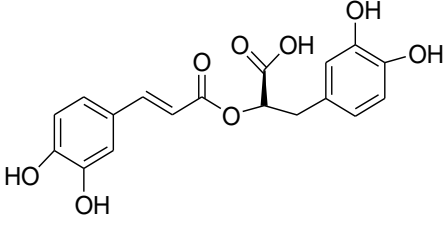
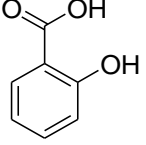
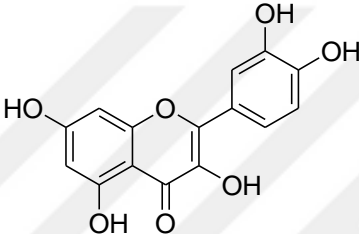
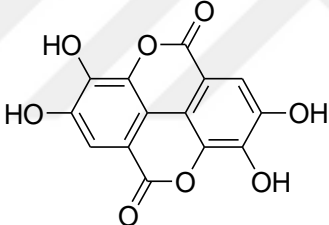
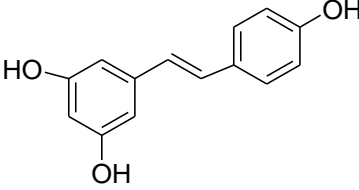
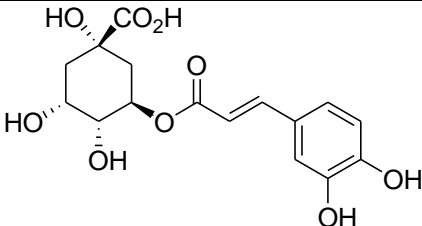
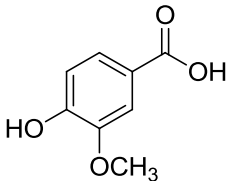
Şekil 3.6 HPLC-TOF/MS

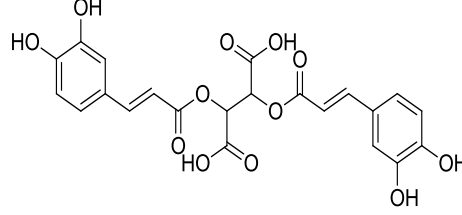
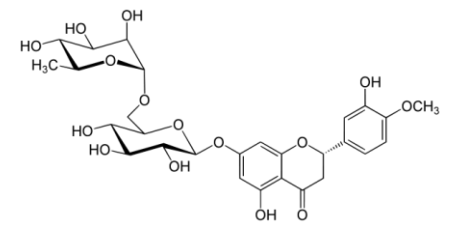
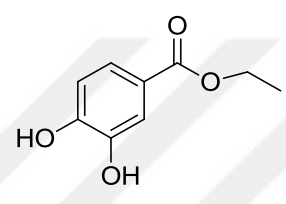
Akış hızı 0,4 ml/dk., kolon sıcaklığı 35°C ve enjeksiyon hacmi 5 µL oldu. Çözücü programı: 0. dakikada % 10 B; 0-1. dakikada % 10 B; 1-10. dakikada % 80 B; 10-19. dakikada % 80 B; 19-19,10. dakikada % 10 B; 19,10-29,1. dakikada % 10 B olarak takip edildi. Tayin basamağında standart bileşiklerin tutunma süreleri ve m/z değerleri kullandı. MS/TOF cihazının iyonizasyon modu 325 °C gaz sıcaklığı ile negatif, gaz akışı 11,0 L/dk ve nebulizör 45 (psi) oldu.

Tablo 3.1 Analizi Gerçekleştirilen Fenolik Bileşenler

No	Molekül Adı	Molekül formülü	Kapalı formülü	Gerçek Molekül ağırlığı (g/mol)	Hesaplanan Molekül ağırlığı (g/mol)
1	Gallik asit		$C_7H_6O_5$	169,0142	169,0112
2	Gentisik asit		$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0163
3	Kateşin		$C_{15}H_{14}O_6$	289,0718	289,0675
4	4-Hidroksi benzoik asit		$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0217
5	Proto kateşoik asit		$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0159
6	Kafeik asit		$C_9H_8O_4$	179,0350	179,0316
7	4-Hidroksi benzaldehit		$C_7H_6O_2$	121,0295	121,0271

8	Rutin		$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1461	609,1395
9	p-Kumarik asit		$C_9H_8O_3$	163,0401	163,0367
10	Ferulik asit		$C_{10}H_{10}O_4$	193,0506	193,0469
11	Apigenin-7-glikozit		$C_{21}H_{20}O_{10}$	431,0984	431,0939
12	Naringenin		$C_{15}H_{12}O_5$	271,0612	271,0698
13	Kamferol		$C_{15}H_{10}O_6$	285,0405	285,0369

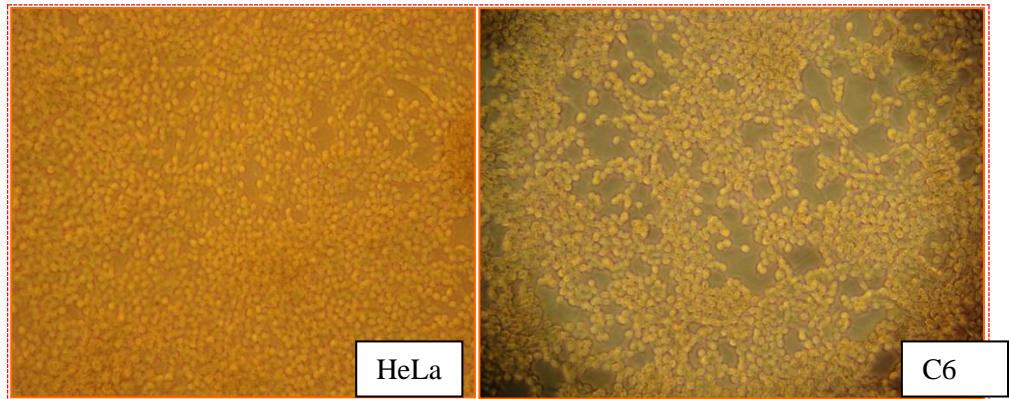
14	Rosmarinik asit		$C_{18}H_{16}O_8$	359,0772	359,0732
15	Salisilik asit		$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0220
16	Kersetin		$C_{15}H_{10}O_7$	301,0354	301,0317
17	Ellajik asit		$C_{14}H_6O_8$	300,9990	300,9946
18	Resveratrol		$C_{14}H_{12}O_3$	227,0714	227,0678
19	Klorojenik asit		$C_{16}H_{18}O_9$	353,0878	353,0826
20	Vanilik asit		$C_8H_8O_4$	168,04	167,035

21	Sisorik asit		$C_{22}H_{18}O_{12}$	474.0798	473.0725
22	Hesperidin		$C_{28}H_{34}O_{15}$	610,1898	609,1825
23	Protokatesik asit etil esteri		$C_9H_{10}O_4$	182,0579	181,0506

3.2.2 Antiproliferatif aktivite testleri

3.2.3 HeLa ve C6 hücrelerinin hücre kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) ve C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi) hücreleri kullanıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 HeLa ve C6 kanser hücreleri

Hücre kültürü çalışmaları steril kabinde gerçekleştirildi. Steril flasklarda bulunan HeLa ve C6 hücreleri (Şekil 2), trypsin-EDTA (10 mL) çözeltisi ile 5 dakika CO₂ inkübatöründe (%5 CO₂, 37°C) inkübe edildi. Test çalışmaları boyunca, HeLa ve C6 hücreleri DMEM besi yeri ile kültüre edildi.



Şekil 3.8 DMEM besi yerinin sterilize edilişi

İnkübatörden çıkarılan hücreler üzerine besi yeri (10 mL) eklenerek ortam nötralize edildi ve hücre süspansiyonu falkon tüpüne aktarıldı. Tüplerdeki hücreler santrifüj (600 RPM, 5 dk.) edilerek hücrelerin çökeltmesi sağlandı. Elde edilen hücre çökeltisi besi yeri (3 mL) ile süspansiyon haline getirildi. Oluşan hücre çözeltisi, içerisinde 20 mL besi yeri bulunan 75 cm²'lik flaslara eklendi ve flaskların kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirildi. Hücre pasajlama işlemi (split) üç-dört günde bir tekrarlandı. Her pasajlama işlemi öncesinde hücrelerin büyümesi ve kontaminasyon olup olmadığı inverted mikroskop altında kontrol edildi.

3.2.4 Hücreslerin sayılması işlemi

Besi yeri ile süspansiyon edilen karışımdan 10 µL alınarak Thoma Lamına damlatıldı ve rastgele beş kuyucukta bulunan hücreler (mavi boyanmayan canlı hücreler) mikroskop altında sayıldı.



Şekil 3.9 Mikroskop

Bu işlem üç kez tekrarlandı ve yapılan üç sayımın ortalaması alındı. Aşağıdaki formül kullanılarak hücre sayısı belirlendi;

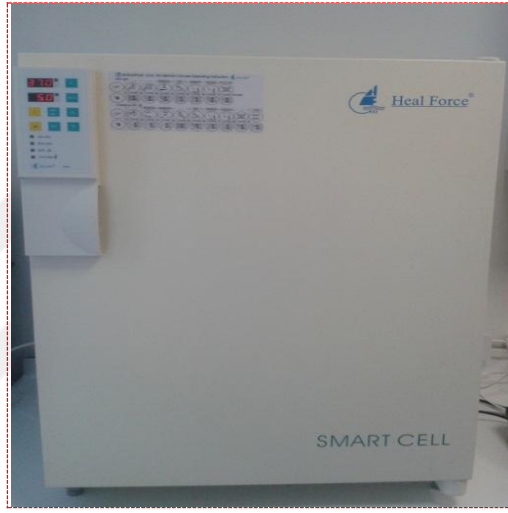
$$\text{Hücre sayısı} = 5 \text{ kuyucuktan sayılan hücre sayısı} \times 50.000 \times \text{Seyreltme faktörü}$$

3.2.4.1 Testler İçin Stok Çözeltilerin Hazırlanması

Örneklerin DMSO daki çözeltileri (20 mg/mL) hazırlandı ve 1:3 oranında besiyeri ile seyreltildi (5mg/mL). Oluşan yeni çözeltiler 0,22 µ'luksteril filtreler kullanılarak steril falcon (15 ml) tüplerine süzöldü ve -20 °C'de saklandı.

3.2.4.2 BrdU ELISA Kolorometrik Testlerin Yapılışı

200 µL hacimli 96-well'lik mikrotelere 30.000 hücre ekildi. Kontrol haricindeki tüm kuyucuklara bitki ekstralarının steril stok çözeltilerinden 8 değişik konsantrasyon (100, 75, 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 µg/mL) verecek şekilde belirlenen kuyucuklara eklendi ve toplam hacmi besi yeri ile 200 µL ye tamamlandı. Aynı işlem 5-FU için de gerçekleştirildi. Hazırlanan deney düzeneği bir gece 37 °C, %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.10 CO₂ İnkübatör

İnkübasyon işlemi sonunda sonra BrdU ELISA testine geçildi. Aşağıda yapılan işlemler kısaca belirtilmiştir;

- 1) İnkübasyon sonunda kuyucuklara 20 µl BrdU etiketleme solüsyonundan eklendi ve 4 saat 37°C, %5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- 2) Etiketlenen kuyucuklardaki çözelti ters çevrilerek boşaltıldı ve 200 µL FixDenat eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 3) Fix Denat solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 200 µL anti-BrdU-POD solüsyonu eklendi ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

4) Anti-BrdU-POD solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra tüm kuyucuklar 3 x 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara 100 µL substrat solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

5) Tüm kuyucuklara 25 µL 1M H₂SO₄ çözeltisi ilave edilmeden önce ve sonra ELİSA okuyucuda 450 ve 650 nm deki absorbansları ölçüldü.

3.2.5 IC50 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Test edilecek her maddenin IC50 konsantrasyonunu (%50'sinin proliferasyonunun inhibe ettiği konsantrasyon) belirlenmesi için her bir test maddesinin belirli bir aralıkta logaritmik olarak artan konsantrasyonlarının (5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µl) hücreler üzerinde test edilmesi sonrasında elde edilen absorbansı değerleri tespit edildi ve standart eğri üzerinden uygun bir program (Excel, SigmaPlot veya ED50V10.XLS) ve analiz metodu kullanılarak hesaplandı.

3.2.6 Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı

Test maddelerinin sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi için, hücreler test maddesinin IC50 konsantrasyonunun altında ve üstünde seçilecek konsantrasyonlarda LDH Cell Cytotoxicity Assay (Roche 04 744 926 001, Germany) kullanarak üretici firmanın presedürüne göre belirlendi ve % sitotoksosite hesaplandı.

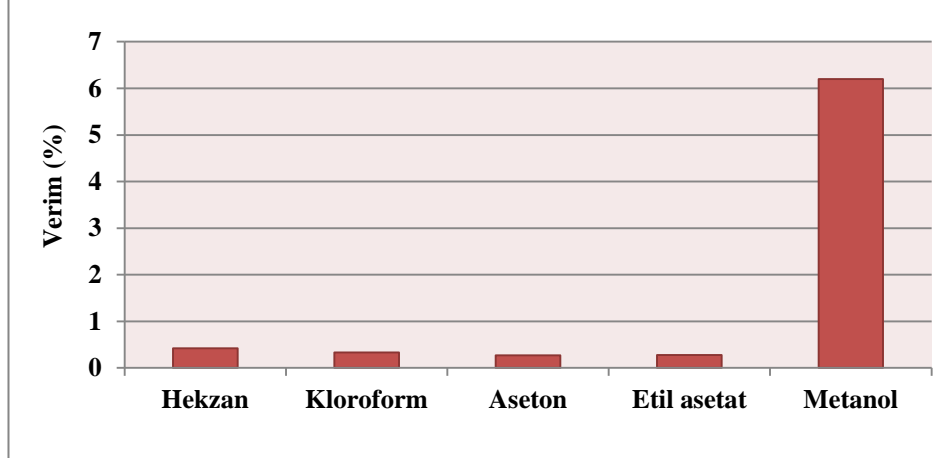
4. BULGULAR

4.1. Ekstrelerin Miktarları ve % Verimleri

DA Hekzan ekstresi 422,7 mg (% 0,7973) ; CHCl₃ ekstresi 333,2 mg (% 0,6285); Aseton ekstresi 273 mg (% 0,5149); EtOAc ekstresi 269 mg (0,5074) ve MeOH ekstresi 6201,8 mg (% 11,6993) olarak elde edildi. En yüksek verimin MeOH ekstresinde (% 11,6993) olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 DA Ekstrelerinin miktarları ve % verimleri

Çözücü	DA			
	Bitki Miktarı (g)	Çözücü Miktarı (mL)	Ekstre (mg)	Verim (%)
Hekzan	53,01	1200	422,7	0,7973
Kloroform			333,2	0,6285
Aseton			273	0,5149
Etil Asetat			269	0,5074
Etanol			6201,8	11,6993

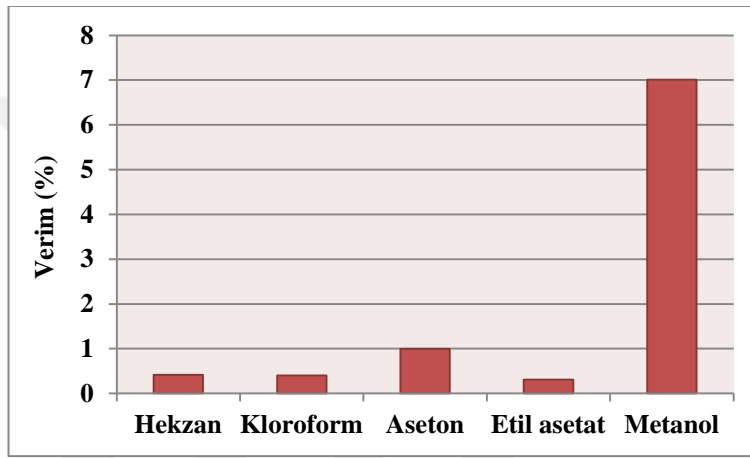


Şekil 4.1 DA ekstrelerinin verimleri (%)

DB Hekzan ekstresi 216,4 mg (% 0,4197) ; CHCl₃ ekstresi 207,8 mg (% 0,4031); Aseton ekstresi 513,5 mg (% 0,9961); EtOAc ekstresi 159,5 mg (0,3094) ve MeOH ekstresi 3613,8 mg (% 7,0102) olarak elde edildi. En yüksek verimin MeOH ekstresinde (% 7,0102) olduğu gözlemlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 DB Ekstrelerinin miktarları ve % verimleri

Çözücü	DB			
	Bitki Miktarı (g)	Çözücü Miktarı (mL)	Ekstre (mg)	Verim (%)
Hekzan	51,55	1500	216,4	0,4197
Kloroform		800	207,8	0,4031
Aseton		1500	513,5	0,9961
Etil Asetat		590	159,5	0,3094
Etanol		650	3613,8	7,0102

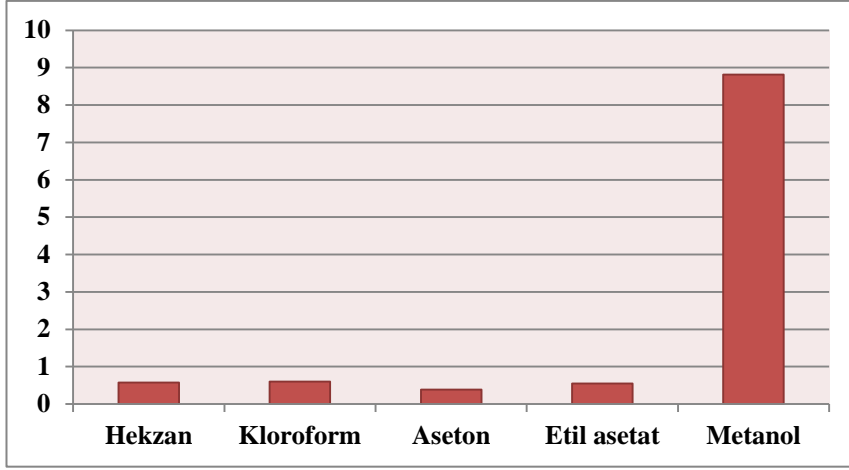


Şekil 4.2 DB ekstrelerinin verimleri (%)

DZ hekzan ekstresi 306,3 mg (% 0,5779) ; CHCl_3 ekstresi 320 mg (% 0,6037); Aseton ekstresi 204,9 mg (%0,3866); EtOAc ekstresi 290,3 mg (0,5477) ve MeOH 5201,9 mg (% 8,8149) olarak elde edildi. En yüksek verimin MeOH ekstresinde (% 8,8149) olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 DZ Ekstrelerinin miktarları ve % verimleri

