



**DÖRT COUSINIA TÜRÜ (SEC. STENOCEPHALAE BUNGE.) ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Leyla PAŞAYEVA

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Ağustos 2017

Leyla PAŞAYEVA tarafından hazırlanan “Dört *Cousinia* Türü (Sec. Stenocephalae Bunge.) Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından ~~OY BİRLİĞİ~~/OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. OSMAN ÜSTÜN

Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan: Prof. Dr. MUSTAFA ASLAN

Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Prof. Dr. MÜBERRA KOŞAR

Farmakognozi Anabilim Dalı, Doğu Akdeniz Üniversitesi

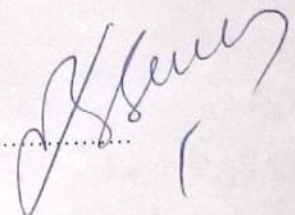
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Prof. Dr. BİLGE ŞENER

Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

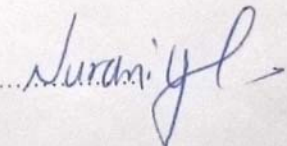
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye: Yrd. Doç. Dr. Nuraniye ERUYGUR

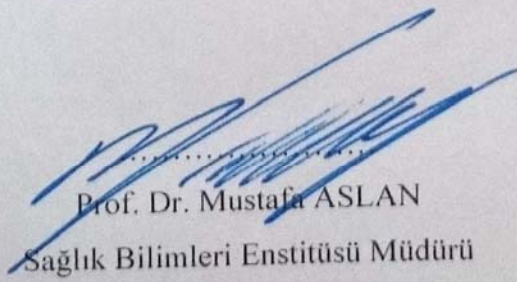
Farmakognozi Anabilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi 15/08/2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Leyla PAŞAYEVA

15/08/2017

DÖRT *COUSINIA* TÜRÜ (SEC. STENOCEPHALAE BUNGE.)

ÜZERİNDE FARMAKOĞNOZİK ARAŞTIRMALAR

(Doktora tezi)

Leyla PAŞAYEVA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2017

ÖZET

Günümüzde birçok sentetik ilacın yan etki ve etkileşimlerinden dolayı kanser tedavisinde kullanımında zorlukların olduğu bilinmektedir. Öte yandan uygulama alanının genişliği, terapötik etkinliği ve düşük toksisitesi ile bitkisel ilaçlar dikkat çekmekte ve üzerinde yapılan antikanser çalışmalar hızlanmaktadır. Antikanser etkisi ile dikkat çeken doğal bileşik gruplarından biri terpenik bileşiklerdir. Çalışmada *Cousinia* türlerinin seçilme nedeni bu türlerin terpenlerce zengin Asteraceae familyasına ait olması, türlerin şimdiye kadar sitotoksik aktivite yönünden incelenmemesi ve fitokimyasal içeriğinin belirlenmemesidir.

Tez çalışması kapsamında Stenocephalae Bunge. seksiyonuna dahil olan dört türün sekonder madde gruplarının saptanması için genel teşhis reaksiyonları yapılmış ve bitkilerin daha çok fenolik ve steroidal bileşikler içerdiği bulunmuştur. Daha sonra bitkilerin metanol ekstraktları hazırlanarak sitotoksik ve antioksidan etki açısından incelenmiş, daha aktif etki görülen bitkilerin alt ekstraktları hazırlanarak akciğer kanseri, kolon kanseri ve sağlıklı akciğer hücre hatlarında sitotoksik etki ve antioksidan etkisi taranmıştır. Uygun aktivite çalışmalarında aktif bulunan *Cousinia stenocephala* bitkisinin diklorometan (CSD) ekstresi (Colo 205 hücre hattında $IC_{50} = 130 \mu g/mL$) ve *C. davisiana* bitkisinin *n*-butanol (CDB) ekstresi üzerinden izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Sonuç olarak farklı kromatografik yöntemlerle CSD kodlu ekstrede triterpen yapısında ψ -taraksasterol bileşiği, CDB ekstresinden ise rutin ve izoramnetin 3-*O*-rutinozid izole edilmiştir. Daha sonra CSD ekstresinden elde edilen ψ -taraksasterol bileşiği aktivite yönünden taranmış ve sitotoksik etki göstermediği görülmüştür. Bitkinin sitotoksik etkisinin fraksiyondan izolasyonu yapılan ψ -taraksasterol maddesi ile LC-MS/MS çalışmaları ile belirlenen mirisetin, kafeik asit esteri, apigenin 7-apiozilglikozid maddelerinin sinerjistik etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. CDB ekstresinden elde edilen bileşiklerin ise literatürde de bulunduğu üzere güçlü doğal antioksidan özellikte oldukları bildirilmiştir. Bunun dışında elde edilen metanol ekstraktları LC-MS/MS ile kimyasal içerik açısından incelenmiş daha çok kafeik asit ve kinik asit türevleri içerdiği bulunmuş ve ekstraktlar arasında belirgin bir farklılık görülmemekle birlikte yalnızca madde miktarlarında farklılık olduğu tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 1017

Anahtar Kelimeler : *Cousinia*, Asteraceae, Sitotoksikite, Antioksidan, NMR, LC-MS/MS

Sayfa Adedi : 128

Danışman : Prof. Dr. Osman ÜSTÜN

PHARMACOGNOSTICAL INVESTIGATIONS on FOUR SPECIES of *COUSINIA*
(SEC. STENOCEPHALAE BUNGE.)

(Ph. D. Thesis)

Leyla PAŞAYEVA

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

August 2017

ABSTRACT

It is known some difficulties of synthetic drugs use in cancer therapy because of side effects and interactions nowadays. On the other hand, because of their wide application, therapeutic efficacy and low toxicity of herbal drugs is more important on anticancer studies and they are on improving. Terpenes are one of the natural compounds have remarkable anticancer activity. The reason of selecting *Cousinia* species is that they are belonged to Asteraceae family which is rich of terpenoids, never studied for cytotoxic activity and have not been phytochemically analyzed.

In this study, preliminary phytochemical analyses were carried out to determine the major active substance groups and plants were found to contain mainly phenolic and steroidal compounds. Then methanol extracts were prepared from species, included this section, and the antioxidant and cytotoxic effects were detected on lung cancer, colon cancer and healthy lung cell lines. More active plants *Cousinia stenocephala* and *C. davisiana* were selected as the guide plants. From both plant extracts and sub-extracts were prepared subjected to activity studies. Isolation studies were carried out on dichloromethane (CSD) extract ($IC_{50} = 130 \mu g / mL$ on Colo 205 cell line) of *Cousinia stenocephala* and n-butanol (CDB) extract of *C. davisiana* plant. As a result, rutin and isorhamnetin 3-O rutinoside isolated from the CDB extract and pseudo-taraxasterol isolated from CDS extract used different chromatographic methods. The compound obtained from the CSD extract was screened for activity and showed no cytotoxic effect. It has been thought that the cytotoxic effect of the plant may be due to the synergistic effect of ψ -taraxasterol which isolated from fraction with myricetin, caffeic acid esters and apigenin 7-apiosylglycoside compounds determined by LC-MS/MS. Compounds obtained from CDB extracts have been reported to be potent natural antioxidant agents as described in literature. Besides, the main methanol extracts were examined in terms of chemical contents with LC-MS/MS and were found to contain mostly caffeic acid and quinic acid derivatives. Although there is no significant difference between the extracts, it has been determined that there is only differences in the amount of the substances.

Science Code : 1017

Key words : *Cousinia*, Asteraceae, Cytotoxicity, Antioxidant, NMR, LC-MS/MS

Page Number : 128

Supervisor : Prof. Dr. Osman ÜSTÜN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, kıymetli bilgi ve tecübelerinden faydalandığım danışmanım Prof.Dr.Osman Üstün'e, tez çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü problemin çözümüne yaptığı katkılar ve kıymetli zamanını bana ayıran, sevgili Hocam Prof.Dr.Bilge Şener'e, tez çalışmalarım boyunca yaptığı bilimsel yardımlar, benden esirgemediği yakın ilgi, alaka, manevi desteği için ve karşılaştığım her tür zorlukta bana cesaret veren sevgili Hocam Prof.Dr.Müberra Koşar'a, "Doğu Akdeniz Üniversitesi Eczacılık Fakültesi", botanik bilgilerini benimle paylaşan ve her türlü yardımını esirgemeyen Prof.Dr.Osman Tugay'a, "Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi", spektrumları yorumlarken karşılaştığım sorularda bilgi ve deneyimlerine başvurduğum Prof.Dr.İhsan Çalış'a, "Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi", sitotoksik etki çalışmaları sırasında her türlü yardımlarından dolayı Yrd.Doç.Dr.Eren Demirpolat ve Farmakoloji Ana Bilim Dalı başkanı Doç.Dr.M.Betül Yerer Aycan'a, "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi", antioksidan aktivite çalışmalarında desteklerinden dolayı Yrd.Doç.Dr.Gökçe Ş. Karatoprak'a, "Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi", çalışmalarımı bünyesinde yürüttüğüm Gazi Üniversitesi Yönetimine, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof.Dr.İlkay Erdoğan Orhan başta olmakla tüm akademik ve idari personele, çalışmalarım süresince desteklerini benden esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanı Prof.Dr.Fatma Tosun olmakla Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve yardımcılarına, Çalışmalarımın bir kısmını bünyesinde yürüttüğüm Erciyes Üniversitesi Yönetimine, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof.Dr.İbrahim Narin başta olmakla tüm akademik ve idari personele, laboratuvar çalışmalarım sırasında teknik destek ve yardımlarını gördüğüm teknisyenimiz Kasım Büyükbezirci'ye, her kararında her zaman yanımda olup manevi desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş.Gör.Esra Köngül, Arş.Gör.Elçin Bakır, Yrd.Doç.Dr. Burcu Ü. Endirlik, Arş.Gör.Selen İlgin ve Arş.Gör.Kübra Uzun'a, akademik hayata başladığım ilk günden beri hep yanımda olan değerli arkadaşım Arş.Gör.Dr.Ayşe Kübra Karaboğa Arslan, eşi Uğur Arslan ve oğlu Yavuz Arel Arslan'a, hayatımın her anında maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen babam Prof.Dr.Nazim Paşayev, annem Mihriban Paşayeva, kardeşim Paşa Paşayev ve eşi Büşra Paşayev'e, hayatımın hiçbir anında beni yalnız bırakmayan, hem meslek hem özel hayatımda beni her zaman her anlamda destekleyen eşim Uzm.Ecz.Hanifa Fatullayev'e, tez çalışmamı 116S115 kodlu proje ile finansal olarak destekleyen TÜBİTAK'a, en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botanik Bilgiler	3
2.1.1. Asteraceae (Compositae)	3
2.2 Fitokimyasal Çalışmalar	21
2.2.1. <i>Cousinia</i> Türlerinden İzole Edilen Bileşikler	21
2.3. <i>Cousinia</i> Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları	32
2.3.1. Sitotoksik etki	32
2.3.2. Antikanser etki	32
2.3.3. Antibakteriyel etki	32
2.4. Kanserin Tanımı ve Özellikleri	33
2.4.1 Kanser oluşumunun nedenleri	34
2.4.2 Akciğer ve kolon kanseri	35
2.5. Sitotoksosite	37
2.6. Oksidan ve Antioksidanlar	39
2.6.1 Doğal antioksidanların önemi	39
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1 Gereç.....	41
3.1.1. Bitkisel materyal	41
3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler	42
3.1.3. Kullanılan cihazlar	43
3.2. Yöntem	45
3.2.1. Kromatografik yöntemler	45
3.2.2. İzole edilen bileşiklerin yapı tayini	48

	Sayfa
3.2.3. Sekonder Metabolit Gruplarının Teşhis Reaksiyonları	49
Oz Teşhisi	49
Alkaloit Teşhisi	49
Kardiyoaktif Heterozit Teşhisi	50
Saponozit Teşhisi	51
Flavonoit Teşhisi	51
Tanen Teşhisi	52
Antrakınonların Teşhisi	52
3.2.4. Ekstraksiyon	53
3.2.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	56
Hücre Kültürü Çalışmaları	56
Antioksidan Kapasite Çalışmaları	56
3.2.6. İstatistiksel Analiz	59
4. BULGULAR	61
4.1. Bazı Sekonder Metabolit Gruplarının Teşhis Reaksiyonlarına ait Sonuçlar	61
4.2. Fitokimyasal Çalışma Sonuçları	62
4.2.1. Dört <i>Cousinia</i> türünün metanol ve alt ekstraktlarının İTK incelemesi	62
4.2.2. İzolasyon çalışmaları	64
4.2.3. Bileşiklerin yapı tayini çalışmaları	68
Triterpenik Bileşikler	68
Flavonoit Glikozitleri	74
4.3. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi/Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS) analizleri	85
4.3.1. Elde Edilen Saf Maddelerin Diğer Ekstrelerde Varlığının LC-MS/MS ile Belirlenmesi	91
4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına ait Bulgular	94
4.4.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	94
4.4.2 Antioksidan Kapasite Çalışmalarına ait Bulgular	104
5. TARTIŞMA	109
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	113
KAYNAKLAR	117
EKLER	125
EK 1. Bitki Toplama Çalışmaları	126
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Cousinia</i> türlerinden izole edilen bileşikler	21
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bitkilere ait bilgiler.....	41
Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemler	42
Çizelge 3.3. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	43
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	43
Çizelge 3.5. <i>C. davisiana</i> , <i>C. foliosa</i> , <i>C. ramosissima</i> ve <i>C. stenocephala</i> bitkilerinden elde edilen ekstraların verimleri (%)	55
Çizelge 4.1. Dört <i>Cousinia</i> türünün metanol ekstralarının sekonder metabolit gruplarının teşhis reaksiyonlarına ait sonuçlar	61
Çizelge 4.2. LE-4'ün ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CDCl ₃ , ¹³ C: 150 MHz; ¹ H: 600 MHz)	70
Çizelge 4.3. L-33'ün ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (CD ₃ OD, ¹³ C: 150 MHz; ¹ H 600 MHz).....	75
Çizelge 4.4. L-15'in ¹³ C ve ¹ H NMR spektroskopik değerleri (metanol-d ₄ , ¹³ C: 150 MHz; ¹ H 600 MHz).....	80
Çizelge 4.5. Dört türün metanol ekstralarında tespit edilen bileşiklerin MS/MS fragmanları	89
Çizelge 4.6. Fr:3 fraksiyonunda tespit edilen bileşiklerin MS/MS fragmanları	90
Çizelge 4.7. CD, CF, CR ve CS kodlu metanol ekstralarının IC ₅₀ (µg/mL) değerleri	96
Çizelge 4.8. CSB, CSD, CSE, CSH ve CSS kodlu alt ekstraların IC ₅₀ (µg/mL) değerleri	98
Çizelge 4.9. FR:1, FR:2, FR:3 kodlu fraksiyonların IC ₅₀ (µg/mL) değerleri	100
Çizelge 4.10. Sisplatin IC ₅₀ (µM) değerleri	102
Çizelge 4.11. a) <i>Cousinia</i> türlerinden elde edilen ana metanol ekstralarının toplam fenolik madde ve toplam flavonoit miktar tayini. b) CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstraların toplam fenolik madde ve toplam flavonoit miktar tayini. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CD: <i>C. davisiana</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CDB: <i>C. davisiana</i> n-butanol ekstresi, CDE: <i>C. davisiana</i> etilasetat ekstresi CDS: <i>C. davisiana</i> su ekstresi, BHA: bütil hidroksi anizol	107

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>C. davisiana</i> bitkisinin karelere göre yayılışı	10
Şekil 2.2. <i>C. davisiana</i> bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler	11
Şekil 2.3. <i>C. foliosa</i> bitkisinin karelere göre yayılışı	13
Şekil 2.4. <i>C. foliosa</i> bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler	14
Şekil 2.5. <i>C. ramosissima</i> bitkisinin karelere göre yayılışı	16
Şekil 2.6. <i>C. ramosissima</i> bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler	17
Şekil 2.7. <i>C. stenocephala</i> bitkisinin karelere göre yayılışı	19
Şekil 2.8. <i>C. stenocephala</i> bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler	19
Şekil 2.9. Kanser hücresinin karakteristik özellikleri	34
Şekil 3.1. <i>C. foliosa</i> ve <i>C. ramosissima</i> türlerinin toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu	54
Şekil 3.2. <i>C. davisiana</i> toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu	55
Şekil 3.3. <i>C. stenocephala</i> toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu	55
Şekil 4.1. CD, CF, CR ve CS kodlu ekstrelerin İTK görünümü. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CD: <i>C. davisiana</i> (Çözücü sistemler: a) Sikloheksan:CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:4:1) ve b) EtoAc:MeOH:FA:H ₂ O (100:13,5:2,5:10), belirteç vanilin/H ₂ SO ₄)	62
Şekil 4.2. <i>C. stenocephala</i> metanol ekstresinden elde edilen alt ekstrelerin (a ve b) İTK görünümü. CSH : <i>C. stenocephala</i> hekzan ekstresi, CSD : <i>C. stenocephala</i> diklorometan ekstresi CSE : <i>C. stenocephala</i> etilasetat ekstresi, CSB : <i>C. stenocephala</i> n-butanol ekstresi, CSS : <i>C. stenocephala</i> su ekstresi. (Çözücü sistemler: a) Sikloheksan:CH ₂ Cl ₂ :MeOH (7:4:1) ve b) EtoAc:MeOH:FA:H ₂ O (100:13,5:2,5:10), belirteç vanilin/H ₂ SO ₄	63
Şekil 4.3. <i>C. davisiana</i> metanol ekstresinden elde edilen alt ekstrelerin İTK görünümü. CDB : <i>C. davisiana</i> n-butanol ekstresi, CDE : <i>C. davisiana</i> etilasetat ekstresi CDS : <i>C. davisiana</i> su ekstresi (Çözücü sistem CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O (80:20:2), belirteç vanilin/H ₂ SO ₄)	63
Şekil 4.4. LE-4 kodlu saf maddenin izolasyon şeması	64
Şekil 4.5. <i>C. davisiana</i> diklorometan ekstresinden elde edilen saf maddelerin İTK görünümü. CDB : <i>C. davisiana</i> n-butanol ekstresi, CDE : <i>C. davisiana</i> etilasetat ekstresi CDS : <i>C. davisiana</i> su ekstresi (Çözücü sistem CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O (80:20:2), belirteç vanilin/H ₂ SO ₄	65
Şekil 4.6. L-15 ve L-33 kodlu saf maddelerin izolasyon şeması	66

Şekil	Sayfa
Şekil 4.7. <i>C. davisiana</i> <i>n</i> -butanol ekstresinden elde edilen saf maddelerin İTK görünümü	67
Şekil 4.8. LE-4 ¹³ C NMR Spektrumu	71
Şekil 4.9. LE-4 ¹ H NMR Spektrumu	71
Şekil 4.10. LE-4 ¹ H- ¹ H COSY NMR Spektrumu	72
Şekil 4.11. LE-4 HMQC NMR Spektrumu	72
Şekil 4.12. LE-4 HMBC NMR Spektrumu	73
Şekil 4.13. L-33 ¹ H NMR Spektrumu	76
Şekil 4.14. L-33 ¹ H NMR Spektrumu (büyütülmüş)	77
Şekil 4.15. L-33 DEPT 135 NMR Spektrumu	77
Şekil 4.16. L-33 HSQC NMR Spektrumu	78
Şekil 4.17. L-33 HMBC NMR Spektrumu	78
Şekil 4.18. L-15 ¹ H NMR Spektrumu	81
Şekil 4.19. L-15 ¹³ C NMR Spektrumu	82
Şekil 4.20. L-15 ¹ H- ¹ H COSY NMR Spektrumu	82
Şekil 4.21. L-15 DEPT 135 NMR Spektrumu	83
Şekil 4.22. L-15 HMQC NMR spektrumu	83
Şekil 4.23. L-15 HMQC NMR Spektrumu (büyütülmüş)	84
Şekil 4.24. L-15 HMBC NMR Spektrumu	84
Şekil 4.25. (a) CD, (b) CF, (c) CR ve (d) CS kodlu metanol ekstrelerinin LC-MS/MS analizi sonucu alınan toplam iyon kromatogramları. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CD: <i>C. davisiana</i>	86
Şekil 4.26. (a) CD, (b) CF, (c) CR ve (d) CS kodlu metanol ekstrelerinin ve (e) Fr:3' e ait kütle spektrumları. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CD: <i>C. davisiana</i>	88
Şekil 4.27. L15 'in negatif MRM iyon kromotogramı a) L15; b) CR; c)CF d) CS. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CF: <i>C. foliosa</i>	91
Şekil 4.28. L33 'ün negatif MRM iyon kromotogramı a) L33; b) CR; c)CF d) CS. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CF: <i>C. foliosa</i>	92

Şekil	Sayfa
Şekil 4.29. LE-4 'ün negatif MRM iyon kromatogramı a) LE-4; b) CR; c)CF d) CD. CD: <i>C. davisiana</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CF: <i>C. foliosa</i>	93
Şekil 4.30. CD, CF, CR ve CS kodlu metanol ekstraktlarının sitotoksikite sonuçları	95
Şekil 4.31. CSH, CSD, CSE, CSB ve CSS kodlu alt ekstraktların sitotoksikite sonuçları	97
Şekil 4.32. CSD kodlu alt ekstraktan elde edilen fraksiyonların sitotoksikite sonuçları	99
Şekil 4.33. CSD kodlu alt ekstraktan elde edilen saf maddenin sitotoksikite sonuçları	101
Şekil 4.34. Sisplatinin sitotoksikite sonuçları	103
Şekil 4.35. a) <i>Cousinia</i> türlerinden elde edilen ana metanol ekstraktların DPPH radikalı süpürücü etki tayini. b) CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstraktların DPPH radikalı süpürücü etki tayini. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CD: <i>C. davisiana</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CDB: <i>C. davisiana</i> n-butanol ekstresi, CDE: <i>C. davisiana</i> etilasetat ekstresi CDS: <i>C. davisiana</i> su ekstresi, BHA: bütill hidroksi anizol	104
Şekil 4.36. a) <i>Cousinia</i> türlerinden elde edilen ana metanol ekstraktların ABTS radikalı süpürücü etki tayini. b) CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstraktların ABTS radikalı süpürücü etki tayini. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CD: <i>C. davisiana</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CDB: <i>C. davisiana</i> n-butanol ekstresi, CDE: <i>C. davisiana</i> etilasetat ekstresi CDS: <i>C. davisiana</i> su ekstresi, TEAC: troloks eşiti antioksidan kapasite; BHA: bütill hidroksi anizol	105
Şekil 4.37. a) <i>Cousinia</i> türlerinden elde edilen ana metanol ekstraktların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini. b) CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstraktların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini. CS: <i>C. stenocephala</i> , CR: <i>C. ramosissima</i> , CD: <i>C. davisiana</i> , CF: <i>C. foliosa</i> , CDB: <i>C. davisiana</i> n-butanol ekstresi, CDE: <i>C. davisiana</i> etilasetat ekstresi CDS: <i>C. davisiana</i> su ekstresi, BHT: bütilllenmiş hidroksi tolueen	106

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Asteraceae familyası üyelerinin dünyadaki yayılımı	4
Resim 2.2. <i>Cousinia davisiana</i>	9
Resim 2.3. <i>Cousinia foliosa</i>	12
Resim 2.4. <i>Cousinia ramosissima</i>	15
Resim 2.5. <i>Cousinia stenocephala</i>	18



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Kısaltmalar	Açıklama
ABS	Absorbans
ABTS[•]	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonik asit)
ACN	Asetonitril
ANK	Ankara üniversitesi herbaryumu
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
CD	<i>Cousinia davisiana</i> metanol ekstresi
CDB	<i>Cousinia davisiana</i> butanol ekstresi
CDE	<i>Cousinia davisiana</i> etilasetat ekstresi
CDS	<i>Cousinia davisiana</i> su ekstresi
CF	<i>Cousinia foliosa</i> metanol ekstresi
COSY	Correlation spectroscopy
COX-2	Siklooksijenaz-2
CR	<i>Cousinia ramosissima</i> metanol ekstresi
CS	<i>Cousinia stenocephala</i> metanol ekstresi
CSB	<i>Cousinia stenocephala</i> butanol ekstresi
CSD	<i>Cousinia stenocephala</i> diklorometan ekstresi
CSH	<i>Cousinia stenocephala</i> hekzan ekstresi
CSS	<i>Cousinia stenocephala</i> su ekstresi
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH[•]	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
ETOAC	Etilasetat
FR	Fraksiyon
GAZI	Gazi üniversitesi herbaryumu (Ankara)
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation

Kısaltmalar	Açıklama
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IC₅₀	Half maximal inhibitory concentration
KNYA	Selçuk üniversitesi herbaryumu (Konya)
LC/MS/MS	Liquid chromatography/mass spectrometry/ mass spectrometry
MEOH	Metanol
MRM	Mutiple reaction monitoring
N-BUOH	Normal butanol
NMR	Nuclear magnetic resonance

1. GİRİŞ

Doğal bileşikler 1950’li yıllarda ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından geniş kapsamlı taranması sonucunda potansiyel antikanser etkili oldukları tespit edilmiştir. 1940-2006 yılları arasında onaylanan antikanser ilaçların üçte ikisinden fazlasının doğal ürünler veya doğal kaynaklı ürün olduğu bildirilmiştir (Fouche ve diğerleri, 2008). *Catharanthus roseus* (L.) G.Don (Apocynaceae), *Angelica gigas* Nakai (Apiaceae), *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae), *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), *Ochrosia elliptica* Labill. (Apocynaceae) ve *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae) bitkilerinin aktif bileşikleri çeşitli kanser türlerinin ileri aşamalarının tedavisinde kullanılmaktadır (Carvalho ve diğerleri, 2013).

Ancak buna rağmen hala antikanser aktiviteye sahip çok sayıda doğal bileşik keşfedilmeyi beklemektedir (Atrrog ve diğerleri, 2009). Ekolojik rolü, biyolojik aktivitesi ve terapötik potansiyeli nedeniyle dünya çapında her zaman araştırma konusu olmuş doğal bileşik gruplarından biri terpenik bileşiklerdir (Zhang ve diğerleri, 2005). Genellikle sitotoksik etkisi ile bilinen bu bileşikler aktivitelerini enflamasyon, metastaz ve apoptoz mekanizmaları üzerine etkileri ile göstermektedir (Fakhoury ve Gali-Muhtasib, 2011).

Bilindiği üzere terpenik bileşikler içeren türlerin dahil olduğu familyalardan biri Asteraceae familyasıdır. Bu familya bitkiler aleminin antikanser, antibakteriyel, antiinflamatuvar gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bileşikler içeren familyası olup (Rocha ve diğerleri 2007) familyaya dahil olan yaklaşık 291 türün halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Çelik ve diğerleri, 2014). Bu verileri göz önünde bulundurarak familyaya dahil olan *Cousinia* cinsinin araştırılması düşünülmüştür. *Cousinia* (Asteraceae) cinsi *Senecio* ve *Vernonia* cinslerinden sonra Asteraceae familyasının üçüncü büyük, Cardueae tribusunun ise en büyük cinsidir (Rechinger, 1986; Bremer, 1994:85-95; Petit, 1997) ve çiçekli bitkilerin en büyük ilk 50 cinsi arasında yer almaktadır (Frodin, 2004). Bu cins Güneybatı Asya ve Orta Asya’da yayılış gösteren 600’den fazla türe sahiptir. İstisnai olarak nisbeten daha dar bir alanda yayılış gösteren birçok türü ihtiva etmektedir. Rechinger (1986)’e göre *Cousinia* cinsi eşsiz bir farklılaşma derecesine sahiptir ve bu cins sınırlı bir yayılış alanında yüksek oranda tür sayısına sahip olması bakımından tektir. Türkiye Florası’nda *Cousinia* cinsini Huber-Morath yazmıştır. Türkiye’de bu cins 6 seksiyon içerisinde toplam 38 tür ile temsil edilmekte ve bunların 26’sı endemiktir. Bu çalışma kapsamında araştırılan Stenocephalae

seksiyonu 2'si endemik toplam 4 türle (*C. davisiana* Hub.-Mor., *C. foliosa* Boiss. & Bal., *C. ramosissima* DC., *C. stenocephala* Boiss) temsil edilmektedir (Davis, 1978: 350).