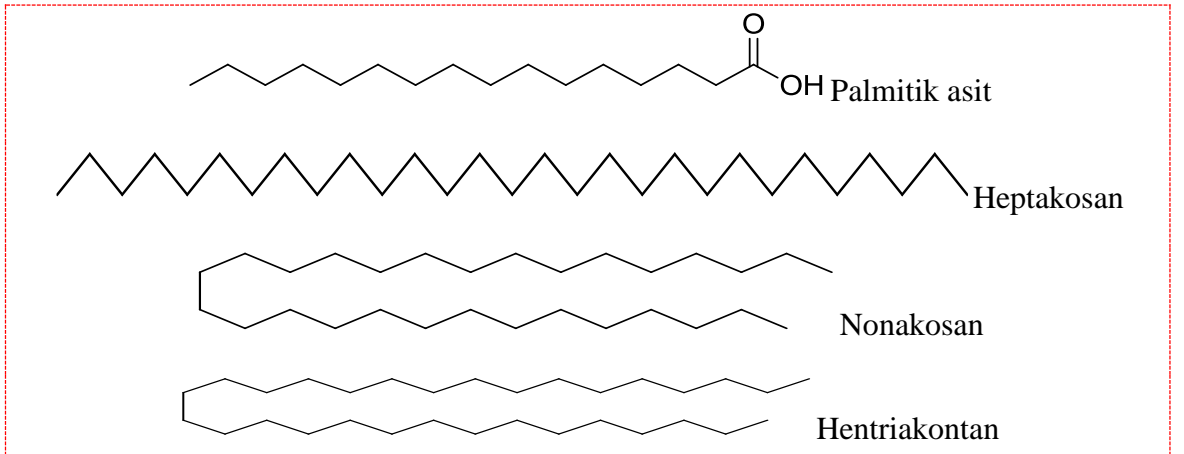
Çözücü	DZ			
	Bitki Miktarı (g)	Çözücü Miktarı (mL)	Ekstre (mg)	Verim (%)
Hekzan	53	800	306,3	0,5779
Kloroform			320	0,6037
Aseton			204,9	0,3866
Etil Asetat			290,3	0,5477
Etanol			5201,9	8,8149



Şekil 4.3 DZ ekstralarının verimleri (%)

4.2 DA, DB ve DZ Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

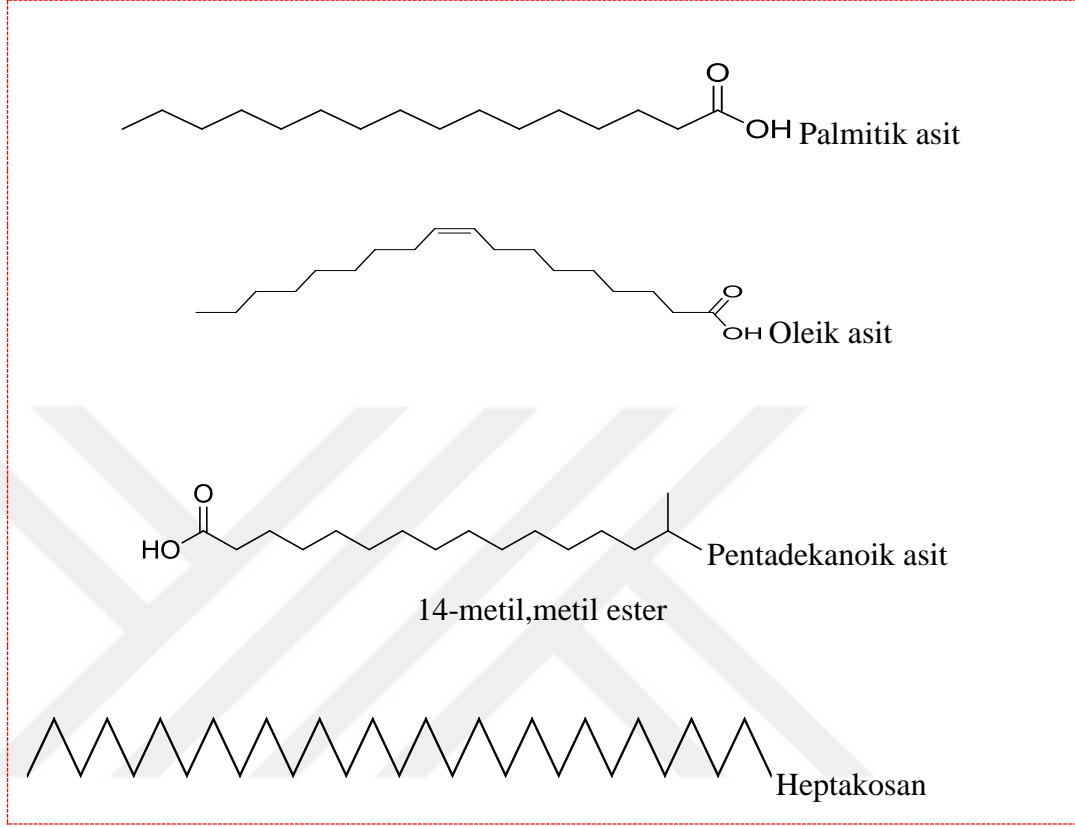
DA hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 4 adet doymuş yağ asidi, 1 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 7 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 12 adet bileşen belirlenmiştir (Tablo4.4). DA Hekzan ekstresinde ana bileşen olarak Palmitik asit (% 6,89), Heptakosan (% 30,30), Nonakosan (% 18,55) ve Hentriakontan (% 26,65) belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil4.4 DA Hekzan ekstresinin GC-MS analizinde bulunan ana bileşenler

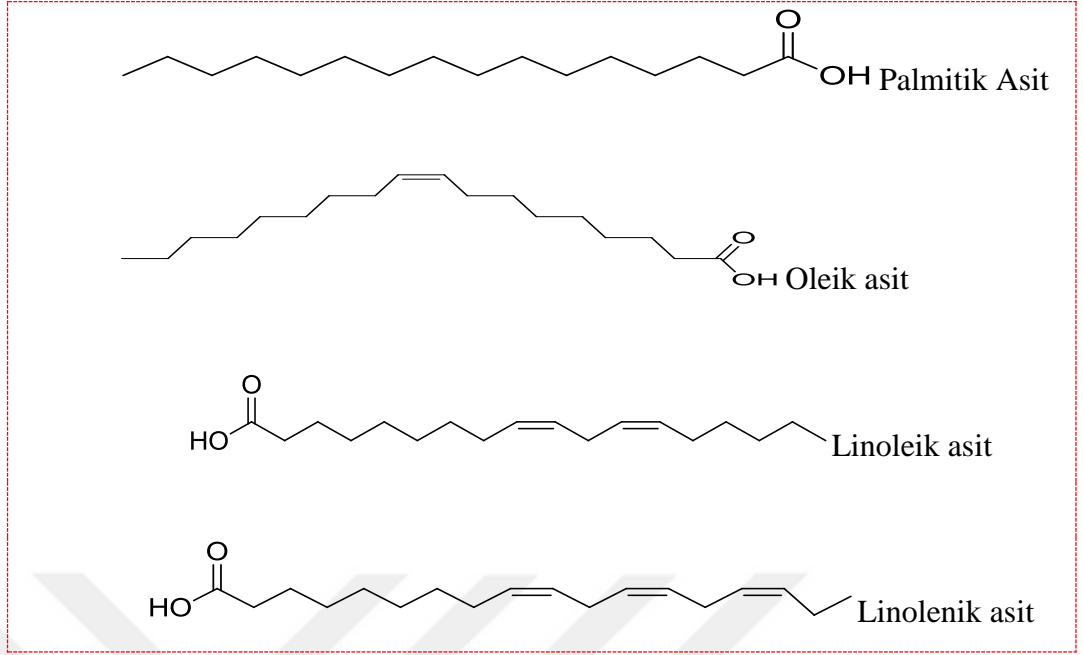
DB hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 6 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi ve 18 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 25 adet

bileşen belirlenmiştir (Tablo 4.4). DB Hekzan ekstresinde ana bileşen olarak Palmitik asit (% 10,46), Oleik asit (% 6,37), Pentadekanoik asit 14-metil, metil ester (% 8,5), Heptakosan (% 45,97) belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 DB Hekzan ekstresinin GC-MS analizinde bulunan ana bileşenler

DZ hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 2 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi, 2 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 1 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 6 adet bileşen belirlenmiştir (Tablo 4.4). DZ Hekzan ekstresinde ana bileşen olarak Palmitik asit (% 35,02), Oleik asit (% 12,85), Linoleik asit (% 9,24), Linolenik asit (% 15,06), Heptakosan (% 24,91) belirlenmiştir (Şekil 4.6).



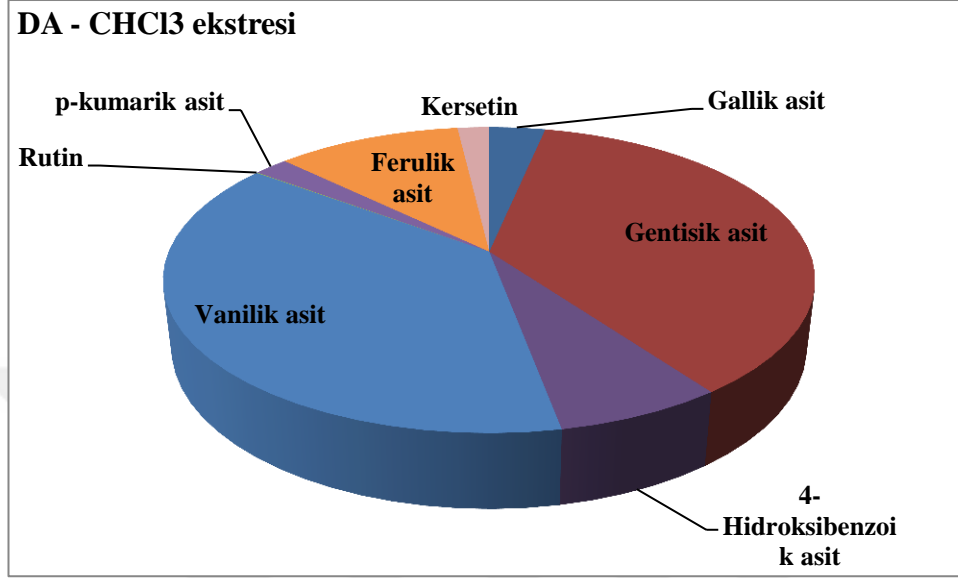
Şekil 4.6 DZ Hekzan ekstresinin GC-MS analizinde bulunan ana bileşenler

Tablo 4.4 DA, DB ve DZ Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

No	RT	İzomer	Bileşik Adı	% miktar		
				DA	DB	DZ
Doymuş Yağ Asitleri						
1	19.86	C ₁₂ :0	Laurik asit		0,23	
2	22.91	C ₁₄ :0	Miristik asit	0,94	0,52	
3	27.63	C ₁₆ :0	Palmitik asit	6,89	10,46	35,02
4	32.58	C ₁₈ :0	Sterik asit	1,02	2,99	2,89
5	34.85	C ₂₀ :0	Arakidik asit	1,30	0,90	
6	37.31	C ₂₂ :0	Behenik asit		0,32	
Ara Toplam				10,16	15,46	37,92
Mono Doymamış Yağ Asitleri						
7	32.79	C ₁₈ :1	Oleik asit		6,37	12,85
Ara Toplam					6,37	12,85
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri						
8	32.18	C ₁₈ :2	Linoleik asit	2,73		9,24
9	32.27	C ₁₈ :3	Linolenik asit			15,06
Ara Toplam				2,73		24,31
Diğer Bileşenler						
10	21.89		2-Pentadekanon		2,17	
11	23.84		2-Hekzadekanon		0,36	
12	25.46		Hekzahidrofarmesilaseton	1,68	0	
13	26.96		2-Heptadekanone	0	0,84	
14	32.19		Pentadekanoik asit, 14-metil, metil ester	0	8,50	
15	32.47		Pitol	0	1,21	
16	34.10		Heneikosan, 3-methyl-	1,30	0	
17	34.10		Eikosan	0	0,54	
18	34.52		Trikosan	0	2,67	
19	36.41		Tetrakosan	0	0,41	
20	36.59		12-Pentakosen	0	1,69	
21	36.89		Behenik alkol	2,66	0	
22	36.90		Pentakosan	0	6,14	
23	37.72		Izooktilfitalat	0	0,59	
24	38.31		Hekzakosan	0	1,45	
25	38.92		Erusik asit	0	0,34	
26	39.60		1-Dokosanol	0	1,78	
27	40.03		Heptakosan	30,30	45,97	24,91
28	44.63		Nonakosan	18,55	0,84	
29	43.95		Etanol, 2-(9-oktadeseniloksi)	0	1,81	
30	50.73		1-Heptakosanol	5,92	0,79	
31	51.83		Hentriakontan	26,65		
Ara Toplam				87,09	78,16	
Genel Toplam				100	100	100

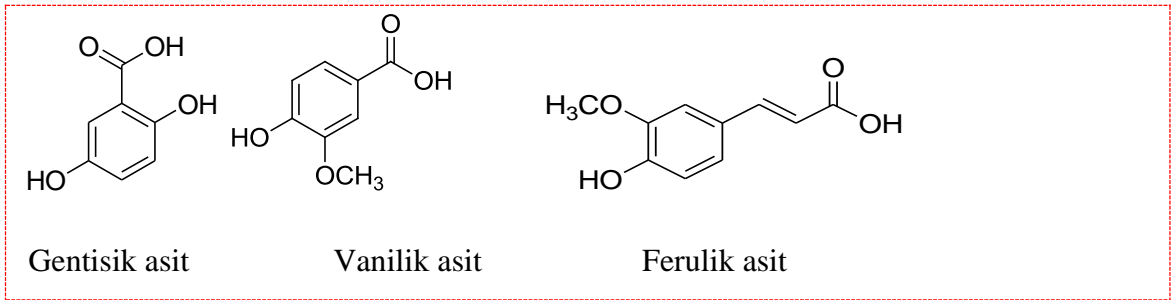
4.3 DA, DB ve DZ Ekstrelerinin HPLC/TOF -MS Analiz Sonuçları

DA CHCl_3 , EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında Tablo 4.4'te belirtilen 25 fenolik bileşenin kantitatif tayini gerçekleştirildi. Buna göre;

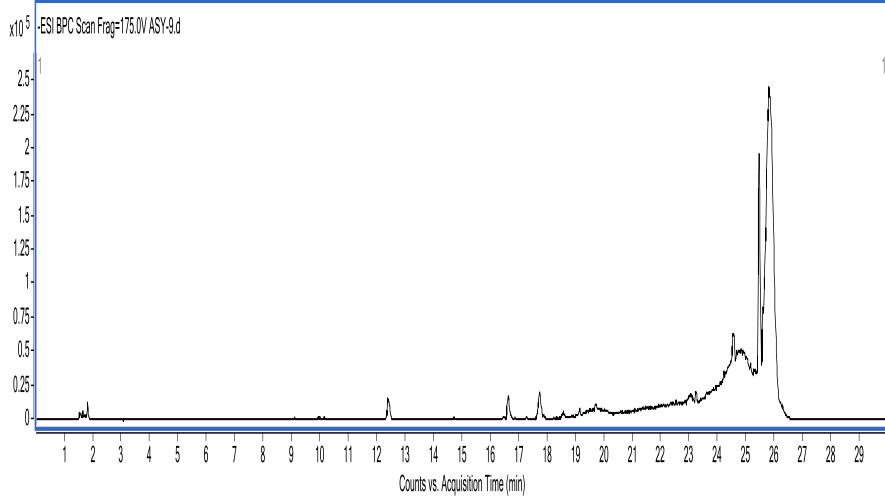


Şekil 4.7 DA CHCl_3 ekstresinin fenolik bileşenleri

DA CHCl_3 ekstresinde 8 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak Vanilik asit (3,84 mg fenolik/Kg kuru bitki), Gentisik asit(3,70 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve Ferulik Asit (1,10 mg fenolik/Kg kuru bitki), belirlendi(Şekil 4.7, 4.8, 4.9).