Bu çalışma ile *Cousinia* cinsinin *Stenocephalae* seksiyonuna ait olan *C. davisiana* Hub.-Mor., *C. foliosa* Boiss. & Bal., *C. ramosissima* DC., *C. stenocephala* Boiss türlerinin farklı kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkili olup olmadığı ve antioksidan etkisi ilk defa araştırılmıştır. Ayrıca literatürde bu türler üzerinde hiçbir fitokimyasal çalışma olmaması nedeniyle yapılmış fitokimyasal çalışmalar da literatürde ilktir. Bunun dışında *Cousinia* türlerinin Türkiye'de çok sayıda olması ve kayda değer oranda endemizm göstermesi nedeniyle biyoaktif bileşiklerin bulunması açısından ülkemiz için önemli bir ekonomik kaynak oluşturacağı düşünülmektedir. Bu çalışma ile biyoaktif bileşikler açısından literatüre önemli katkı sağlayacak bileşiklerin izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca doğadan yeni bileşiklerin elde edilmesi ya da daha önce elde edilmiş ancak etkinlikleri konusunda veri bulunmayan bileşiklerin etkilerinin tespiti, yarı sentetik ve/veya sentetik bileşiklerin geliştirilmesi için model oluşturabilecektir. Bu da hem toplum sağlığına hem de ulusal ekonomiye katkıda bulunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

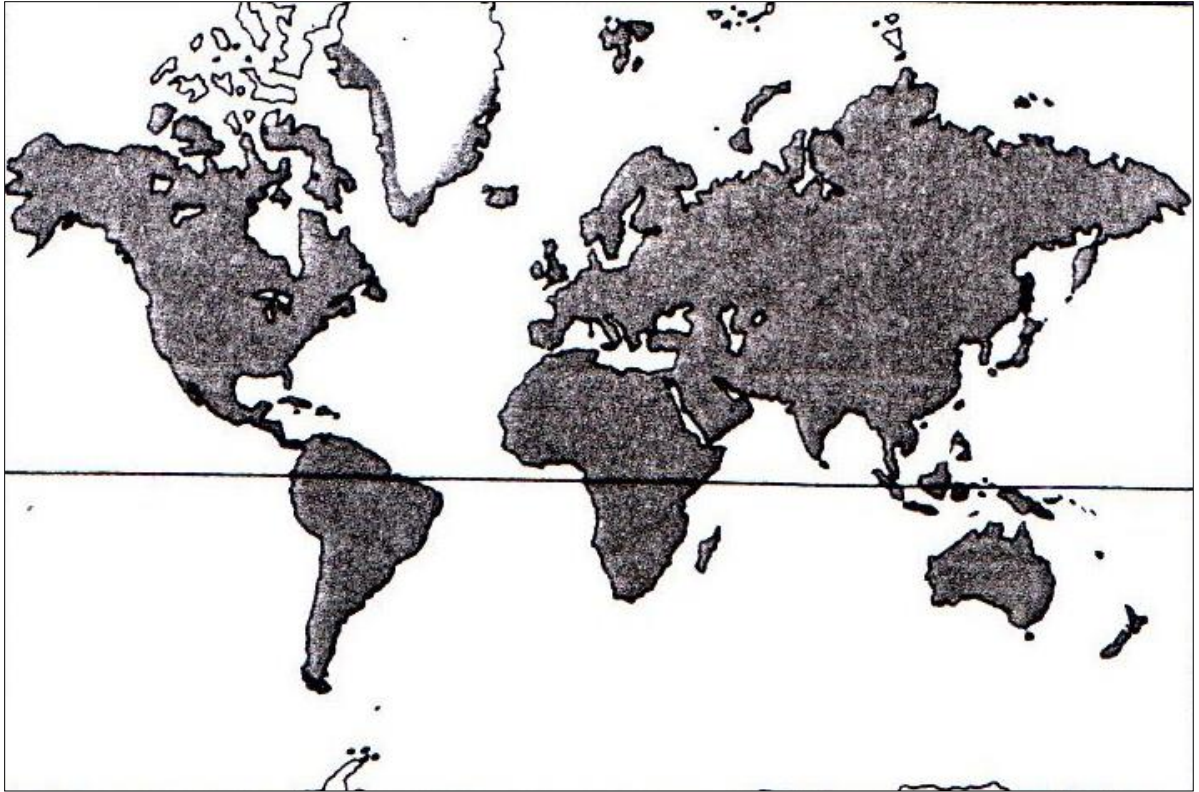
2.1.1. Asteraceae (Compositae)

Bu familya mensupları bir, iki veya çok yıllık, otsu, bazen çalı şeklinde olan bitkilerdir. Dokularında lateks kanalları mevcut ya da değildir. Yapraklar alternat veya bazen karşılıklı; nadiren stipullu, yaprak ayası parçalanmamış, dişli, loblu veya değişik şekillerde derin parçalanmıştır. Çiçekler genellikle çok sayıda (nadiren tek), sapsız ve çiçekler kapitulum durumunda, kapitulumun çevresi bir veya çok sıralı involukral brakteler ile örtülmüş, bunlar nadir olarak birleşmiş; kapitulum bazen ikinci bir kapitulum benzeri baş şeklini (pseudocephalum) almıştır. Işınsal ya da zigomorf simetridir. Reseptakulum çıplak, üzerinde pullar mevcut, uzun tüyler ya da setalar var. Çiçekler (çiçekçikler) epigin, hermafrodit ve protan, dişi, erkek (en azından işlev bakımından böyle) ya da verimsizdir. Kaliks ovaryumun ucunda pappus (meyve zamanında büyür) şeklinde indirgenmiş, pappus tüy, seta, pul yada arista, ya da az çok devamlı bir taç halini almış; bazen tamamen ortadan kalkmıştır. Korolla birleşik, tübüler (huni şeklinde ya da altta dar silindirik ve üstte kampanulat), ipliksi, ligulat, nadiren bilabiat, genellikle 3–5 dişli; bazen mevcut değildir. Stamenler (4)5, epipetal, filamentler genellikle serbest, anterler lateral olarak stilus çevresinde silindir halinde birleşmiş (singenezik), nadiren serbest; içe doğru açılır. Ovaryum alt durumlu, tek lokuluslu, bazal anatrop ovul tek; stilus genellikle iki parçalı, kapitulumun orta bölgesindeki tüpsü çiçeklerin stilusları anter silindirlerinden savrulan polenleri toplamak için çoğunlukla toplayıcı fırça tüyleri taşır. Meyva bir aken ve genellikle devamlı ya da düşücü bir pappus taşır. Pappus sapsız ya da saplıdır (Davis, 1978: 350).

Anatomik olarak, Asteraceae familyası reçine kanallarının varlığı (*Lactuceae* tribüsü dışındaki üyelerinde) ve lateks kanalları (tüm *Lactuceae*, *Carduae* ve *Arctotideae*'nin birkaç cinsi) ile karakterize edilmektedir. Karakteristik biyokimyasal özellikleri ise toprakaltı kısımlarında nişasta yerine polisakkaritlerden inulinin, tohumlarında ise yağ asitlerinin bulunuşudur.

Asteraceae familyası sahip olduğu yaklaşık 1.100 cins ve 25.000 türü ile çiçekli bitkilere ait en geniş familyadır. Familya gıda (*Lactuca*, *Helianthus* vd.), süs (*Chrysanthemum*,

Dahlia vd.), yabani ve zehirli bitkileri, ilaç ve drog kaynağı çeşitli bitkileri içermektedir. Örneğin *Tanacetum cinerariifolium* insektisit olarak kullanılan piretrumun doğal kaynağıdır. *Artemisia* türlerinden, örneğin *A. cina* ve *A. maritima*'dan elde edilen santonin antihelmintik olarak kullanılır. Zehirli *Senecio* türleri özellikle doğada diğer zehirli bitkilere göre daha çok ölümlere sebep olmaktadır. *Ambrosia artemisiifolia* ve *A. trifida* bitkilerinin rüzgarla taşınan polenleri Güney Amerikadaki saman nezlesinin ana sebeplerinden biridir.



Resim 2.1. Asteraceae familyası üyelerinin dünyadaki yayılımı

Asteraceae familyası 2 altfamilya ile temsil edilmektedir. Bu iki altfamilya tribuslara ayrılmıştır.

A. Altfamilya Lactucoeae

1. Tribus Lactuceae
2. Tribus Mutisieae
3. Tribus Eremothamneae
4. Tribus Arctotideae
5. **Tribus Cardueae** → **Alttribus Carduinae** →
6. Tribus Vernonieae
7. Tribus Liabeae
8. Tribus Eupatotieae

B. Altfamilya Asteroideae

9. Tribus Senecioneae
10. Tribus Tageteae
11. Tribus Heliantheae
12. Tribus İnuleae
13. Tribus Anthemideae
14. Tribus Ursinieae
15. Tribus Calenduleae
16. Tribus Cotuleae
17. Tribus Astereae (Heywood, 1979).

57. *Cynara*
58. *Cousinia*
59. *Arctium*
60. *Onopordum*
61. *Silybum*
62. *Cirsium*
63. *Picnomon*
64. *Lamyropsis*
65. *Ptilostemon*
66. *Notobasis*
67. *Carduus*
68. *Tyrimnus*
69. *Jurinea*
70. *Jurinella*
71. *Myopordon*

Bu familya ülkemizde 133 cins ve 1156 tür ile temsil edilmektedir (Baytop, 1999).

Taksonomik Sınıflandırma:

Alem **Plantae**

Altalem **Tracheobionta**

Bölüm **Magnoliophyta**

Sınıf **Magnoliopsida**

Altsınıf **Asteridae**

Takım **Asterales**

Familya **Asteraceae**

Cins ***Cousinia***

***Cousinia* cinsinin özellikleri**

İki yıllık veya çok yıllık dikenli otlar; çoğu zaman taban kısmı odunsu, çatalımsı dallanmış, üstte şemsiyemsi salkım, $\pm$ çok başlı, çok kere örümcek ağımsı-yünlü veya kırıksı ve çoğu zaman az çok çıplaklaşan, nadiren tüysüz. Yapraklar çoğu derimsi, batıcı ve ya dikenli, dişli, loplu, pinnatifit ve ya pinnatipartit, çoğu zaman kayıcı ve bu suretle gövde kanatlı. Kapitulumdaki bütün çiçekler aynı eşeyde, diskoit. İnvolukrum silindirselden küremsiye kadar; involukrum brakteleri çoklu, sert, kiremitsi, diken ya da dikensi dişli. Reseptakulum yoğun kılçıklı-palealı, düz ya da kısa sakallı kıllara sahip. Çiçekler hermofrodit, sarı veya morumsu kırmızı, nadiren beyaz. Akenler çıplak, ters dönmüş, $\pm$ yassı, tepesi dairemsi veya kesik, çoğu zaman $\pm$ bariz olarak küçük dişli kenarlı. Papus tüyleri pürüzlü, serbest kolayca düşücü (Davis, 1978: 350).

Türkiye Florası'nda *Cousinia* cinsini Huber-Morath yazmıştır. Türkiye'de bu cins 6 seksiyon içerisinde toplam 38 tür ile temsil edilmekte ve bunların 26'sı endemiktir. *Sphaerocephalae* Bunge. seksiyonu 1 endemik türle (*C. satdagensis* Hub.-Mor.); *Cousinia* seksiyonu 19'u endemik toplam 22 türle (*C. aleppica* Boiss., *C. aucheri* DC., *C. bicolor*

Freyn & Sint., *C. birandiana* Hub.-Mor., *C. brachyptera* DC., *C. caesarea* Boiss. & Bal., *C. cataonica* Boiss. & Hausskn., *C. cirsioides* Boiss. & Bal., *C. decolorans* Freyn & Sint., *C. eleonora* Hub.-Mor., *C. ermenekensis* Hub.-Mor., *C. euphratica* Hub.-Mor., *C. halysensis* Hub.-Mor., *C. humilis* Boiss., *C. iconica* Hub.-Mor., *C. intertexta* Freyn & Sint., *C. nabelekii* Bornm., *C. sintenisii* Freyn, *C. sivasica* Hub.-Mor., *C. stapfiana* Freyn & Sint., *C. urumiensis* Bornm., *C. woronowii* Bornm.); Stenocephalae Bunge. Seksiyonu 2'si endemik toplam 4 türle (*C. davisiana* Hub.-Mor., *C. foliosa* Boiss. & Bal., *C. ramosissima* DC., *C. stenocephala* Boiss.); Leiocaulae Bunge. seksiyonu 1 türle (*C. boissieri* Buhse); Cynaroidae Bunge. seksiyonu 4'ü endemik toplam 8 türle (*C. aintebensis* Boiss. & Hausskn., *C. arbelensis* C.Winkler & Bornm., *C. birecikensis* Hub.-Mor., *C. canescens* DC., *C. eriocephala* Boiss. & Hausskn., *C. grandis* C.A.Meyer, *C. hakkarica* Hub.-Mor., *C. vanensis* Hub.-Mor.); Pugioniferae Bunge. seksiyonu 2 türle (*C. macroptera* C.A.Meyer, *C. wesheni* Post) temsil edilmektedir. Bunların dışında şüpheli kaydedilen Cousinia seksiyonunda 3 (*C. araratica* Azn., *C. fedorovi* Takht., *C. orientalis* (Adams) C. Koch); Tenella Bunge. Seksiyonunda 1 (*C. tenella* Fisch. & Mey.) tür bulunmaktadır (Davis, 1975).

Cousinia cinsinin P.H.Davis'in "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı kitabının 5. cild'inde yer alan *Stenocephalae* Bunge. seksiyonu'na dahil olan türlerin teşhisinde kullanılacak tayin anahtarları aşağıdaki gibidir:

1. Korolla (9-)10-15-(-17) mm, farklı renklerde; involukrum 3-5 cm'den daha az genişlemiş, dikenli, çoğu zaman 2-5 cm'e kadar; papusun sakallı tüyleri 1-3-(-5) mm, reseptikulumun sakallı tüyleri çoğu zaman düz.

10. Korolla sarı veya sarı renk pembe ton ile renklenmiş.

18. Çiçekler 4-15; involukrum brakteleri yayıktan kıvrığa kadar, 1-2 mm dikenlere sahip, veya tamamen preslenmemiş, uzun dikenlere sahip.

19. İnvolum dikkörtkensi-silindirel, involukrum brakteleri 12-30, kısa kıvrık dikenlere sahip.

27. C. stenocephala

19. İnvolum ovattan dikkörtkensiye kadar, involukrum brakteleri 30-80, kırılmamış.

20. İnvolum brakteleri 70-80, yoğun örümcek ağına benzer, dikenler preslenmemiş, 5-15 mm.

24. C. davisiana

20. İnvolum brakteleri 30-65, seyrek örümcek ağına benzer, çabuk çıplaklaşan, dikenler yayık, 1-2 mm.

21. İnvolum brakteleri 45-65, involukrum uzunluğunun ½' den daha alçak guddesiz.

25. C. foliosa

21. İnvolum brakteleri 30-50, involukrum uzunluğunun ¼'den alçak olmayan, ± noktalı guddeli.

26. C. ramosissima

Stenocephalae seksiyonunun botanik özellikleri

Çokyıllık. Gövde 15-60 sm, şemsiyemsi dallanmış, çoğu zaman çalimsı. Gövde yaprakları çoğu zaman kayıcı, en üst yapraklar çoğu zaman involukrum şeklinde. Kapitula küçük, çok sayıda, seyrek –(3-25)- çiçekli. Involukrum genellikle dikdörtgensiden sislendirsele kadar, bazen yumurta şeklinde; involukrum brakteleri 12-90, dik veya kıvrık çoğunlukla kısa dikenli. Çiçekler sarı, pembe veya kırmızı, nadiren beyaz, 8-14 mm. Akenler küçük, 4-5x2-3 mm, çoğunlukla tepede, tepesi kesik ve ucu küçük dişli (Davis, 1975)

Cousinia davisiana Hub.-Mor.bitkisinin botanik özellikleri

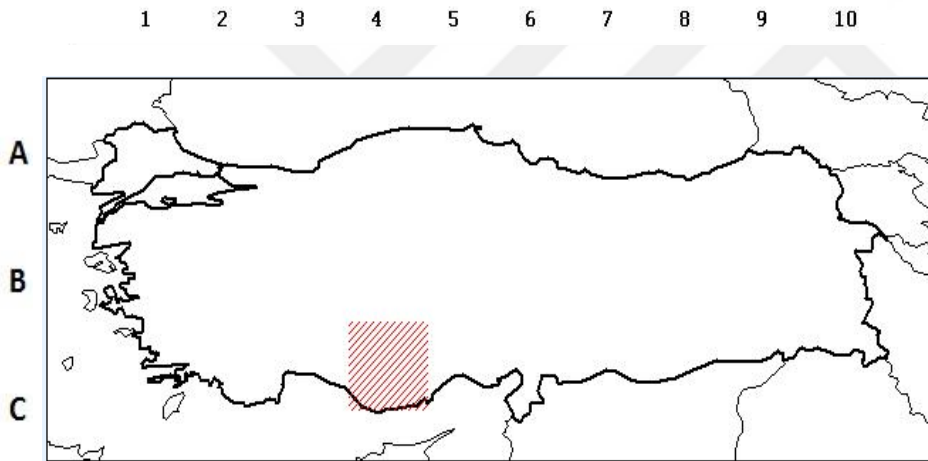


Resim 2.2. *Cousinia davisiana* Hub.-Mor.

Çok yıllık, 30 cm'den yüksek, üzeri baştanbaşa sık yünsü örümcek ağımsı tüy örtüsü ile kaplı, çok başlı. Gövdeler sert, silindrik, çok sayıda yayılmış ve yüksek dallı. Yapraklar her iki yüzü ağımsı-yünlü, alt yüzü bariz ağımsı-damarlı, sığ dişli veya loplu, çok sayıda düzensiz 2 cm'e kadar dikenli kıvrıkları 1-4 cm uzunluğunda, gövdenin aşağı kısmındaki yapraklar dikdörtgensi 5-12x'den 8 cm'e kadar uzunluğunda, 12-20 adet üçgen şekilli dişli, gövdenin üst kısmındaki yapraklar lanseolat, $\pm$ sığ dikenli dişli. Kapitula 25 ve daha çok sayıda, az çiçekli. Ovaldan dikdörtgensiye kadar, 1-1,5 cm genişlikte dikenli involukrum, 70-80 adet, sık ağımsı-yünlü, çıplak yatık batıcı uçlu, yatık taban kısmından 2 mm yukarı kısma doğru 7-15 mm biz şeklinde kalkan ve gitgide keskinleşen involukrum brakteleri. Reseptakulum kılları yumuşak. Çiçekler sarı, 14-15 mm, akenler kahve renkli, dikdörtgensi-obovat, 6x25 mm, boyuna çizgili, tepe kısmına kadar dişli kenarlı (Davis, 1975)

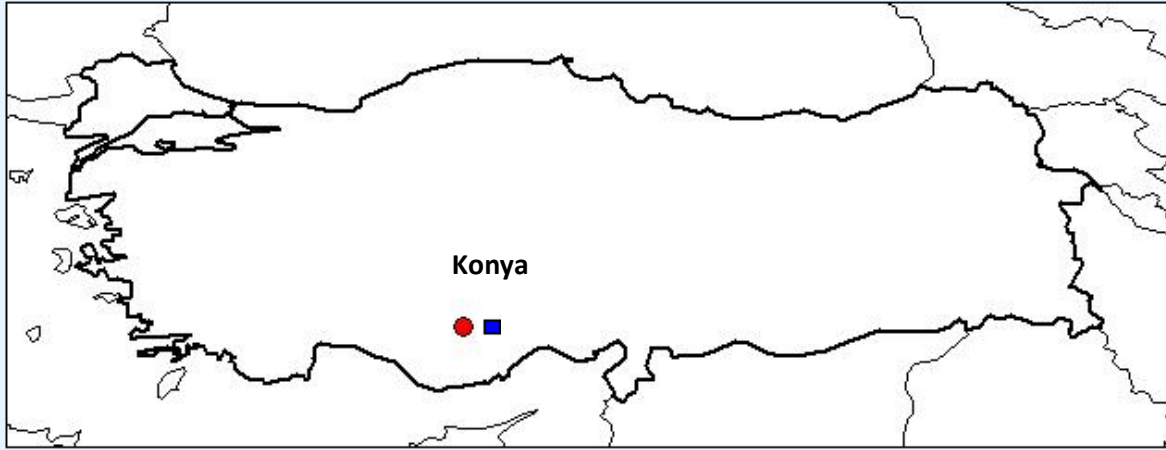
Ömür	: Çok yıllık
Çiçeklenme	: 7. ay
Habitat	: Tebeşirli yamaç
Yükseklik	: 1400 metre
Endemik	: Endemik
Türkiye dağılımı	: Güney Anadolu
Genel Dağılımı	: Türkiye
Bulunduğu kareler	: C4

Cousinia davisiana Hub.-Mor. bitkisinin Türkiye'deki yayılışı



Şekil 2.1. *Cousinia davisiana* Hub.-Mor. bitkisinin karelere göre yayılışı

C4 Konya: Ermenek, kireçli yamaçlar, 1400 m, 13viii 1949, P.H. Davis 16144 (holo.E!).



Şekil 2.2. *C. davisiana* bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler.(● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 5.cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplanma yerleri, ■ Çalışmamızda kullanılan *C. davisiana* bitkisinin toplandığı yer)

Cousinia davisiana Hub.-Mor. bitkisinin herbaryum kayıtları

C4 Konya: Ermenek, 1400 m (ANK 16144)(!).

C. davisiana Hub.-Mor. bitkisinin halk arasındaki adları

Türkçe adı: İç Kızan (Güner ve diğerleri, 2012)

Cousinia foliosa Boiss. & Bal. bitkisinin botanik özellikleri



Resim 2.3. *Cousinia foliosa* Boiss. & Bal.

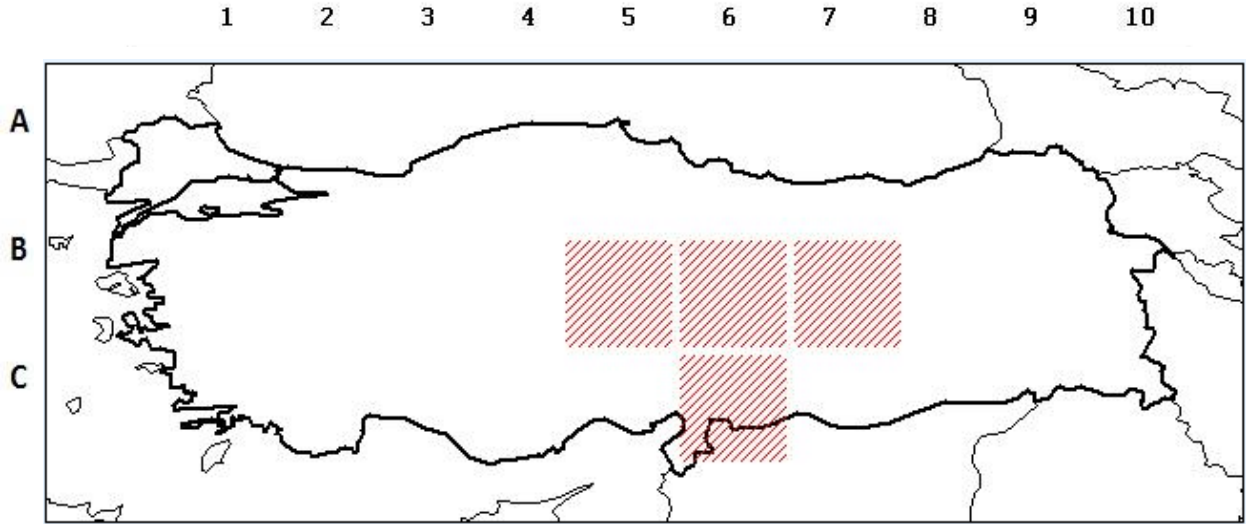
Çok yıllık, 15-30 cm, tabandan dikotomik dallanmış, çalımsı. Gövdeler ince, silindirik, sık beyaz örümcek ağımsı-yünlü, çıplak. Yapraklar batıcı dikenli-dişli, hemen hemen ağımsı yünlü, yukarı kısmı erken çıplaklaşan ve parlak, aşağı kısmı sık beyaz yünlü yumuşak tüylü; taban yaprakları 3 cm'e kadar kısa petiollere sahip, dikdörtgensiden lanseolata kadar, 5-15x2,5-3,5 cm, düzensiz dişli veya sığ loplu; gövde yaprakları gitgide küçülen, bütünü veya dikenli dentat, 3 cm uzunluğunda kayıcıdan kamamsıya kadar kanatlı. Kapitula 10-30, 7-15 çiçekli. İnvolukrum oval-küremsi 1-1,5 cm genişliğinde dikenli, involukrum brakteleri 45-65, kademeli olarak taban kısmında kısa yatık geniş lanseolatdan akuminata doğru, dik yayılmış, üst kısmı hiçbir zaman geri kıvrılmayan, 1 mm'den uzun olmayan uçta batıcı dikenlere sahip. Reseptakulum tüyleri yumuşak. Çiçekler sarı renkli, 10 mm uzunluğunda. Akenler kahve renkli, dikdörtgensi obovat, 5x2 mm, ince kenarlı ve tepede dentikulat (Davis, 1978: 353).

Çiçeklenme	: 6-8. ay
Habitat	: Kurak yamaç, step
Yükseklik	: 1250-1650 m
Endemik	: Endemik
Element	: İran-Turan
Türkiye dağılımı	: Orta Anadolu, Güney Anadolu
Genel Dağılımı	: Türkiye

C. foliosa Boiss. & Bal. bitkisinin sinonimleri

Arctium foliosum (Boiss. & Bal.) O. Kuntze, Rev. Gen. Pl. 1:307 (1891)

Cousinia foliosa Boiss. & Bal. bitkisinin Türkiye’de yayılışı



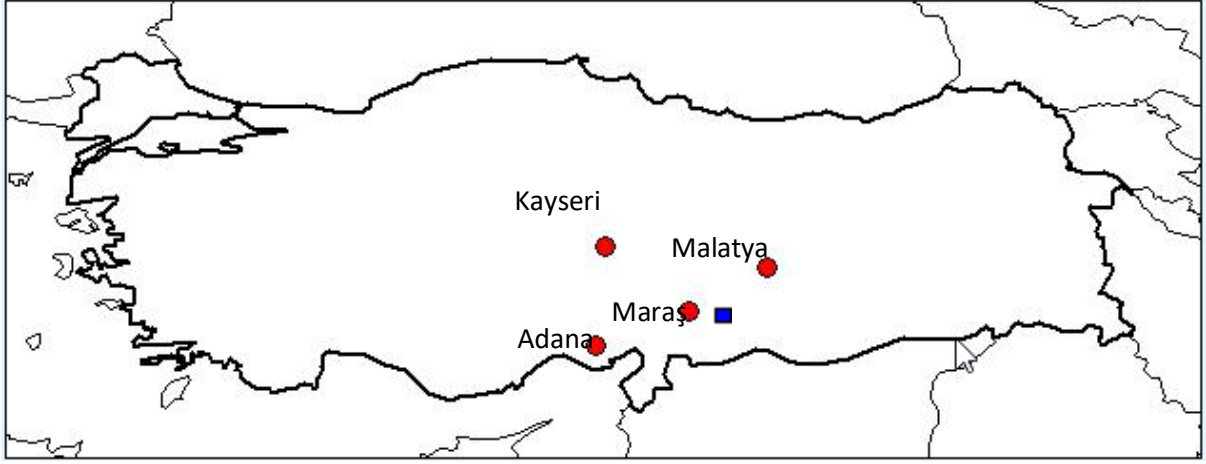
Şekil 2.3. *Cousinia foliosa* Boiss. & Bal. bitkisinin karelere göre yayılışı

B5 Kayseri: Dağlık bölge Aslan Dağ yüksekliği, Kapadokya, 5vii 1856, *Balansa* 697 (holo. G!)

B6 Maraş: Binboğa Dağının batı ayağı, Göksun’un 27 km kuzeyinde, 1540-1580 m, Hub.-Mor. 11180! Adana: Haçın (Saimbeyli) Karakilise doğru, *G. & B. Post* 538!

B7 Malatya: Bey Dağının batı yamaçları Malatyanın kuzeyi, 1650 m, Hub.-Mor. 8915!

C6 Malatya: Gölbaşı’ndan Sürgü’ye doğru, Erkenek’in 3 km güneyinde, 1250 m, Hub.-Mor. 15927! Maraş: Ahır Dağı Maraş’ın kuzeyi, *Hauskn.*



Şekil 2.4. *Cousinia foliosa* Boiss. & Bal. bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler (● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 5.cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplanma yerleri, ■ Çalışmamızda kullanılan *C. foliosa* bitkisinin toplandığı yer)

Cousinia foliosa Boiss. & Bal. bitkisinin herbaryum kayıtları

Sivas: Gürün, Güllübucak Köyü, 1800-1850 m, dağ stebi, (GAZI 3483)(!); C6 Kahramanmaraş: Engizeh Dağı, Mahmutlar Mahallesi kuzeyi, 1800-1900 m (GAZI 3348)(!); C6 Kahramanmaraş: Engizeh Dağı, Kale Köyü kuzeyi, 1800 m, yüksek dağ stebi, taşlık alanlar (GAZI 2348)(!); C6 Kahramanmaraş: Ahır Dağı, Çallıbalcı Mahallesi 1700-1800 m, step (GAZI 4093)(!); B6 Maraş: Habek Dağı, Göksunun güzeyi, 2000 m (ANK 20226)(!); B6 Maraş: Berit Dağı, 1400 m (ANK 20387)(!)

Cousinia foliosa Boiss. & Bal. bitkisinin halk arasındaki adları

Türkçe adı: Gümüş Kızan (Güner ve diğerleri, 2012)

Cousinia ramosissima DC. bitkisinin botanik özellikleri



Resim 2.4. *Cousinia ramosissima* DC.

Çok yıllık, 20-60 cm, dallanmış, girift dallara sahip. Gövdeler ince, silindirik, ağımsı-yünlü, erken çıplaklaşan. Yapraklar dikenli, ağımsı yünlü, erken çıplaklaşan ve yukarıda noktacıklı guddeli, aşağı kısmı sık beyaz kıtıksı; taban yaprakları 3 cm uzunluğunda kısa petiollere sahip, dikdörtgensi-lanseolat, c. 10x1,5-3,5 cm, düzensiz derin kesimli ve ya loplu, 1 cm uzunluğunda tüysüz sarı dikenlere sahip; gövde yaprakları nispeten küçük, 1 cm uzunluğunda kayıcıdan kamamsıya kadar kanatlı, en üst yapraklar dar lanseolat, 1-3x0,1-1 cm, az dikenli dişli ve çok uzun uç dikenlere sahip. Kapitula 10-30 ve daha çok, 7-12 çiçekli. İnvolukrum ovaldan dikdörtgensi ovala kadar, 0,8-1 cm genişliğinde dikenli, involukrum brakteleri 30-50, yatık, kısa üçgensiz-lanseolat, kıvrıkcık, $\pm$ noktacıklı guddeli, 1 mm uzunluğunda dikenlere sahip. Akenler kahve renkli, obovat-kamamsı, 4-5x2-3 mm, boyuna çizgili, tepe kesik veya kısa dentikulat (Davis, 1978: 350).

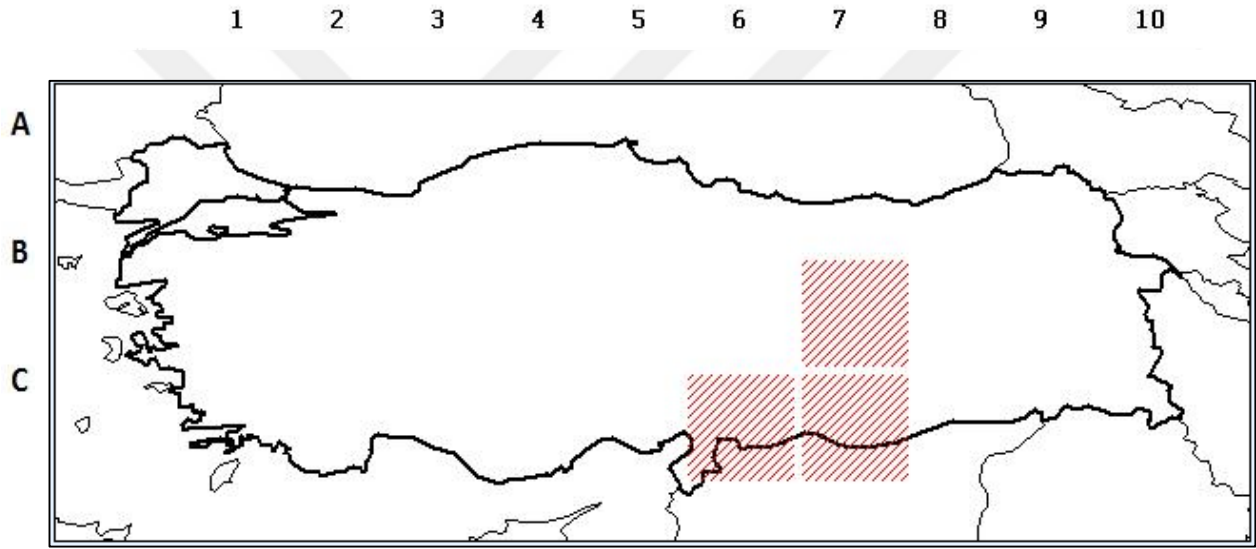
Ömür	: Çok yıllık
Çiçeklenme	: 5-6. ay
Habitat	: Kurak yamaç, step
Yükseklik	: 320-370 m

Element : İran-Turan
Türkiye dağılımı : Doğu Anadolu (Mezopotamya)
Genel Dağılımı : Lübnan, Suriye

Cousinia ramosissima DC. bitkisinin sinonimleri

C. drusorum Bornm. & Samuelsson in Feddes Rep. 40:342 (1936); *Arctium ramosissimum* (DC.) O. Kuntze, Rev. Gen. Pl. 1:308 (1891)! Ic: Jaub. & Spach, III. Pl. Or. 2:t. 171 (1846).

Cousinia ramosissima DC. bitkisinin Türkiye’de yayılışı

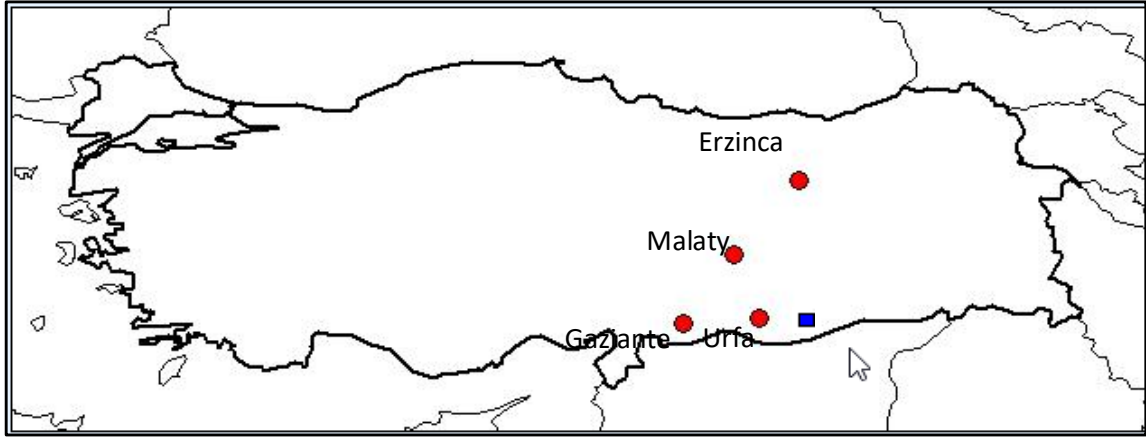


Şekil 2.5. *C. ramosissima* DC. bitkisinin karelere göre yayılışı

B7 (Türkiye, Malatya/Erzincan) Kapadokya Fırata kadar, *Aucher* 3544 (holo. G!)

C6 Mezopotamya, Gaziantep: Nizip’ten Birecik’e 13 km, 320 m, Hub.-Mor. 14657!

C7 Urfa: 4 km Doğu Birecik, 370 m, *Birand*!



Şekil 2.6. *Cousinia ramosissima* DC. bitkisinin Türkiye'de yetiştiği yerler (● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 5.cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplanma yerleri, ■ Çalışmamızda kullanılan *C. ramosissima* bitkisinin toplandığı yer)

Cousinia ramosissima DC. bitkisinin herbaryum kayıtları

C6 Şanlıurfa: Birecik, Çiftlik Köyü yolu, 570 m (GAZI 2721)(!); C7 Urfa: Birecik’e 4 km, küçük bir yavşan stebi (ANK 61)(!)

Cousinia ramosissima DC. bitkisinin halk arasındaki adları

Türkçe adı: Uzun Kızan (Güner ve diğerleri, 2012)

Cousinia stenocephala Boiss. bitkisinin botanik özellikleri



Resim 2.5. *Cousinia stenocephala* Boiss.

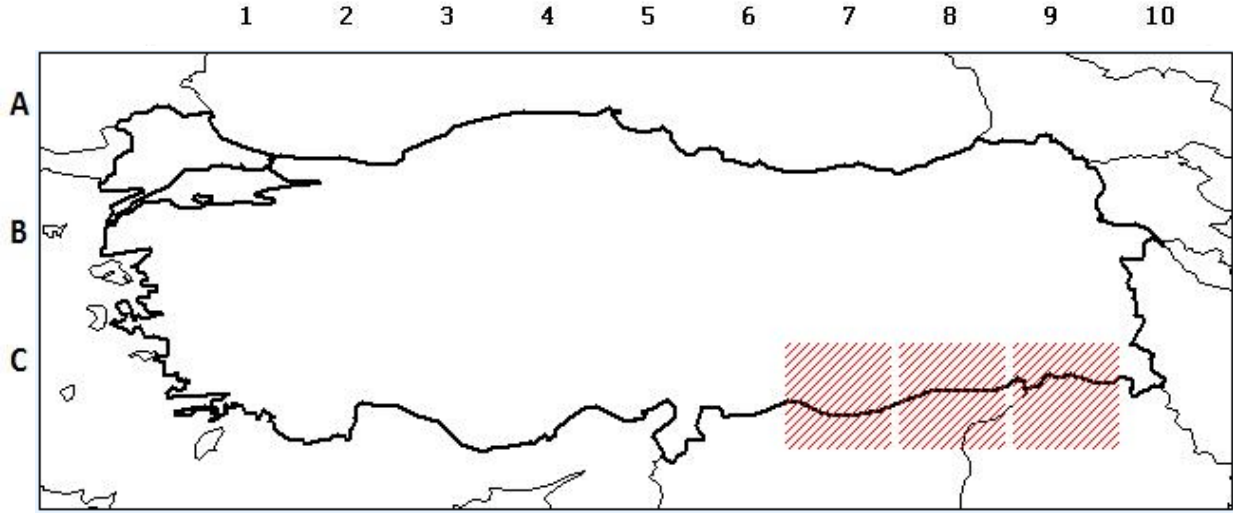
Çok yıllık, 15-60 cm, gövdenin taban kısmından dikotomik dallanmış, gevşekce korimboz. Gövdeler ince, silindirik, ağımsı-yünlü, çabuk çıplaklaşan ve tepede parlak, aşağıda sık beyaz kıtıksı, belirgin retikulat-damarlanmış; taban yaprakları dikdörtkensi, 6-19x3-7 cm, kademeli olarak 1-7 cm'e kadar daralan petiollere sahip, düzensiz kısa loplanmış ve dentat 1-5 mm dikenlere sahip; gövde yaprakları düzensiz küçülmüş, az sayıda $\pm$ düzenli dikenli dişlere sahip. Kapitula 5-50 veya daha çok, 4-10 çiçekli. Involukrum dikdörtkensi-silindirimsi, 0,8-1 cm geniş dikenlere sahip; involukrum brakteleri 12-30, beyaz-kıtıksı, lineardan linear-lanseolata kadar, 10 mm, çıplak, geri kıvrık, çatalı 2 mm'den uzun olmayan dikenli. Reseptakulum tüyleri pürüzsüz, çiçekler sarı veya kırmızımsı, 10-12 mm. Akenler parlak kahve, dikdörtken-obovat, 3-4x1,5-2,2 mm, tepesi kesik, tepesi hemen hemen marjinal ve dentikulat.

Ömür	: Çok yıllık
Çiçeklenme	: 5-7. ay
Habitat	: Step, boş tarla, Quercus koruluğu
Yükseklik	: 300-1000 m
Element	: İran-Turan
Türkiye dağılımı	: Doğu Anadolu (Mezopotamya)
Genel Dağılımı	: Batı İran, Irak, Suriye
Bulunduğu kareler	: C7, C8, C9

Cousinia stenocephala Boiss. bitkisinin sinonimleri

C. involucrata Boiss.; *Arctium stenocephalum* (Boiss.) O. Kuntze, Rev. Gen. Pl. 1:308 (1891)! Ic: Rech., Fl. Iranica 90:t. 76 (1972)

Cousinia stenocephala Boiss. bitkisinin Türkiye’de yayılışı

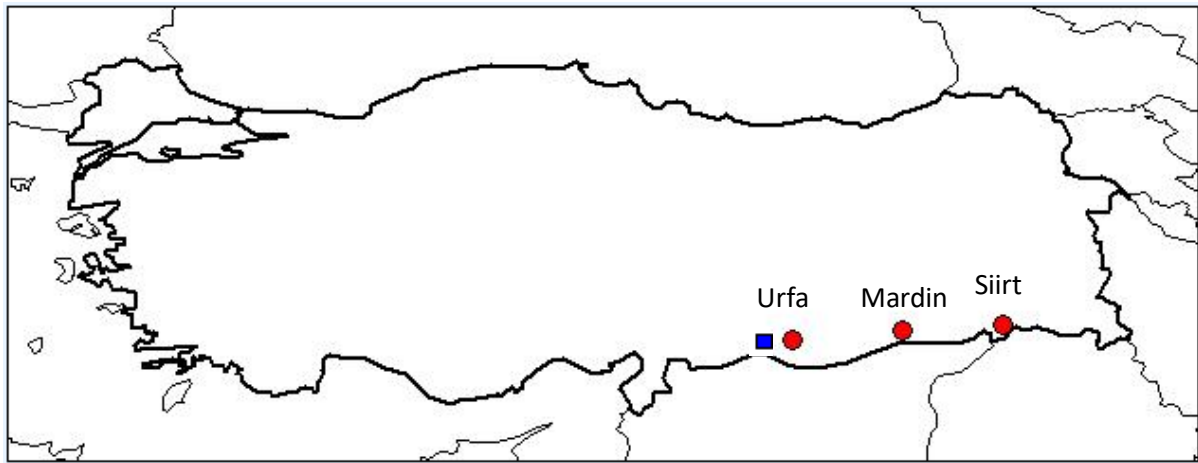


Şekil 2.7. *Cousinia stenocephala* Boiss. bitkisinin karelere göre yayılışı

C7 Urfa: Urfa, 1910, *Hand.-Mazz.*; Ceylanpınar’ ın 11 km batısında, 300 m, Hub.-Mor. 14659!

C8 Siirt: Cizre’in yukarısında Fındık, 1910, *Hand.-Mazz.* Mardin, *Sint.* 1888:1251!

C9 Siirt: Cizre, 1910, *Hand.-Mazz.*



Şekil 2.8. *Cousinia stenocephala* Boiss. bitkisinin Türkiye’de yetiştiği yerler (● Bitkilerin “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” 5.cildi’nde kayıtlı ve incelenen herbaryum örneklerinin toplanma yerleri, ■ Çalışmamızda kullanılan *C. stenocephala* bitkisinin toplandığı yer)

Cousinia stenocephala Boiss. bitkisinin herbaryum kayıtlar

C7 Şanlıurfa: Ceylanpınar, Beyazkule çevresi, 550m, (GAZI 2529)(!); C7 Şanlıurfa: Ceylanpınar, Hamit Köy çevresi, 570 m (GAZI 2646)(!), C7 Şanlıurfa: Ceylanpınar, Akrepli çevresi, 570 m, (GAZI 2594)(!); C7 Urfa: Ceylanpınardan Akçakaleye doğru 8 km, step (ANK 68)(!); C7 Urfa: Ceylanpınar Devlet Üretim Çiftliği 450 m (ANK)(!)

Cousinia stenocephala Boiss. bitkisinin halk arasındaki adları

Türkçe adı: Tel Kızan (Güner ve diğerleri, 2012)



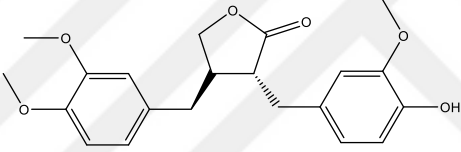
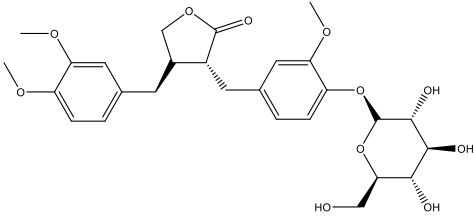
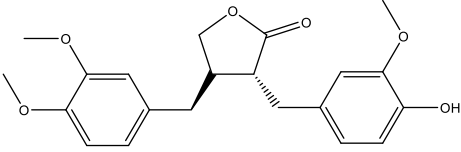
2.2. Fitokimyasal Çalışmalar

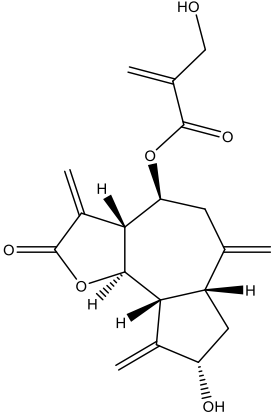
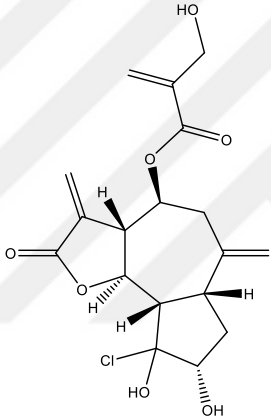
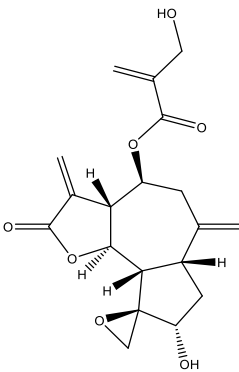
Bu kısımda, *Cousinia* türlerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar derlenmiştir.

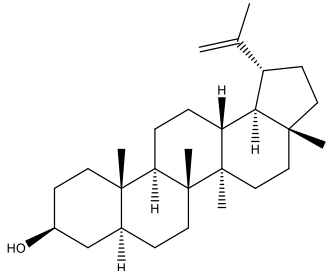
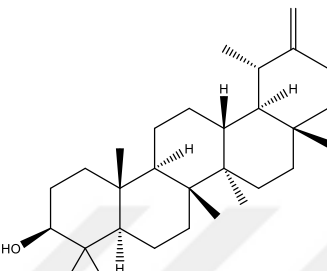
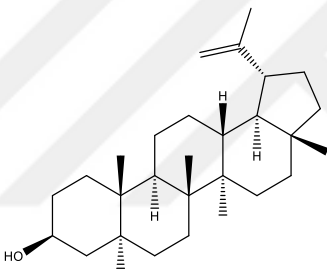
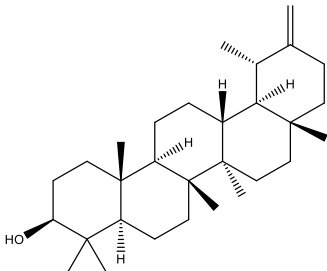
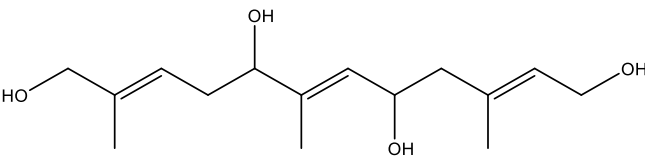
2.2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda farklı *Cousinia* türlerinden elde edilmiş bileşiklerin kimyasal yapıları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

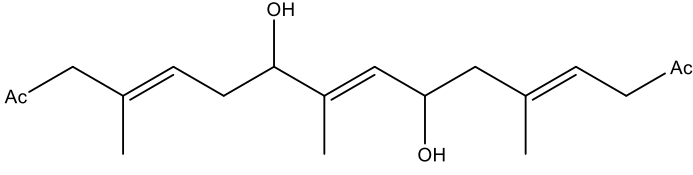
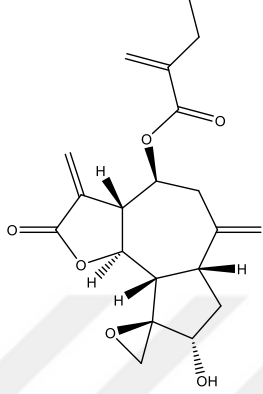
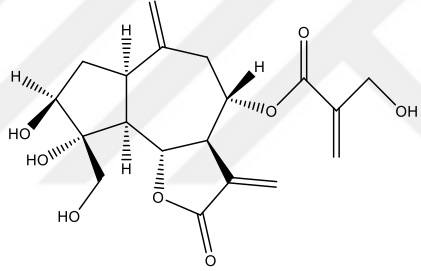
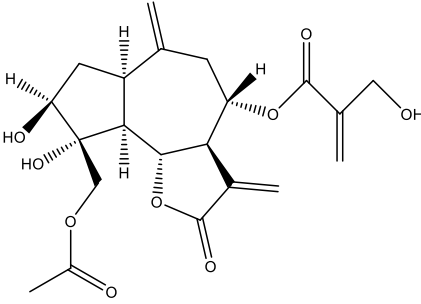
Çizelge 2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler

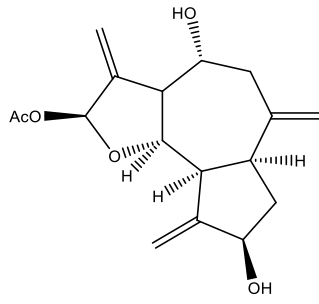
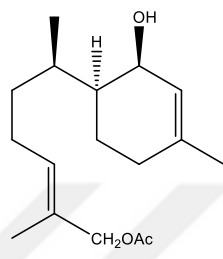
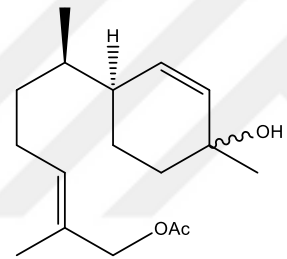
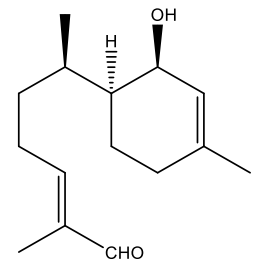
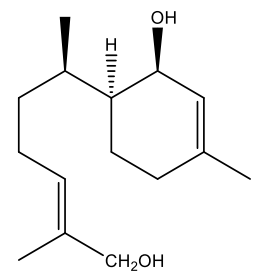
Bitki türü	Bileşik formülü ve adı	Kaynak
Fenolik bileşikler		
<i>C. aitchisonii</i>	 Arktigenin	Iranshahy ve diğerleri, 2016
<i>C. aitchisonii</i>	 Arktiin	Iranshahy ve diğerleri, 2016
<i>C. picheriana</i>	 Arktigenin	Marco ve diğerleri, 1993

Terpenik bileşikler		
<i>C. adenostica</i>	 Sinaropikrin	Suchy ve diğerleri 1960
<i>C. adenostica</i>	 Klorojanerin	Gonzalez ve diğerleri, 1978
<i>C. adenostica</i>	 Janerin	Seaman, 1982

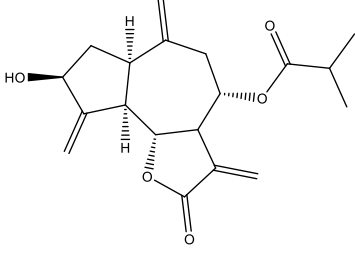
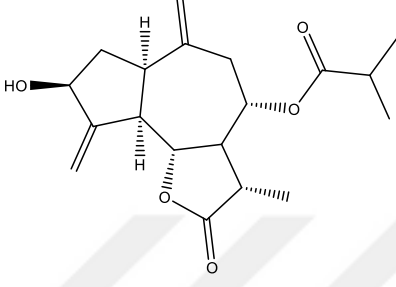
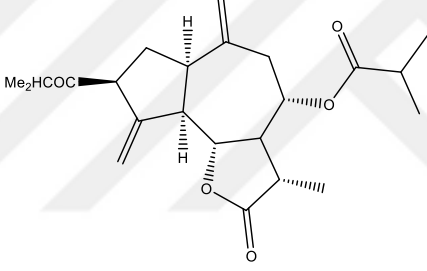
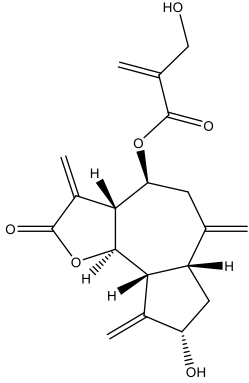
<i>C. adenostica</i>	 Lupeol	Rustaiyan ve diğerleri, 1987
<i>C. adenostica</i>	 Taraksesterol	Rustaiyan ve diğerleri, 1987
<i>C. adenostica</i>	 Lupeol	Rustaiyan ve diğerleri, 1987
<i>C. adenostica</i>	 Taraksesterol	Rustaiyan ve diğerleri, 1987
<i>C. adenostica</i>	 5,8,12 - trihidroksifarnesol	Rustaiyan ve diğerleri, 1987

Çizelge 2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler (devam)

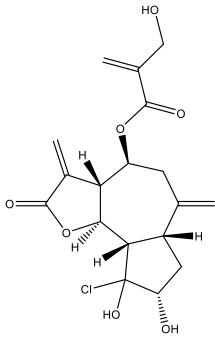
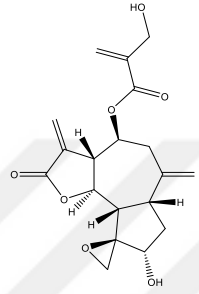
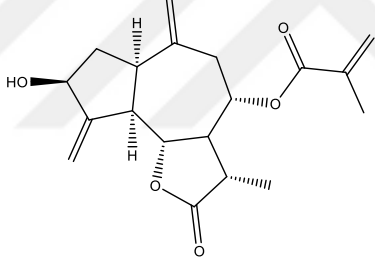
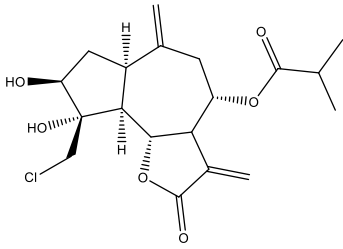
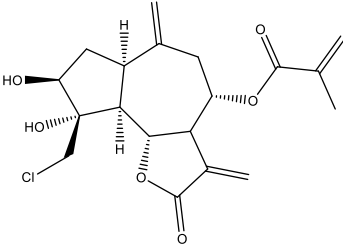
<i>C. adenostica</i>	 12 - asetoksi - 5,8 dihidroksifarnesil asetat	Rustaiyan ve diğerleri, 1987
<i>C. aitchisonii</i>	 Deoksijanerin	Iransahy ve diğerleri, 2016
<i>C. aitchisonii</i>	 Aitşisonolit	Iransahy ve diğerleri, 2016
<i>C. aitchisonii</i>	 Raserolit	Iransahy ve diğerleri, 2016

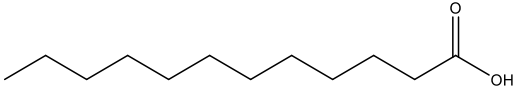
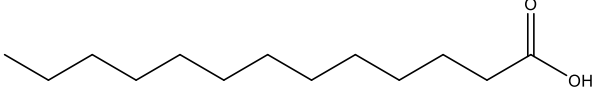
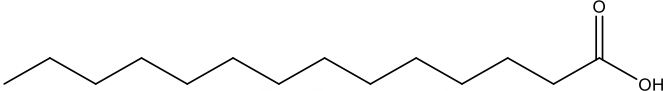
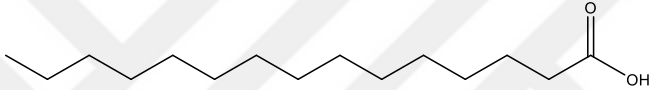
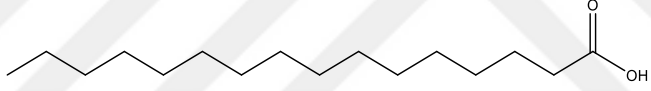
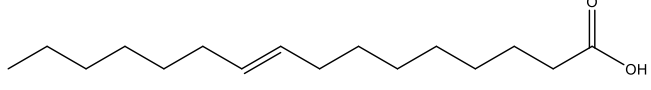
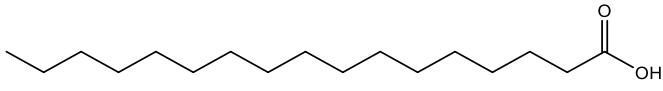
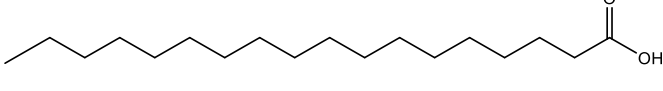
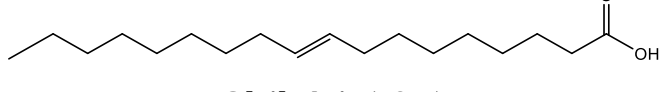
<i>C. canescens</i>	 Deasilsinaropikrin 3-asetat	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. canescens</i>	 12-asetoksibisabola-2,10E-dien-1-ol	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. canescens</i>	 12-asetoksibisabola-1,10E-dien-3-ol	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. canescens</i>	 1-hidroksibisabola-2,10E-dien-12-al	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. canescens</i>	 Bisabola-2,10E-dien-1,12-diol	Marco ve diğerleri, 1993

Çizelge 2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler (devam)

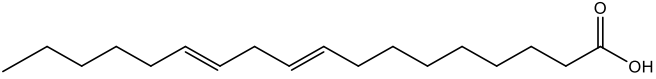
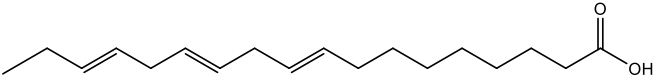
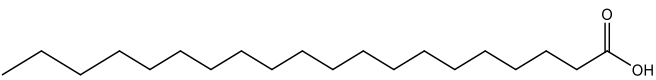
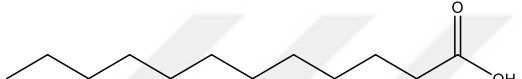
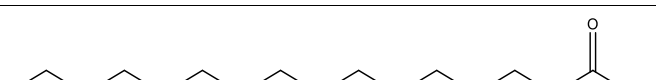
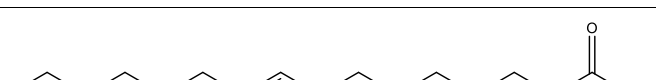
<i>C. picheriana</i>	 Aguerin A	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. picheriana</i>	 11 β, 13-dihydroaguerin A	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. picheriana</i>	 11 β, 13-dihydroaguerin A 3- isobutirat	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. piptocephala</i>	 Sinaropikrin	Marco ve diğerleri, 1993

Çizelge 2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler (devam)

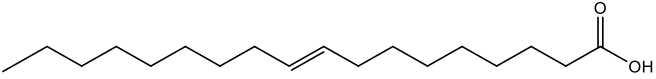
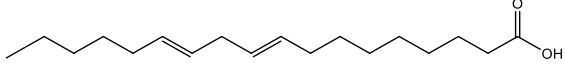
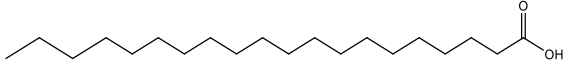
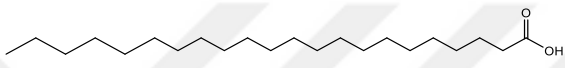
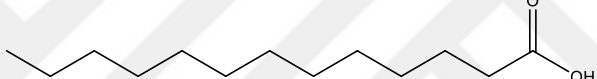
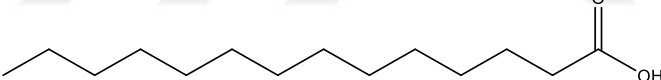
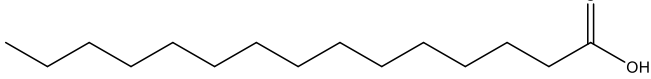
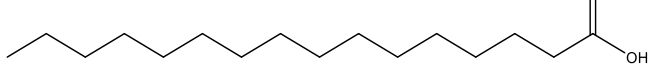
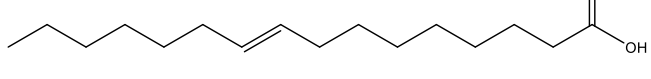
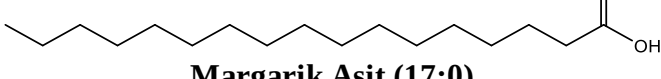
<i>C. piptocephala</i>	 Klorojanerin	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. piptocephala</i>	 Janerin	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. piptocephala</i>	 Aguerin B	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. piptocephala</i>	 Klorhidrin	Marco ve diğerleri, 1993
<i>C. piptocephala</i>	 Liniklorin A	Marco ve diğerleri, 1993

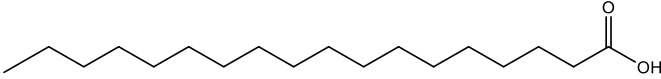
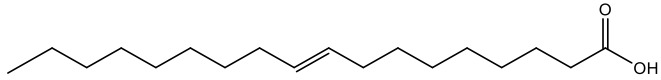
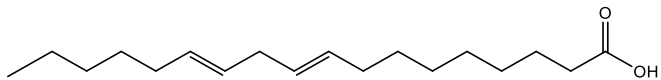
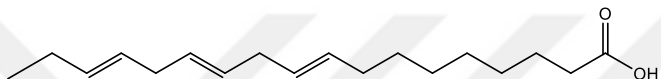
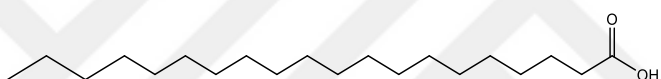
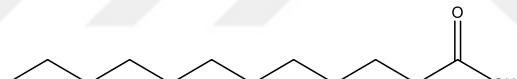
Yağ asitleri		
<i>C. aurea</i>	 Laurik Asit(12:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Tridesilik Asit (13:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Miristik Asit (14:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Pentadekanoik Asit (15:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Palmitik Asit (16:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Palmitoleik Asit (16:1)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Margarik Asit (17:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Stearik Asit (18:0)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Oleik Asit (18:1)	Ul'chenko ve diğerleri, 1999

Çizelge 2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler (devam)

<i>C. aurea</i>	 Linoleik Asit (18:2)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 α-Linolenik Asit (18:3)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. aurea</i>	 Araşidik Asit (20:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. seversovii</i>	 Laurik Asit(12:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Miristik Asit (14:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Pentadekanoik Asit (15:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Palmitik Asit (16:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Palmitoleik Asit (16:1)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Margarik Asit (17:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Stearik Asit (18:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981

Çizelge 2.1. *Cousinia* türlerinden izole edilen bileşikler (devam)

<i>C. seversovii</i>	 Oleik Asit (18:1)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Linoleik Asit (18:2)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Araşidik Asit (20:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. seversovii</i>	 Behenik Asit (22:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1981
<i>C. umbrosa</i>	 Tridesilik Asit (13:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Miristik Asit (14:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Pentadekanoik Asit (15:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Palmitik Asit (16:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Palmitoleik Asit (16:1)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Margarik Asit (17:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999

<i>C. umbrosa</i>	 Stearik Asit (18:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Oleik Asit (18:1)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Linoleik Asit (18:2)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 α-Linolenik Asit (18:3)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Araşidik Asit (20:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999
<i>C. umbrosa</i>	 Laurik Asit(12:0)	Ul'chenko ve diğçerleri, 1999

2.3. *Cousinia* Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.3.1. Sitotoksik etki

Yapılan bir çalışmada farklı *Cousinia* türleri toplanmış ve etanol ekstraktları hazırlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar fibrokarsinoma hücre hattında sitotoksik taramaya tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre tüm ekstraktlarda önemli sitotoksik etki görülmesine rağmen en yüksek aktivite *C. verbascifolia* türünde gözlenmiştir ($IC_{50} = 18,4 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$) (Sajjadi ve diğerleri, 2015).

Iranshahy ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *C. aitchisonii* türünün diklorometan ekstresinden elde edilen dezoksijanerin ve raserolit adlı seskiterpen bileşikler beş farklı hücre hattında sitotoksik taramaya tabi tutulmuştur. Tarama sonucunda her iki maddenin meme kanseri MCF-7 hücre hattında anlamlı sitotoksik etki gösterdiği (sırasıyla $IC_{50} = 4,5 \mu\text{g/mL}$ ve $4,6 \mu\text{g/mL}$) görülmüştür (Iranshahy ve diğerleri, 2016).

2.3.2. Antikanser etki

C. shulabadensis türü üzerinde yapılan bir çalışmada bitkinin MMP inhibitör etkisi araştırılmış ve doza bağlı etki gösterdiği bildirilmiştir ($IC_{50} = 49,2 \pm 0,51 \mu\text{g/mL}$) (Shahverdi ve diğerleri, 2007a).

2.3.3. Antibakteriyel etki

Yedi farklı *Cousinia* türünün etanol ekstraktlarının antibakteriyel etkilerinin araştırılması amaçlı yapılan bir çalışmada farklı Gram(+) ve Gram(-) suşlarda disk difüzyon metodu ile tayin edilmiş ve en yüksek etkiyi *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* bakterilerine karşı *C. phyllocephala* ekstresinin gösterdiği bildirilmiştir (MIC= 4 mg/disk) (Shahverdi ve diğerleri, 2007b).