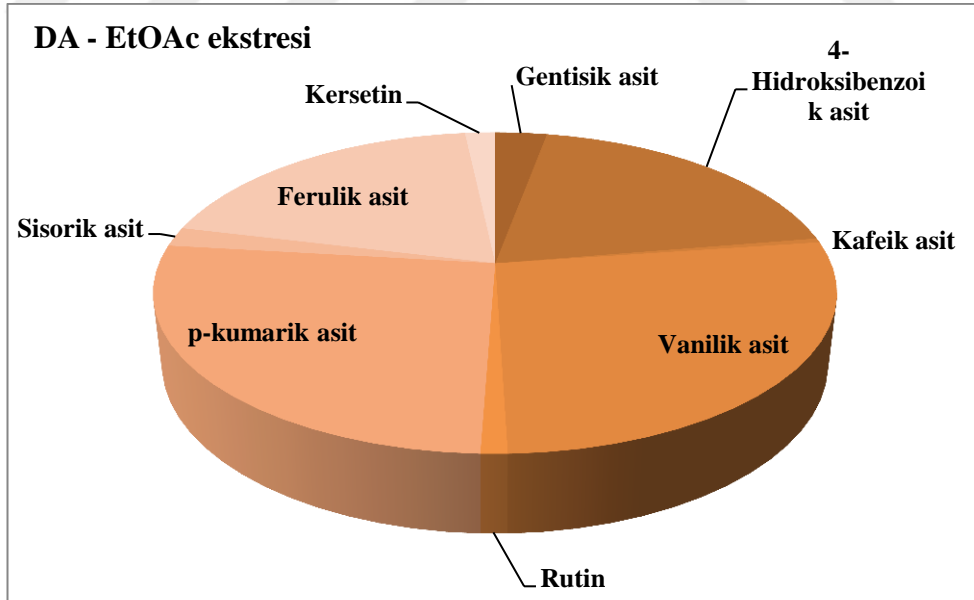


Şekil 4.8 DA CHCl_3 ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

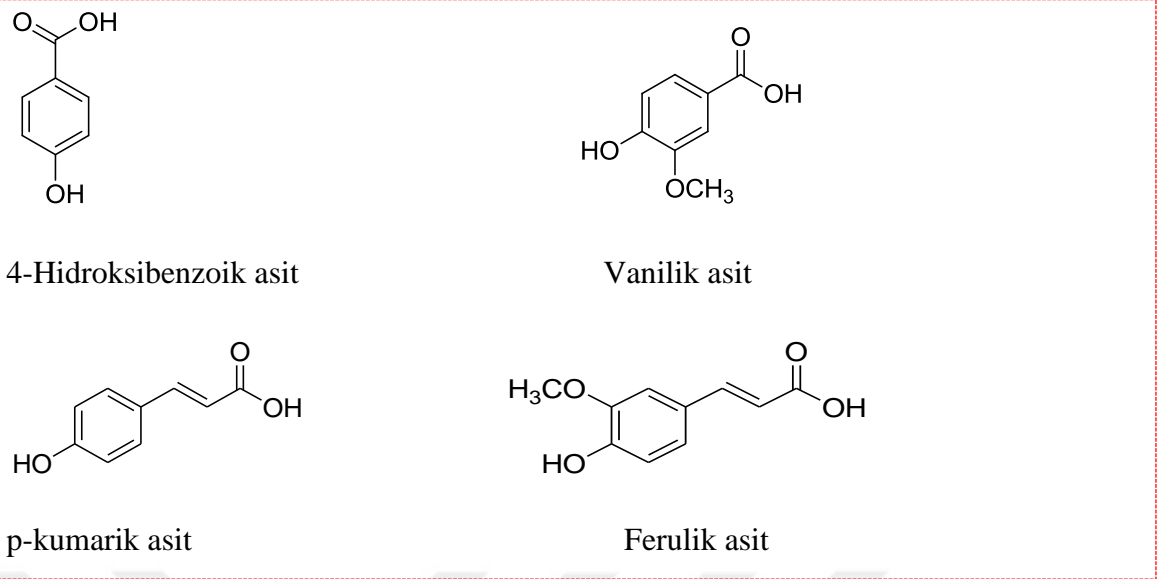


Şekil 4.9 DA CHCl_3 ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

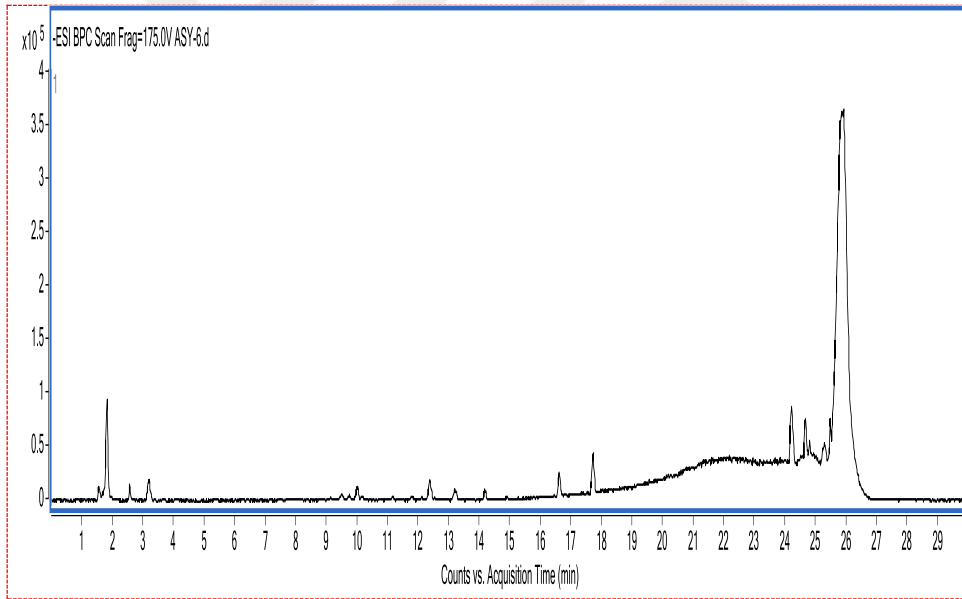
DA EtOAc ekstresinde 9 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak vanilik asit (2,44 mg fenolik/Kg kuru bitki), p-kumarik asit (2,39 mg fenolik/Kg kuru bitki), ferulik asit (1,78 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve 4-hidroksibenzoik asit (1,77 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.10, 4.11, 4.12).



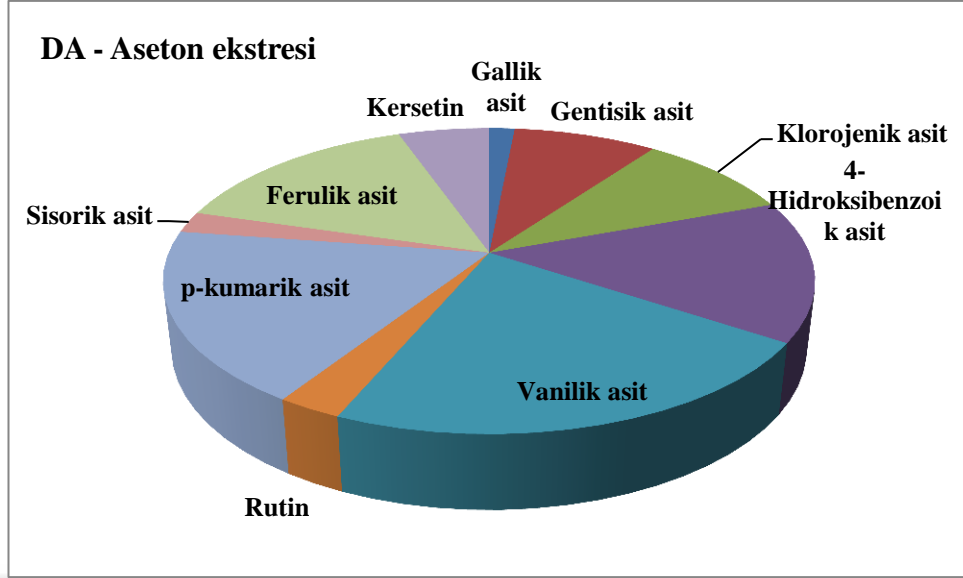
Şekil 4.10 DA EtOAc ekstresinin fenolik bileşenleri



Şekil 4.11 DA EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri

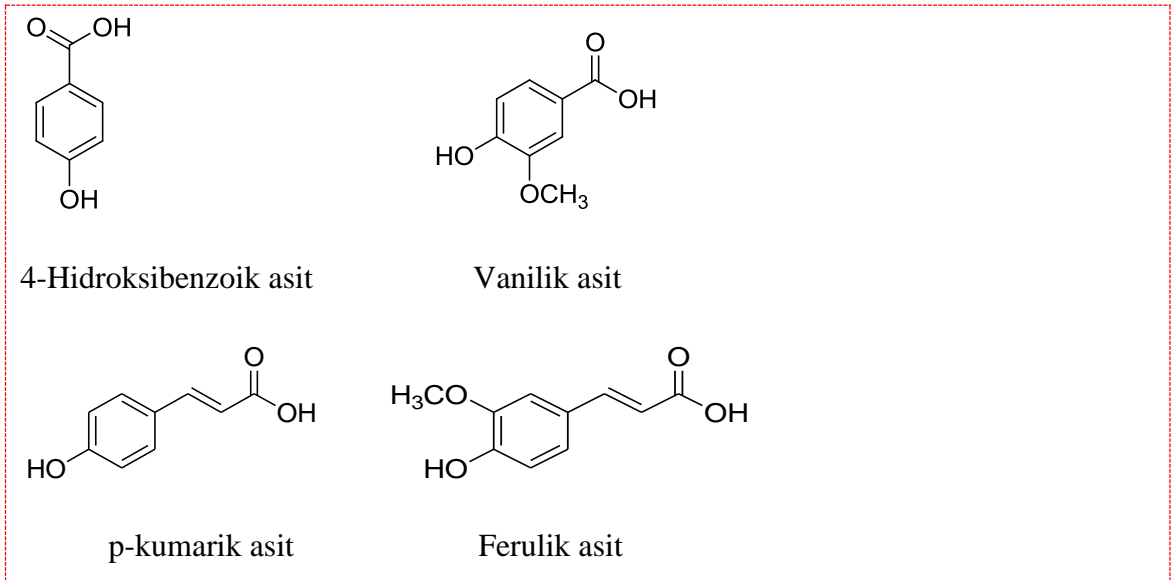


Şekil 4.12 DA EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

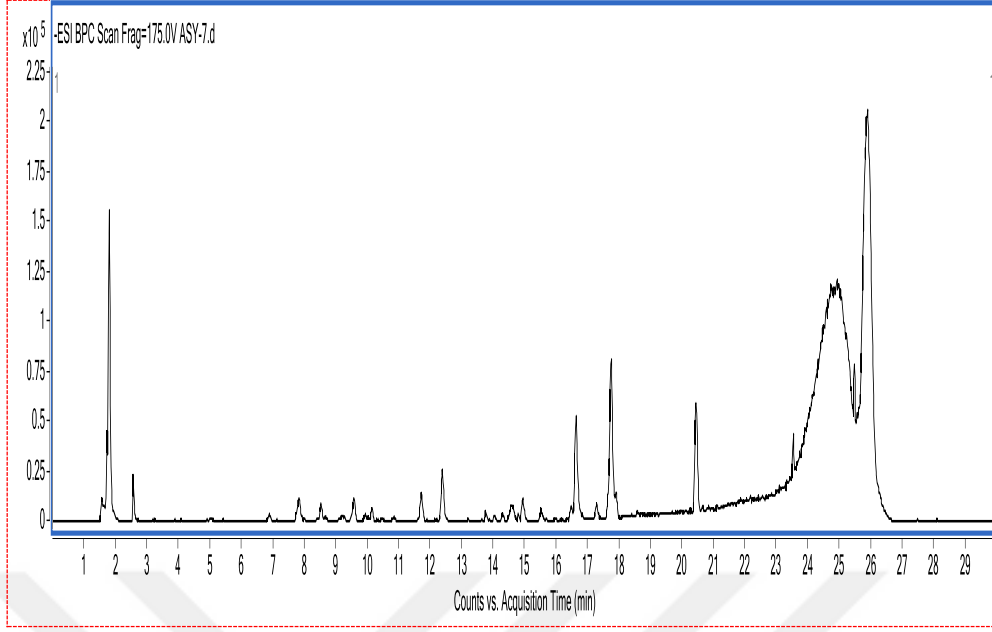


Şekil 4.13 DA Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri

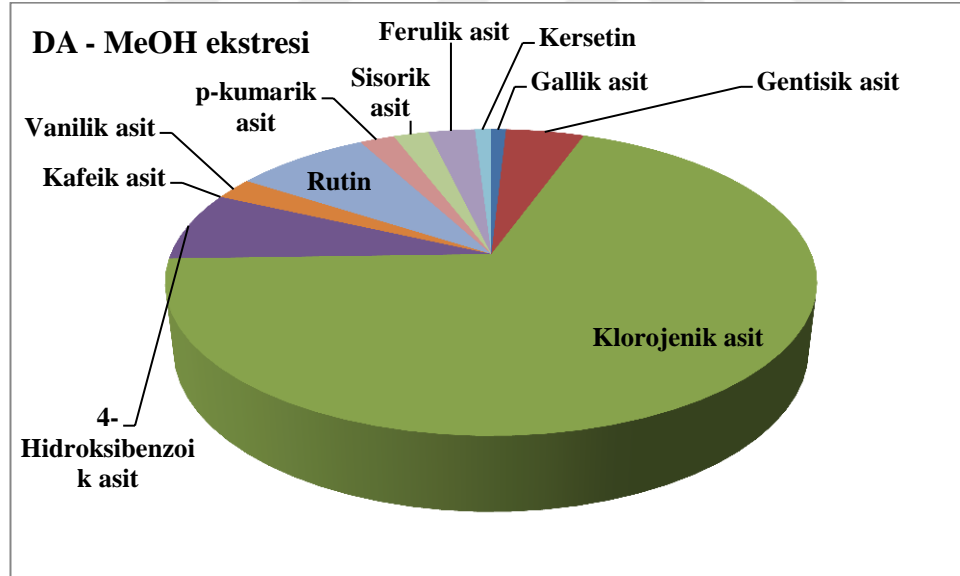
DA aseton ekstresinde 10 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak vanilik asit (2,69 mg fenolik/Kg kuru bitki), p-kumarik asit (2,21 mg fenolik/Kg kuru bitki), ferulik asit (1,83 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve 4-hidroksibenzoik asit (1,81 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil4.13, 4.14, 4.15).



Şekil 4.14 DA Aseton ekstresinin HPLC/TOF -MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri



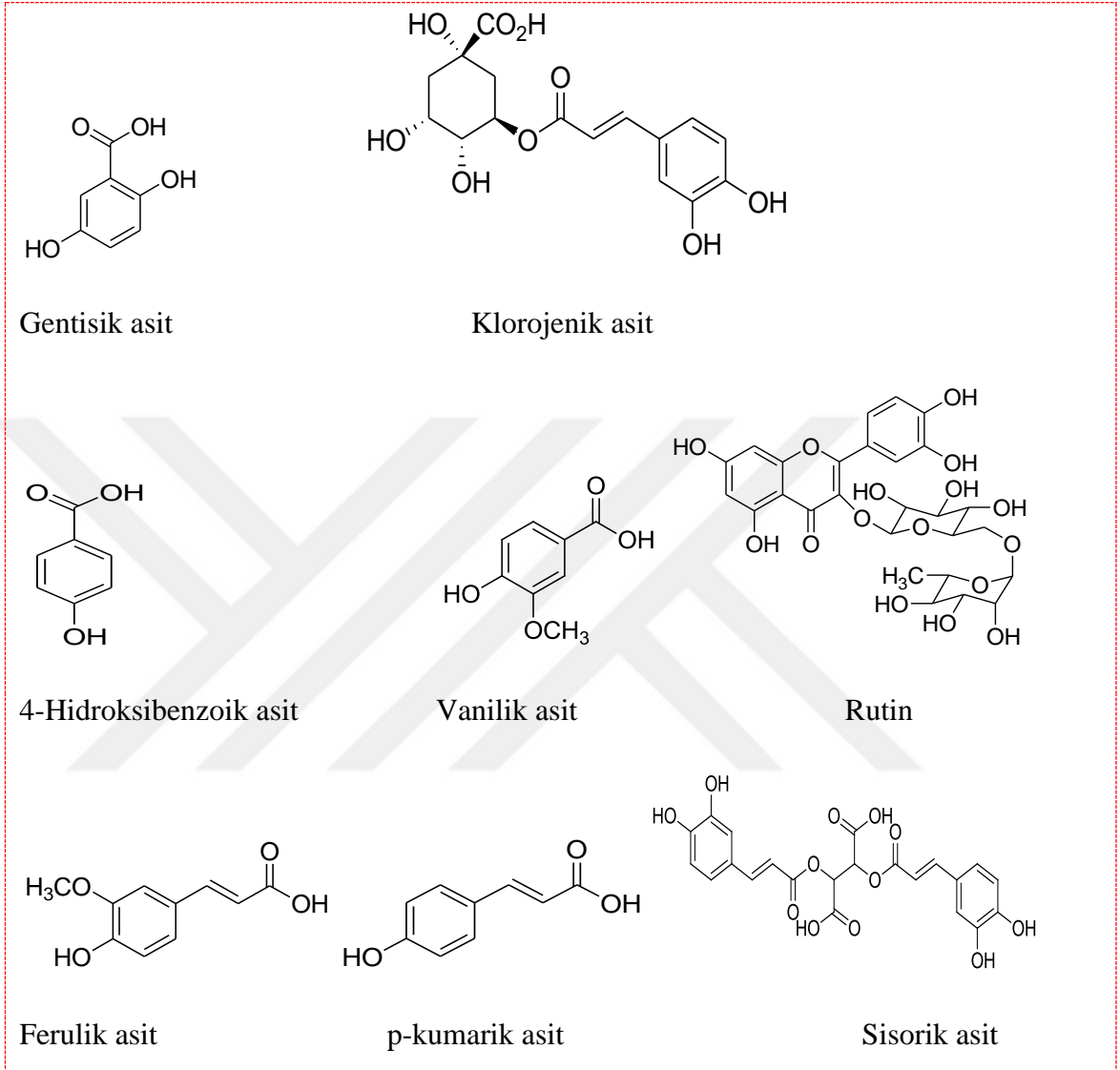
Şekil 4.15 DA Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı



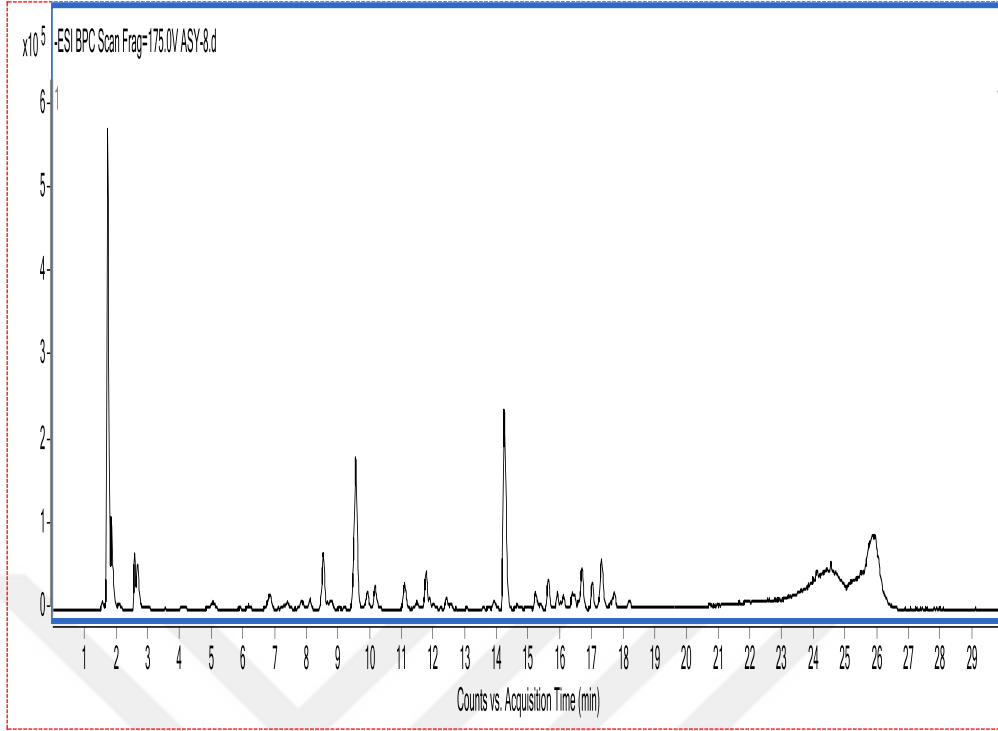
Şekil 4.16 DA MeOH ekstresinin fenolik bileşenleri

DA MeOH ekstresinde 10 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak klorojenik asit (336,60 mg fenolik/Kg kuru bitki), rutin (38,94 mg fenolik/Kg kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (35,55 mg fenolik/Kg kuru bitki), gentisik asit (22,67 mg fenolik/Kg kuru bitki), ferulik Asit (13,00 mg fenolik/Kg kuru bitki), vanilik asit

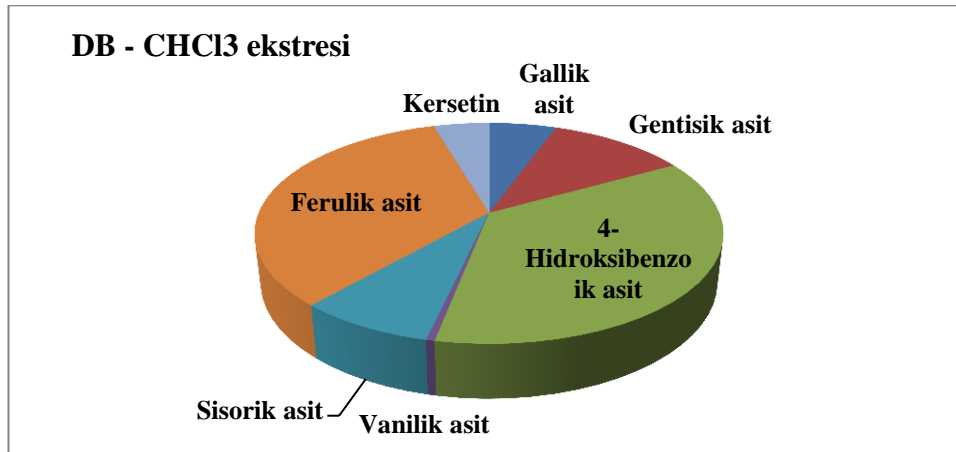
(11,25mg fenolik/Kg kuru bitki), sisorik asit (10,22 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve p-kumarik asit (10,08 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.16, 4.17, 4.18).