2.4. Kanserin Tanımı ve Özellikleri

Kanser Dünya ve Türkiye genelinde bugün kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelen ölüm sebebidir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl dünya genelinde 8 milyondan çok insan kanser nedeniyle yaşamlarını yitirmektedir (Boyle ve Levin 2008:85-95; Stewart ve Wild 2014).

Kanser, vücudun belirli organ veya dokusunda beliren bazı hücrelerin kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde çoğalması sonucu oluşan hastalıktır. Tümörlerin iki türü vardır: iyi huylu (yayılma özelliği olmayan “benign” tümörleri) ve kötü huylu (vücutta yayılabilen “malignan” tümörleri). Kanser vücutta lenf ve kan yoluyla (metastaz) uzak dokulara yayılabilmek özelliğine sahiptir. Oluşum ve şekil farklılıklarına rağmen, kanserlerin ortak özelliği invazyon ve metastaz yapma, hücre bölünmesinin sıklıkla uyarılması, büyüme baskılayıcılarından kaçınma, genomik kararsızlık, hücre ölümüne karşı direnç, anjiyogenezin indüklenmesidir (Chu ve Sartorelli, 2007: 878-907).

Kanserin gelişim süreci 3 aşama şeklinde verilebilir; başlama, yükselme ve ilerleme. Başlama evresinde hücrede gen ekspresyonunu regüle eden kromosom ve DNA hasarı meydana gelmektedir. İlerleme aşaması genomik dayanıksız hücrelerin selüler büyümesinin uzun bir evresi olup enflamasyonla desteklenmektedir. İlerleme aşamasında hücreler genomunda hasara sebep olmakla kendileri bir invazif malignant tümör hücrelerine dönüşürler (Reuter ve diğerleri, 2010).

Yüzü aşkın sayıda tipleri bulunan bu hastalık köken aldığı dokuya göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

1. Epitelyal hücrelerden meydana gelenler – Karsinom
2. Mezoderm hücrelerinden meydana gelenler – Sarkom
3. Salgı bezi hücrelerinden meydana gelenler – Adenokarsinom (Hanahan ve Weinberg, 2000)



Şekil 2.9. Kanser hücresinin karakteristik özellikleri

2.4.1. Kanser oluşumunun nedenleri

Kanserin kesin sebebi bilinmemekle birlikte oluşumundaki faktörler aşağıdaki gibi listelenebilir:

- Genetik faktörler
- Radyasyon
- Viral ve immünolojik faktörler
- Kimyasal ve fiziksel maddeler
- Beslenme

Genellikle olguların %50'ni beslenme ve diyet ile ilgili faktörler oluşturmakta ve bunu sigaranın (%35) izlediği bilinmektedir. Bunun dışında %5'lik oranı mesleki, %10'luk kısmı ise geri kalan faktörler oluşturmaktadır. Aynı zamanda alkol, cinsel davranış, obezite, hava kirliliği ve stress de kansere sebep olan faktörler arasındadır. Bu faktörler kişide doğrudan gen hasarına yol açtığı gibi genetik olarak da görülmektedir (Güran, 2005).

Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi veya bunların kombinasyonu kullanılmaktadır. Hastaların bireysel özellik ve hastalık durumuna

göre belirlenen bu tedaviler kanseri tamamen yok etmeğe yönelik olduğu için aktif tedavi yöntemleri olarak bilinmektedir.

Kanser tedavi yöntemleri iyileştirici, destekleyici ve palyatif olarak üçe ayrılır. *İyileştirici tedavide* hastalığı ortadan kaldırmak amaçlandığı halde *destekleyici tedavide* cerrahi müdahale sonrasında geriye kalan kanserli hücrelerin yok edilmesi hedeflenmektedir. *Palyatif tedavide* ise kanseri önlemek amaçlı birçok tedbirler alınması amaçlanmaktadır (yaşam kalitesini arttırmak, yaşam süresini uzatmak, kansere neden olacak sebepleri engellemek).

Kanserden korunma yolları ise *birincil*, *ikincil* ve *üçüncül* koruma olarak sıralanmaktadır. *Birincil korumada* kansere sebep olacak her tür kanserojen madde ve oluşum engellenmektedir. *İkincil koruma* ise erken tanıyla kanseri belirleyip önlem almak, *üçüncül koruma* ise kanserli hastanın optimum tedavisini yaparak hastanın erken ölümünü engellemektir (Lebovits ve diğerleri, 1984).

Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaçların birçoğu doğrudan DNA sentezini gerçekleştirmekle etki edecek şekilde tasarlanmıştır. Yeni nesil ilaçlar ise doğrudan DNA sentezleyerek değil hücre siklusunu, büyüme faktörü ve reseptörlerini, aynı zamanda DNA onarımı ve apoptozu regule ederek etki etmesi amaçlanarak tasarlanmaktadır (Ziegler ve diğerleri, 1993). Kanser tedavisinde kullanılan ilaç grupları a) alkilleyici ajanlar, b) antimetabolitler, c) sitotoksik antibiyotikler ç) Vinca alkaloidleri ve bitkisel kaynaklı diğer ilaçlar, d) sisplatin, diğer platin türevleri ve amifostin, e) protein kinaz inhibitörleri, f) hormon ve hormon antagonistleri, g) monoklonal antikorlar, ğ) diğer antineoplastik ilaçlar olmakla sıralanabilir (Johnstone ve diğerleri, 2002).

2.4.2 Akciğer ve kolon kanseri

Kolon kanseri (kolorektal veya rektal kanser) Dünya genelinde ölüm sebepleri arasında erkekler arasında üçüncü kadınlar arasında ise ikinci sırada, Türkiye Sağlık Bakanlığı'nın 2007-2008 verilerine göre ise kolorektal kanser, tanısı konulan kanser tanıları arasında üçüncü sırada gelmektedir. Her yıl 1 milyon insana kolon kanseri tanısı konulmakta ve 500,000 insan bu hastalıktan ölmektedir (Winawer, 2007).

Kolorektal kanser oluşumuna genetik, çevresel ve aynı zamanda yaşam tarzı gibi pek çok faktörün sebep olduğu bildirilmektedir. Kolon kanseri sporadik, genetik ve ailevi olmakla üç şekilde meydana gelebilir. Her ne kadar kolon kanseri olgularının çoğunluğu sporadik

olsa da, vakaların %10'unun kalıtsal olduğu düşünülmektedir. En yaygın iki genetik kolon kanseri türü *ailesel adenomatöz polipozis* ve *genetik nonpolifozisli* kolorektal kanserdir.

Küresel epidemiyolojik ve bilimsel araştırmalara dayanarak, kolorektal kanser riskinin işlenmiş ve işlenmemiş et tüketimiyle arttığını ve gıda bileşiminin bağırsakta mikrobik metabolizmaya etki ederek kanser riskini etkilediğini göstermektedir. Bağırsak florası, enterik enzimler tarafından sindirime dirençli olan kompleks diyet artıklarını fermente etmek için gereken enerjiyi vücudun metabolik ihtiyaçları için kullanılan kısa zincirli butirik yağ asitlerini parçalamakla sağlar. Butiratlar antineoplastik özelliklere sahip genellikle kolonositlerin tercih ettiği enerji kaynağıdır. Bu bileşikler mukozal bütünlüğü koruyarak bağışıklık, gen ve epigenetik modülasyon üzerindeki etkileriyle iltihabı ve karsinogenezi baskılar. Safra asidi ile uyarılmış protein kalıntıları ve yağlar da, neoplastik progresyon riskini arttıran mikrobiyot tarafından inflamatuvar ve/veya karsinojenik metabolitlere metabolize olur.

Kolorektal kanser oluşumu tipik çok adımlı bir süreçtir: adenomatöz polipozis coli (apc) veya p53 tümör süpresör geni gibi önemli onkojenlerde birkaç mutasyon meydana getirmekle hücre değişikliği ve kontrolsüz proliferasyonu tetikler. Dahası, bu mutasyonlar siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunun normal bağırsak mukozasına kıyasla kolon karsinomlarında % 80 kadar artmasına neden olmaktadır (Eberhart ve diğerleri, 1994).

Akciğer kanseri kansere bağlı ölümlerin dörtte birini oluşturmakla dünya genelinde en çok ölüme sebep olan kanser türlerindendir. Hızla yayılabilen bu kanser türüne sebep olan faktörler arasında sigara kullanımı ön sıralarda yer almaktadır. Sigara içenlerde içmeyenlere göre risk faktörü 10 kat fazladır. Kişinin sigara içme yaşına, sıklığına ve süresine bağlı olarak kansere yakalanma süresi de farklı olabilir. Bu sebepler dışında sigara yan dumanı, asbest, radon, arsenik, nikel ve hava kirliliğine maruz kalma da akciğer kanserine yakalanma sebepleri arasındadır. Bunun dışında p53 genindeki mutasyonlar da bu kanser türüne sebep olmaktadır.

Akciğer kanserlerinin skuamoz hücreli akciğer kanseri (SHAK), adenokarsinoma (AdenoKA), küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK), büyük hücre anaplastik karsinomalar (BHAK) gibi tipleri vardır (Miller, 2005).

2.5. Sitotoksisite

Sitotoksisite hücrelerin kontrolsüz çoğalmasının inhibe edilerek engellenmesi ve hücrenin hem yapısı hem de fonksiyonlarının belirgin olarak hasar görmesidir.

Sitotoksisite testler ise hücrelerde meydana gelen bu hasarların belirlenip hangi ölçüde meydana geldiğini saptamaktır. Bu şekilde sitotoksik etkisi ölçülerek maddenin seçilen hücreler üzerindeki toksik etkileri ortaya çıkarılır. (Celis, 2006: 315-324).

Sitotoksisite çalışmalarının amaçları:

- Potansiyel ilaç etken maddelerinin belirlenmesi
- Seçilen maddelerin toksik etki mekanizmasının belirlenmesi
- Antikanser aktivite için ön tahminlerin belirlenmesi
- Potansiyel hedef hücre popülasyonunun tanımlanması
- Toksik doz aralığının belirlenmesi
- Konsantrasyon etki ilişkisi

Sitotoksisite ölçümünde kullanılan yöntemler kalitatif ve kantitatif olmak üzere ikiye ayrılır:

Kalitatif yöntemler: ekstraksiyon, agar difüzyon, doğrudan kontakt.

Kantitatif yöntemler: Tripan Mavisi ile Boyama, Nötral Red ile Boyama, Alamar Mavisi Testi, MTT, XTT, MTS, WST -1, ATP Testi, LDH ve SRB (Berridge ve diğerleri, 2005).

Tripan Mavisi Testi: Tripan mavisi negatif yüklü bir boya olmakla hücre membranı hasar görmüş cansız hücreler tarafından absorbe edilerek mavi renk alırlar.

Nötral Kırmızısı Testi: (3-amino 7-dimetiamino-2 metil fenazin hidroklorür) zayıf katyonik bir boya olmakla 40 µg/mL konsantrasyonda canlı hücrelere aktif transport yolu ile geçerek hücreleri boyar.

Alamar Mavisi Testi: Floresan ve toksik özelliği olmayan mavi renkli resazurin maddesi hücre içine girerek kırmızı floresan veren resofurine indirgenir. Renk şiddeti 570 nm 'de ölçülür.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Testi: Sarı renkli tetrazol boyası olan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) canlı hücrelerde indirgenerek çözünmeyen farmazan tuzuna dönüşerek pembe mor renk alır. Hücreler 3-4 saat % 5'lik CO₂ 'li inkübatörde 37°C'de inhibe edilir. 570 nm'de ölçüm yapılır. (Martin, 1992)

2,3-bis-(2-metoksi-4nitro-5-sufofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilit (XTT) Testi: Tetrazolium türevi olan XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4nitro-5-sufofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilit) hücreler tarafında belirli sürede indirgenerek suda çözünebilir formazan tuzuna dönüşür. Sonuçlar 450-570 nm'de okunur (Zhao ve diğerleri, 2002).

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) Testi: Tetrazolium türevi olan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) farmazon tuzuna indirgenir ve formazan miktarı canlı hücre miktarı kadardır. Bu test MTT testinin bir basmağı gibi de kabul edilir. Renk şiddeti 490-500 nm'de ölçülür. (Malich ve diğerleri, 1997)

Water Soluble Tetrazolium Salt-1 (WST-1) Testi: Canlı hücrelerde tuzların ayrıştırılmasına dayanır. MTT'den farkı indirgenme prosesinin hücre dışında olmasıdır. Oluşan farmazon boya canlı hücreleri boyayarak renk şiddeti ölçülür.

Lactate dehydrogenase (LDH) Testi: Hücre zarı lizise uğradıktan sonra ortama salgılanan LDH NADH oluşturarak tetrazolium tuzu substratı ile reaksiyon sonucu sarı turuncu renk meydana getirerek bu renk şiddeti spektrometrede ölçülür. Bu değer hücre zarı lizise uğramış hücre sayısı ile doğru orantılıdır. (Fotakis ve Timbrell, 2006)

Adenosine triphosphate bioluminescence (ATP) Testi: Lusiferaz enzimi lusiferin oksidasyonu için ATP kullanır. Bu sırada meydana gelen ışımının şiddeti hücredeki ATP miktarı ile paraleldir. (Riss ve diğerleri, 2011)

Sulforadamin B (SRB) Testi: Yöntemin esası sulforadamin B maddesinin canlı hücrelerde elektostatik bağlarla proteinlere bağlanarak pembe mor renk meydana getirmesidir. Sonuçlar 560-580 nm'de microplate okuyucuda ölçülür. (Martin, 1992)

2.6. Oksidan ve Antioksidanlar

Serbest radikaller bir veya birden fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Serbest radikallerin türlerinden biri reaktif oksijen türleridir (ROT). Reaktif oksijen türleri de hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid peroksit (LOOH), singlet oksijen, hidroksil radikali ($\bullet OH$), peroksil radikali ($ROO\bullet$) ve peroksinitrit ($-OONO$) gibi birçok oksidanlar içermektedir. Bu moleküllerin hücre zarı yapısında bulunan yağ asitleri, DNA'da bulunan nükleotitler ve proteinlerdeki sülfidril bağları ile reaksiyona girerek hücre hasarına yol açtığı bilinmektedir (Machlin ve Bendich, 1987).

Serbest radikaller kararlı hale geçebilmek için diğer moleküllerin yapılarını bozarak zincirleme reaksiyon başlatırlar. Antioksidanlar ise kendileri elektron verici olarak davranır ve serbest radikallerin kararlı hale geçmesini sağlarlar. Bu şekilde serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasında denge oluşmaktadır. Bu nedenle antioksidanlar serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önleyerek hücre ve dokuların bütünlüğünü sağlarlar.

Antioksidanların etki mekanizmaları Süpürme etkisi (Scavenging), Söndürme etkisi (Quenching), Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking), Onarma etkisi (Repair), Hücresel kinaz kayıplarını önleme, Enzimatik etki olarak sıralanabilir. (Aydemir ve Karadağ Sarı, 2009)

ROS'ların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta çeşitli 'antioksidan savunma sistemler' i mevcuttur. Bu savunma sistemlerinden a) süpürücü antioksidanlar (askorbik asit α - tokoferol, tiyoller, β -karoten), b) enzimatik antioksidanlar (katalaz, paraoksonaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz), c) sentetik antioksidanlar (N-asetilsistein, allopurinol, probakol, penisilamin), ç) koruyucu antioksidanlar (transferrin, albümin, seruloplasmin, ferritin) bildirilmiştir (Atalay ve Laaksonen, 2002).

2.6.1. Doğal antioksidanların önemi

Günümüzde birçok sentetik antioksidanların (BHT (bütillenmiş hidroksi toluen), BHA (bütillenmiş hidroksi anisol) ve TBHQ (tersiyer bütıl hidrokinon)) kullanımı olası yan etkileri nedeniyle sınırlandırılmaktadır. Bu açıdan doğal antioksidanlar daha çok tercih nedenidir. Doğal antioksidanlara enzimler (katalaz CAT, hidroksiperoksidaz),

makromoleküller (seruloplazmin, myoglobin, ferritin) ve mikromoleküller (β -karoten, A,C,E vitaminleri, glutation (GSH)) örnek verilebilir (Sabbobeh ve diğerleri, 2016). Bunun dışında besinler, tıbbi bitkiler ve fitokimyasal bileşiklere büyük ilgi duyulmaktadır. Fitokimyasallardan özellikle polifenollerin (flavanoitler, fenilproponoitler, fenolik asit ve tanenler) antioksidan etkileri bilinmektedir. Bu bileşiklerin bir veya daha fazla fenolik gruptan oluşan yapılar içermesi nedeniyle elektron verici olarak davranarak antioksidan etki gösterdikleri bilinmektedir. Aynı zamanda çeşitli *Salvia* türlerinin rozmarinik asit ve kamosik asit içermesi nedeniyle güçlü serbest radikal süpürücü etkisinin olduğu ve bu nedenle bazı ülkelerde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Al-Qudah ve diğerleri, 2014).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bitkisel materyal

Cousinia davisiana, *C. foliosa*, *C. ramosissima* ve *C. stenocephala* bitkilerinin toplandığı yer, tarih, herbaryum numarası Çizelge 3.1. de verilmiştir. Bitkilerin teşhisi Prof. Dr. Osman Tugay tarafından yapılmıştır. Bitkilere ait herbaryum örnekleri Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesine ait herbaryumda saklanmaktadır.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Bitkilere Ait Bilgiler

Bitki adı	Toplandığı yer	Toplama tarihi	Herbaryum No
<i>C. davisiana</i>	Karaman; Ermenek doğusundan	26.07.2015	KNYA 26.976
<i>C. foliosa</i>	Kahramanmaraş; Ahir Dağı'ndan	27.07.2015	KNYA 26.977
<i>C. ramosissima</i>	Şanlıurfa, Birecik çevresinden	28.07.2015	KNYA 26.978
<i>C. stenocephala</i>	Şanlıurfa, Ceylanpınar çevresinden	28.07.2015	KNYA 26.979

3.1.2. Kullanılan kimyasal madde ve çözücüler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal madde ve çözücüler Merck (asetik asit, aseton, metanol, diklorometan, etilasetat, *n*-hekzan, *n*-butanol, siklohekzan, formik asit, petrol eteri, kloroform, dötero dimetil sulfoksit, dötero kloroform, kolon kromatografisi için silikajel 60, silikajel 60 HF 254 hazır plak, RP 20 x 20 alüminyum hazır plak, kolon kromatografisi için RP 18, DMEM, SRB), Mediatech (RPMI, Penicillin-Streptomycin), Genaxxon (FBS) ve Gibco (Trypsin-EDTA) firmalarından temin edilmiştir.

Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri ve adsorbanlar ile hangi yöntemlerde kullanıldıkları Çizelge 3.2 ve 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Çözücü Sistemi	Kromatografik yöntem
Siklohekzan-CH ₂ Cl ₂ -H ₂ O (7:4:1)	SFK
Toluen-EtOAc (1:1)	İTK
CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5), (99:1), (90:10), (90:10:1)	p-İTK, İTK
CHCl ₃ - <i>n</i> -Hekzan (1:1), (1:0)	SK
CHCl ₃ -CH ₃ OH-H ₂ O (61:32:7), (80:20:2), (70:30:3), (90:10:1)	SK, İTK
EtOAc-CH ₃ OH-HCOOH-H ₂ O (100:13,5:2,5:10)	İTK
EtOAc-CH ₃ OH-H ₂ O (100:13,5:10)	SK
P.E.- EtOAc (99:1), (95:5), (90:10), (80:20), (70:30), (50:50)	SK
<i>n</i> -Hekzan- EtOAc (95:5)	İTK, p-İTK
<i>n</i> -Hekzan- EtOAc (99,5:0,5), (99:1), (99:2), (99:3) (99:4), (100:5)	SK, İTK
CH ₃ OH -H ₂ O (20:80), (25:75), (30:70), (35:65), (40:60), (50:50), (60:40), (80:20), (100:0)	OBSK
A: CH ₃ COOH-H ₂ O (1:99) B: CH ₃ COOH- CH ₃ OH (1:99) A: HCOOH-H ₂ O (0,5:99) B: HCOOH-CH ₃ OH (0,5:99)	LC-MS/MS

İTK: Normal faz silika jel ince tabaka kromatografisi, **Prep. OBSK:** Preparatif orta basınçlı sıvı kromatografisi, **p- İTK:** Preparatif normal faz silika jel ince tabaka kromatografisi, **RP:** Ters faz kolon kromatografisi, **SFK:** Sephadex LH-20 kolon kromatografisi, **SK:** Silika jel kolon kromatografisi

Çizelge 3.3. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Yöntem	Adsorban
İTK	Normal faz silika jel (Hazır alüminyum plak, Kieselgel 60 F ₂₅₄ 0,2 mm, Merck 5554) Ters faz silika jel (Hazır alüminyum plak, Merck 105559)
KK	Normal faz silika jel (Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm, Merck 7734) (Sephadex LH-20, Fluka)
LC-MS/MS	Ters faz silika jel (Restek C18, 150mm x 4,6mm; partikül çapı 3µm)
Prep. OBSK	Normal faz silika jel (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck) Ters faz silika el

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve ilgili bilgiler Çizelge 3.4 de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar

IR Spektrofotometresi	Perkin Elmer 400 FT-IR/FT-FIR Spectrometer Spotlight 400 Imaging System
UV Spektrofotometresi	Shimadzu UV-1800
Mikroplak okuyucu	Biotek Synergy HT, Gen5
NMR Spektrometresi	Bruker Avance III HD 600 MHz
Liyofilizatör	Labconco Freeze
Rotavapor	Büchi
UV Lambası	Camag (Tip: 29000)
Kromatografi Tankı	Camag (cam küvet, 22 x 23 x 8 cm)
Orta Basınçlı Sıvı Kromatografisi Cihazı	Büchi C-620
Ultrasonik Banyo	Wiseclean WUC- DOGH/DIOH/D22H
Etüv	Memmert Expertsin Thermostatics
Vorteks karıştırıcı	Velp scientifica

pH metre	Inolab pH 720 WTW
LC-MS/MS	Shimadzu 8040



3.2. Yöntem

3.2.1. Kromatografik yöntemler

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kolon kromatografisi çalışmalarında elde edilen fraksiyonların incelenmesi ve bileşiklerin şahit maddeler ile karşılaştırılmasında, normal faz ve ters faz silika jel kaplı hazır aluminyum plaklar kullanıldı.

Numune Tatbiki: Numuneler bir cam kapiler yardımıyla, plağın alt ucunun 1 cm yukarısından ve 0.6 cm aralıklarla tatbik edildi. Uygun çözücülerle doyurulmuş kromatografi tankına konulan plaklar 7-10 cm mesafe boyunca develop edildi.

Lekelerin Belirlenmesi: Plaklara vanilinin derişik sülfürik asit içindeki % 1'lik çözeltisi püskürtölüp 105-110 °C'de birkaç dakika ısıtılmasının ardından lekeler UV lamba ile 254 ve 366 nm'de belirlendi.

Preparatif Tabaka Kromatografisi (PLC)

Numune Tatbiki: Fraksiyonlar, 20x20 cm, 1mm kalınlığında hazır cam plağa 20 mg'dan fazla olmayacak şekilde, tatbik edilerek fraksiyondaki maddelerin sürüklenme mesafesi ve yoğunluğuna göre bir veya birkaç kez sürüklendi.

Lekelerin Belirlenmesi: Plağın kenarından 1 cm genişliğinde kısma reaktif püskürtölerek UV aktif olmayan maddeler 254 ve 366 nm'de belirlendi.

Normal faz silika jel kolon kromatografisi (CC)

Kolonun hazırlanması: Tatbik edilecek ekstre veya fraksiyonun miktarına göre belirlenen silika jel tartılarak yeterli miktarda başlangıç çözücü sistemi ile süspansiyon haline getirilerek alt ucuna cam pamuğu yerleştirilen cam kolona aktarıldı. Kolondan yeterli miktarda çözücü sistemi geçirilerek adsorbanın yerleşmesi sağlandıktan sonra adsorban üzerinde 2 - 3 mm çözücü kalıncaya kadar beklendi ve çözücü sisteminde çözülmüş olan numune kolona tatbik edildi. Adsorban yüzeyinin bozulmaması için üzerine pamuk yerleştirildi.

Kolon Kromatografisi İçin Numune Tatbiki

A. Yaş tatbik: Başlangıç çözücüsünde çözünebilen numuneler için yaş tatbik yöntemi kullanıldı. Numuneler çok az miktarda çözücü sisteminde çözülerek pastör pipeti yardımıyla kolona tatbik edildi. Kolon musluğu açılarak adsorbana emdirilen numune üzerine adsorban yüzeyinin bozulmaması için pamuk yerleştirildi.

B: Kuru tatbik: Başlangıç çözücüsünde çözünmeyen numuneler için (CSD kodlu ekstrenin fraksiyonlanması) kuru tatbik yöntemi kullanıldı. Numune 1-2 mL kadar çözünebildiği çözücü içerisinde çözülerek belirli miktarda adsorbanla karıştırıldı. Çözücünün tamamı uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan adsorban ve numune karışımı üzerine 1-2 cm çözücü bırakılmış kolona aktarıldı. Adsorban yüzeyinin bozulmasını engellemek amacıyla üzerine pamuk yerleştirilerek çözücü sistemiyle elüsyona başlandı.

Sephadex LH-20 kolon kromatografisi (SFK)

Kolonun hazırlanması: Uygun miktarda tartılan Sephadex LH-20, yeterli miktarda başlangıç çözücüsü ile karıştırılarak alt ucuna cam pamuğu yerleştirilmiş cam kolona dolduruldu ve adsorban tamamen yerleşinceye kadar kolondan çözücü geçirildi. Daha sonra jelin üzerinde 1-2 mm çözücü kalıncaya kadar beklenerek metanolde çözülen numune kolona tatbik edildi.

Orta Basınçlı Sıvı Kromatografisi (MPLC)

Ters faz silika jel kolon kromatografisi (RP): Yeterli miktarda adsorban kuru sistemle kolona doldurularak basınç altında ve bir vibratör yardımıyla sıkıştırıldı. Kolon, önce yeterli miktarda su, daha sonra elüsyona başlanacak çözücü sistemi geçirilerek şartlandırıldı. Numune, 1-2 mL çözücü sistemi içinde çözülerek bir enjektör yardımıyla kolona enjekte edildi.

Ters Faz Orta Basınçlı Sıvı Kromatografisi (MPLC) Şartları

Adsorban	LiChroprep C ₁₈ (40 - 63 µm, Merck)
Kolon	Büchi, 2.6 x 46 cm
Peristaltik Pompa	Büchi C-601

Çözücü Sistemi $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$ (20:80), (25:75), (30:70), (35:65),
(40:60), (50:50), (60:40), (80:20), (100:0)

Akış Hızı 10 mL/dak
Basınç 3-4 bar
Fraksiyon Hacmi 10 mL
Fraksiyon Toplayıcı Büchi C-660

(LC-MS/MS)

LC-MS/MS Çalışma Şartları

Cihaz: Shimadzu 8040

Kolon: Restek C18 analitik kolon (150 x 4.6 mm, 3 μm partikül çapı)

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Akım hızı: 0.4 mL/dak

Kütle aralığı: m/z 100-1000

Kurutma sıcaklığı: 200 C

Nebulizer basıncı: 40 psi

Kurutma gazı: 15 mL/dak

Kapiler voltaj: 4 kV

İyonlaştırma turu: ESI –/+

Hareketli faz: A: metanol:su:formik asit (10:89:1 h/h/h)

B: metanol:su:formik asit (89:10:1 h/h/h)

Gradient akış:

Zaman (dk)	Haraketli Faz A (%)	Haraketli Faz B (%)
0,01	75	25
15	60	40
18	55	45
21	45	55

25	25	75
38	15	85
43	15	85
53	5	95
58	5	95
68	0	100

MRM çifti oluşturma şartları

Cihaz: LC-MS/MS Shimadzu 8040

Akım hızı: 0.6 mL/dak

Kütle aralığı: m/z 100-1000

Kurutma sıcaklığı: 200 C

Nebulizer basıncı: 40 psi

Kurutma gazı: 15 mL/dak

Kapiler voltaj: 4 kV

İyonlaştırma turu: ESI –

Çözücü sistemi: A: formik asit: su (1:99 h/h)

B: formik asit :metanol (1:99 h/h)

Akış: Haraketli faz: A- %50

Haraketli faz: B- %50

3.2.2. İzole edilen bileşiklerin yapı tayini

Saflaştırılan bileşiklerin yapı aydınlatmaları için UV, FT-IR, MS, 1D-NMR (¹H, ¹³C, DEPT), 2D-NMR (COSY, HMQC, HMBC) spektral analiz teknikleri kullanıldı.

Saf bileşiklerin, FT-IR, MS ve NMR analizleri için üniversite içi ve üniversite dışından hizmet alımı gerçekleştirildi.

Üniversite içi hizmet alımı için Erciyes Üniversitesi (ERÜ) Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM)'ne, Üniversite dışı hizmet alımı için İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)'ne teşekkürlerimizi sunarız.

3.2.3. Bazı sekonder metabolit guruplarının teşhis reaksiyonları

Cousinia türlerinin içerdiği sekonder metabolit gruplarının saptanması için genel teşhis reaksiyonları uygulandı.

Oz teşhis reaksiyonları

5 g toz edilmiş numune bir beher içerisinde kalın bir baget yardımı ile 20 mL su içerisinde iyice ezildi. Sulu kısım pamuktan süzülerek alındı. Süzüntüye 5 ml % 10'luk kurşun asetat çözeltisi ilave edildi. Çöken kısım süzülerek atıldı. Süzüntüye doymuş Na_2HPO_4 çözeltisinden damla damla ilave edilerek kurşunun fazlası çöktürüldü ve süzüldü. Süzüntü test çözeltisidir. Test çözeltine aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı:

a) Asitlerle reaksiyon

1 ml test çözeltisi üzerine derişik H_2SO_4 tabaka teşkil edecek şekilde ilave edildi. Pembeden kahverengine değışen renkli bir halkanın meydana gelip gelmediğı gözlemlendi.

b) Fehling reaksiyonu

Fehling reaksiyonu: Bir deney tüpünde 1 ml test çözeltisi üzerine 2 ml Fehling A ve 2 ml Fehling B ilave edilip su banyosunda dikkatle ısıtıldı. Kırmızı renkli Cu_2O 'in çökeltisinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

c) Molish reaksiyonu

1 ml test çözeltisine α -naftolün alkoldeki % 15'lik çözeltisinden 1-2 damla ilave edildi. Üzerine 1 ml kadar derişik H_2SO_4 tabaka teşkil edecek şekilde dikkatlice ilave edildiğinde iki tabaka arasında mor halkanın meydana gelip gelmediğı gözlemlendi (Yadav ve Agarwala, 2011).

Alkaloit teşhisi

Bitkilerin toz edilmiş toprak üstü kısımlarından 0,5 g alınarak % 6 H_2SO_4 içeren % 70' lik etanolün 10 ml' si ile 1 dakika kaynatıldı, soğutuldu ve çökmeye bırakıldı. Üst faz iki tüpe eşit miktarda bölündü. Tüplerden birine Mayer, diğerine ise Dragendorff reaktifi eklendi. Çökelek meydana gelip gelmediğı kontrol edildi. Bu kontrolden sonra etanollü ekstre

küçük bir ayırma hunisine alındı. Ardından % 25' lik Na_2CO_3 çözeltisi ile alkalilendirildi. 15 ml kloroformla çalkalandı. 15 ml % 10' luk asetik asit çözeltisiyle tüketildi. Asetik asitli faz 3 ayrı tüpe alındı. Bunlardan biri kontrol için saklanırken, ikincisine Mayer, üçüncüsüne ise Dragendorff reaktifleri eklenerek çökelek meydana gelip gelmediği gözlemlendi (Tanker ve diğerleri, 1986: 45).

Kardiyoaktif heterozit teşhisi

a) Keller-Kiliani Reaksiyonu

1 g toz edilmiş drog 10 mL % 70'lik alkolle su banyosunda 2 dak. kaynatılarak soğuduktan sonra pamuktan süzüldü. Süzüntüye 10 mL su ve 5 damla doymuş bazik kuşunasetat çözeltisi eklendi, süzülerek ayırma hunisinde 10 mL kloroform ile ekstre edildi. Kloroform tabakası (altta) bir kapsülde kuruluğa kadar uçuruldu ve kapsüldeki bakiye 3 mL asetik asitte (içinde 1 damla % 5' lik FeCl_3 çözeltisi taşıyan) çözüldü. Bu çözelti tüpe alındı ve üzerine 3 mL derişik H_2SO_4 tüp hafifçe eğilerek dikkatle eklendi (tabakalandırma yapacak şekilde). İki sıvı arasında esmer kırmızı bir tabakanın meydana gelip gelmediği gözlemlendi.

1 g kaba toz edilmiş drog 10 mL kloroform:etanol (4:1) ile en az 45 dakika ara sıra çalkalanarak maserasyona tabi tutuldu. Maserasyon sonunda sıvı kısım küçük bir pamuktan süzülerek ayrıldı ve aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı.

b) Baljet Reaksiyonu

Süzüntünün 2 mL' si üzerine 0.5 mL Baljet Reaktifi (Pikrik asit çözeltisi) ve 2 damla % 20'lik NaOH çözeltisi eklendi. Turuncu-kırmızı rengin meydana gelip gelmediği gözlemlendi.

c) Kedde Reaksiyonu

Süzüntünün 2 mL' si kapsülde uçuruldu, bakiye üzerine Kedde Reaktifi (3,5 dinitrobenzoik asit çözeltisi) ve 2 damla % 20'lik NaOH çözeltisi eklendiğinde erguvani kırmızı rengin oluşup oluşmadığı gözlemlendi (Tanker ve diğerleri, 1986: 27).

Saponozit teşhisi

a) Köpürme Deneyi

Bitkilerin toz edilmiş 0,5 g toprak üstü kısımları 10 ml sıcak su ile beraber bir deney tüpüne konup soğuduktan sonra yaklaşık 10 saniye kadar kuvvetle çalkalandı. En az 10 dakika sabit kalan 1-10 cm yüksekliğinde ve üzerine 1-2 damla 2 N HCl damlatıldığında kaybolmayan bir köpük tabakasının meydana gelip gelmediği kontrol edildi (Trease ve Evans 1983: 309-540).

b-1) Salkowski Reaksiyonu

0.5 g drog bir deney tüpünde 5 ml % 3'lük H_2SO_4 ile su banyosunda 5 dakika dikkatle kaynatılarak hidroliz edildi. Sıcakken süzülen ve soğutulan süzüntü soğutulduktan sonra ayırma hunisinde eşit hacimde kloroform ile ekstre edildi. Yaklaşık 2 ml kloroformlu kısım 1-2 damla derişik H_2SO_4 ile tabakalandırıldı. Sarı renkli halka oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

b-2) Lieberman-Burchard Reaksiyonu

Diğer tüpteki yaklaşık 2 ml kloroformlu kısım porselen kapsül içerisinde su banyosu üzerinde kuruluğa kadar uçuruldu, 1 ml glasiyel asetik asit eklenerek bakiye çözöldü. Deney tüpüne alınan çözelti 1-2 damla derişik H_2SO_4 ile tabakalandırıldı. İki tabakanın temas yüzeyinde mor- mavi halkanın oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

c) Brieskorn-Briner Reaksiyonu

0.5 g drog bir deney tüpünde 5 ml % 3'lük H_2SO_4 ile su banyosunda 5 dakika dikkatle kaynatılarak hidroliz edildi. Sıcakken süzölerek soğutulduktan sonra ayırma hunisinde eşit hacimde kloroform ile ekstre edildi. Bir kapsölde kuruluğa kadar uçurulan ekstrenin üzerine 1-2 damla klorosölfonik asit ilave edildi, kırmızı renk verip vermediği gözlemlendi (Tanker ve diğlerleri, 1986: 27).

Flavonoit teşhisi

1 g toz edilmiş drog 10 mL distille su ile kaynatılarak sıcakken süzöldü. Soğutulmuş süzöntünün 1 mL'si üzerine birkaç damla 20% NaOH ilave edilerek sarı renk, birkaç damla asit damlatılması ile ise oluşan rengin kaybolması gözlemlendi (Trease ve Evans 1983: 309-540).

Siyanidin Reaksiyonu

Toz edilmiş bitki örnekleri 5 ml etanolle iyice çalkalanarak ve hafif ısıtılarak ekstre edildi. Ekstre süzildükten sonra süzüntü üzerine 0,5 mL derişik HCl ve bir spatül ucu kadar Mg tozu ilave edildi. Hidrojen çıkışı ile köpükte oluşan renkler gözlendi (Tanker ve diğerleri, 1986: 24).

Tanen teşhisi

Bitki örneklerinin toz edilmiş toprak üstü kısımları % 5' lik infüzyon hazırlandı. Bu infüzyon üzerinde aşağıdaki incelemeler yapıldı:

b) 5 mL infüzyon üzerine seyreltik FeCl_3 (% 5) çözeltisinden 3 damla eklendiğinde oluşan mavi-siyah renk ve çökelek gallik tanen varlığını gösterdi.

c) 5 mL infüzyon üzerine 2 mL tuzlu jelatin çözeltisi eklendiğinde oluşan krem renkli çökelek, tanenlerin varlığını gösterdi.

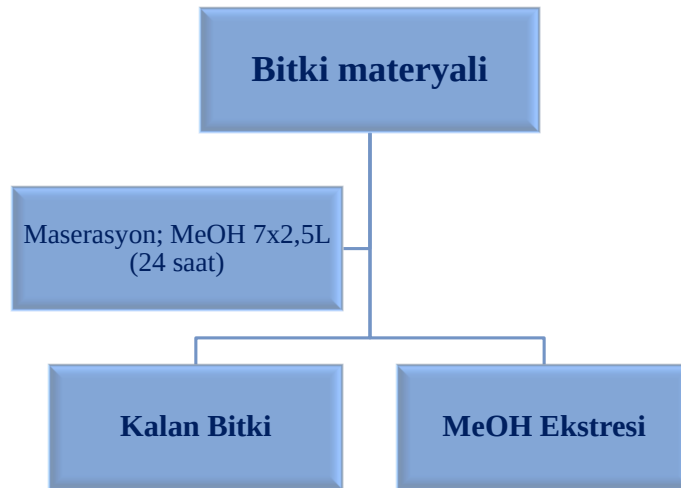
d) 10 mL infüzyon üzerine 5 mL hidroklorik asitli formol (Stiasny Reaktif) konuldu ve karışım 80°C ye kadar ısıtıldı. Parçalar halindeki çökelek, numunede kateşik tanen bulunduğunu gösterdi. (Çubukçu ve diğerleri 1992).

Antrakininonların teşhisi

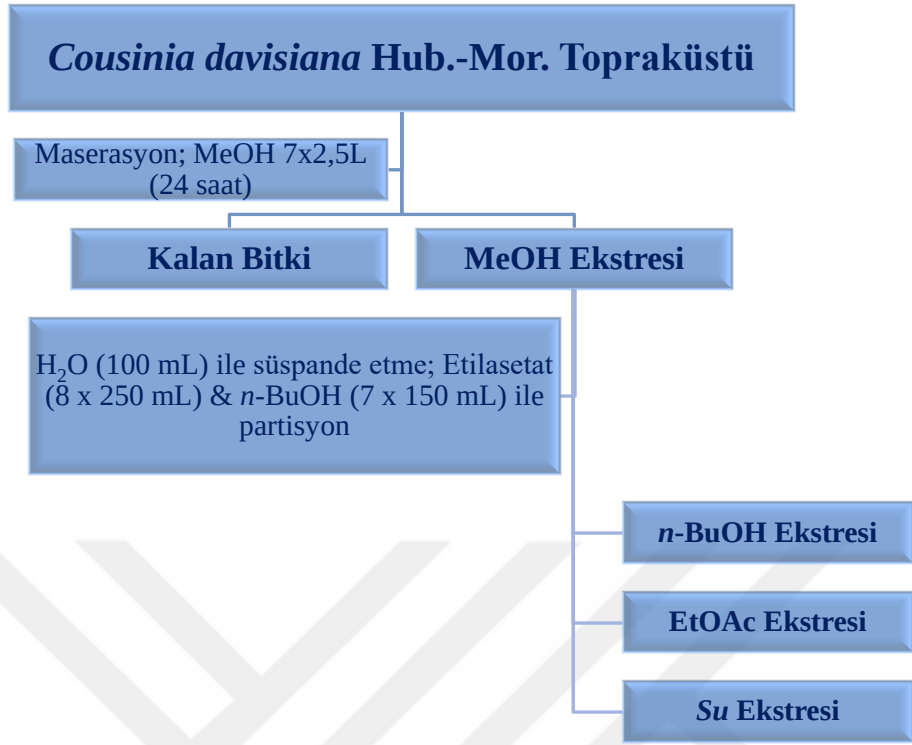
1 g toz edilmiş drog 2 mL 10% HCl ile 5 dk. kaynatılarak ekstre edildi. Sıcakken süzülen ve soğutulan ekstre eşit hacimde kloroformla partisyona tabi tutuldu. Kloroform tabakası temiz bir tüpe aktarılarak üzerine eşit hacimde %10 amonyak solüsyonu eklendi. Çalkalanarak ayrılması beklendi. Ayrılan amonyak tabakasındaki renk değişimi gözlendi (Trease ve Evans 1983: 309-540).

3.2.4. Ekstraksiyon

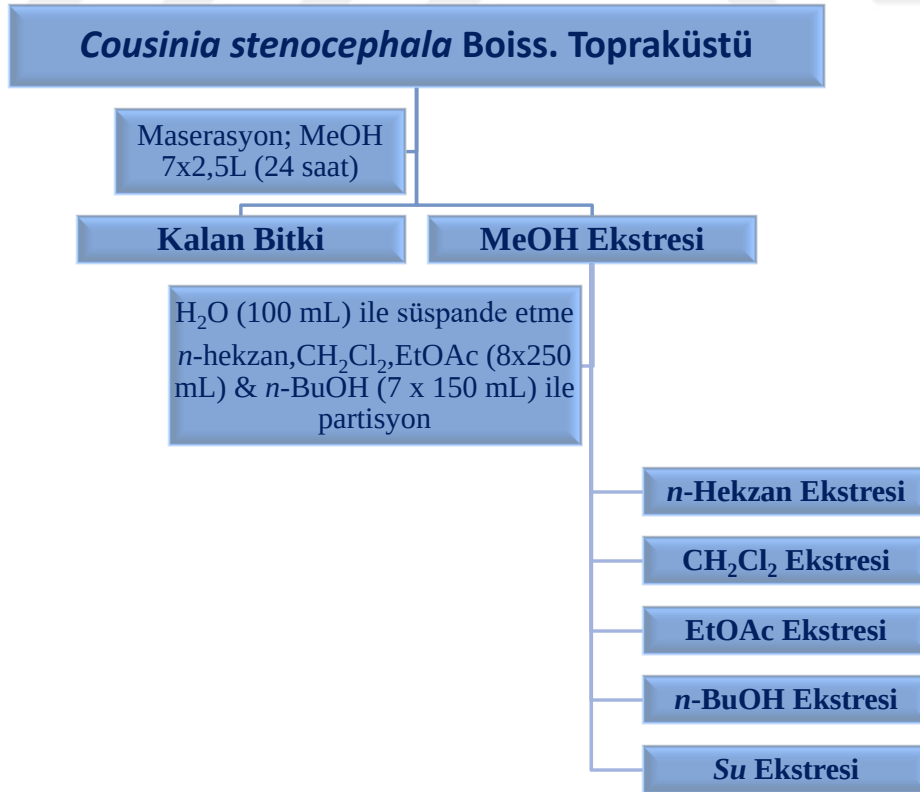
Toplanan türlerin ekstraksiyon yöntemlerine literatür taramaları sonucu karar verildi. Bu türlerin toprak üstü kısımları her biri kurutulduktan sonra toz etme işlemine tabi tutuldu ve metanol ile oda sıcaklığında maserasyona bırakılarak ekstre edildikten sonra süzgeç kağıdından süzüldü. Birleştirilen süzüntülerin çözücüsü rotavaporda 38°C’de düşük basınç altında uzaklaştırılarak ham metanol ekstresi elde edildi. Dört türün sitotoksik aktivite tarama sonuçlarına göre daha aktif ekstre olarak belirlenen *C. stenocephalae* bitkisinin metanol ekstresi üzerinden izolasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verildi. Bu amaçla bitkinin metanol ekstresi 300 mL suda süspande edildikten sonra bir ayırma hunisinde sırasıyla tüm kimyasal bileşik guruplarının ekstre edilmesini sağlamak amacıyla apolardan polara doğru çözücülerden *n*-hekzan, diklorometan, etilasetat ve *n*-butanol ile, aynı zamanda antioksidan etki çalışmalarında yüksek aktivite gösteren *C. davisiana* bitkisi de 200 mL suda süspande edilerek önce etilasetat sonra ise *n*-butanolle partisyon yöntemiyle ekstre edildi. Rotavaporda, 38° C’de ve düşük basınç altında çözücüsü kuruluğa kadar uzaklaştırılan ekstrater liyofilize edilerek çalışmalara bu ekstrater üzerinden devam edildi. Ekstrelerin hazırlanışı Şekil 3.1-3.3’de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.1. *Cousinia foliosa* ve *Cousinia ramosissima* türlerinin toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu



Şekil 3.2. *Cousinia davisiana* toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu



Şekil 3.3. *Cousinia stenocephala* toprak üstü kısımlarının ekstraksiyonu

Çizelge 3.5. *Cousinia davisiana*, *Cousinia foliosa*, *Cousinia ramosissima* ve *Cousinia stenocephala* bitkilerinden elde edilen ekstrelerin verimleri (%). (**CD**: *C. davisiana*, **CDB**: *C. davisiana* *n*-butanol ekstresi, **CDE**: *C. davisiana* etilasetat ekstresi, **CDS**: *C. davisiana* su ekstresi, **CF**: *C. foliosa*, **CR**: *C. ramosissima*, **CS**: *C. stenocephala*, **CSB**: *C. stenocephala* *n*-butanol ekstresi, **CSD**: *C. stenocephala* diklorometan ekstresi, **CSE**: *C. stenocephala* etilasetat ekstresi, **CSH**: *C. stenocephala* *n*-hekzan ekstresi, **CSS**: *C. stenocephala* su ekstresi).

Ekstre adı (ekstre kodu) Bitki	Metanol	<i>n</i> -Hekzan	Diklorometan	Etilasetat	<i>n</i> -Butanol	Su
<i>C. stenocephala</i>	10 (CS)	32 (CSH)	7 (CSD)	10 (CSE)	20 (CSB)	25 (CSS)
<i>C. foliosa</i>	10 (CF)	-	-	-	-	-
<i>C. ramosissima</i>	8,7 (CR)	-	-	-	-	-
<i>C. davisiana</i>	10 (CD)	-	-	25 (CDE)	30 (CDB)	30 (CDS)

3.2.5. Biyolojik aktivite çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü ortamının hazırlanması ve hücrelerin çoğaltılması

Hücre kültürü ile ilgili deneyler, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada, A549 (ATCC, CCL-185), CoLo 205 (ATCC, CCL-222) ve sağlıklı akciğer hücreleri (BEAS) kullanıldı. Hücreler, hücre kültürü laboratuvarında 37°C’de 5% CO₂’ li ortamda çoğaltılarak her iki hücre için de Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640 Mediatech 15-040-CVR) besiyeri kullanıldı ve üreticinin resmi sitesindeki kılavuzlara uygun olarak pasajlama işlemi gerçekleştirildi.

Hücre canlılığının ölçülmesi

(SRB gelişme inhibisyonu testi)

A549, COLO 205, ve BEAS hücre hatlarında ekstre ve saf maddelerin koruyucu etkileri SRB (sulforhodamine-B) canlılık testi kullanılarak incelendi. 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 12.500 hücre dağıtıldıktan sonra bir gece %5 CO₂ 37°C’ de inkübasyona bırakıldı. Değişen konsantrasyonlardaki ekstre ve saf maddeler (% 5 DMSO veya etanolde çözülüp besi yerinde seyreltildi) uygulandıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakıldı ve %10’ luk trikloroasetik asit çözeltisinden 50 µL eklendikten sonra +4°C’ de 1 saat fikse edildi. Tüm kuyuların içeriği uzaklaştırıldıktan sonra 5 kez deiyonize suyla yıkandı. Kuru plağın %0,4 SRB çözeltisinden 50 µL uygulandıktan sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildi ve bu süre sonunda plağın içeriği uzaklaştırılıp 5 kez %1 asetik asit çözeltisiyle yıkama işlemi gerçekleştirildi. Kuru plağa 10 mM Tris bazı çözeltisi eklendikten sonra 492 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü ve sonuçlar kontrol kuyusuna bölündükten sonra % canlılık grafiği olarak verildi. İnhibisyon görülen gruplar için IC₅₀ değeri Systat Sigma Plot ver12.0 kullanılarak hesaplandı.

Antioksidan kapasite çalışmaları

Antioksidan kapasite çalışmaları ABTS⁺, DPPH[•] radikal süpürücü ve β-Karoten / linoleik asit birlikte oksidasyonu inhibe edici etki tayini radikal süpürücü kapasite yöntemleri ile test edildi.

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

Deneyin yapılışı: Ekstrelerin DPPH• radikalini süpürücü etkileri Gyamfi ve diğerlerinin (1999) metoduna göre yapıldı. Tris-HCl tamponu (50 nM, pH 7,4) ve 1mL 0,1 mM metanolde hazırlanmış 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil çözeltisi (DPPH•) ile karıştırıldı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol olarak BHT, BHA, rozmarinik asit, askorbik asit ve gallik asit kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar 517 nm’de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri nonlinear regregasyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 versiyon 7.0, SPSS Inc., Chicago IL) hesaplandı. Analizler 3 paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerler kullanılarak % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = [(Abs_{kontrol} - Abs_{örnek}) / Abs_{kontrol}] \times 100$$

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS⁺•) radikalini süpürücü etki tayini

Deneyin yapılışı: Ekstrelerin ABTS⁺• radikalini süpürücü etkileri incelendi. (Re ve diğerleri, 1999). ABTS⁺• radikali (7 mM) ABTS’ in sulu çözeltisi ile K₂S₂O₈ (2,45 mM, son konsantrasyon)’ un karanlıkta 12-16 saat bekletilmesiyle meydana getirildi ve absorbansı oda sıcaklığında 734 nm’de 0,700 (± 0,030) olacak şekilde ayarlandı. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi (990 µL) ile ekstre çözeltileri (10 µL) karıştırıldı ve 734 nm’de 1 dakikalık aralıklarla 30 dakika süresince reaksiyon kinetiği ölçüldü. Konsantrasyona karşı ölçülen inhibisyon yüzdeleri Troloks’a eşdeğer olarak (TEAC) hesaplandı. Deneyler üç paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı.

β-Karoten / linoleik asit birlikte oksidasyonu inhibe edici etki tayini

Deneyin yapılışı: Deneyin esası β- karotenin linoleik asit oksidasyonu sonucu oluşan peroksit radikallerinin bu molekülde meydana getirdiği renk açılımını antioksidanların hangi oranda inhibe ettiğinin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (Velioglu ve diğerleri, 1998). Tween 20 (120 mg) ve linoleik asit (120 mg) tartılıp kloroformla yıkanarak kuru cam bir balona alındı. Üzerine 1.2 mL β-karoten (1mg/ mL kloroform içerisinde) eklenip karışımdaki kloroform rotavoporda uçurularak uzaklaştırıldı. 300 mL distile su eklenerek yavaşça karıştırıldı. Kontrol, standart ve örnekler konulmadan

aynı prosedürle, kontrol ve örneklerin şahitleri ise aynı şekilde β -karotensiz olarak ayrıca hazırlandı. Ekstreler, standartlar ve kontroller hazırlanan emülsiyonlarla beraber plak kuyucuklarına aktarıldı ve 470 nm’ de spektrofotometrede ölçümleri alındı. Daha sonra plaktaki bu örnekler otooksidasyon için 50 °C’ de 105 dakika cihazda bekletildi, her 15 dakikada bir ölçüm yapılarak solma derecesi izlendi. Deneyler üç paralel olarak tekrarlandı ve ortalama değerleri hesaplandı.

$$AA\% = [1 - (\text{Abs}^0_{\text{örnek}} - \text{Abs}^{105}_{\text{örnek}}) / (\text{Abs}^0_{\text{kontrol}} - \text{Abs}^{105}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

Toplam Fenolik Madde Miktarı

Deneyin yapılışı: Ekstrelerin içerdikleri toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı (Singleton ve diğerleri, 1999). 6 mL distile su içeren 10mL’lik kap içerisine 100 μ L örnek çözelti ve 500 μ L Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi ve 1 dakika sonra 1,5 mL %20’lik sulu Na_2CO_3 ilave edilip 10 mL’ye su ile tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. 25 °C’de 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm’de absorbansı ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç paralel olacak şekilde yapıldı ve sonuçlar ortalama değerler olarak verildi.

Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Deneyin yapılışı: Ekstrelerin toplam flavonoit analizi Zhishen ve diğerleri (1999) tarafından yapılan çalışmalarda kullandıkları metot modifiye edilerek yapıldı. Buna göre 1 mL ektre t=0. dakikada 0,3 mL % 5’lik NaNO_2 çözeltisi ile karıştırıldı, t=5. dakika’ da 0,3 mL % 10’luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilavesinden sonra, t=6. dakika’da 2 mL 1 M NaOH çözeltisi eklendi ve 2,4 mL su ilave edilerek karıştırıldı. 510 nm’de köre karşı absorbans ölçüldü. Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları kateşine eşdeğer olarak mg CE/ g_{ekstre} olarak hesaplandı. Kateşinin kalibrasyon eğrisi aynı şekilde etanol kullanılarak hazırlandı. Bütün ölçümler 3 paralel olacak şekilde yapıldı ve ortalama değerler alındı.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler Sigma Plot ver.12 programı ile yapıldı. Tedavi grupları ve kontrol gruplarının SRB deneyi ile elde edilen absorbans değerleri arasındaki fark One Way Anova yöntemiyle ile belirlendi. Deney grupları ortalamalarının birbirinden farklı olduğu $p < 0,001$ olarak ifade edildi. Tedavi gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede fark gösterip göstermediği ise Dunnett testi ile belirlendi. Anlamlılık değeri ise $p < 0,05$ olarak ifade edildi.





4. BULGULAR

4.1. Bazı Sekonder Metabolit Gruplarının Teşhis Reaksiyonlarına ait Sonuçlar

Kalitatif sekonder metabolit gruplarının teşhis reaksiyonları uygulanarak örneklerde oz, alkaloit, kardiyoaaktif heterozit, saponozit, flavanoit, tanen, antrakinon taraması yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.1’de diğer türlerle karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

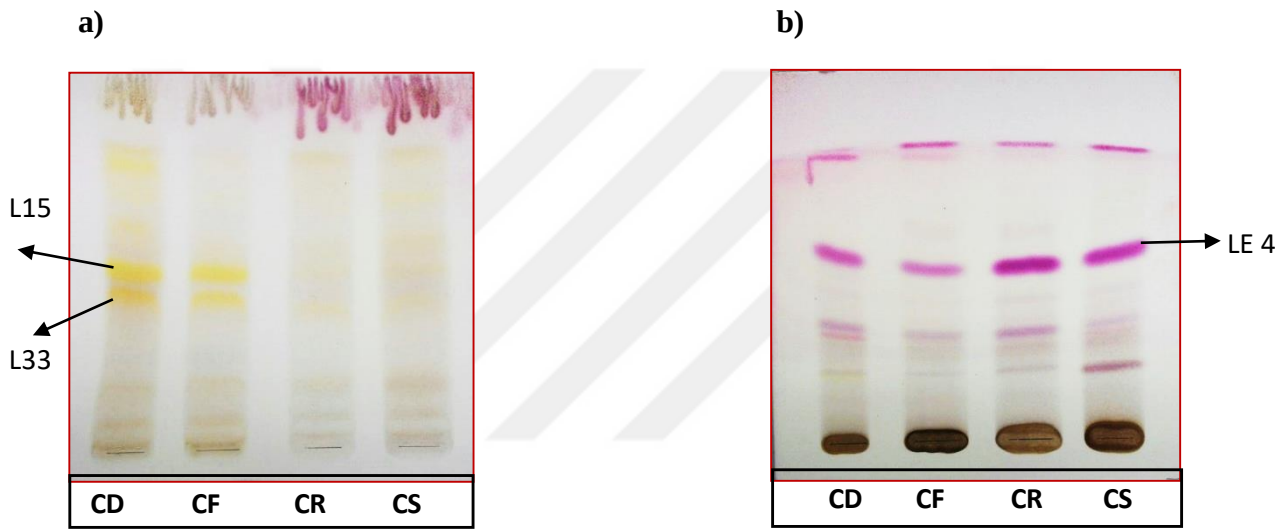
Çizelge 4.1. Dört *Cousinia* türünün metanol ekstrelerinin sekonder metabolit gruplarının teşhis reaksiyonlarına ait sonuçlar (+: pozitif, olumlu sonuç; -: negatif, tespit edilemedi)

Kimyasal grup	Kimyasal reaksiyon	<i>C. davisiana</i>	<i>C. stenocephala</i>	<i>C. foliosa</i>	<i>C. ramosissima</i>
Oz	Molish	+	+	+	+
	Fehling	+	+	+	+
	Asitler	-	-	-	-
Alkaloit	Mayer	-	-	-	-
	Dragendorf	-	-	-	-
Kardiyoaaktif Heterozit	Keller-Kiliani	-	-	-	-
	Baljet	+	+	+	+
	Kedde	+	+	+	+
Saponozit	Köpürme	+	+	+	+
	Salkowski	+	+	+	+
	Lieberman-Burchard	+	+	+	+
	Brieskorn-Briner	+	+	+	+
Flavanoit	Amonyak	+	+	+	+
	Siyanidin	+	+	+	+
Tanen	FeCl ₃ Reaktifi	+	+	+	+
	Stiasny Reaktifi	+	+	+	+
	1% Tuzlu Jelatin	+	+	+	+
Antrakinon	Borntrager Reaksiyonu	-	-	-	-

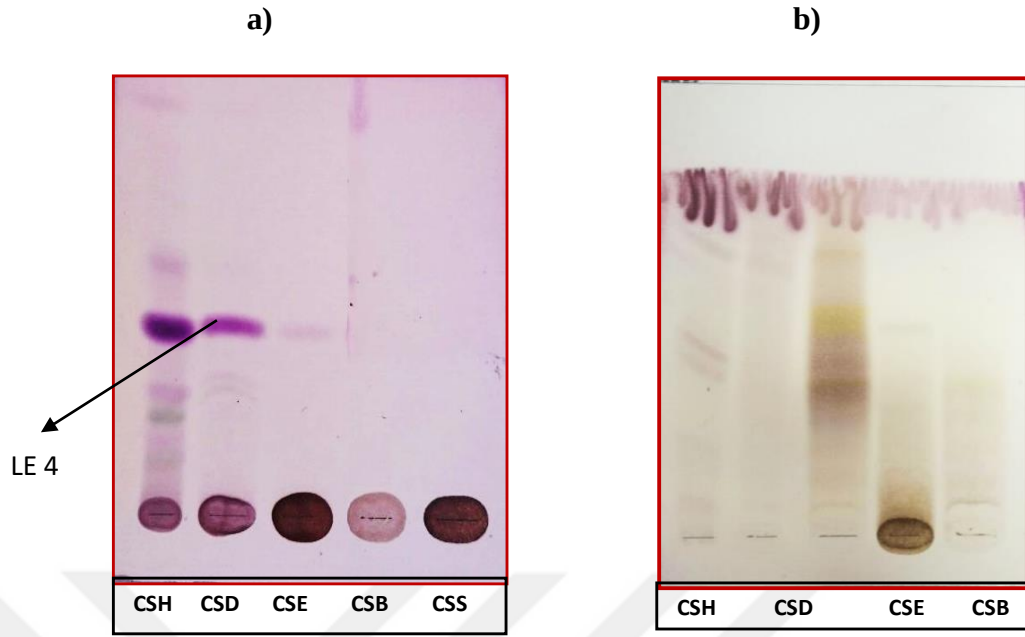
4.2. Fitokimyasal Çalışma Sonuçları

4.2.1. Dört *Cousinia* türünün metanol ve alt ekstralarının İTK ile incelenmesi

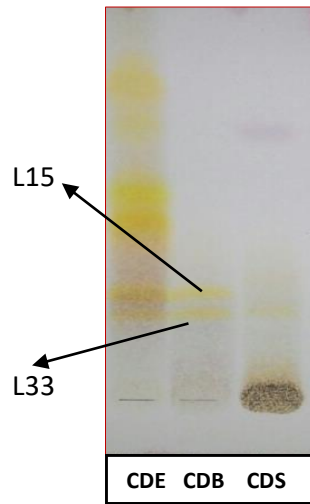
Dört *Cousinia* türünün topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstraları iki farklı çözücü sisteminde İTK ile incelendi. Sonuçlar Şekil 4.1’de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında ekstre içeriklerinin pek farklılık göstermediği görülmektedir. Ayrıca biyoaktivite rehberli fraksiyonlamada aktif çıkan bitkilerden hazırlanan alt ekstraların İTK görüntüleri Şekil 4.2 ve 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.1. CD, CF, CR ve CS kodlu ekstraların İTK görünümü. **CD:** *C. davisiana*, **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*, **CS:** *C. stenocephala*, (Çözücü sistem: a) Sikloheksan:CH₂Cl₂:MeOH (7:4:1) ve b) EtOAc:MeOH:FA:H₂O (100:13,5:2,5:10), belirteç vanilin/H₂SO₄)



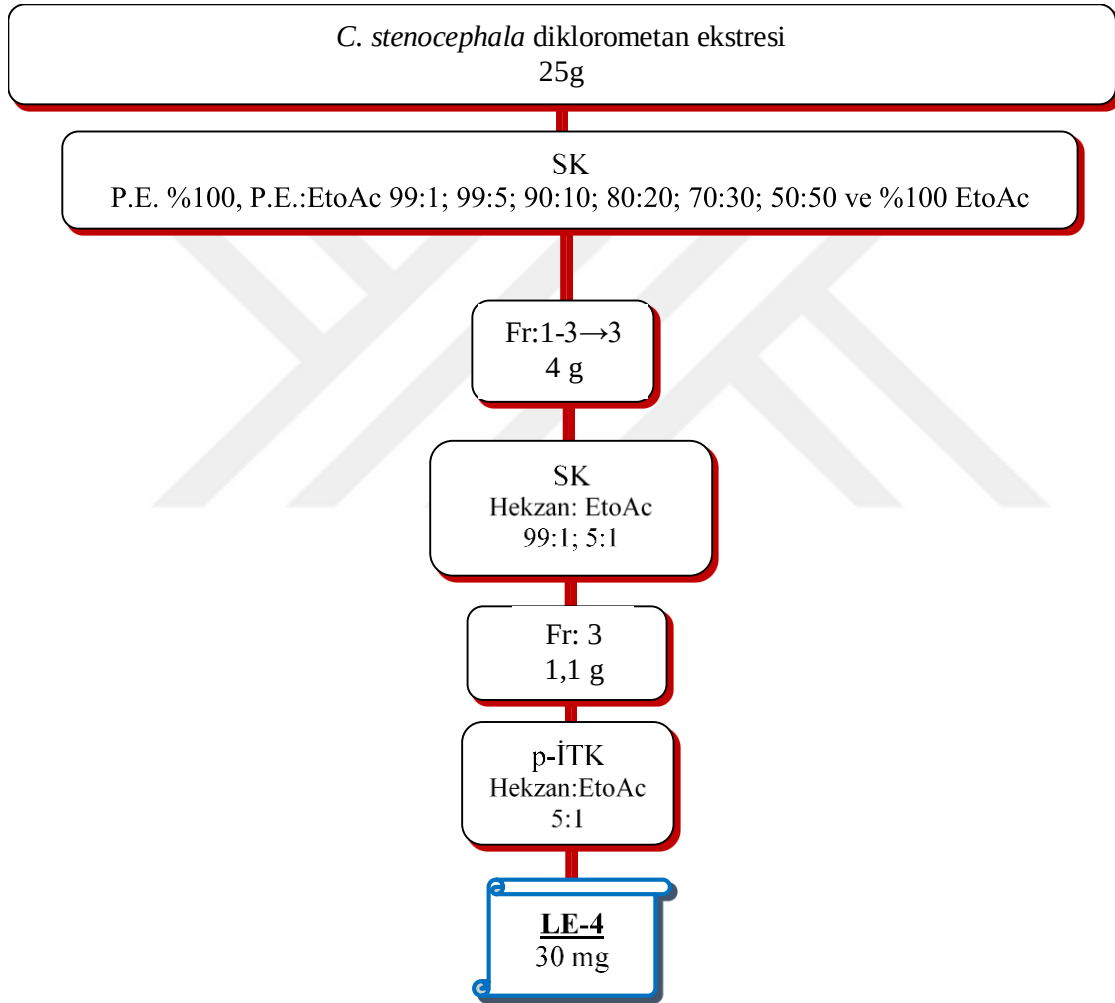
Şekil 4.2. *C. stenocephala* metanol ekstresinden elde edilen alt ekstrelerin (a ve b) İTK görünümü. **CSB**: *C. stenocephala* n-butanol ekstresi, **CSD**: *C. stenocephala* diklorometan ekstresi, **CSE**: *C. stenocephala* etilasetat ekstresi, **CSH**: *C. stenocephala* hekzan ekstresi, **CSS**: *C. stenocephala* su ekstresi. (**Çözücü sistem**: a) Sikloheksan:CH₂Cl₂:MeOH (7:4:1), b) EtOAc:MeOH:FA:H₂O (100:13,5:2,5:10).