Şekil 4.17 DA MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS analiz sonucuna göre ana bileşenleri

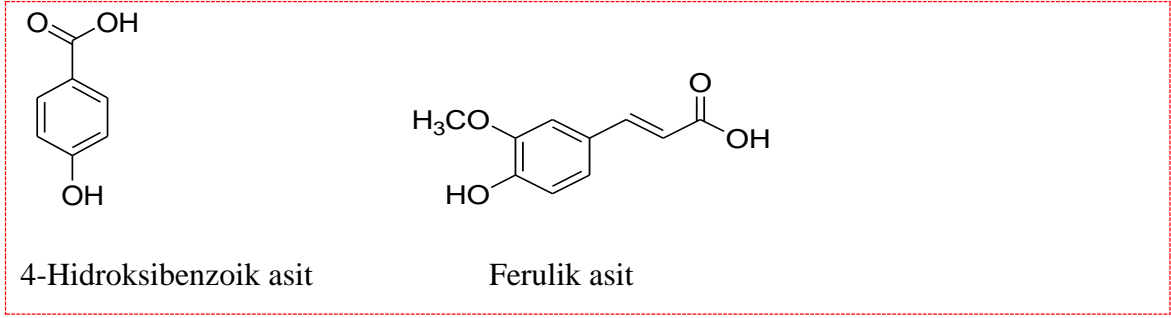


Şekil 4.18 DA MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

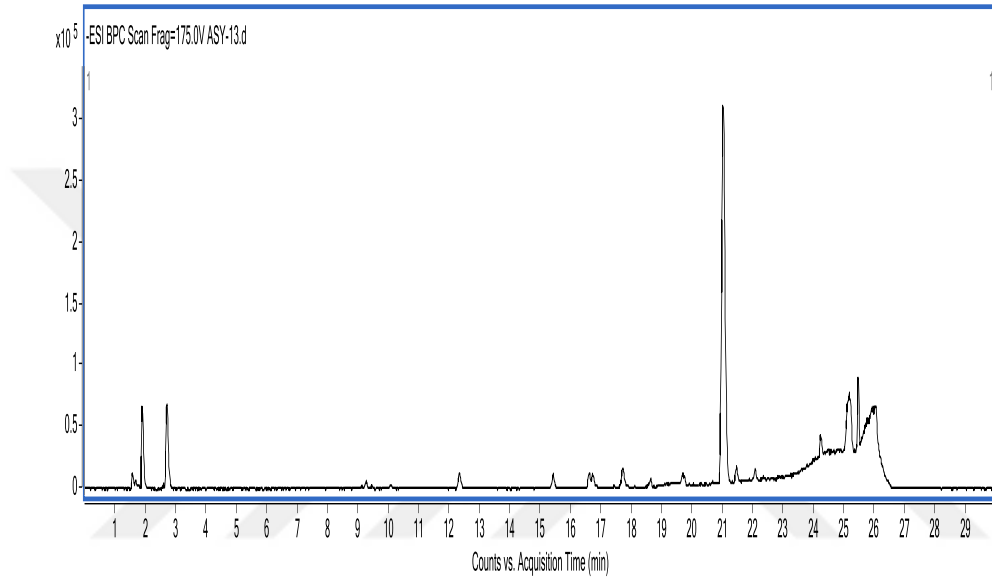


Şekil 4.19 DB CHCl_3 ekstresinin fenolik bileşenleri

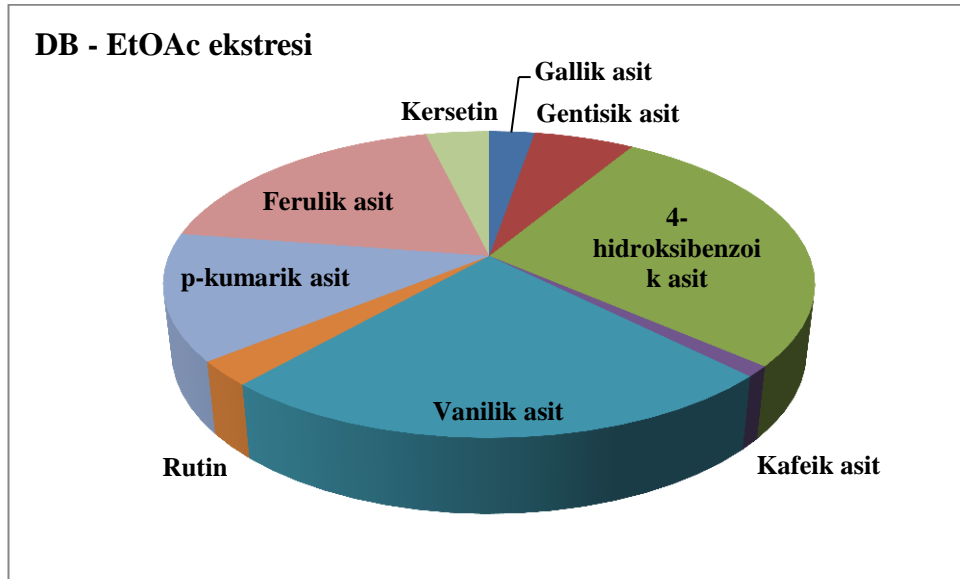
DB CHCl_3 ekstresinde 7 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak 4-hidroksibenzoik asit (0,93 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve ferulik asit (0,87 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi(Şekil 4.19, 4.20, 4.21).



Şekil 4.20 DB CHCl₃ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

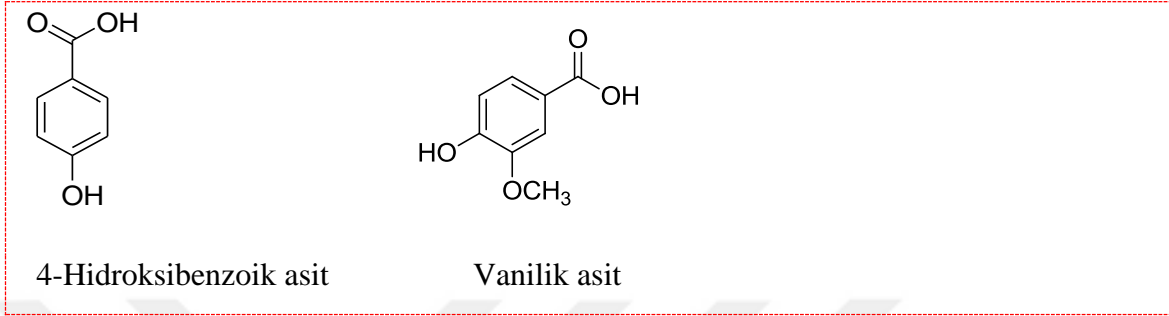


Şekil 4.21 DB CHCl₃ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

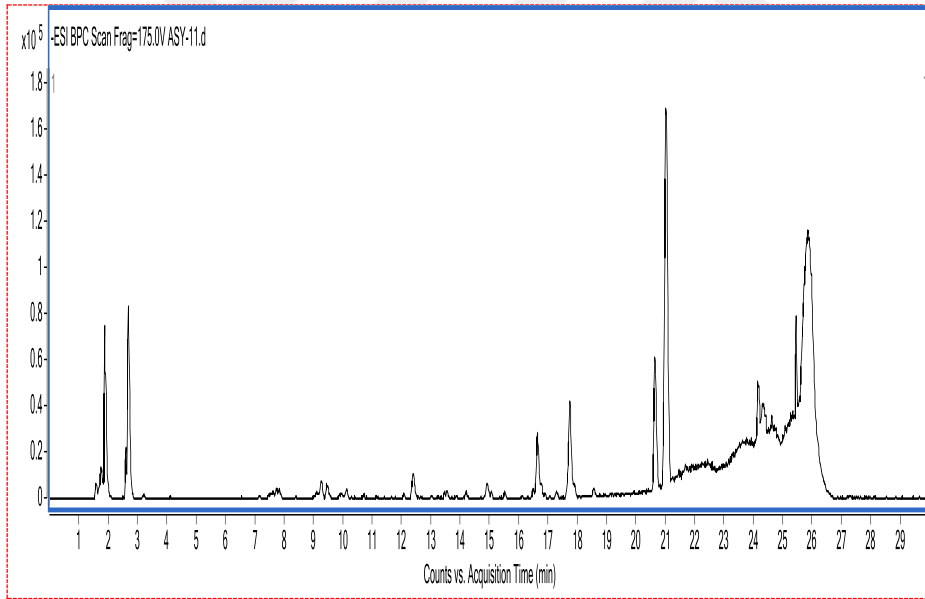


Şekil 4.22 DB – EtOAc ekstresinin fenolik bileşenleri

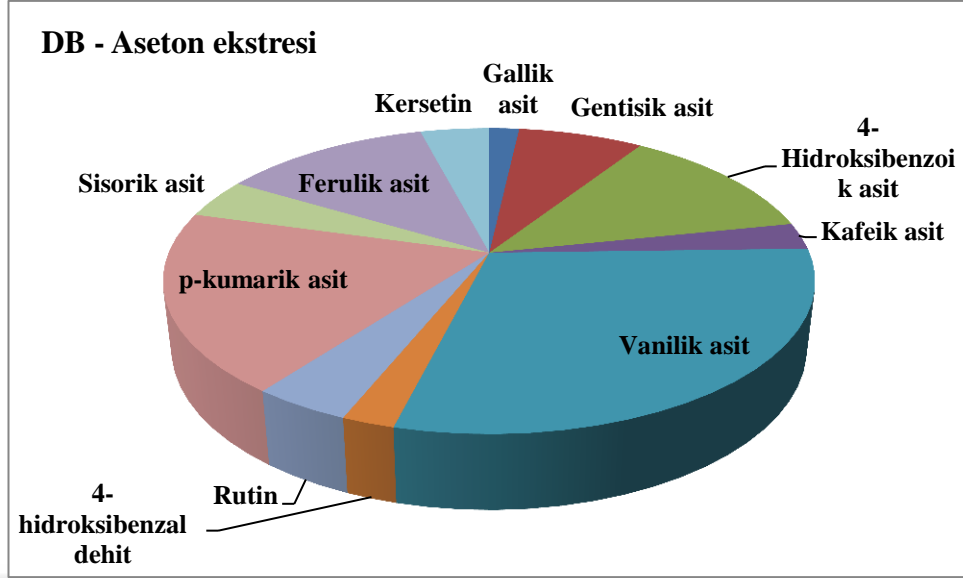
DB EtOAc ekstresinde 9 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak 4-hidroksibenzoik asit(1,41 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve Vanilik asit(1,22 mg fenolik/Kg kuru bitki)belirlendi (Şekil 4.22, 4.23, 4.24).



Şekil 4.23 DB EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

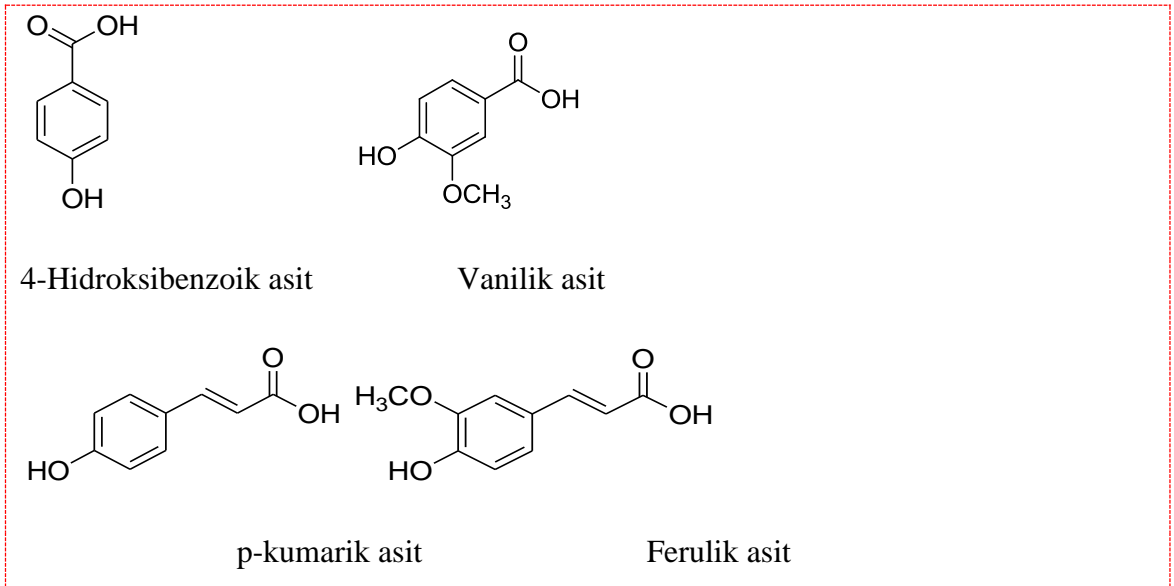


Şekil 4.24 DB EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

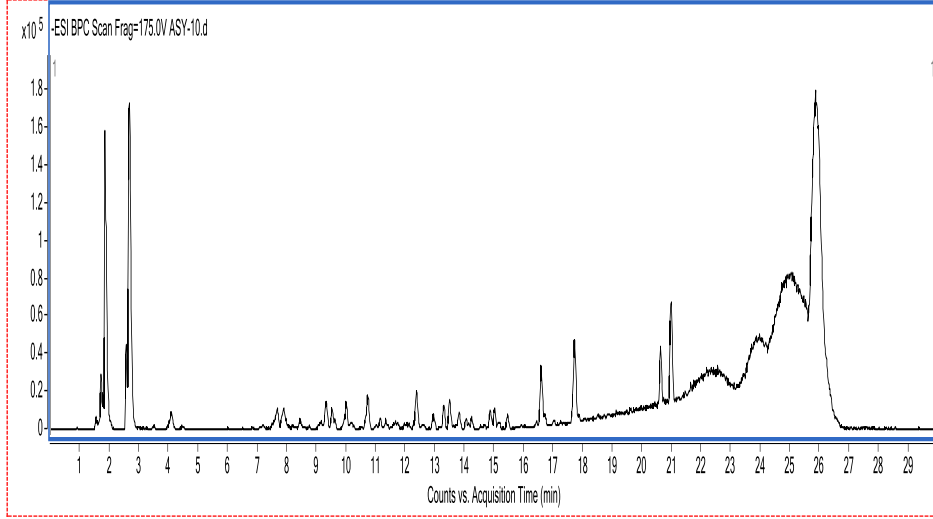


Şekil 4.25 DB Aseton ekstresinin fenolik bileşenleri

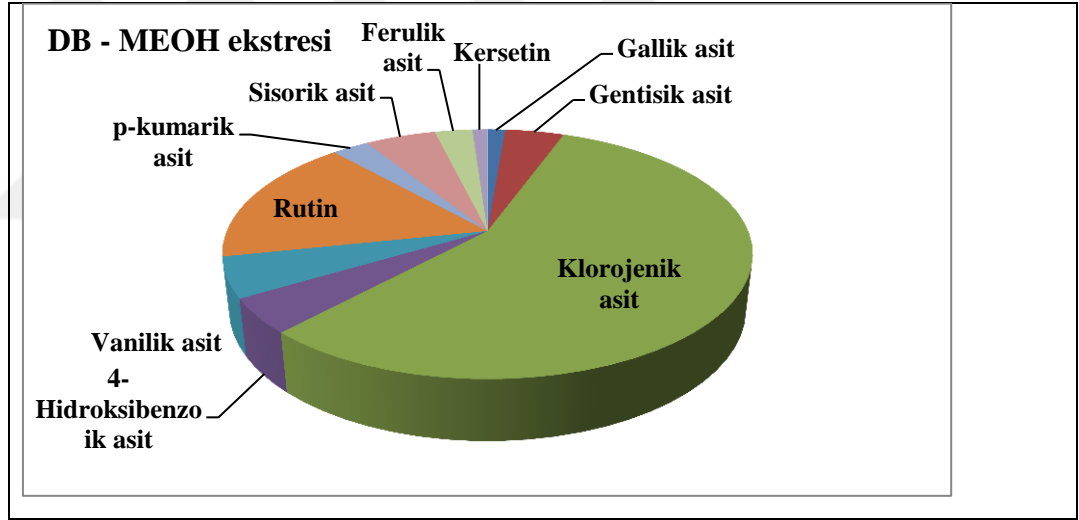
DB Aseton ekstresinde 11 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak vanilik asit (6,21 mg fenolik/Kg kuru bitki), p-kumarik asit (4,03 mg fenolik/Kg kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (2,66 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve ferulik asit (2,61 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.25, 4.26, 4.27).



Şekil 4.26 DB Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

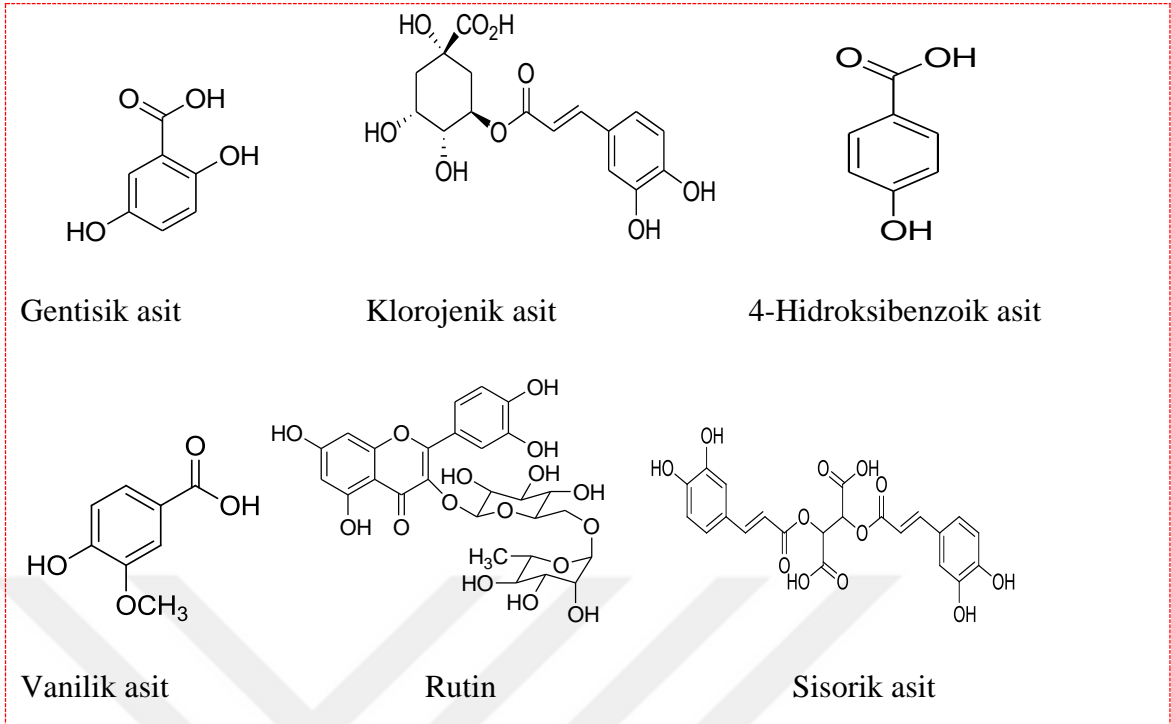


Şekil 4.27 DB Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

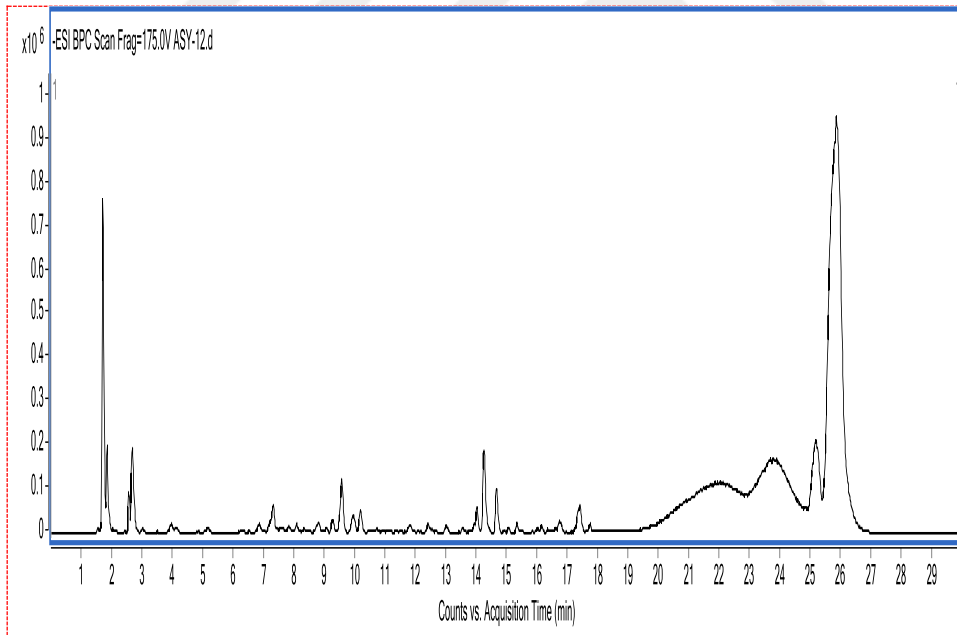


Şekil 4.28 DB MEOH ekstresinin fenolik bileşenleri

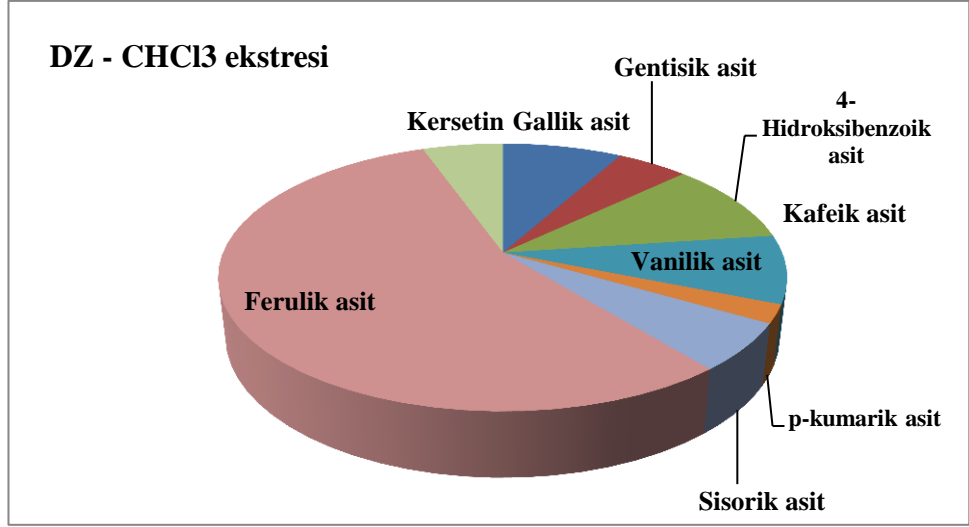
DB MeOH ekstresinde 10 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak klorojenik asit (185,01 mg fenolik/Kg kuru bitki), rutin (54,37 mg fenolik/Kg kuru bitki), vanilik asit (17,11 mg fenolik/Kg kuru bitki), sisorik asit (16,90 mg fenolik/Kg kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (14,77 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve gentsik asit (14,08 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.28, 4.29, 4.30).



Şekil 4.29 DB MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler



Şekil 4.30 DB MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

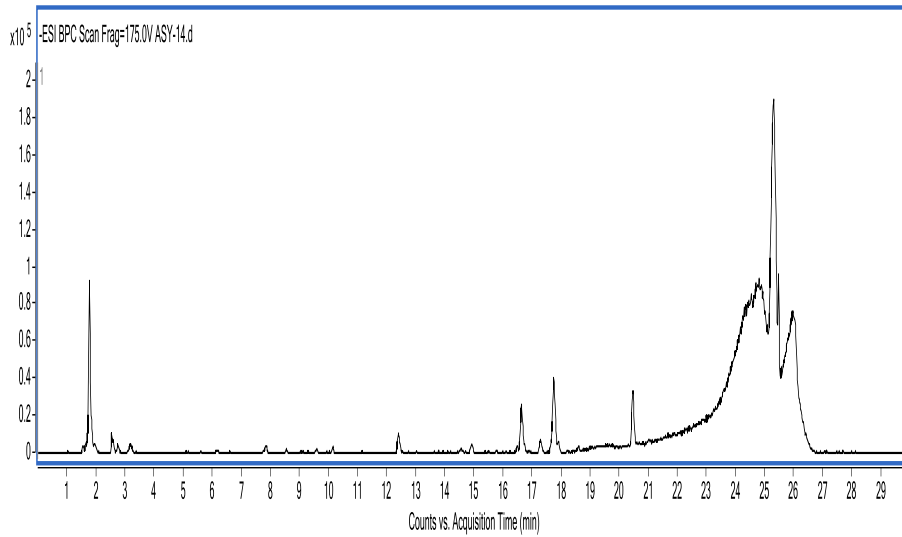


Şekil 4.31 DZ CHCl₃ ekstresinin fenolik bileşenleri

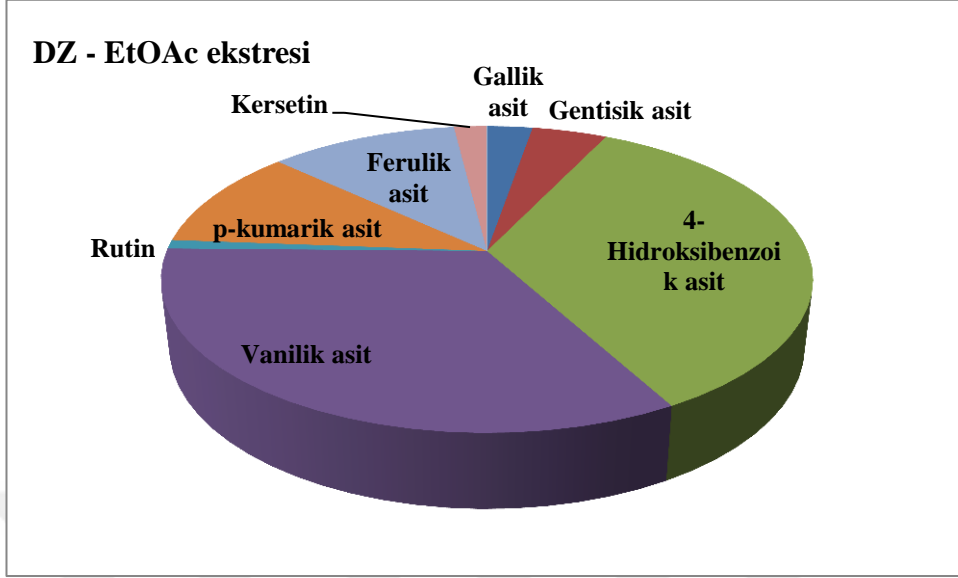
DZ CHCl₃ekstresinde 8 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak ferulik asit(1,82 mg fenolik/Kg kuru bitki)belirlendi (Şekil 4.31, 4.32, 4.33).



Şekil 4.32 DZ CHCl₃ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

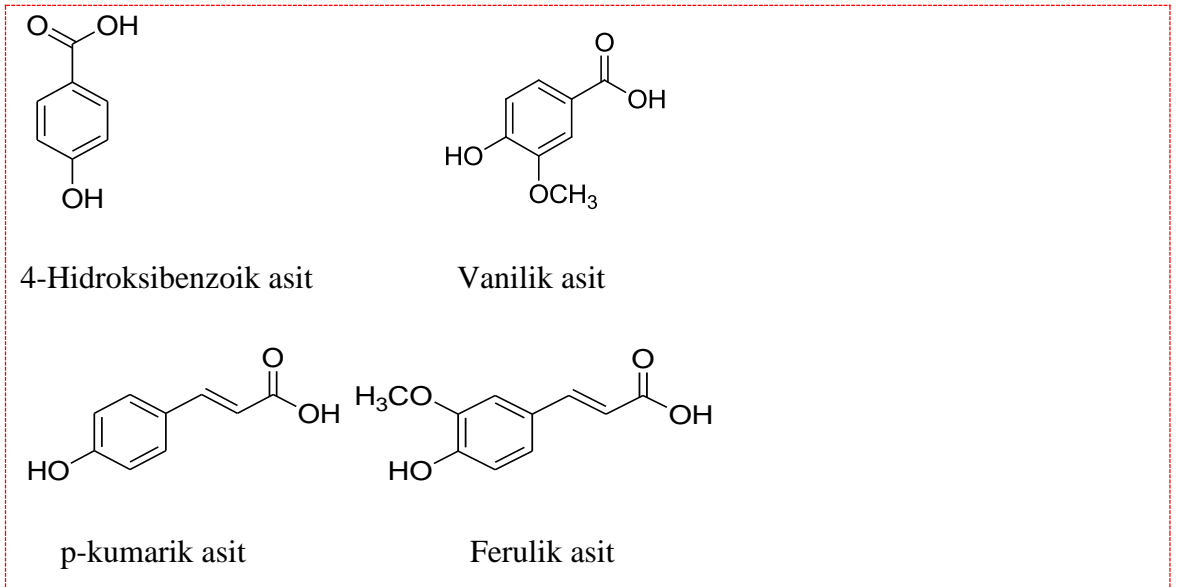


Şekil 4.33 DZ CHCl₃ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

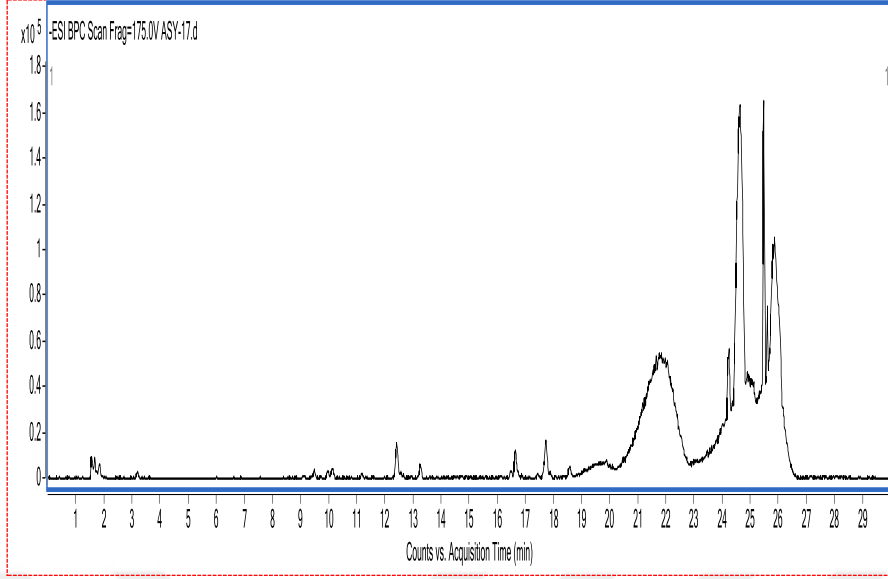


Şekil 4.34 DZ EtOAc ekstresinin fenolik bileşenleri

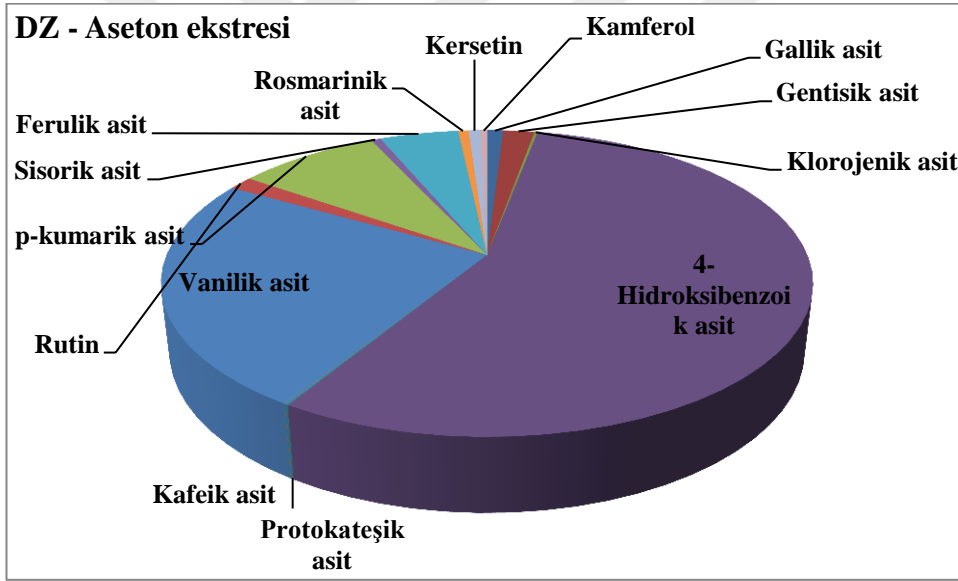
DZ EtOAc ekstresinde 8 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak 4-hidroksibenzoik asit (3,06 mg fenolik/Kg kuru bitki), vanilik asit (2,92 mg fenolik/Kg kuru bitki), ferulik asit (0,98 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve p-kumarik asit (0,93 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.34, 4.35, 4.36).



Şekil 4.35 DZ EtOAc ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

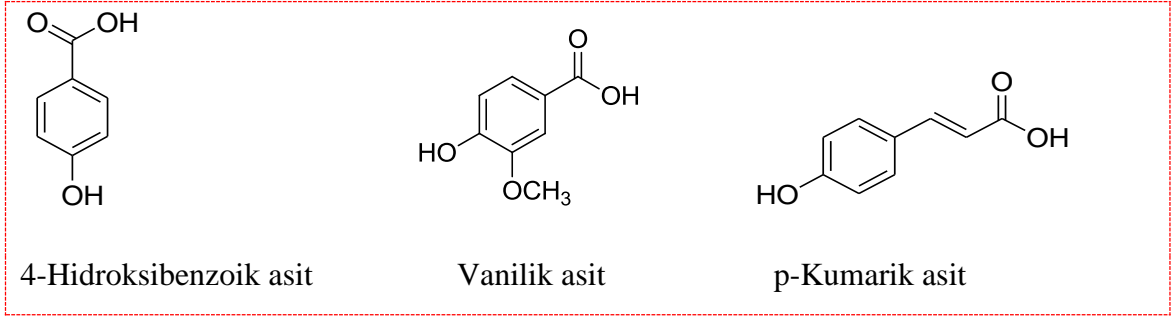


Şekil 4.36 DZ EtOAc ekstrelerinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

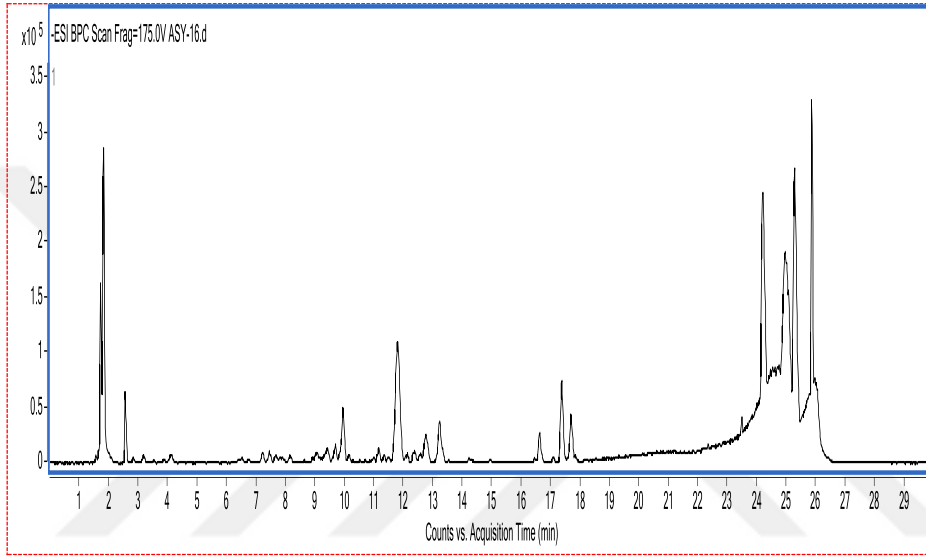


Şekil 4.37 DZ Aseton ekstrelerinin fenolik bileşenleri

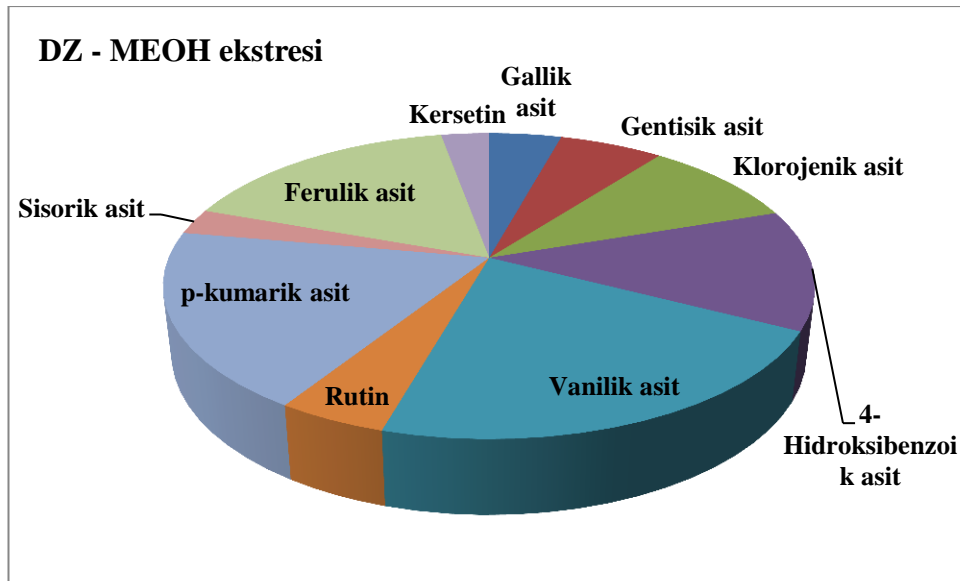
DZ Aseton ekstrelerinde 14 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak 4-hidroksibenzoik asit(11,90 mg fenolik/Kg kuru bitki), vanilik asit(5,19 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve p-kumarik asit(1,79 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.37, 4.38, 4.39).