Şekil 4.3. *C. davisiana* metanol ekstresinden elde edilen alt ekstrelerin İTK görünümü. **CDB**: *C. davisiana* n-butanol ekstresi, **CDE**: *C. davisiana* etilasetat ekstresi **CDS**: *C. davisiana* su ekstresi (**Çözücü sistem** CHCl₃:CH₃OH:H₂O (80:20:2), belirteç vanilin/H₂SO₄)

4.2.2. İzolasyon çalışmaları

Yapılan biyoaktivite rehberli fraksiyonlamada sitotoksik etki yönünden aktif bulunan *C. stenocephala* bitkisinin metanol ekstresinden partisyon yöntemiyle alt ekstreler hazırlandı. Bu ekstreler yeniden sitotoksik etki taramasına tabi tutularak CSD kodlu ekstre daha aktif bulundu. Bu ekstreden çeşitli kromatografik yöntemlerle LE-4 kodlu bileşik elde edildi. Bileşiğin izolasyon şeması Şekil 4.4’de, İTK görüntüsü Şekil 4.5’de verilmiştir.

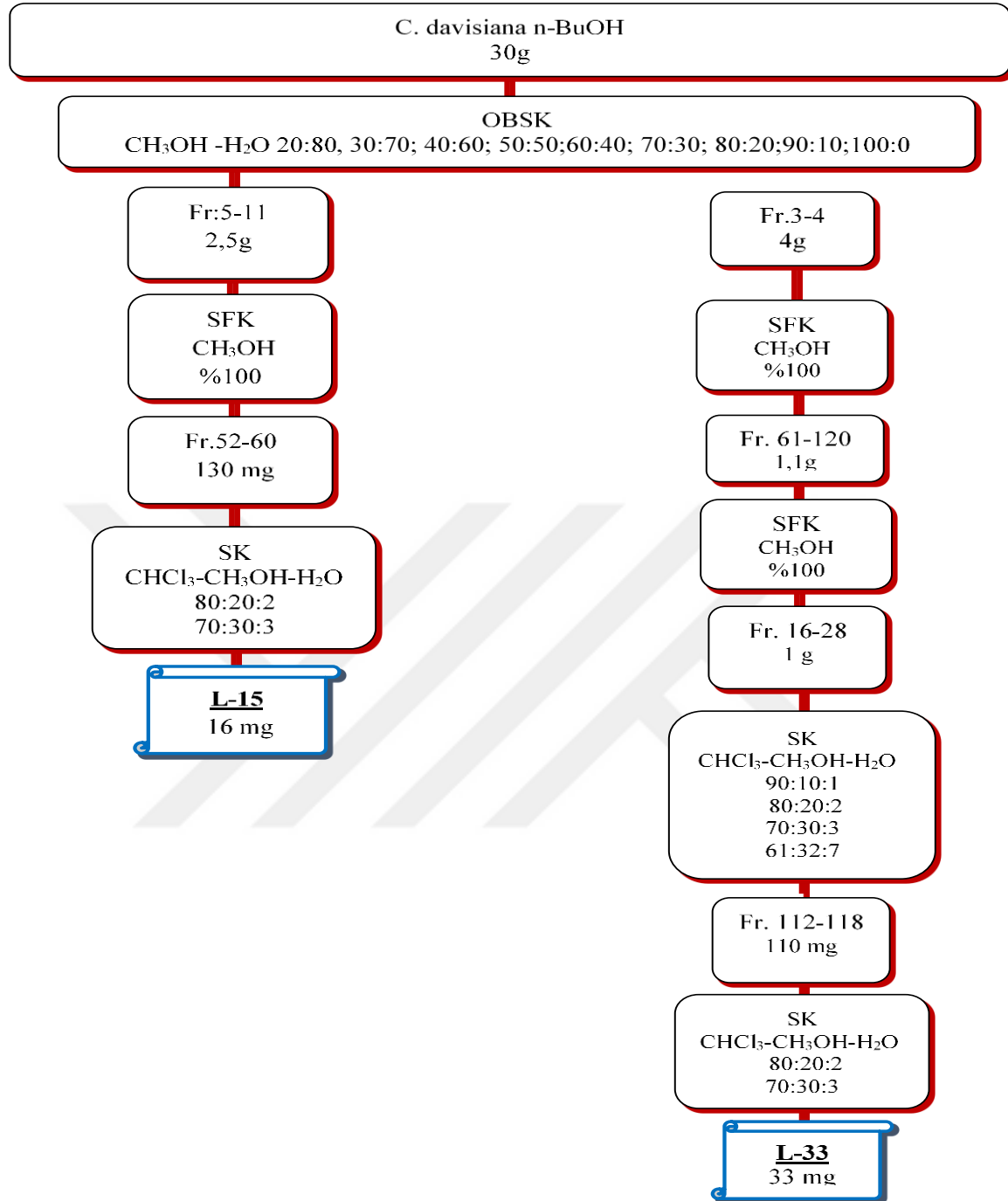


Şekil 4.4. LE-4 kodlu saf maddenin izolasyon şeması

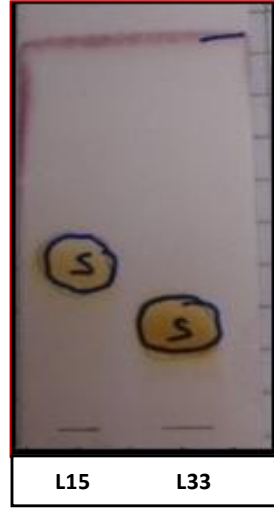


Şekil 4.5. *C. stenocephala* diklorometan ekstresinden elde edilen saf maddenin İTK görünümü. (Çözücü sistem: Siklohekzan:CH₂Cl₂:MeOH (7:4:1), belirteç vanilin/H₂SO₄)

Antioksidan etki yönünden yapılan biyoaktivite rehberli fraksiyonlamada ise aktif bulunan *C. davisiana* bitkisinin metanol ekstresinden partisyon yöntemiyle alt ekstreler hazırlandı. Bu ekstreler yeniden sitotoksik etki taramasına tabi tutuldu ve CDB kodlu ekstre daha aktif bulundu. Bu ekstrelerden çeşitli kromatografik yöntemlerle L15 ve L33 kodlu bileşikler elde edildi. Bileşiklerin izolasyon şeması Şekil 4.6'da, İTK görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.6. L-15 ve L-33 kodlu saf maddelerin izolasyon şeması



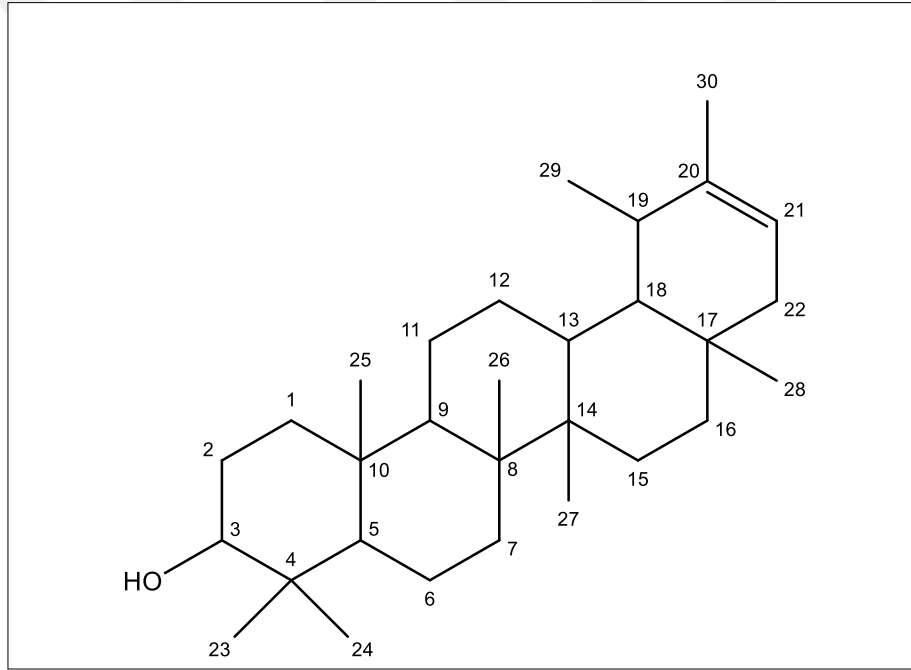
Şekil 4.7. *C. davisiana* n-butanol ekstresinden elde edilen saf maddelerin İTK görünümü.
(Çözücü sistem $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20:2), belirteç vanilin/ H_2SO_4)

4.2.3. Bileşiklerin yapı tayini çalışmaları

Sitotoksisite ve antioksidan etki yönünden yapılan biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen etkiden sorumlu bileşikleri tespit etmek amacıyla çeşitli NMR yöntemleri kullanılarak yapı tayini çalışmaları yapıldı. Sonuç olarak LE-4 kodlu bileşiğin bir pentasiklik triterpen yapısında ψ -taraksesterol bileşiği, L15 kodlu bileşiğin izoramnetin 3-O-rutinozit, L33'ün ise rutin olduğu tespit edildi. Bileşiklere ait NMR verileri aşağıda verilmiştir.

Triterpenik Bileşikler

ψ -taraksasterol (urs-20-en-3-ol)



LE-4: C₃₀H₅₀O (Mol. Ağ: 426)

LE-4 maddesi, *C. stenocephala* bitkisinin topraküstü kısımlarının diklorometan fraksiyonundan beyaz bir madde olarak elde edildi. İTK sürüklemelerinin ardından, reaktif püskürtülmeden önce UV₂₅₄ ve UV₃₆₅ nm'de adsorbans vermemesi, vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtülmesinin ardından 105°C'de 1-2 dk ısıtılınca mor renk vermesi bileşiğin terpenik yapıda olabileceğini gösterdi.

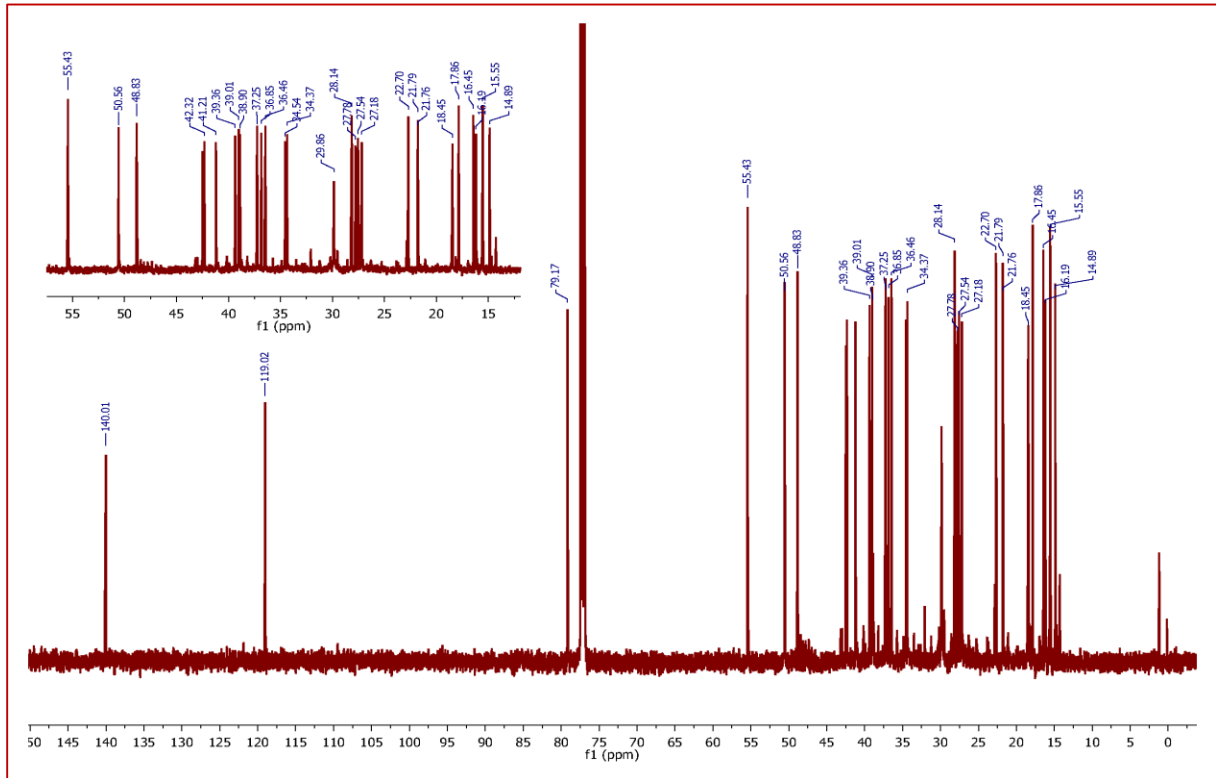
Molekül ağırlığı 426 olarak belirlenen, NMR verileri göz önünde bulundurularak molekülün kapalı formülü C₃₀H₅₀O olarak belirlendi. 2D NMR yöntemleri ile de yapıda 7 kuaterner karbon (C), 6 metin karbonu (CH), 9 metilen (CH₂) ve 8 metil (CH₃) grubunun

olduğu görüldü. Aynı zamanda ^{13}C spektrumunda karakteristik (δ_c 140,01 ve 119,02) etilenik bağ olduğu görüldü ve bu IR yardımıyla da kanıtlandı. Yapıda alifatik sekonder alkol grubunun da varlığı IR ve NMR yardımıyla ispatlandı. Tüm veriler değerlendirildiğinde ve literatürlerle karşılaştırıldığında yapının ψ -taraksasterol olduğu belirlendi (Reynolds ve diğerleri, 1986; Jassbi ve diğerleri, 2016).

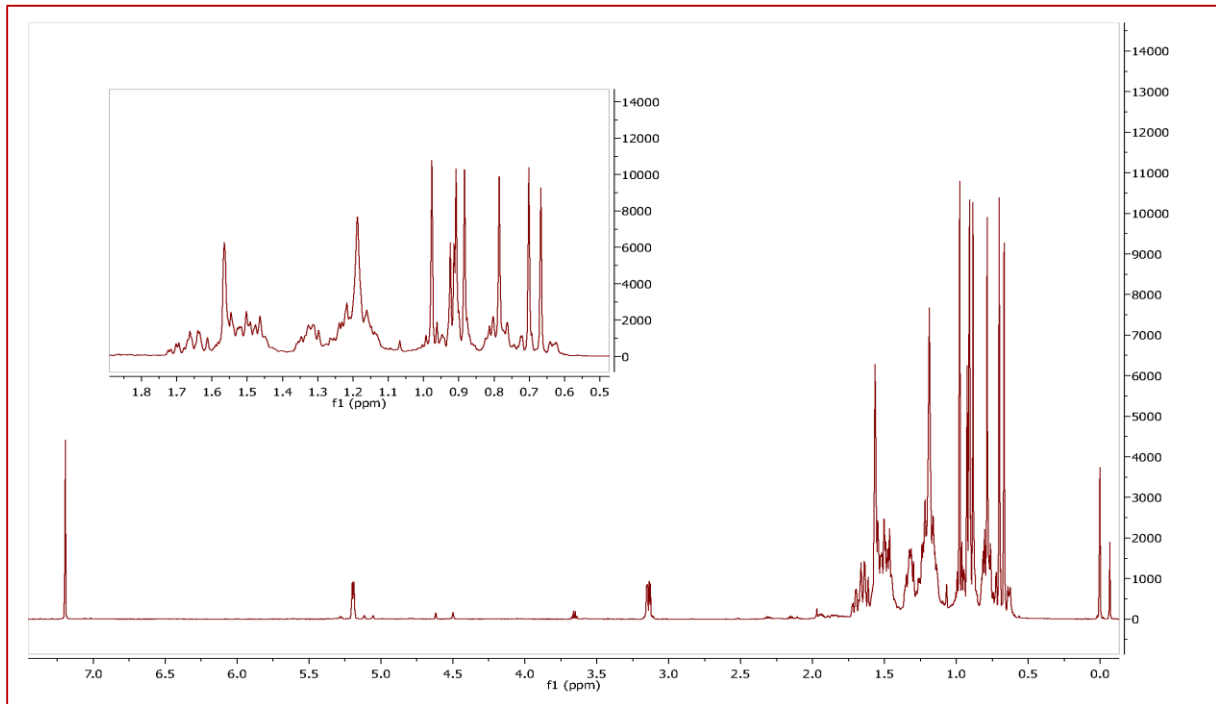


Çizelge 4.2. LE-4'ün ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CDCl_3 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H : 600 MHz)

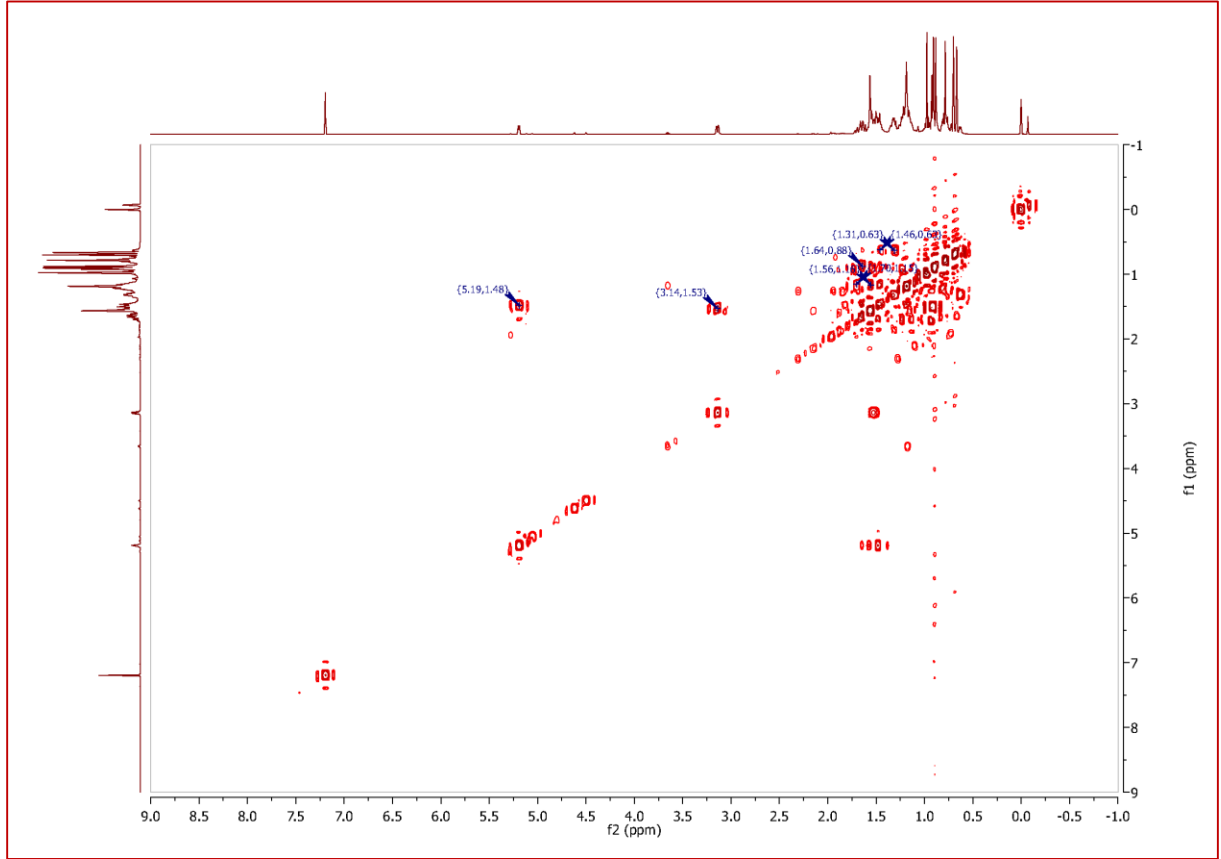
N	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J(Hz)	H $\rightarrow$ C HMBC	C $\rightarrow$ H HMBC	H $\leftrightarrow$ H COSY
1	CH ₂	38.90	1.66/0.88			
2	CH ₂	27.54	1.16			
3	CH	79.17	3.14	C4		H2
4	C	39.01				
5	CH	55.43	0.63			
6	CH ₂	18.45	1.31/1.46			
7	CH ₂	34.37	1.33			
8	C	41.21				
9	CH	50.56	1.22			
10	C	37.25				
11	CH ₂	21.76	1.48/1.56			
12	CH ₂	27.78	1.55			
13	CH	39.36	1.54	C14, C18		H14
14	C	42.48	1.48			
15	CH ₂	27.18	1.70			
16	CH ₂	36.85	1.22/1.55			
17	C	34.54				
18	CH	48.83	0.98			
19	CH	36.46	1.50			
20	C	140.01			H19, H29, H30	
21	CH	119.02	5.19	C19,C22	H19, H30	
22	CH ₂	42.32	1.48/1.64			
23	CH ₃	28.14	0.92			
24	CH ₃	15.55	0.70			
25	CH ₃	16.45	0.78			
26	CH ₃	16.19	0.98			
27	CH ₃	14.89	0.88			
28	CH ₃	17.86	0.66			
29	CH ₃	22.70	0.92 d			
30	CH ₃	21.79	1.57	C20	H21, H22	



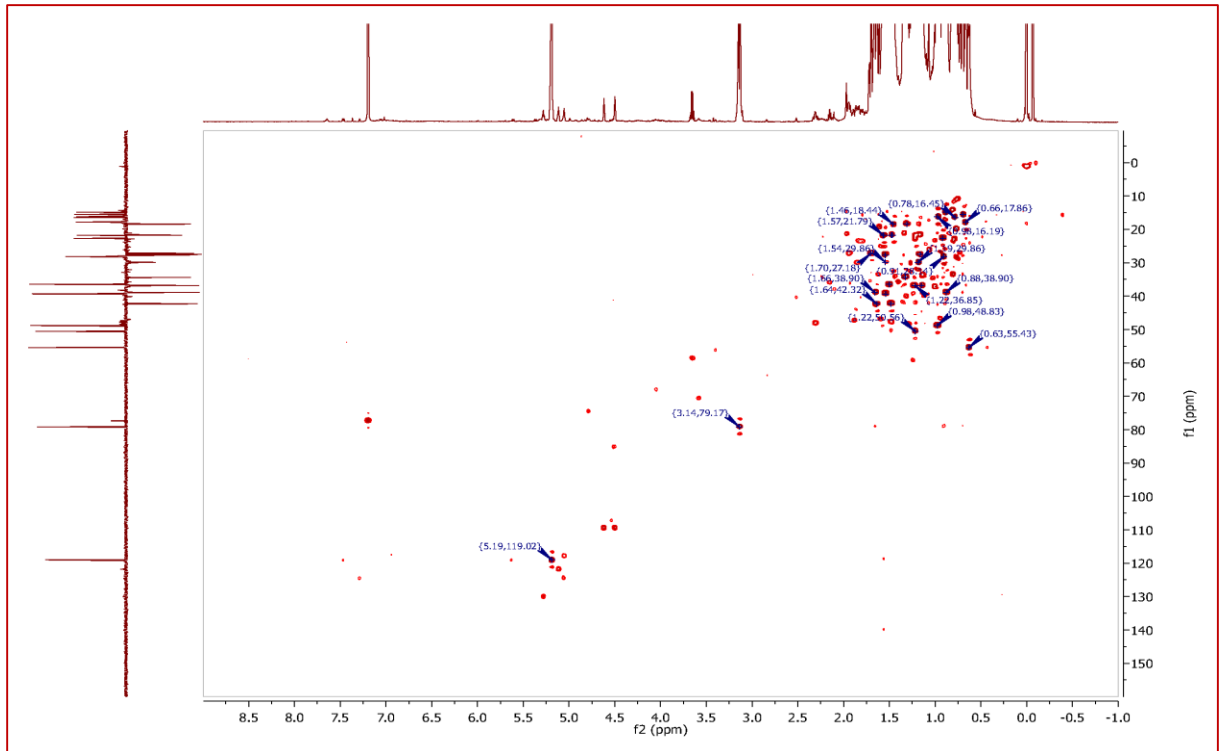
Şekil 4.8. LE-4 ¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃, ¹³C NMR 150 MHz)



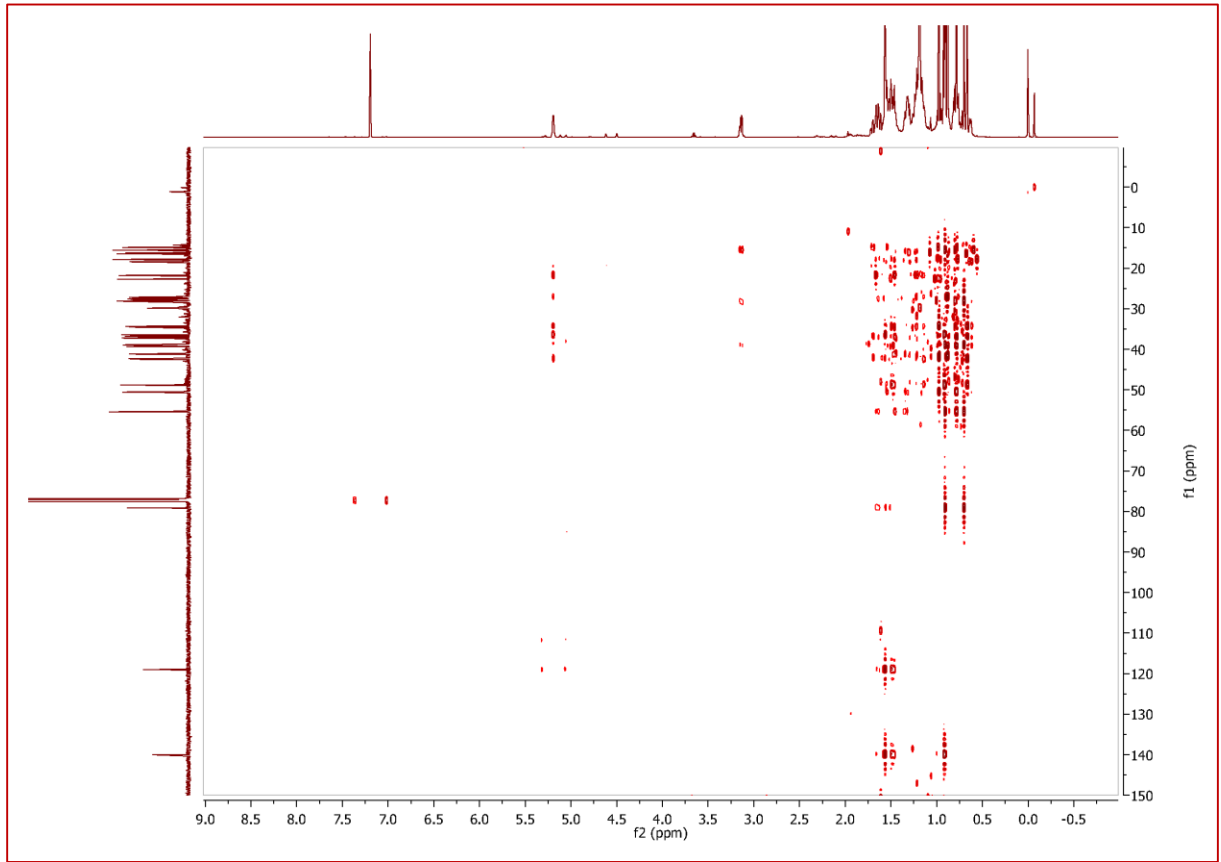
Şekil 4.9. LE-4 ¹H NMR Spektrumu (CDCl₃, ¹H NMR 600 MHz)



Şekil 4.10. LE-4 ^1H - ^1H COSY NMR Spektrumu (CDCl_3 , ^1H NMR 600 MHz,)



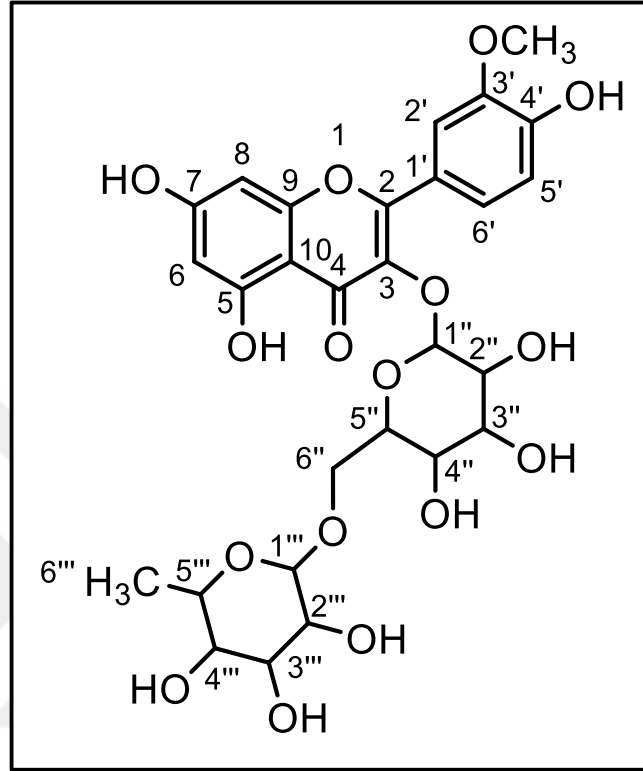
Şekil 4.11. LE-4 HSQC NMR Spektrumu (CDCl_3 , ^1H NMR 600 MHz, ^{13}C NMR 150 MHz)



Şekil 4.12. LE-4 HMBC NMR Spektrumu (CDCl_3 , ^1H NMR 600 MHz, ^{13}C NMR 150 MHz)

Flavonoit glikozitleri

Rutin (Kersetin-3-rutinozit)



L33: C₂₇H₃₀O₁₆ (Mol. Ağ: 610)

L33 maddesi, *C. davisiana* bitkisinin topraküstü kısımlarının *n*-butanol fraksiyonundan sarı renkli bir madde olarak elde edildi. İTK sürüklemelerinin ardından, NH₃ buharına tutulduğunda sarı rengin belirginleşmesi, reaktif püskürtülmeden önce UV₂₅₄ nm’de mavi, UV₃₆₅ nm’de açık sarı, vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtülmesinin ardından 105°C’de 1-2 dk ısıtılınca sarı-kahverengi renk vermesi bileşiğin flavonoit yapıda olabileceğini gösterdi.