Şekil 4.38 DZ Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler

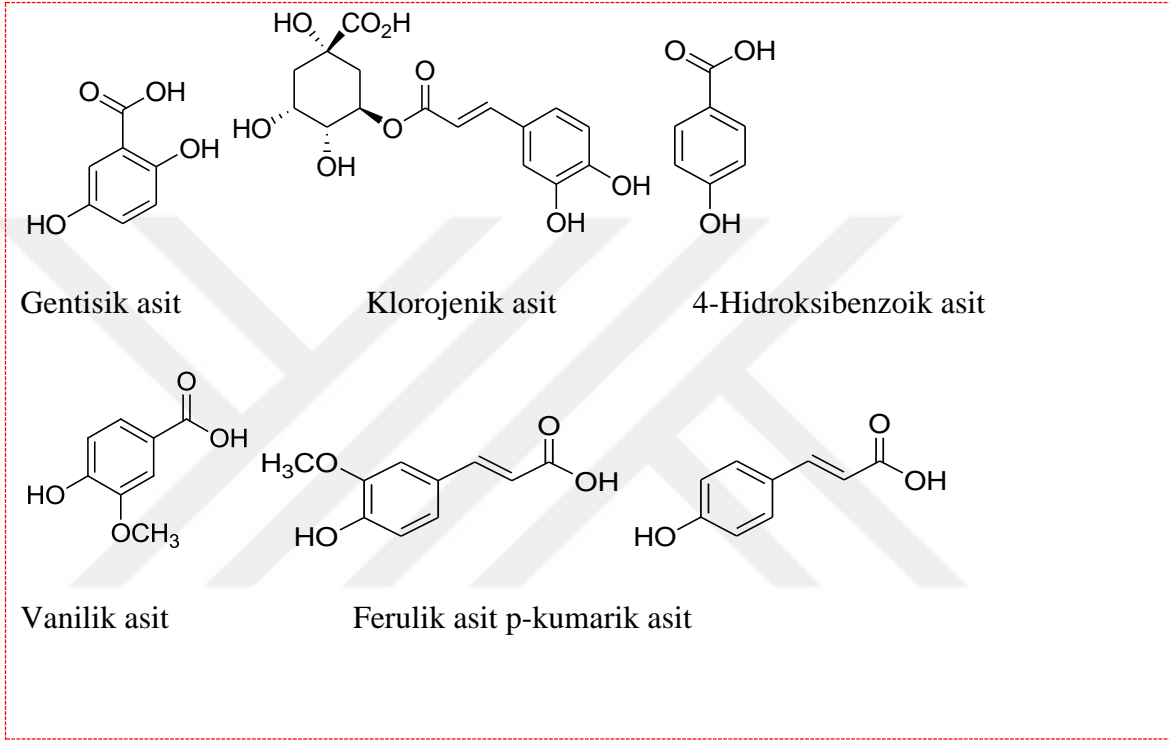


Şekil 4.39 DZ Aseton ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

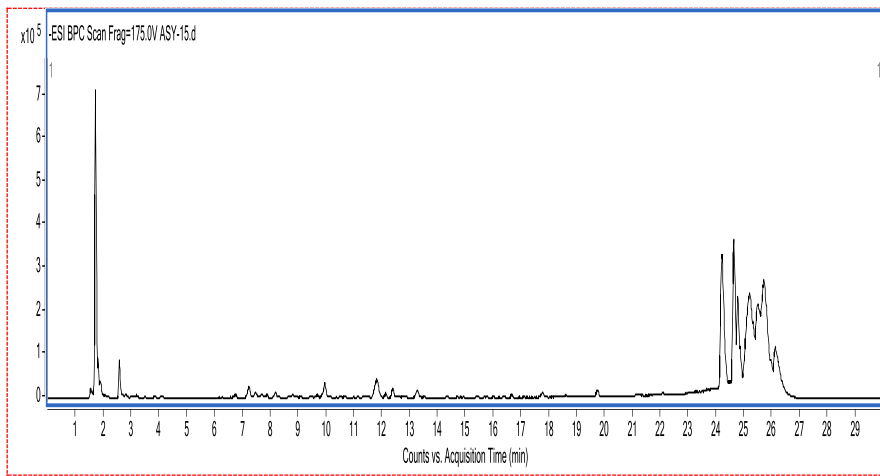


Şekil 4.40 DZ MEOH ekstresinin fenolik bileşenleri

DZ MeOH ekstresinde 10 adet bileşen tespit edildi. Ana bileşen olarak vanilik asit (29,16 mg fenolik/Kg kuru bitki), p-kumarik asit (24,97 mg fenolik/Kg kuru bitki), ferulik asit (22,23 mg fenolik/Kg kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (16,97 mg fenolik/Kg kuru bitki), klorojenik asit (12,52 mg fenolik/Kg kuru bitki) ve gentisik asit (8,20 mg fenolik/Kg kuru bitki), rutin, sisorik asit ve kersetin belirlendi (Şekil 4.40, 4.41, 4.42).



Şekil 4.41 DZ MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS analizinde bulunan ana bileşenler



Şekil 4.42 DZ MeOH ekstresinin HPLC/TOF-MS kromatogramı

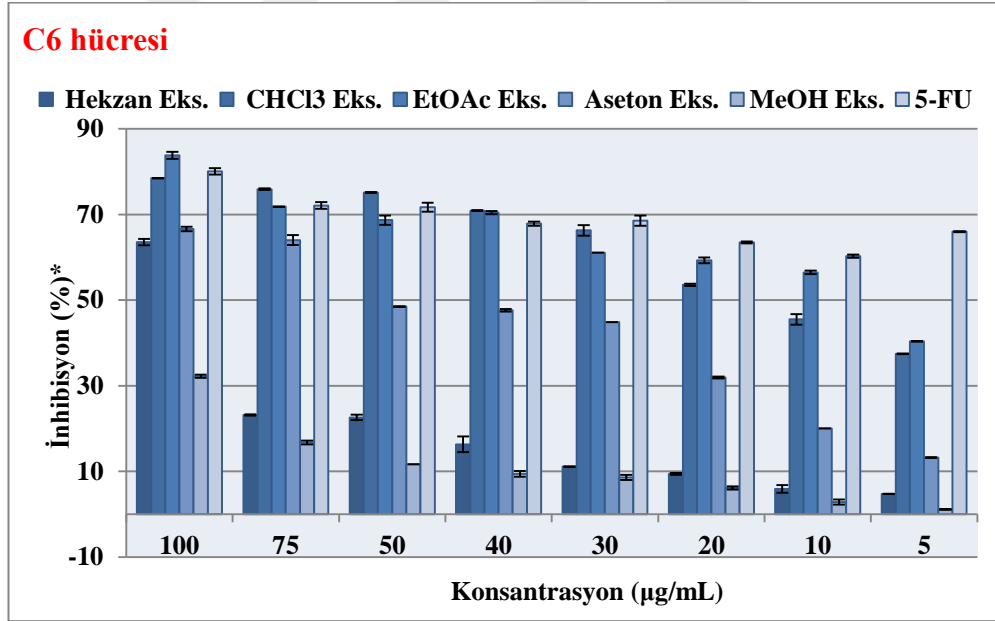
Tablo 4.5 DA, DB ve DZ Ekstrelerinin HPLC/TOF-MS Analiz Sonuçları(mg fenolik/Kg kuru bitki)

Molekül Adı	DA				DB				DZ			
	EtOAc	Aseton	EtOH	CHCl ₃	EtOAc	Aseton	EtOH	CHCl ₃	EtOAc	Aseton	EtOH	CHCl ₃
Gallik asit	-	0,18	4,25	0,33	0,13	0,37	4,23	0,14	0,23	0,20	5,70	0,26
Gentisik asit	0,26	1,03	22,67	3,70	0,30	1,56	14,06	0,29	0,39	0,39	8,20	0,15
Klorojenik asit	-	1,14	336,60	-	-	-	185,01	-	-	0,04	12,52	-
4-hidroksibenzoik asit	1,77	1,81	35,55	0,71	1,41	2,66	14,77	0,93	3,06	11,90	16,97	0,32
Protokateşik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
Kafeik asit	0,03	-	-	-	0,05	0,59	-	-	-	0,004	-	-
Vanilik asit	2,44	2,69	11,25	3,84	1,22	6,21	17,11	0,01	2,92	5,19	29,16	0,27
4-hidroksibenzaldehit	-	-	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-	-
Rutin	0,09	0,33	38,94	0,006	0,13	0,87	54,37	-	0,08	0,30	6,12	-
p-kumarik asit	2,39	2,21	10,08	0,20	0,67	4,03	8,80	-	0,93	1,79	24,97	0,07
Sisorik asit	0,17	0,27	10,22	-	-	0,89	16,90	0,20	-	0,12	3,59	0,18
Ferulik asit	1,78	1,83	13,43	1,10	0,95	2,61	9,00	0,87	0,98	1,00	22,23	1,82
Rosmarinik asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-
Kersetin	0,15	0,65	4,74	0,19	0,19	0,86	3,61	0,11	0,17	0,15	3,80	0,18
Kamferol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,07	-	-

4.4 Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

4.4.1 C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

DA bitkisinden elde edilen hekzan, CHCl₃, EtOAc, aseton ve MeOH ekstraları ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.43). Elde edilen ekstraların C6 hücrelerine karşı IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri Tablo 4.6’da verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstraların doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.43). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücrelerine karşı en yüksek aktivite EtOAc ve CHCl₃ ekstralarında gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: EtOAc ekstrası > 5-FU > CHCl₃ ekstrası > Aseton ekstrası > Hekzan ekstrası > MeOH ekstrası şeklindedir.

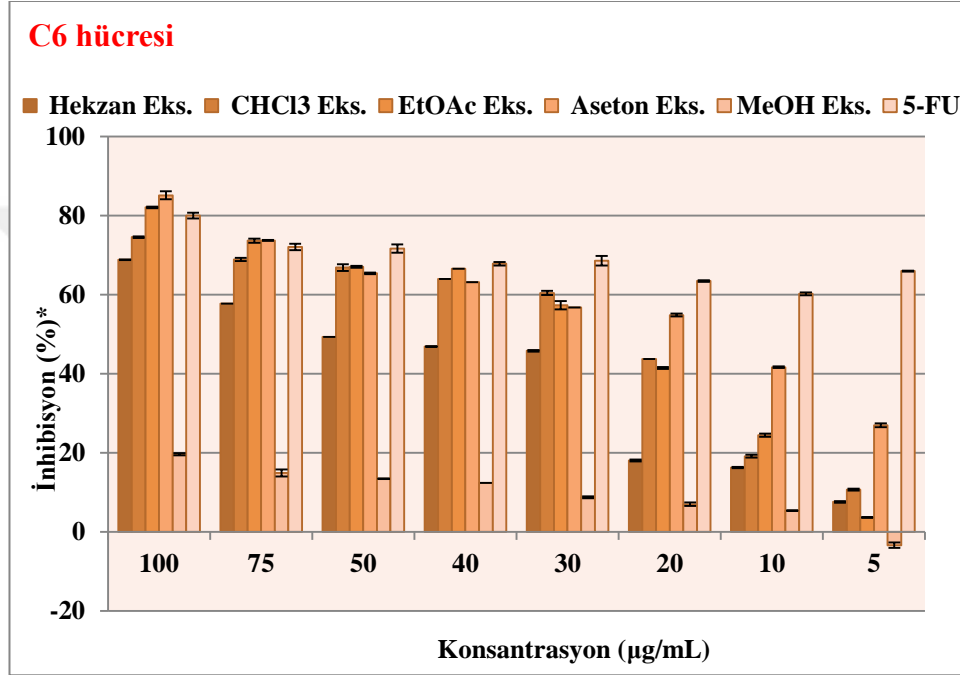


Şekil 4.43 DA ekstralarının C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları

(* testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.)

DB bitkisinden elde edilen hekzan, CHCl₃, EtOAc, aseton ve MeOH ekstraları ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.44). Elde edilen ekstraların C6 hücrelerine karşı IC₅₀ Tablo 4.46’da verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstraların doz artışına bağlı olarak

aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.32). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücresine karşı en yüksek aktivite EtOAc ve aseton ekstraktlarında gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: Aseton ekstresi>EtOAc ekstresi> 5-FU> CHCl₃ ekstresi >Hekzan ekstresi>MeOH ekstresi şeklindedir.

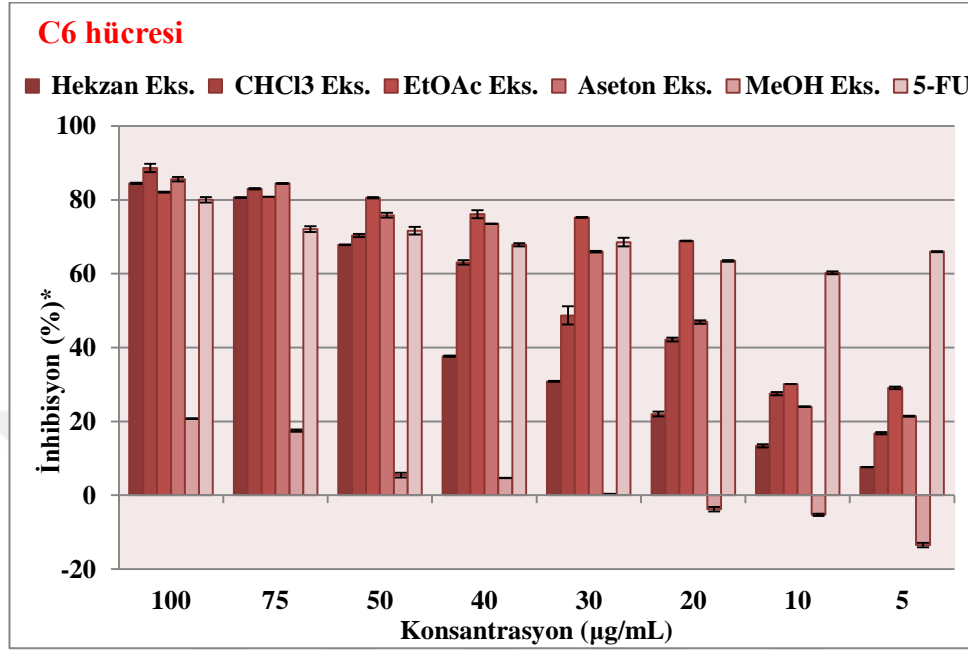


Şekil 4.44 DB ekstraktlarının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları

(* testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.)

DZ bitkisinden elde edilen hekzan, CHCl₃, EtOAc, aseton ve MeOH ekstraktları ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin C6 hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.45). Elde edilen ekstraktların C6 hücresine karşı IC₅₀ Tablo 4.46'da verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstraktların doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.33). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücresine karşı en yüksek aktivite hekzan, CHCl₃, EtOAc ve aseton ekstraktlarında gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: CHCl₃

ekstresi>Aseton ekstresi>Hekzan ekstresi>EtOAc ekstresi>5-FU>MeOH ekstresi
şeklindedir.

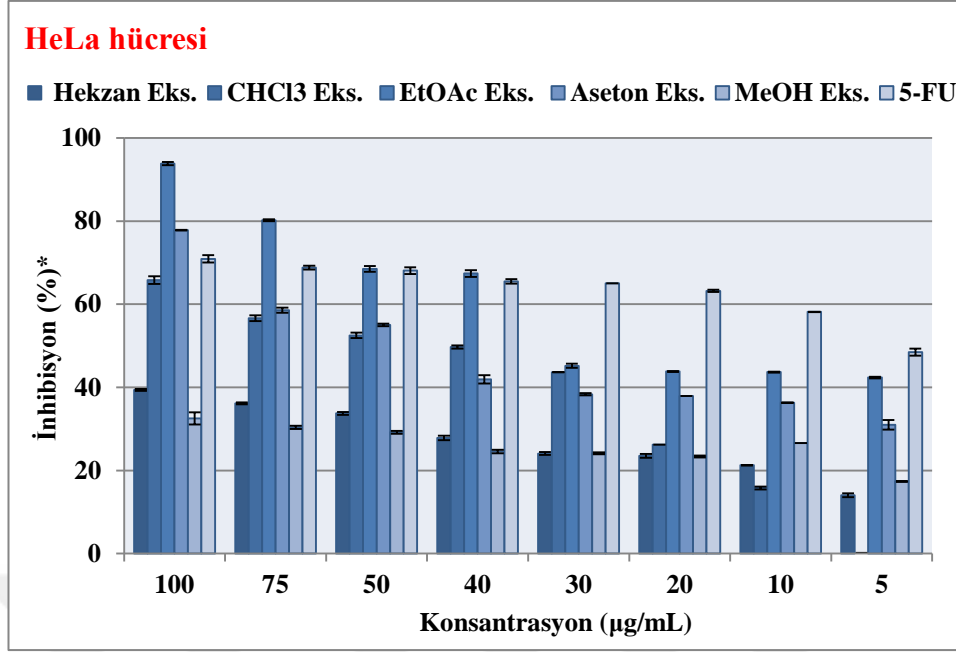


Şekil 4.45 DZ ekstralarının C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları

(* testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.)