¹H NMR ve DEPT spektrumlarında görülen δ_H 5,10 (d, $J=7,72$) δ_C 104,70 ve δ_H 4,51 (d, $J=1,63$) δ_C 102,41’de görülen anomerik proton ve karbon sinyalleri yapıda iki oz olabileceğini düşündürdü, anomerik protonların yarıma değerleri diğer oz sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde ozların β -glikoz ve ramnoz olduğu belirlendi. NMR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde biri karbonil (δ_C 179,25) olmak üzere 10 kuaterner karbon, 15 metin karbonu (CH), 1 metilen (CH₂) ve 1 metil (CH₃) bulunduğu tespit edildi. Oz moleküllerine ait sinyaller ayrıldığında aglikona ait 15 C atomu bulunduğu tespit edildi. ¹H NMR spektrumunun aromatik bölgedeki sinyallerle birlikte değerlendirildiğinde yapının bir flavonoit olduğu belirlendi. Yapıda OH gruplarının varlığı

IR spektrumu ile de kanıtlandı. HMBC spektrumunda görülen ^1H ^{13}C uzak mesafe etkileşiminden β -glikozun anomerik protonunun δ_{H} 5,22 (d, $J=7,31$) aglikonunun C-3 (δ_{C} 135,63) bağlandığını gösterdi. Tüm veriler değerlendirildiğinde ve literatürle kıyaslandığında yapının rutin molekülüne ait olduğu tespit edildi (Napolitano ve diğerleri, 2012; Agrawal 2013; Akkol ve diğerleri, 2015).

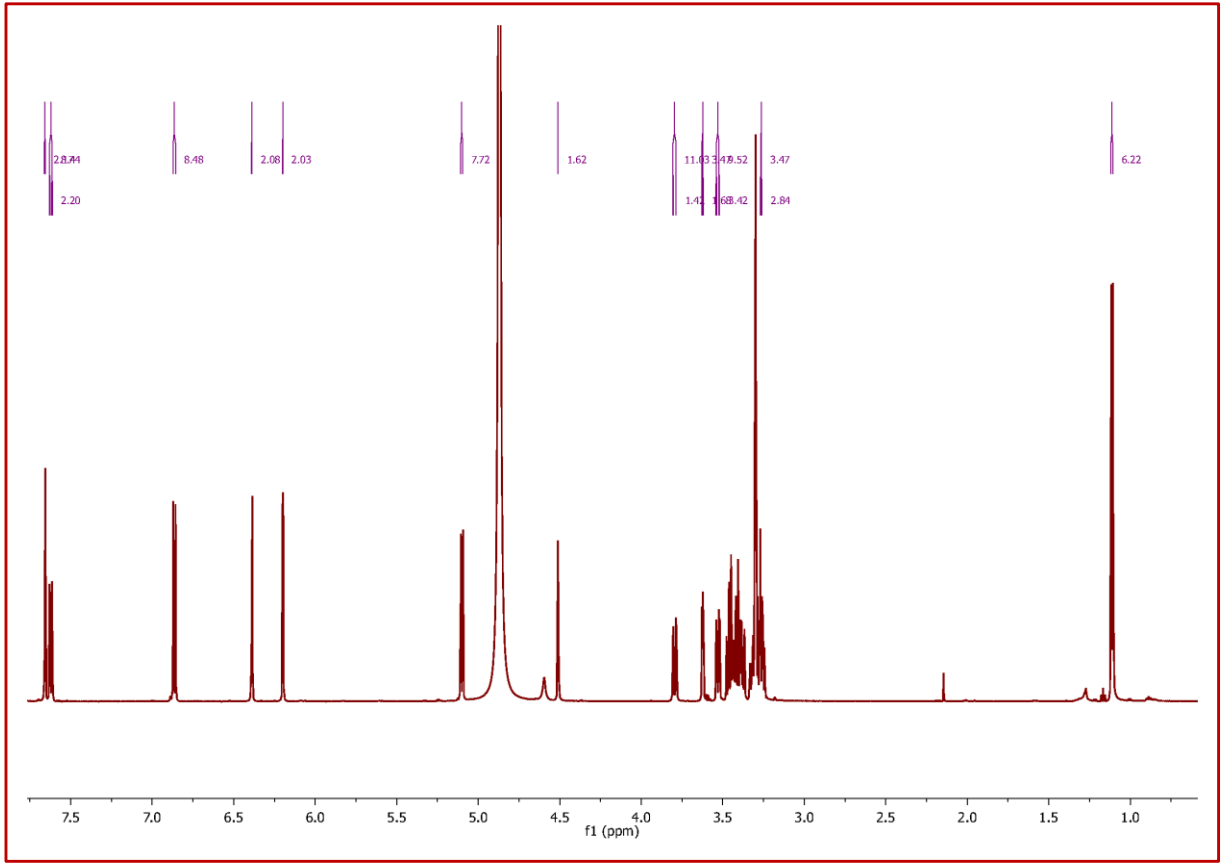
Çizelge 4.3. L-33'ün ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (CD_3OD , ^{13}C : 150 MHz; ^1H 600 MHz)

No	DEPT	δ_{C}	δ_{H} (ppm), J(Hz)	H→C HMBC
1	-	*		
2	C	158.50		
3	C	135.61		
4	C	179.39		
5	C	162.97		
6	CH	99.94	6.20 d (2.0)	C-10
7	C	166.05		
8	CH	94.85	6.39 d (2.08)	
9	C	159.31		
10	C	105.60		
1'	C	123.10		
2'	CH	117.67	7.66 d (2.17)	C-6'
3'	C	145.83		
4'	C	149.80		
5'	CH	116.04	6.86 d (8.48)	C-1', C-3'
6'	CH	123.54	7.62 dd (8.44/2.20)	C-4'
1''	CH	104.70	5.10 d (7.72)	C-3
2''	CH	78.17	3.42 **	C-5'''
3''	CH	75.72	3.44 **	
4''	CH	72.22	3.62 dd (3.47/1.68)	
5''	CH	77.20	3.32 **	
6''	CH_2	68.53	3.79/3.39 dd/** (11.03/1.42/**)	C-1'''

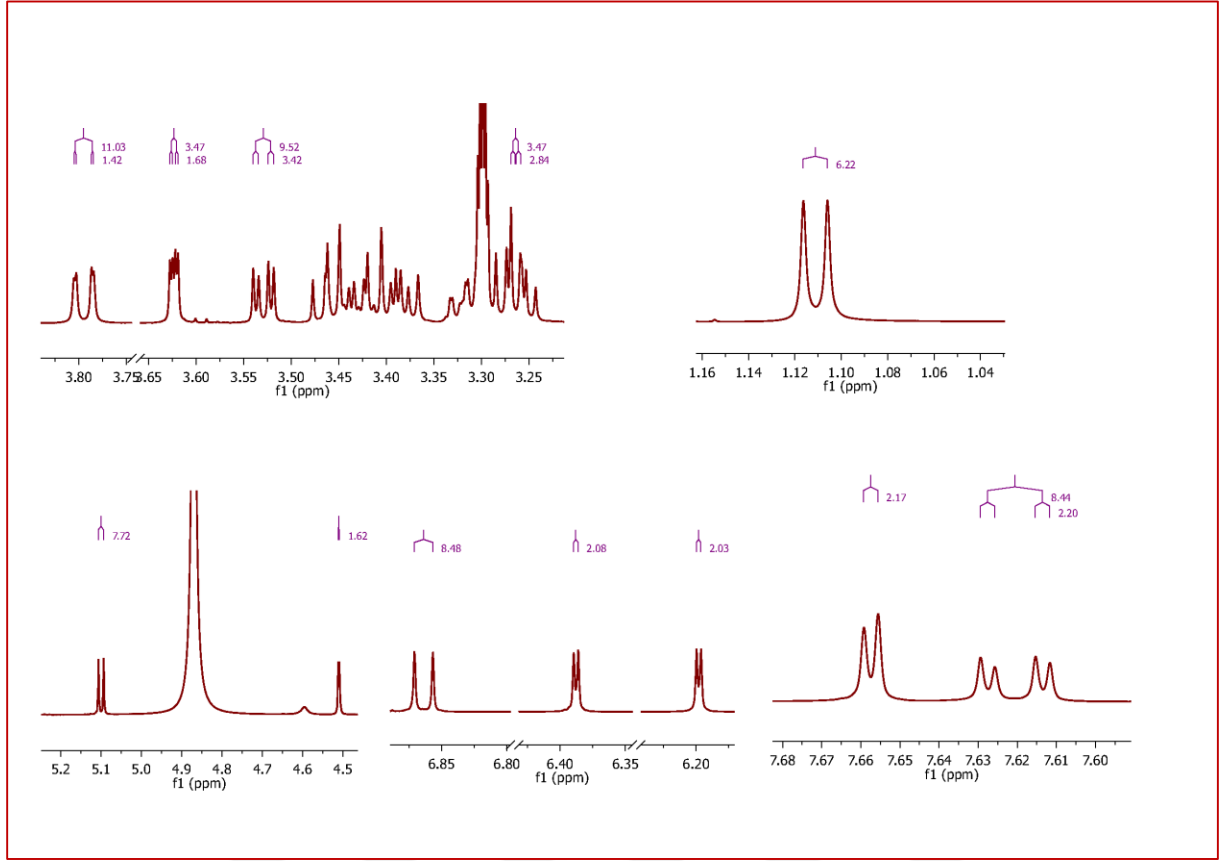
Çizelge 4.3. (devam) L-33'ün ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (metanol- d_4 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H 600 MHz)

1'''	CH	102.41	4.51 d (1.63)	C-2'''
2'''	CH	72.09	3.53 dd (9.52/3.42)	
3'''	CH	71.38	3.26 **	
4'''	CH	73.92	3.28 **	
5'''	CH	69.70	3.46 **	
6'''	CH_3	17.89	1.11 d (6.22)	C-5'''

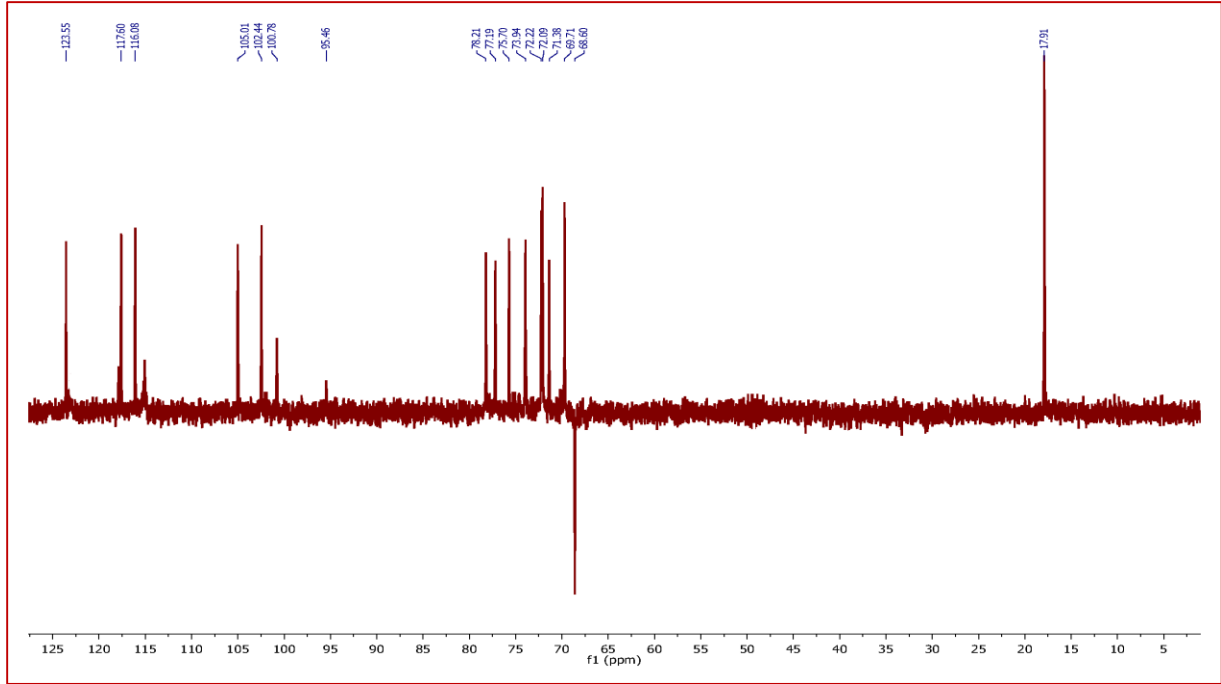
** sinyal örtüşmesi sebebiyle J değerleri ölçülememiştir



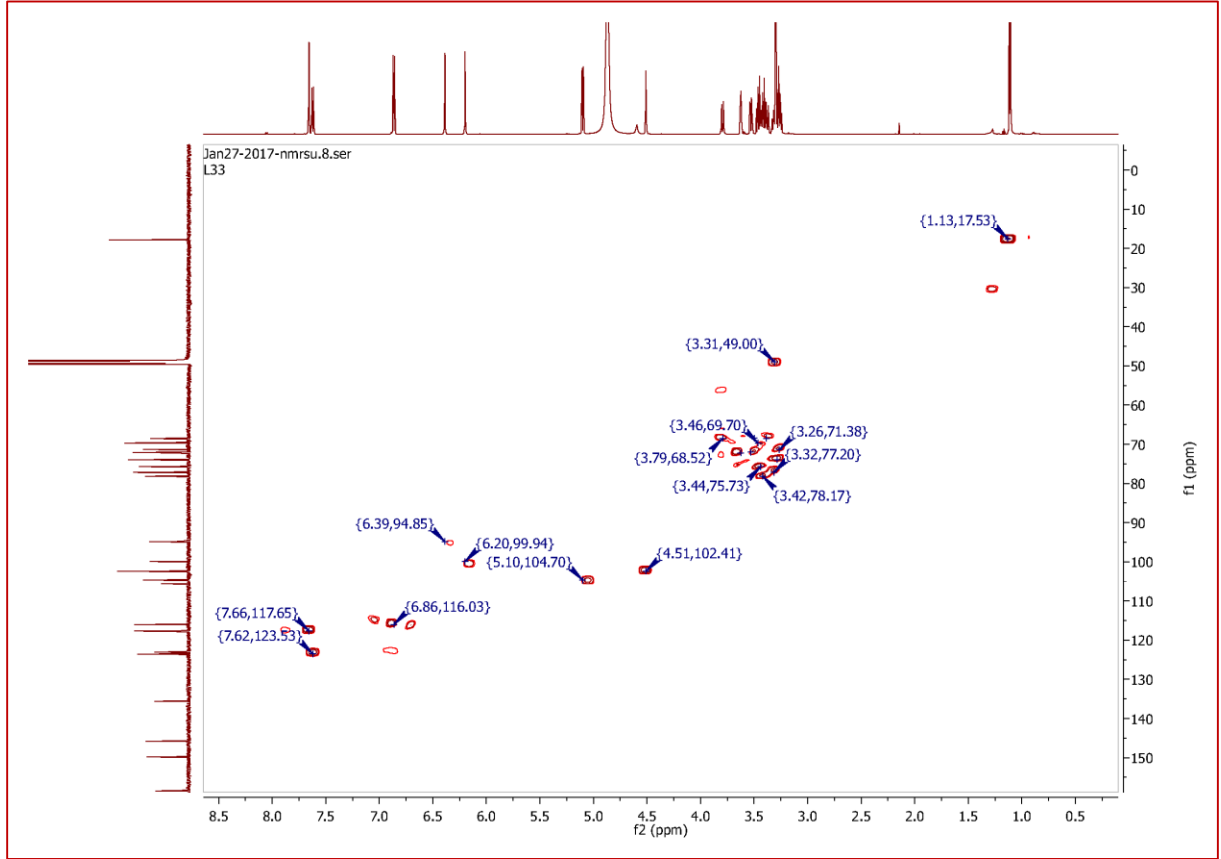
Şekil 4.13. L-33 ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD , ^1H NMR 600 MHz)



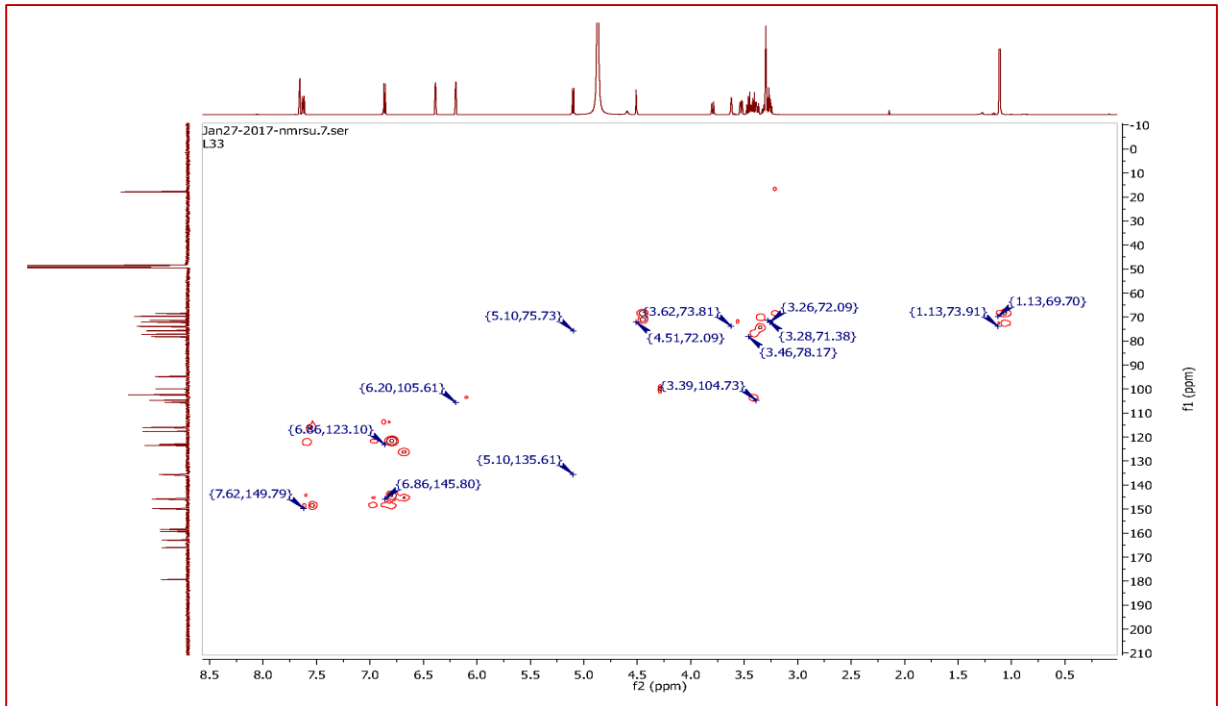
Şekil 4.14. L-33 ¹H NMR Spektrumu (büyütülmüş) (CD₃OD, ¹H NMR 600 MHz,)



Şekil 4.15. L-33 DEPT 135 NMR Spektrumu (CD₃OD, ¹³C NMR 150 MHz)

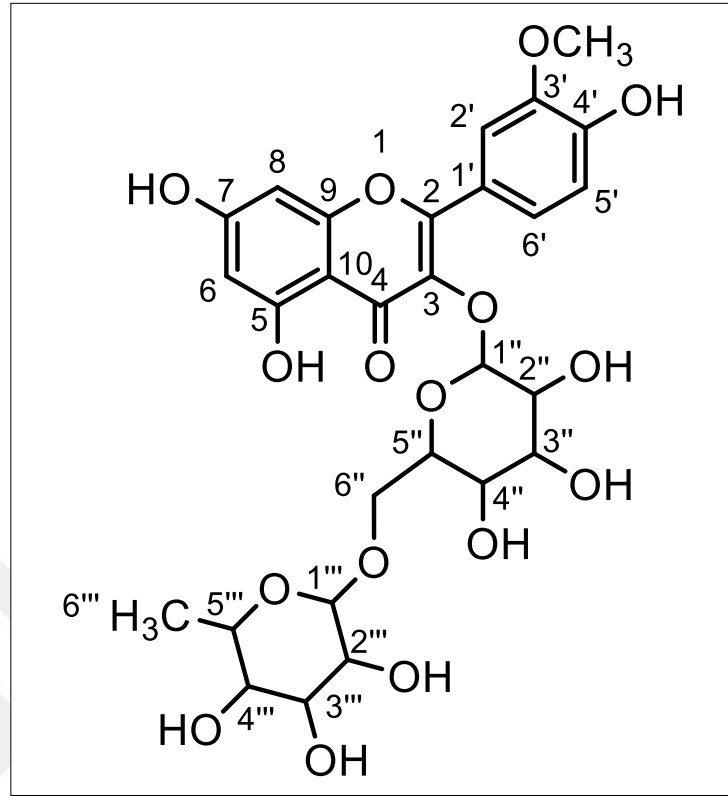


Şekil 4.16. L-33 HSQC NMR spektrumu (CD₃OD, ¹H NMR 600 MHz, ¹³C NMR 150 MHz)



Şekil 4.17. L-33 HMBC NMR Spektrumu (CD₃OD, ¹H NMR 600 MHz, ¹³C NMR 150 MHz)

İsoramnetin 3-O-rutinozit

L15: C₂₈H₃₂O₁₆ (Mol. Ağ: 624)

L15 maddesi, *C. davisiana* bitkisinin topraküstü kısımlarının *n*-butanol fraksiyonundan sarı renkli bir madde olarak elde edildi. İTK sürüklemelerinin ardından, NH₃ buharına tutulduğunda sarı rengin belirginleşmesi, reaktif püskürtülmeden önce UV₂₅₄ nm’de mavi, UV₃₆₅ nm’de açık sarı, vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtülmesinin ardından 105°C’de 1-2 dk ısıtılınca sarı-turuncusu renk vermesi bileşiğin flavonoit yapıda olabileceğini gösterdi.

¹H NMR ve DEPT spektrumlarında görülen δ_H 5,22 (d, *J*=7,31) δ_C 104,39 ve δ_H 4,53 (d, *J*=1,61) δ_C 102,47’de görülen anomerik proton ve karbon sinyalleri yapıda iki oz olabileceğini düşündürdü, anomerik protonların yarılama değerleri diğer oz sinyalleri ile birlikte değerlendirildiğinde ozların β-glikoz ve ramnoz olduğu belirlendi. NMR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde biri karbonil (δ_C 179,25) olmak üzere 10 kuaterner karbon 15 metin karbonu (CH), 1 metilen (CH₂) ve 2 metil (CH₃) grubunun bulunduğu tespit edildi. δ_H 3,94 s, δ_C 56,74’de görülen sinyaller yapıda bir metoksi grup (OCH₃) olduğunu ve HMBC uzak alan etkileşiminde bu grubun δ_C 148,25’e bağlı olduğu görüldü. Oz moleküllerine ait sinyaller ayrıldığında aglikona ait 16 C atomu bulunduğu tespit edildi. ¹H NMR spektrumunun aromatik bölgedeki sinyallerle birlikte değerlendirildiğinde yapının bir flavonoit olduğu belirlendi. Yapıda OH gruplarının varlığı

IR spektrumu ile de kanıtlandı. HMBC spektrumunda görülen ^1H ^{13}C uzak mesafe etkileşiminden β -glükozun anomerik protonunun δ_{H} 5,22 (d, J=7,31) aglikonun C-3 (δ_{C} 135,41) konumuna bağlandığı görüldü. Tüm veriler değerlendirildiğinde ve literatürle karşılaştırıldığında yapının izoramnetin 3-O rutinozit olduğu belirlendi (Napolitano ve diğerleri, 2012; Agrawal 2013).

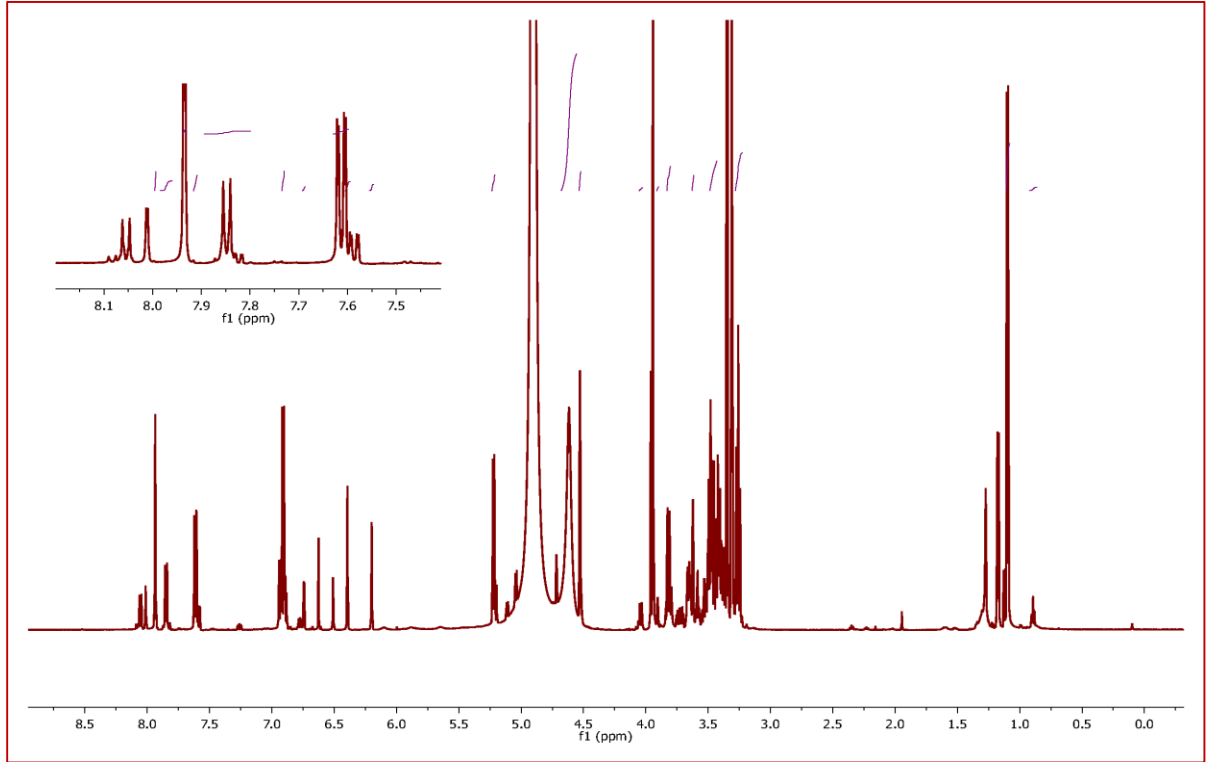
Çizelge 4.4. L-15'in ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (metanol- d_4 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H 600 MHz)

N	DEPT	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), J(Hz)	H→C HMBC
1	-	*		
2	C	158.36		
3	C	135.41		
4	C	179.25		
5	C	162.84		
6	CH	100	6.20 d (2.02)	C-8, C-10
7	C	165.99		
8	CH	94.95	6.39 d (2.07)	C-6, C-10, C-7, C-9
9	C	158.83		
10	C	105.61		
1'	C	122.93		
2'	CH	114.49	7.93 d (2.04)	C-2, C-6', C-3'
3'	C	148.25		
4'	C	150.78		
5'	CH	116.07	6.91 d (8.48)	C-1', C-3', C-4'
6'	CH	123.95	7.60 dd (8.47/2.09)	C-2, C-2'
1''	CH	104.39	5.22 d (7.31)	C-3
2''	CH	75.86	3.75 **	
3''	CH	77.28	3.47 **	
4''	CH	72.02	3.66 **	
5''	CH	78.09	3.41 **	
6''	CH ₂	68.50	3.82/3.46 dd/** (8.22/2.26)	C-1'''
1'''	CH	102.47	4.53 d (1.61)	
2'''	CH	71.56	3.26 **	
3'''	CH	72.23	3.43 **	
4'''	CH	73.79	3.26 **	
5'''	CH	69.76	3.34 **	