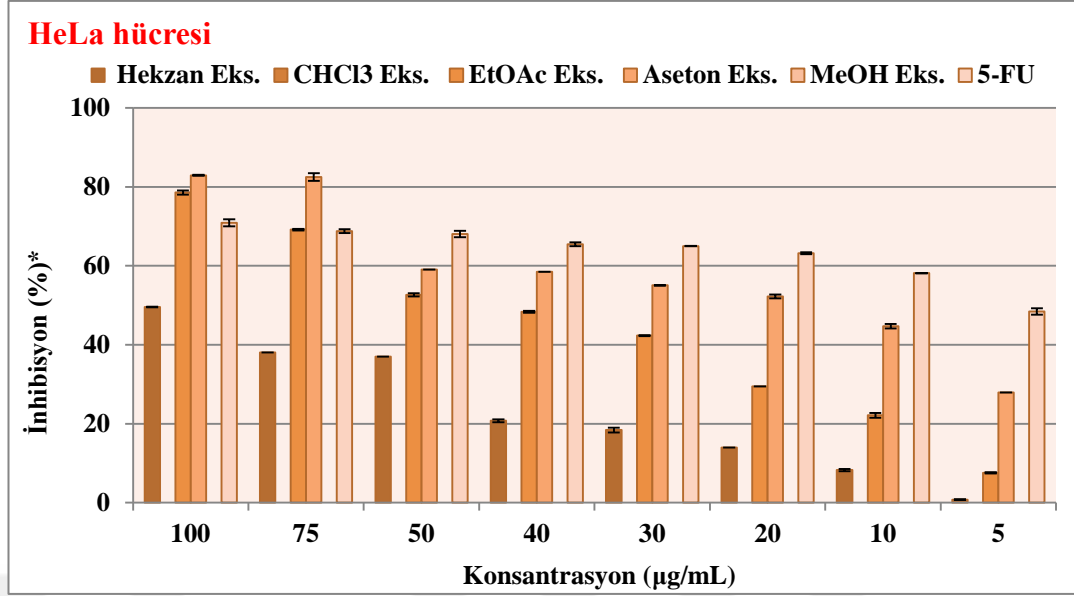
4.4.2 HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları

DA bitkisinden elde edilen hekzan, CHCl₃, EtOAc, Aseton ve MEOH ekstraları ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin HeLa hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.46). Elde edilen ekstraların HeLa hücresine karşı IC₅₀ değerleri Tablo 4.6' da verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstraların doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.1). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde HeLa hücresine karşı en yüksek aktivite EtOAc ve aseton ekstralarında gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: EtOAc ekstresi>Aseton ekstresi>5-FU>CHCl₃ ekstresi>Hekzan ekstresi>MeOH ekstresi şeklindedir.



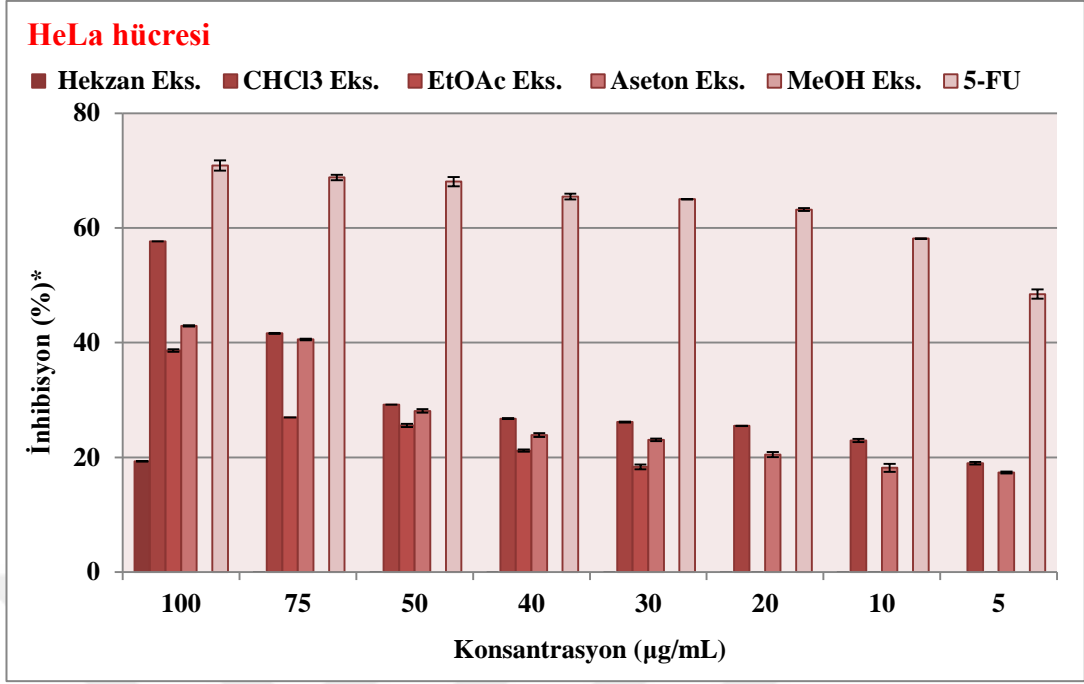
Şekil 4.46 DA ekstrlerinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.)

DB bitkisinden elde edilen hekzan, kloroform (CHCl₃), etil asetat (EtOAc), aseton ve metanol (MeOH) ekstreleri ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin HeLa hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.47). Elde edilen ekstrelerin HeLa hücresine karşı IC₅₀ değerleri Tablo 4.46'da verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.47). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde HeLa hücresine karşı en yüksek aktivite aseton ve EtOAc ekstrelerinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: Aseton ekstrisi > EtOAc ekstrisi > 5-FU > Hekzan ekstrisi > CHCl₃ ekstrisi ~ MeOH ekstrisi şeklindedir.



Şekil 4.47 DB ekstrlerinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.)

DZ bitkisinden elde edilen hekzan, CHCl₃, EtOAc, aseton ve MeOH ekstrleri ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin HeLa hücresine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.48). Elde edilen ekstrlerin HeLa hücresine karşı IC₅₀ değerleri Tablo 4.46’da verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstrlerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.48). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde HeLa hücresine karşı en yüksek aktivite CHCl₃ ekstresinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: 5-FU > CHCl₃ ekstresi > Aseton ekstresi > EtOAc ekstresi > Hekzan ekstresi > MeOH ekstresi şeklindedir.



Şekil 4.48 DZ ekstralarının HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları (* testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.)

Tablo 4.6 DA, DB ve DZ ekstralarının HeLa ve C6 hücresine karşı IC₅₀ değerleri

Ekstre adı	DA		DB		DZ	
	HeLa	C6	HeLa	C6	HeLa	C6
Hekzan	9.41	64.11	44.19	34.16	89.36	40.33
CHCl₃	31.65	*	**	18.75	35.05	26.91
EtOAc	17.76	*	34.84	25.89	48.35	*
Aseton	23.49	25.24	10.06	10.52	23.01	16.67
MeOH	*	58.50	**	41.49	**	61.94

* < 5 µg/ mL; ** belirlenemedi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerden yararlanılarak günümüzde pek çok bilimsel çalışma sürdürülmektedir. Özellikle de sağlık alanında yürütülen bu çalışmalar, literatürü konu olmuştur.

Bu çalışma C6 (Sıçan Beyin Tümörü) ve HeLa (İnsan Rahim Kanseri) kanser hücrelerinde DA, DB ve DZ'nin Hekzan, Kloroform, Etil Asetat, Aseton ve Metanol ekstralarının fitokimyasal analizleri, antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılarak antikanser özelliklerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Tez çalışması kapsamında DA, DB ve DZ bitkileri ile yapılan çalışmalar Şekil 5.1. de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. En yüksek aktivite gösteren ekstraların (Tablo 5.1) C6 hücresine karşı sitotoksik aktiviteleri belirlendi (Tablo 5.2).

Tablo 5.1. DA, DB ve DZ ekstralarının antiproliferatif aktiviteleri (100 µg/mL konsantrasyonda)

Ekstre Adı	DA		DB		DZ	
	HeLa	C6	HeLa	C6	HeLa	C6
Hekzan	39,38	63,55	49,58	68,85	19,30	84,49
CHCl ₃	65,76	78,47	*	74,56	57,65	88,67
EtOAc	93,84	83,81	78,59	82,11	38,65	82,10
Aseton	77,83	66,59	82,95	85,14	42,92	85,65
MeOH	32,53	32,24	*	19,65	*	20,74
5-FU	70,91	80,05	70,91	80,05	70,91	80,05

*< proliferatif etki gösteriyor.

Tez çalışması kapsamında yapılan çalışma sonucunda elde edilen bilgilere göre;

1. DA Hekzan ekstresi 422,7 mg (% 0,7973) ; CHCl₃ ekstresi 333,2 mg (% 0,6285); Aseton ekstresi 273 mg (% 0,5149); EtOAc ekstresi 269 mg (0,5074) ve MeOH ekstresi 6201,8 mg (% 11,6993) olarak elde edildi. **En yüksek verimin MeOH ekstresinde** (% 11,6993) olduğu gözlemlendi (Tablo 4.1).

2. DB Hekzan ekstresi 216,4 mg (% 0,4197) ; CHCl₃ ekstresi 207,8 mg (% 0,4031); Aseton ekstresi 513,5 mg (% 0,9961); EtOAc ekstresi 159,5 mg (0,3094) ve MeOHekstresi 3613,8 mg (% 7,0102) olarak elde edildi. **En yüksek verimin MeOH ekstresinde** (% 7,0102) olduğu gözlemlendi (Tablo 4.2).
3. DZ hekzan ekstresi 306,3 mg (% 0,5779) ; CHCl₃ ekstresi 320 mg (% 0,6037); Aseton ekstresi 204,9 mg (%0,3866); EtOAc ekstresi 290,3 mg (0,5477) ve MeOH 5201,9 mg (% 8,8149) olarak elde edildi. **En yüksek verimin MeOH ekstresinde** (% 8,8149) olduğu gözlemlendi (Tablo 4.3).
4. DA Hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 4 adet doymuş yağ asidi, 1 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 7 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 12 adet bileşen belirlenmiştir (Tablo 4.4). DA Hekzan ekstresinde ana bileşen olarak **Heptakosan** (% 30,30), **Hentriakontan** (% 26.65),**Nonakosan** (% 18,55) ve **Palmitik asit** (% 6,89)belirlenmiştir (Şekil 4.4).
- ✓ DB Hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 6 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi ve 18 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 25 adet bileşen belirlenmiştir (Tablo 4.4). DB Hekzan ekstresinde ana bileşen olarak **Heptakosan** (% 45,97),**Palmitik asit** (% 10,46), **Oleik asit** (% 6,37), **Pentadekanoik asit 14-metil, metil esteri** (% 8,5), belirlenmiştir (Şekil 4.5).
- ✓ DZ Hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 2 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi, 2 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 1 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 6 adet bileşen belirlenmiştir (Tablo 4.4). DZ Hekzan ekstresinde ana bileşen olarak **Palmitik asit** (% 35,02), Heptakosan (% 24,91), **Linolenik asit** (% 15,06), **Oleik asit** (% 12,85), **Linoleik asit** (% 9,24), belirlenmiştir (Şekil 4.6).
5. DAEtOAc, Aseton, MeOH ve CHCl₃ ekstralarında Tablo 4.4'te belirtilen 25 fenolik bileşenin kantitatif tayini gerçekleştirildi. Buna göre; **DA EtOAc ve**

Aseton ekstresinde; ana bileşen olarak, Vanilik asit, p-kumarik asit, Ferulik Asit ve 4-hidroksibenzoik asit belirlendi. **DA MeOH ekstresinde;** ana bileşen olarak Klorojenik asit, Rutin, 4-hidroksibenzoik asit (4-HBA), Gentisik asit, Ferulik Asit, Vanilik asit, Sisorik asit ve p-kumarik asit (10,08 mg fenolik/Kg kuru bitki) belirlendi. **DA CHCl₃ ekstresinde;** ana bileşen olarak Vanilik asit, Gentisik asit ve Ferulik asit belirlendi.

DB EtOAc ekstresinde; ana bileşen olarak 4-hidroksi-benzoik asit ve Vanilik asit belirlendi. **DB Aseton ekstresinde;** ana bileşen olarak Vanilik asit, p-kumarik asit, 4-hidroksibenzoik asit ve Ferulik Asit belirlendi. **DB MeOH ekstresinde;** ana bileşen olarak Klorojenik asit, Rutin, Vanilik asit, Sisorik asit, 4-hidroksibenzoik asit ve Gentisik asit belirlendi. **DB CHCl₃ ekstresinde;** ana bileşen olarak 4-hidroksi-benzoik asit ve Ferulik asit belirlendi. **DZ EtOAc ekstresinde;** ana bileşen olarak 4-hidroksibenzoik asit, Vanilik asit, Ferulik asit ve p-kumarik asit belirlendi. **DZ Aseton ekstresinde;** ana bileşen olarak 4-hidroksibenzoik asit, Vanilik asit ve p-kumarik asit belirlendi. **DZ MeOH ekstresinde;** ana bileşen olarak Vanilik asit, p-kumarik asit, Ferulik asit, 4-hidroksibenzoik asit, Klorojenik asit ve Gentisik asit, Rutin, Sisorik asit ve Kersetin belirlendi. **DZ CHCl₃ ekstresinde;** ana bileşen olarak Ferulik asit belirlendi.

6. DA, DB, DZhekzan, CHCl₃, EtOAc, aseton ve MeOH ekstreleri ve standart olarak kullanılan 5-FU nun C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. **DA ekstrelerinde;** en yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücrelerine karşı en yüksek aktivite EtOAc ve CHCl₃ ekstrelerinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: **EtOAc ekstresi > 5-FU > CHCl₃ ekstresi > Aseton ekstresi > Hekzan ekstresi > MeOH ekstresi** şeklindedir.

✓ **DB ekstrelerinde;** en yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücrelerine karşı en yüksek aktivite EtOAc ve aseton ekstrelerinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: **Aseton ekstresi > EtOAc ekstresi > 5-FU > CHCl₃ ekstresi > Hekzan ekstresi > MeOH ekstresi** şeklindedir.

- ✓ **DZ ekstrelerinde;** en yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde **C6 hücrelerine karşı** en yüksek aktivite CHCl₃, Aseton, Hekzan ve EtOAc ekstrelerinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: **CHCl₃ ekstresi > Aseton ekstresi> Hekzan ekstresi> EtOAc ekstresi> 5-FU>MeOHekstresi** şeklindedir.
 - ✓ DA, DB ve DZ bitkisinden elde edilen hekzan, CHCl₃, EtOAc, aseton ve MeOH ekstreleri ve 5-FU nin HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi. **DA ekstrelerinde;** en yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde **HeLa hücrelerine karşı** en yüksek aktivite EtOAc ve aseton ekstrelerinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: **EtOAc ekstresi> Aseton ekstresi> 5-FU> CHCl₃ ekstresi > Hekzan ekstresi>MeOHekstresi** şeklindedir.
 - ✓ DB ekstrelerinin en yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde **HeLa hücrelerine karşı** en yüksek aktivite aseton ve EtOAc ekstrelerinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: **Aseton ekstresi> EtOAc ekstresi> 5-FU> Hekzan ekstresi> CHCl₃ ekstresi ~ MeOHekstresi** şeklindedir.
 - ✓ DZ ekstrelerinin en yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde HeLa hücrelerine karşı en yüksek aktivite CHCl₃ ekstresinde gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: **5-FU> CHCl₃ ekstresi > Aseton ekstresi> EtOAc ekstresi> Hekzan ekstresi>MeOH ekstresi** şeklindedir.
7. DA, DB ve DZ ekstrelerinden en yüksek aktivite gösteren ekstrelerin C6 hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri belirlendi (Tablo 5.2)

Tablo 5.2 DA, DB ve DZ ekstralarının sitotoksik aktivite sonuçları

Örnek Adı	% Toksikite
DA CHCl ₃	31,30
DA EtOAc	8,84
DB CHCl ₃	31,20
DB EtOAc	24,70
DB Aseton	11,50
DZ Hekzan	20,50
DZ CHCl ₃	11,10
DZ EtOAc	53,00
DZ Aseton	31,20
5-FU	38,30

DZ EtOAc ekstresi hariç diğer tüm ekstralar 5-FU'dandaha düşük toksisiteye sahip oldukları gözlemlendi. Ekstrelerdeki ana bileşenlerin literatürdeki önemleri ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda belirtildi.

Nagata et al., yapmış oldukları bir hücre ölümü deneyinde, palmitik asit dozları 50 ve 1000 µM, da U266 hücre canlılığı doza bağlı olarak azaltıldığını tespit etmişlerdir. DA DA, DB ve DZ hekzan ekstralarında, palmitik asit ana bileşenlerden biri olarak belirlenmiştir. Apoptotik hücre yüzdesi palmitik asit ile muameleden 24 saat sonra yükselmiştir. Bunun aksine, palmitik asit, normal periferik kan mononükleer hücre (PBMC) canlılığı üzerinde herhangi bir etki yapmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları, palmitik asit, özellikle multipl miyelom (MM) hücrelere saldıran yeni terapötik maddeler için bir potansiyel aday olduğunu göstermiştir (Nagata et al., 2015).

DB ve DZ hekzan ekstralarında, oleik asit ana bileşenlerden biri olarak tespit edilmiştir. Carrillo et al., n-6 çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) bakımından yüksek bir alımı, tümör arttırıcı etkiye sahip olduğunu, n-3 PUFA yağ asitlerinin ise inhibe edici etkilere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda geniş bir yelpazede zeytinyağı ve oleik asitin meme kanseri üzerine potansiyel koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (Chajes et al., 2008; Escrich et al., 2008; Martín-Moreno et al., 1994). Martínez et al., yapmış oldukları bir çalışmada insan adenokarsinoma hücrelerinde oleik asit, hiçbir belirgin toksik göstermediğini tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak, oleik asit ile muamele neticesinde hem hayvan modellerinde ve hem de kültür hücrelerinde kanserlerin büyümesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Martínez et al., 2005). Mono doymamış yağ asitleri (MUFA) etkisi ile ilgili olarak, bazı araştırmacılar, reaktif oksijen

türleri (ROS) üretiminin oleik asit ve diğer doymamış yağlı asitleri ile YAC-1 tümör hücresinin (YAC-1 yeni doğan bir A / Sn fareye Moloney Lösemi virüsü (MLV) aşılması ile elde edilen bir T hücre lenfomasıdır.) inkübasyondan sonra arttığı bildirilmiştir (Puertollano et al., 2003).

DA CHCl_3 , EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında; DB EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında ve DZEtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında vanilik asit ana bileşenlerden biri olarak belirlendi. Çeşitli bitkilerde ve meyvelerde bulunan ve bir fenolik türev olan Vanilik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), etkileyici derecede farmakolojik profil görüldü. Deneysel çalışmalarda, Vanilik asitin kalp-damar sistemi (StanelyMainzenPrince et al., 2011), sindirim sistemi (Kim et al., 2010) ve karaciğer hastalıkları (Itoh et al., 2009) üzerine olan etkinliğini incelendi. Ayrıca, vanilik asitin inflamatuvar süreç üzerine olan faydalı aktivitesi de olduğu belirlendi (Leal et al., 2011). Ek olarak, Kim et al., tarafından yapılan bir çalışmada Vanilik asitin Tümör Nekros Faktör (TNF)- α , interlökin(IL)-6, siklooksijenaz-2 ve Nitrik oksit(NO)(inflamasyon süreci boyunca artan düzenleyiciler) sentezini durdurduğu ya da salınımını yavaşlattığı tespit edildi(Kim et al., 2010). Angeles Yrbas et al., yapmış oldukları bir çalışmada, vanilik asitin ağrılı hastalıklar için potansiyel bir terapötik seçenek olabileceğini, hareketin periferik ve merkezi antinosiseptif (ağrıya karşı artan tolerans) mekanizması Vanilik asit sayesinde azaltılacağını tespit etmişlerdir (Angeles Yrbas et al., 2015).

DA CHCl_3 (sadece ferulik asit), EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında; DB Aseton ve CHCl_3 (sadece ferulik asit) ekstralarında ve DZ aseton (sadece p-kumarik asit), CHCl_3 (sadece ferulik asit), EtOAc ve MeOH ekstralarında ferulik asit ve p-kumarik asit ana bileşenlerden biri olarak belirlendi. Bouzaiene et al., yapmış oldukları bir çalışma da kafeik, kumarik ve ferulik asitin, süperoksit anyon üretimi, insan akciğer (A549) ve kolon adeno karsinom (HT29-D4) kanser hücre hatlarında adezyonu ve migrasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu fenolik asitlerin, her iki kanser hücresinin proliferasyonunu inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Yine bu çalışma da, kafeik, kumarik ve ferulik asitler, önemli ölçüde A549 ve HT29-D4 hücrelerinde süperoksit üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Bouzaiene et al., 2015). Ayrıca, A549 ve HT29-D4 hücre adezyonu ferulik asitin yüksek test konsantrasyonunda(200 mM) sırasıyla, % 77.9 ve %

79.8 oranında azalttığı gözlenmiştir (Bouzaiene et al., 2015). Fahrioğlu ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışma da, ferulik asitin kültüre edilmiş MIA PaCa-2 insan pankreas kanseri hücresi üzerine canlılık, koloni oluşturma, migrasyon/invazyon etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları incelemeler sonucu ferulik asitin, MIA PaCa-2 hücrelerinin invazyon, apoptik ve koloni oluşumu davranışının hücre döngüsünü etkileyerek bir anti-kanser ajan olarak davrandığı öne sürmektedirler.

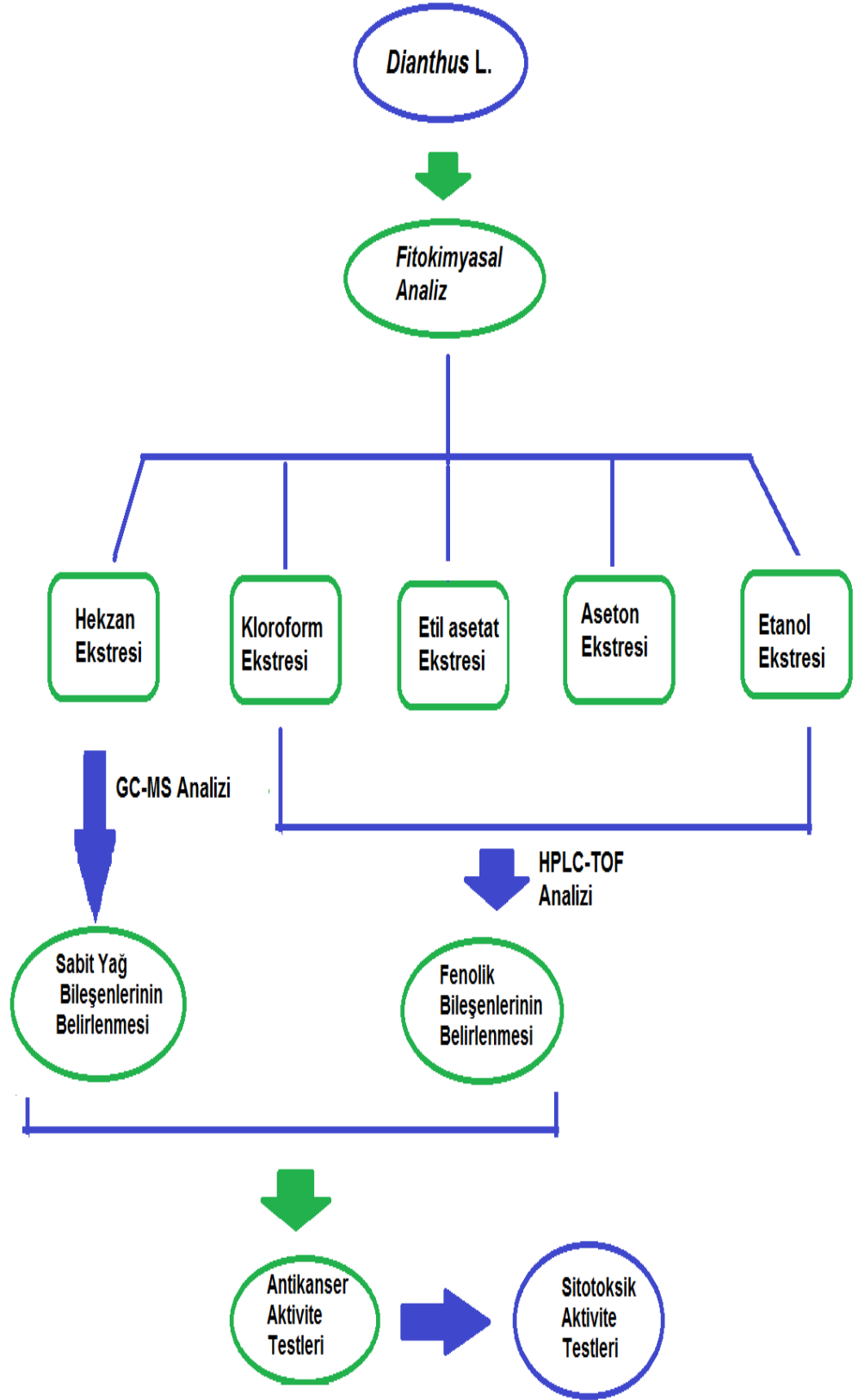
DA, DB ve DZ MeOH ekstralarında; klorojenik asit ana bileşenlerden biri olarak belirlendi. Literatürde, klorojenik asit antibakteriyel ve antiviral aktiveye sahip olduğu belirtilmektedir (Lou et al., 2011). Klorojenik asit, hepatoselüler karsinoma (HCC) için kemoterapi ajanı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda serbest radikallerin engellenmesi yoluyla kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eden bir anti-kanser gibi çalışmaktadır (Sukohar et al., 2013). Klorojenik asit, antibakteriyel, antifilojistik, antimutajenik, antioksidan ve diğer birçok biyolojik aktiviteleri sahip olduğu literatürde belirtilmektedir (Kono et al., 1997; Li et al., 2005; Bouayed et al., 2007; Li et al., 2009; Wang et al., 2009).

DA EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında DB CHCl₃, EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında ve DZ EtOAc, Aseton ve MeOH ekstralarında 4-HBA ana bileşenlerden biri olarak belirlendi. Hong yapmış olduğu bir çalışmada, Bu çalışmada iki farklı fenolik asit olan gallik asit ve 4-hidroksibenzoik asit ile pamuklu kumaş muamele etmiş ve mekanik özellikler, anti-bakteriyel ve antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, fenolik asitlerin, pamuklu kumaşların, renk, dokunma ve çekme mukavemeti üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını tespit etmişlerdir. Ancak, her iki gallik asit ve 4-hidroksi benzoik asit ile muamele edilen pamuklu kumaşlar *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumonia* karşı yüksek antibakteriyel yeteneğini gösterdiği bulunmuştur. Ancak, sadece gallik asit ile muamele edilen pamuklu kumaşlar makul oranda antioksidan aktivite gözlenmiştir (Hong, 2014).

Sonuç olarak, endemik *Dianthus ancyrensis* Hausskn. & Bornm., *Dianthus balansea* Boiss., *Dianthus zederbaueri* Vierh. Türlerinin C6 ve HeLa hücrelerine doza bağlı olarak antiproliferatif aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Ayrıca DA, DB ve DZ (HeLa

hariç) EtOAc ve aseton ekstralarında her iki hücre türü içinde dikkate değer oranda antiproliferatif aktivite tespit edilmiştir. Elde edilen antiproliferatif aktivite sonuçları fitokimyasal analiz sonuçları ile desteklenmiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışması tezde adı geçen *Dianthus* sp. türlerinin daha ileri fitokimyasal analizleri için öncü bir çalışma niteliği taşımaktadır.





Şekil 5.1 Çalışmanın Özeti

KAYNAKLAR

- Angeles Yrbas , M Morucci, F., Alonso, R., Gorzalczany, S., 2015. Pharmacological mechanism underlying the antinociceptive activity of vanillic acid. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 132, 88–95.
- Anonim 1998. WHO, Medicinal plants in the Republic of Korea, World Health Organization, Regional Office for Western Pacific, Manila, Philippines, 1998.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. 2007. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci* 262(1–2),77–84.
- Bouzaïene, N. N., Jaziri, S. K., Kovacic, H, Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J., 2015. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*, 766, 99–105.
- Casiglia, S., Bruno, M., Senatore, F. (2014). Volatile constituents of *Dianthus rupicola* Biv. from Sicily: activity against microorganisms affecting cellulosic objects, *Natural Product Research*, 28 (20), 1739-1746.
- Chajes V, Thiebaut AC, Rotival M, Gauthier E, Maillard V, Boutron-Ruault MC et al. Association between serum transmonounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3NEPIC Study. *Am J Epidemiol* 2008; 167 (11): 1312-20.
- Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., Tagliatalata-Scafati, O., 2001. Kaempferide triglycoside: a possible factor of resistance of carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Phytochemistry*, 56 (7), 717-721.
- Curir, P; Dolci, M; Dolci, P; et al. 2003. Fungitoxic phenols from carnation (*Dianthus caryophyllus*) effective against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Phytochemical Analysis*, 14(1), 8-12.
- Dahiya, R., 2008. Synthesis and biological activity of a cyclic hexapeptide from *Dianthus superbus*, *Chemical Papers*, 62 (5), 527-535.
- Demirtas, I., Sahin, A., 2013. Bioactive volatile content of the stem and root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. *carduiformis* var. *carduiformis*. *E-J.Chem.* 2013, 1–6.
- Ding, C., Zhang, W., Li, J., et al. 2013. *Cytotoxic constituents of ethyl acetate fraction from Dianthus superbus*. *Natural Product Research*, 27(18), 1691-1694.
- Durucasu, I., Mutlu, K., Şik, L., et., 2009. Apolar Constituents Of Some Biologically Active *Dianthus* Species From Western Anatolia, *Chemistry Of Natural Compounds*, 45(6), 782-785.
- Escrich E, Solanas M, Moral R, Grau L, Costa I, Vela EE, R. Dietary lipids and breast cancer: Scientific clinical, anatomopathological and molecular evidences. *Revista Española de Obesidad* 2008; 6(3), 129-38.
- Fahrioğlu, U., Dodurga, Y., Elmas, L., Seçme, M., 2016. Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells *in vitro*. *Gene* 576, 476–482.
- Hong, K.H., 2014. Preparation and properties of multifunctional cotton fabrics treated by phenolic acids. *Cellulose*, 21, 2111–2117.
- Hsu, H. Y., Chen, Y. P., Shen, C. S., Hsu, C. C., Chang, H. C. 1986. *Oriental Materia Medica*, Oriental Healing Arts Institute, Long Beach, Calif, USA.

- Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Kobayashi M, Tamesada M, et al. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol Pharm Bull* 2009;32,1215–9.
- Kim MC, Kim SJ, Kim DS, Jeon YD, Park SJ, Lee HS, et al. Vanillic acid inhibits inflammatory mediators by suppressing NF- κ B in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010;33:525–32.
- Kim, S. Y., Kim, J. H., Kim, S. K., Oh, M. J., Jung, M. Y. 1994. Antioxidant activities of selected oriental herb extracts, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 71, no. 6, pp. 633–640.
- Kono Y, Kobayashi K, Tagawa S, Adachi K, Ueda A, Sawa Y, Shibata H. 1997. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Gen Subjects* 1335(3):335–42.
- Kosuge, T., Yokota, M., Sugiyama, K. 1985. Studies on antitumor activities and antitumor principles of Chinese herbs. I. Antitumor activities of Chinese herbs, *Yakugaku Zasshi*, 105, 8, pp. 791–795.
- Leal LK, Pierdoná TM, Góes JG, Fonsêca KS, Canuto KM, Silveira ER, et al. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis*. *Phytomedicine* 2011;18,230–3.
- Li H, Liu Y, Zhang Z, Liao H, Nie L, Yao S. 2005. Separation and purification of chlorogenic acid by molecularly imprinted polymer monolithic stationary phase. *J Chromatogr A* 1098(1–2),66–74.
- Li S-Y, Chang C-Q, Ma F-Y, Yu C-L. 2009. Modulating effects of chlorogenic acid on lipids and glucose metabolism and expression of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- [alpha] in golden hamsters fed on high fat diet. *Biomed Environ Sci* 22(2),122–9.
- Lou ZX, Wang HX, Zhu S, Ma CY, Wang ZP. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci.* 2011;6:398–403.
- Martineti, V., Tognarini, I., Azzari, C., Sala, S.C., Clematis, F., Dolci, M., Lanzotti, V., Tonelli, F., Brandi, M.L., Curir, P., 2010. Inhibition of In Vitro Growth and Arrest in the G0/G1 Phase of HCT8 Line Human Colon Cancer Cells by Kaempferide Triglycoside from *Dianthus caryophyllus*, *Phytotherapy Research*, 24 (9), 1302-1308.
- Martínez J, Vogler O, Casas J, Barcelo F, Alemany R, Prades J et al. 2005. Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of minerval. *Mol Pharmacol.* 67 (2),531-40.
- Martín-Moreno JM, Willett WC, Gorgojo L, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Fernández-Rodríguez JC et al. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1994; 58 (6),774-80.
- Nagata, Y., Ishizaki, I., Waki, M., Ide, Y., Hossen, M.A., Ohnishi, K., Miyayama, T., Setou, M., 2015. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion massspectrometry, demonstrates anti-multiple myeloma activity. *Leukemia Research*, 39, 638–645.
- Perdue, Jr, R.E., Hartwell, J.L., 1969. The Search for plants sources of anticancer drugs. *World Botanical Associates*, 35-36.

- Puertollano MA, de Pablo MA, Alvarez de Cienfuegos G., 2003. Polyunsaturated fatty acids induce cell death in YAC-1 lymphoma by a caspase-3-independent mechanism. *Anticancer Res.*, 23 (5A), 3905-10.
- StanelyMainzenPrince P, Rajakumar S, Dhanasekar K. Protective effects of vanillic acid on electrocardiogram, lipid peroxidation, antioxidants, proinflammatory markers and histopathology in isoproterenol induced cardiotoxic rats. *Eur J Pharmacol* 2011; 688,233–40.
- Sukohar, A., Herawati, H., Witarto, A.B., Setiawan, Wirakusumah, F.F., Sastramihardja, H.S., (2013). Role Of Chlorogenic Acid From Lampung Robusta Coffee Against Gene Expression Of MiRNA (Micro Rna) 146 A On Hepatocellular Carcinoma Cells. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*, 2(6), 776 - 784.
- URL-1.<http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleri-yay%C4%B1nland%C4%B1.html>
- URL-2.chromeextension://oemmdcbldboiebfnladdacbfmadadm/http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/per/belge/kemoterapi_yan_etki.pdf
- URL-3- <http://www.kanser.org/toplum/?action=sayfa&id=2>
- URL-4:<http://www.tazehaber.com/haber.php/525549/2-bin-yillikmumyada-kanser-tespit-edildi> Erişim tarihi: 24.12.2013
- URL – 5: (<https://tr.wikipedia.org/wiki/Karanfilgiller> Erişim tarihi: 02.05.2016)
- URL- 6: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=1396
- URL- 7: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=1416
- URL - 8: http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=1401
- Wang G-F, Shi L-P, Ren Y-D, Liu Q-F, Liu H-F, Zhang R-J, Li Z, Zhu F-H, He P-L, Tang W, Tao P-Z, Li C, Zhao W-M, Zuo J-P. 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral Res* 83(2):186–90.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

T.C. Kimlik No : 39068044992
Soyadı, adı : ŞAHİN, İlknur
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 15.11.1984 Türkeli / SİNOP
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 312 979 81 24
GSM : 0 505 768 49 58
E-Posta : e133446@metu.edu.tr
Adres : Alsancak Mah. Alsancak Sok. Alsancak Apt. No:29
Daire: 16 ETİMESGUT /ANKARA

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Orta Doğu Teknik Üniversitesi / Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü (Kayıt tarihi: 27.02.2012)	
Yüksek Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi / Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü	13.02.2012
Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi / Organik Kimya (Kayıt tarihi: 16.01.2013)	06.05.2016
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi / Bilim Tarihi (Kayıt tarihi: 08.02.2016)	
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi / Kimya Öğretmenliği Bölümü	13.02.2012
Lise	Sinop Anadolu Öğretmen Lisesi / Fen Bilimleri	26.06.2002

Yabancı Dil: İngilizce, Almanca, Osmanlıca