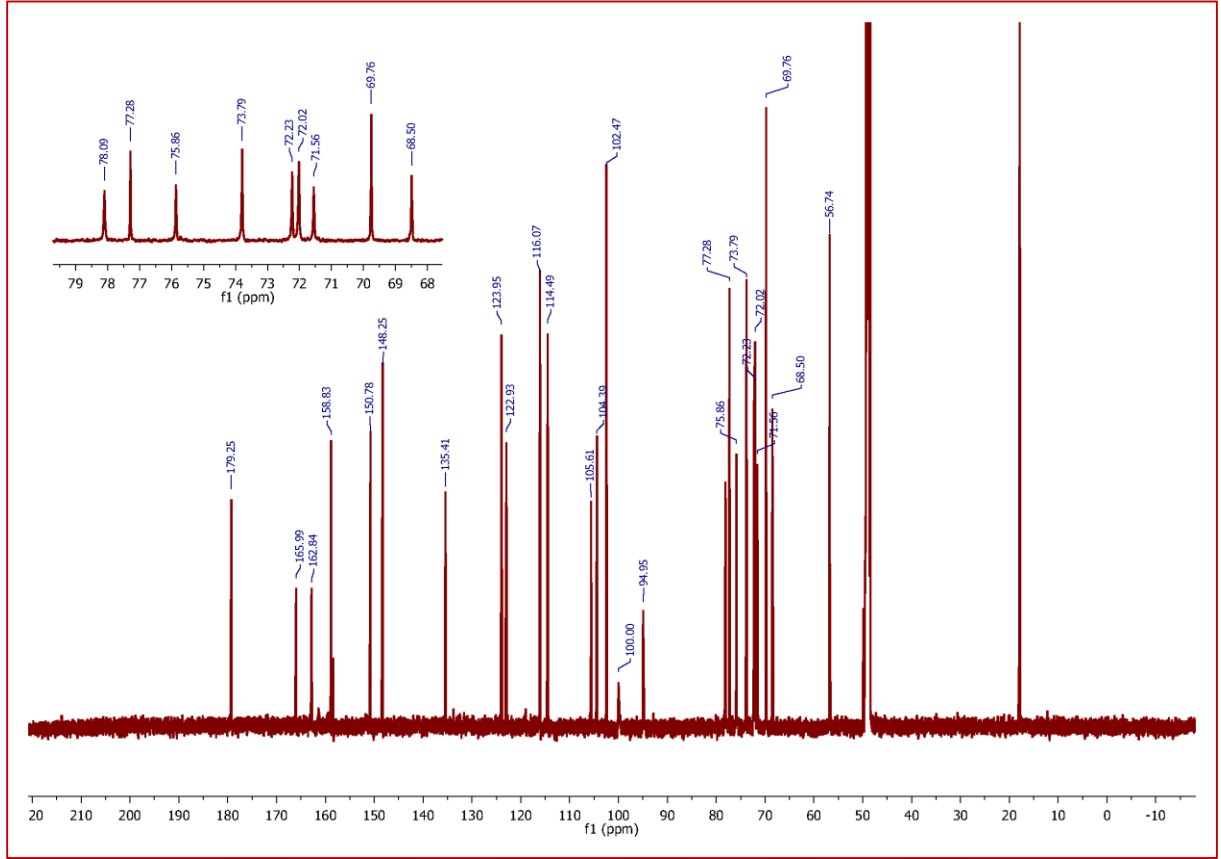
Çizelge 4.4. (devam) L-15'in ^{13}C ve ^1H NMR spektroskopik değerleri (metanol- d_4 , ^{13}C : 150 MHz; ^1H 600 MHz)

6'''	CH_3	17.87	1.10 d (6.2)	C-5'''
OCH_3	CH_3	56.74	3.94 s	C-3'

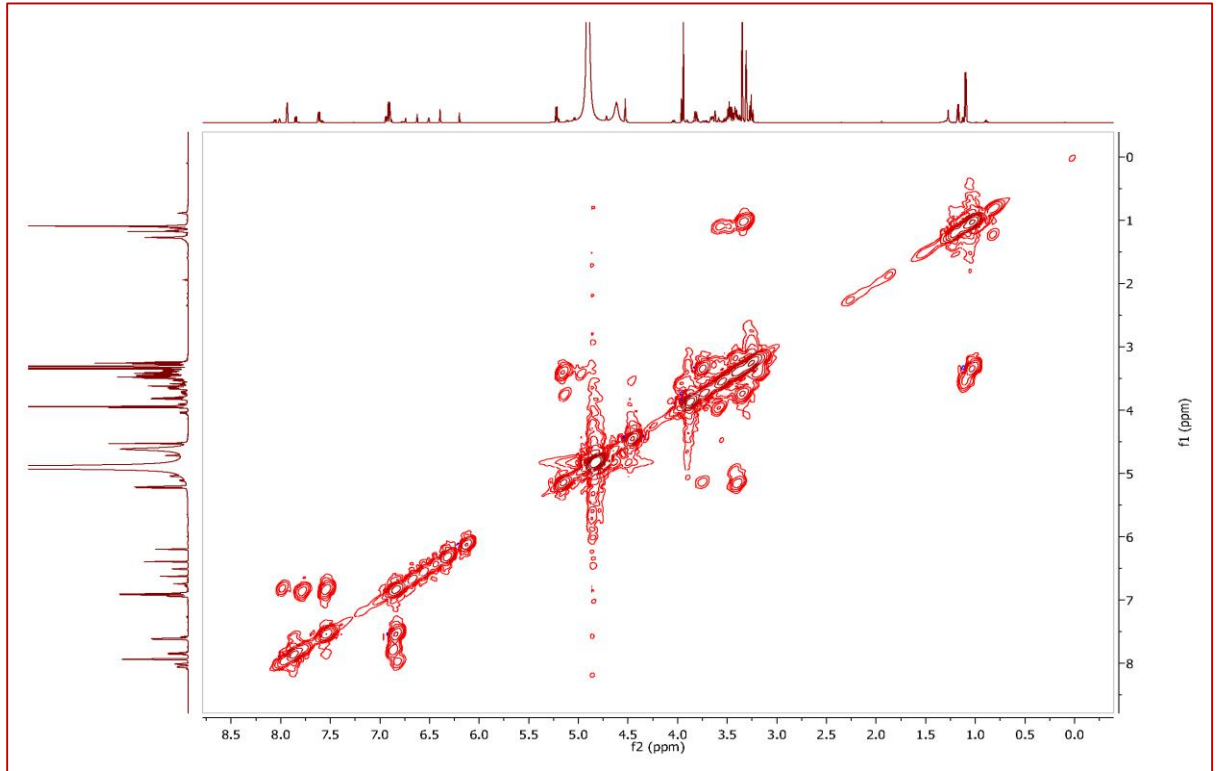
** sinyal örtüşmesi sebebiyle J değerleri ölçülememiştir



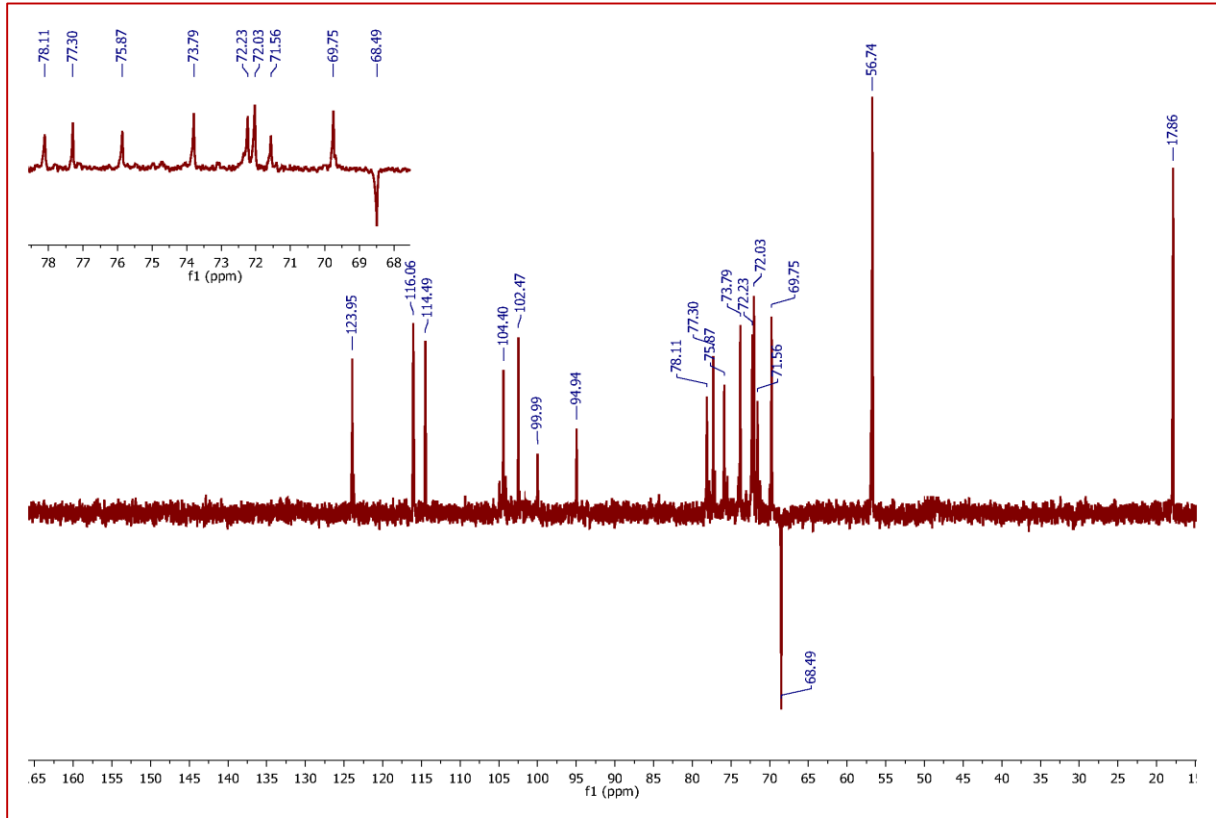
Şekil 4.18. L-15 ^1H NMR Spektrumu (CD_3OD , ^1H NMR 600 MHz)



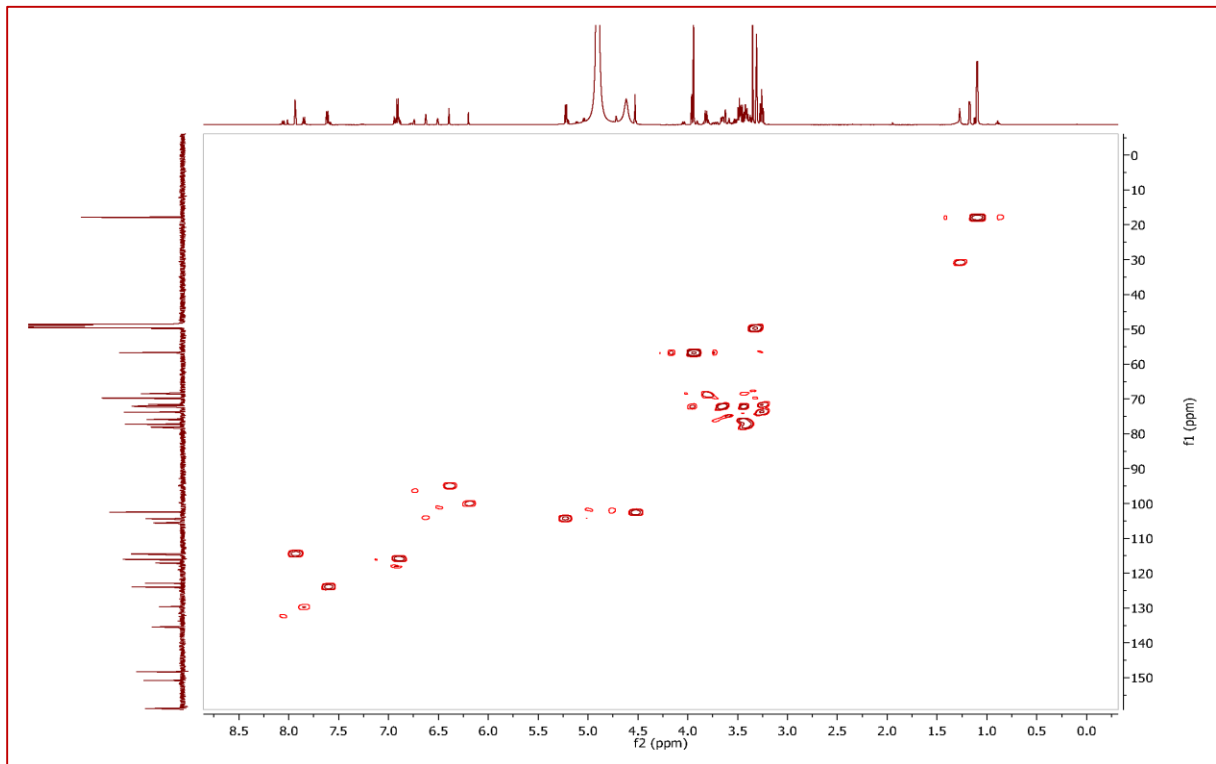
Şekil 4.19. L-15 ^{13}C NMR Spektrumu (CD_3OD , ^{13}C NMR 150 MHz)



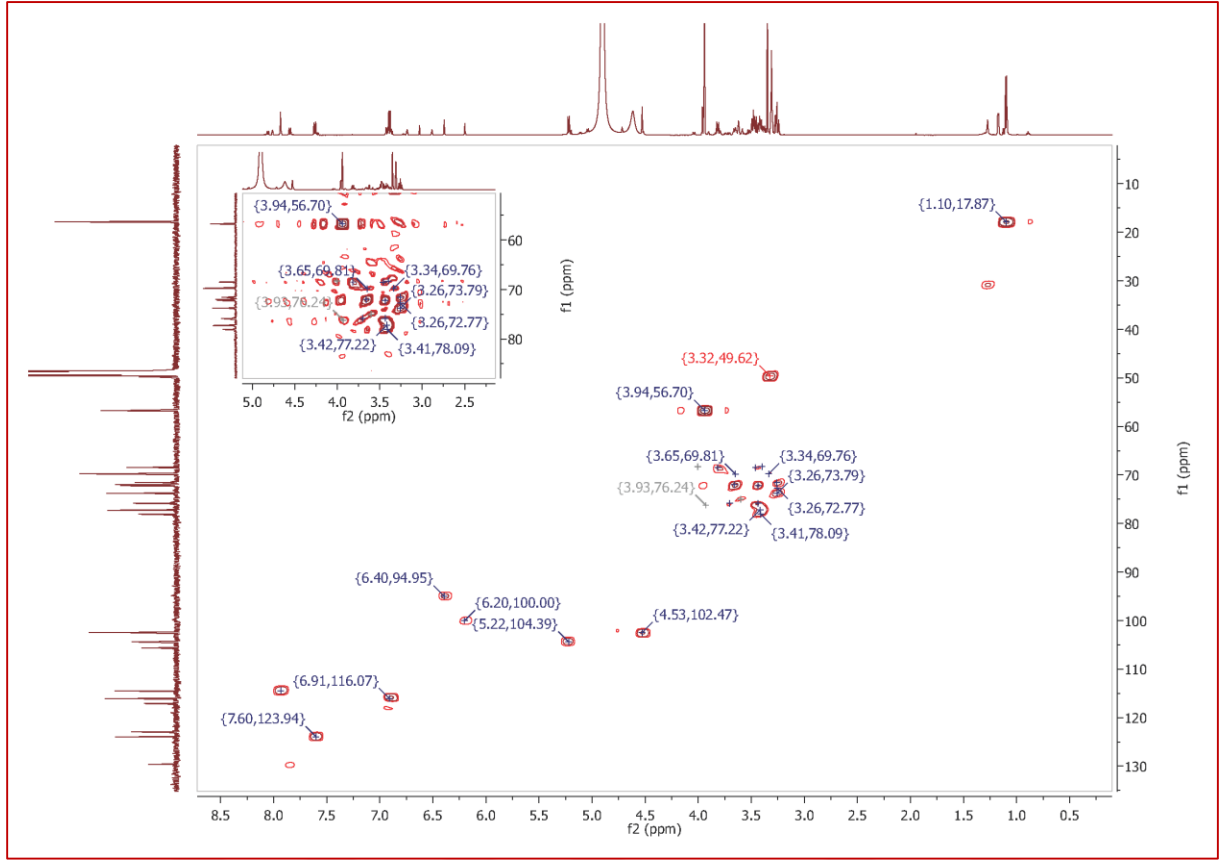
Şekil 4.20. L-15 ^1H - ^1H COSY NMR Spektrumu (CD_3OD , ^1H NMR 600 MHz)



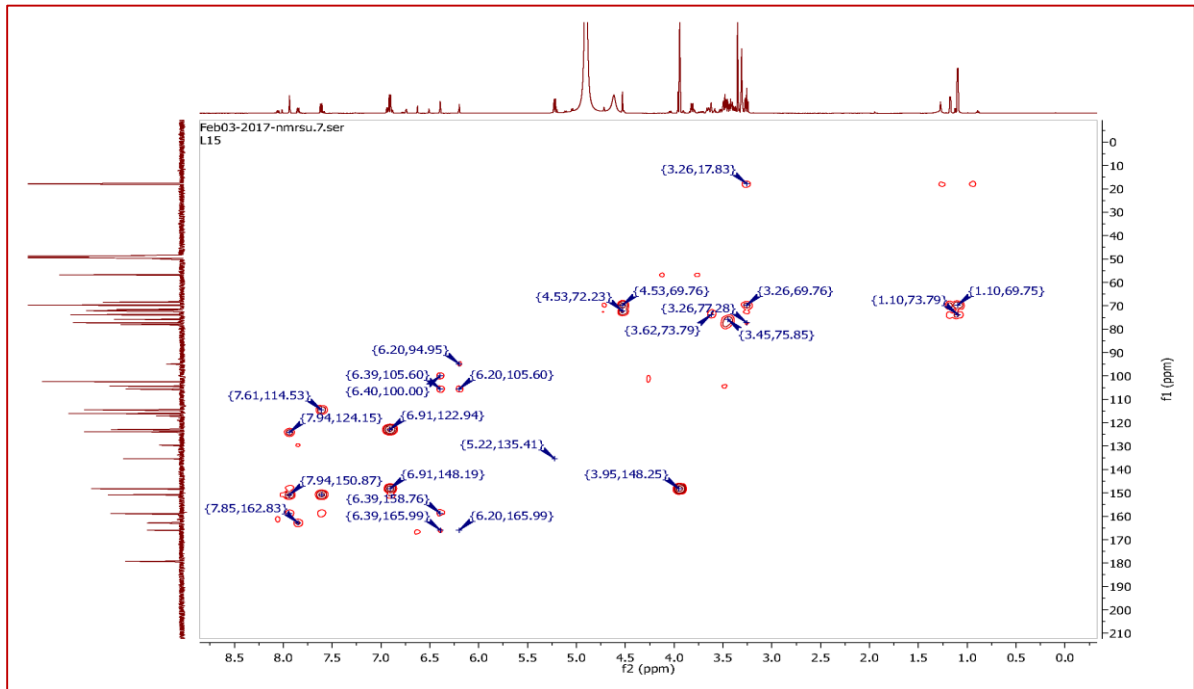
Şekil 4.21. L-15 DEPT 135 NMR Spektrumu (CD_3OD , ^{13}C NMR 150 MHz)



Şekil 4.22. L-15 HMQC NMR spektrumu (CD_3OD , ^1H NMR 600 MHz, ^{13}C NMR 150 MHz)



Şekil 4.23. L-15 HMQC NMR Spektrumu (büyütülmüş) (CD_3OD , ^1H NMR 600 MHz, ^{13}C NMR 150 MHz)

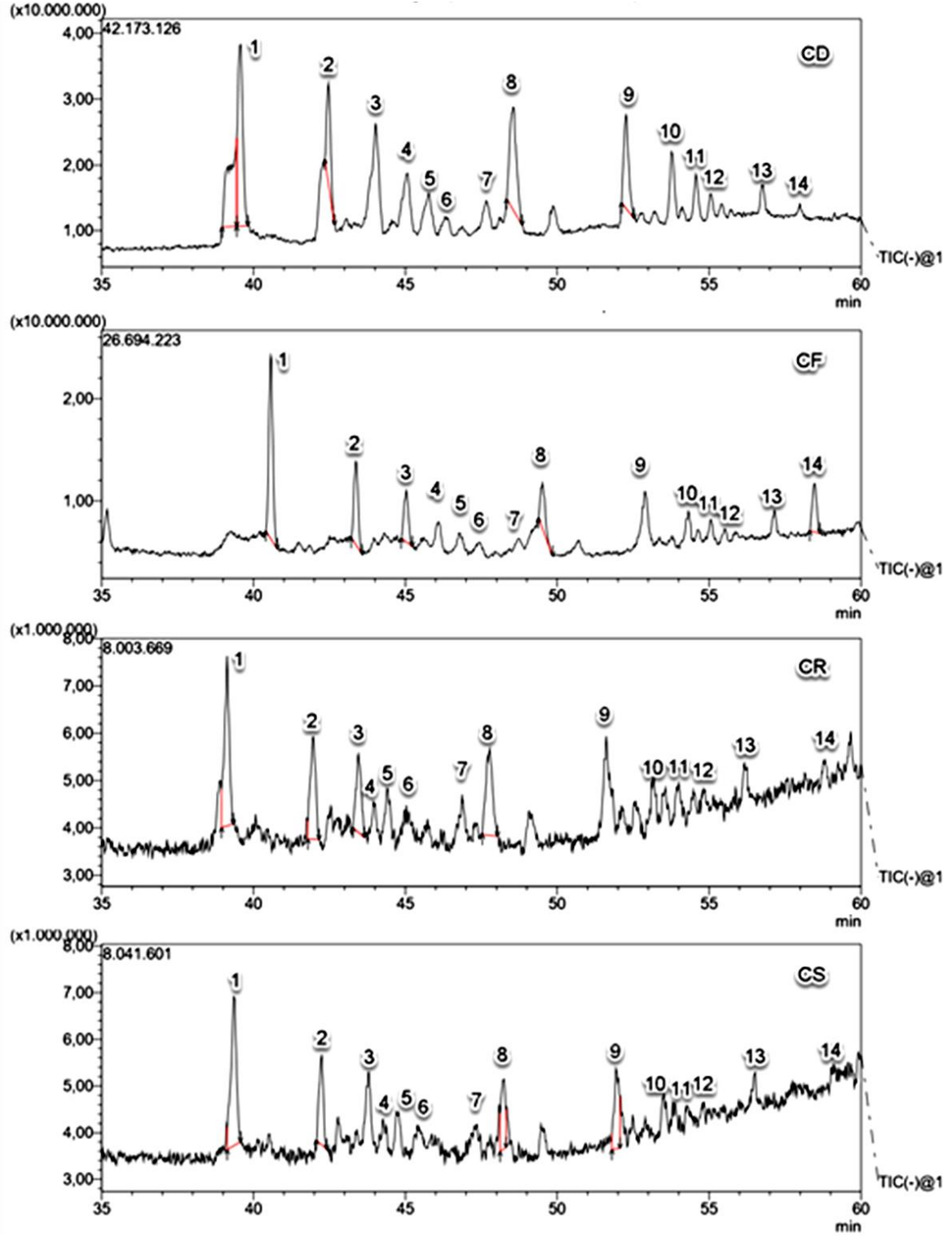


Şekil 4.24. L-15HMBC NMR Spektrumu (CD_3OD , ^1H NMR 600 MHz, ^{13}C NMR 150 MHz)

4.3. Sıvı Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi/ Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) analizleri

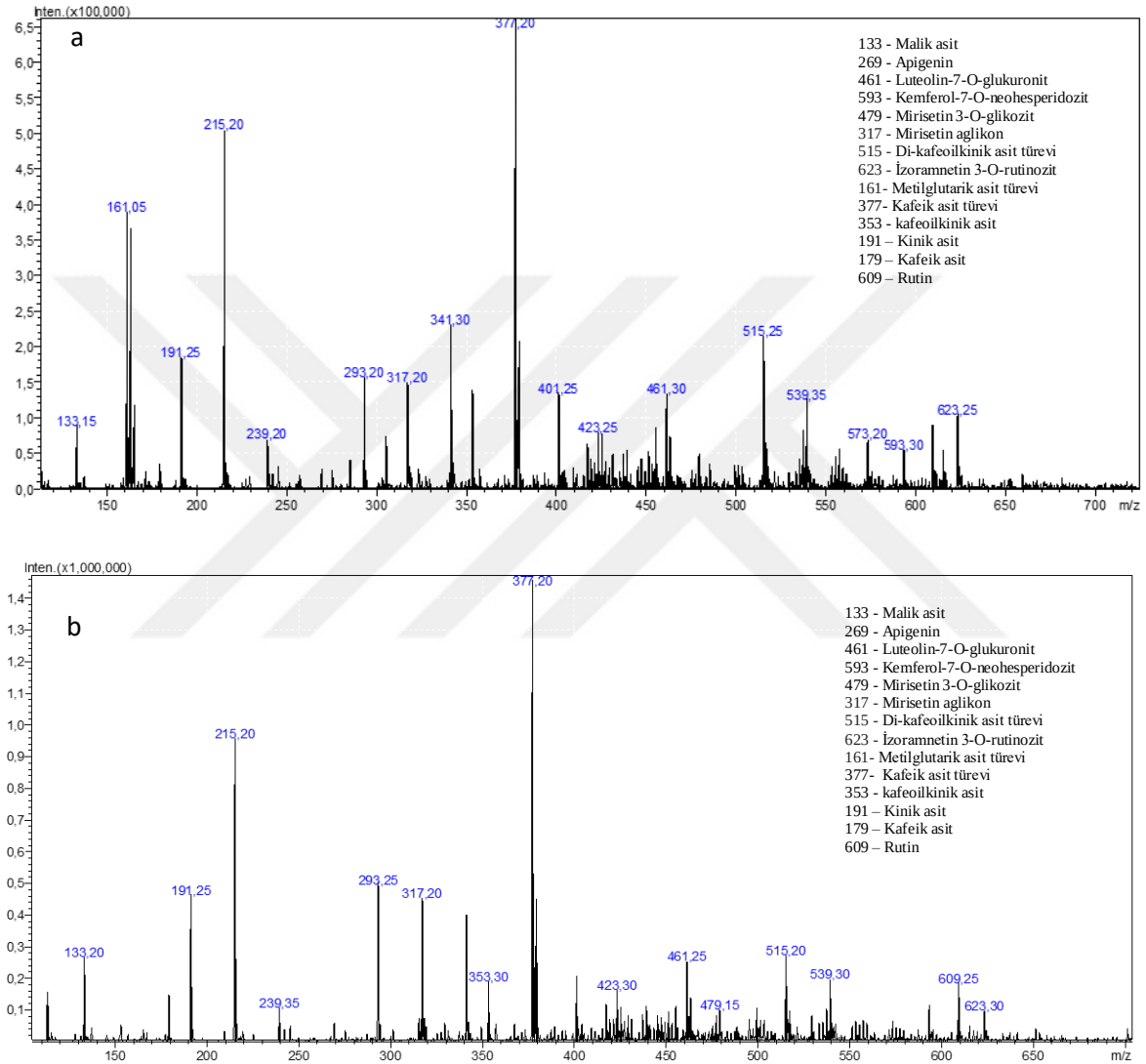
Çalışmada kullanılan 4 *Cousinia* türünün kimyasal içeriklerini kıyaslamak amacıyla metanol ekstrelerini kullanarak (CS, CR, CD ve CF), ayrıca major madde olarak izole edilen ψ -taraksasterol bileşiğinin elde edildiği Fr:3'ün içerdiği bileşikleri belirlemek amacıyla Elektron Sprey İyonlaşma yöntemi (ESI) ile LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi. Ekstrele ait toplam iyon kromatogramları Şekil 4.25'de, ekstreler ve Fr:3'e ait kütle spektrumları ise Şekil 4.26'da verilmiştir.

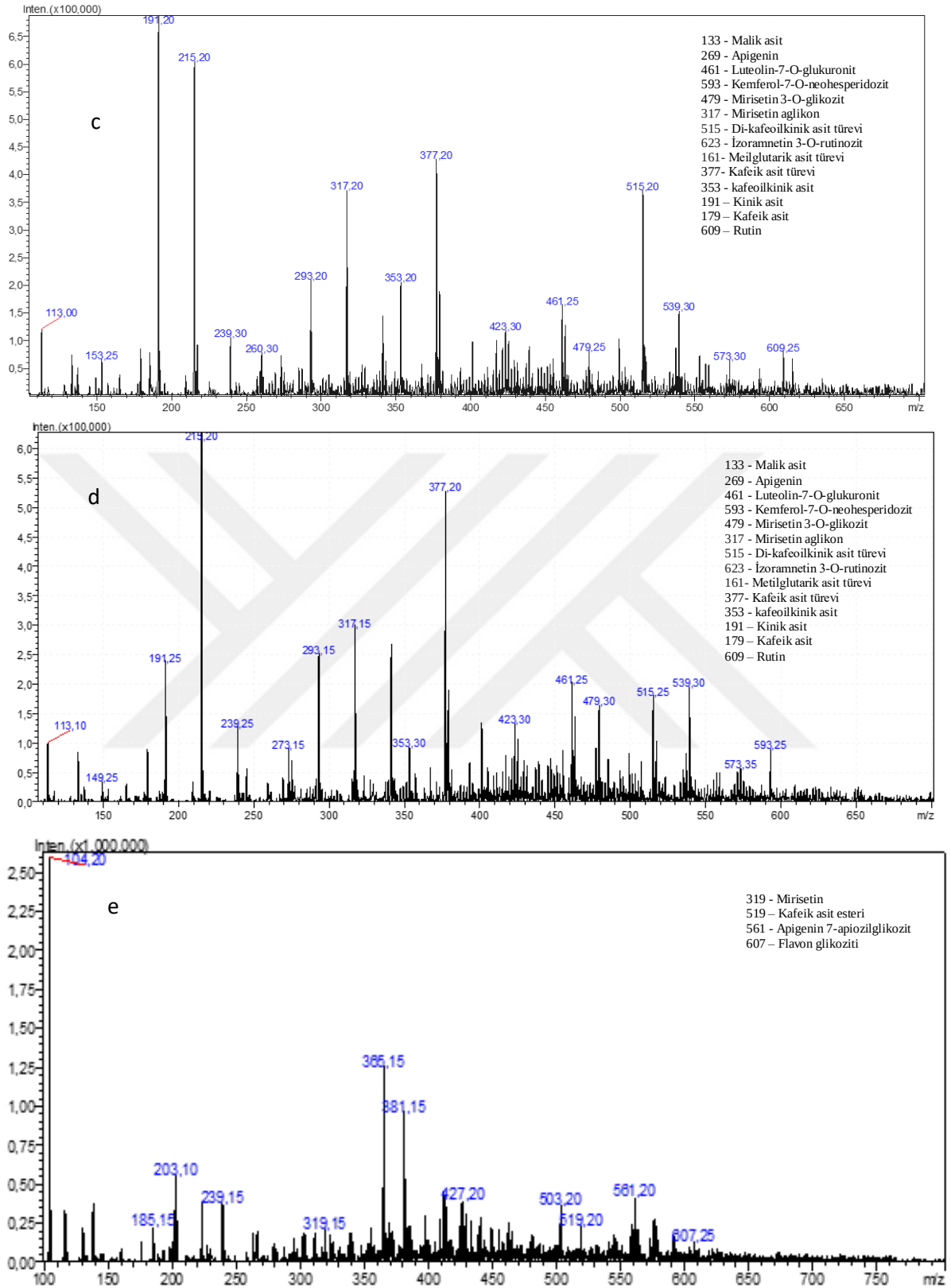




Şekil 4.25. (a) CD, (b) CF, (c) CR ve (d) CS kodlu metanol ekstraktlarının LC-MS/MS analizi sonucu alınan toplam iyon kromatogramları. **CD:** *C. davisiana*, **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*, **CS:** *C. stenocephala*

Spektrumlarda bulunan piklere ait ana fragment iyonları ise Çizelge 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. LC-MS/MS analizleri ile ekstraların kimyasal kompozisyon açısından benzer olduğu yalnızca içerdikleri bileşiklerin miktarlarında türler arası farklılıklar olduğu, Fr:3'de ise sinerjistik etkiden sorumlu olabilecek maddeler belirlendi. Bunun dışında ekstraların daha çok kafeik ve kinik asit türevleri içerdiği tespit edildi.





Şekil 4.26. (a) CD, (b) CF, (c) CR, (d) CS kodlu metanol ekstrlerine ve (e) Fr:3'e ait kütle spektrumları. **CD**: *C. davisiana*, **CF**: *C. foliosa*, **CR**: *C. ramosissima*, **CS**: *C. stenocephala*

Çizelge 4.5. Dört türün metanol ekstralarında tespit edilen bileşiklerin MS/MS fragmanları (RT- tutunma zamanı)

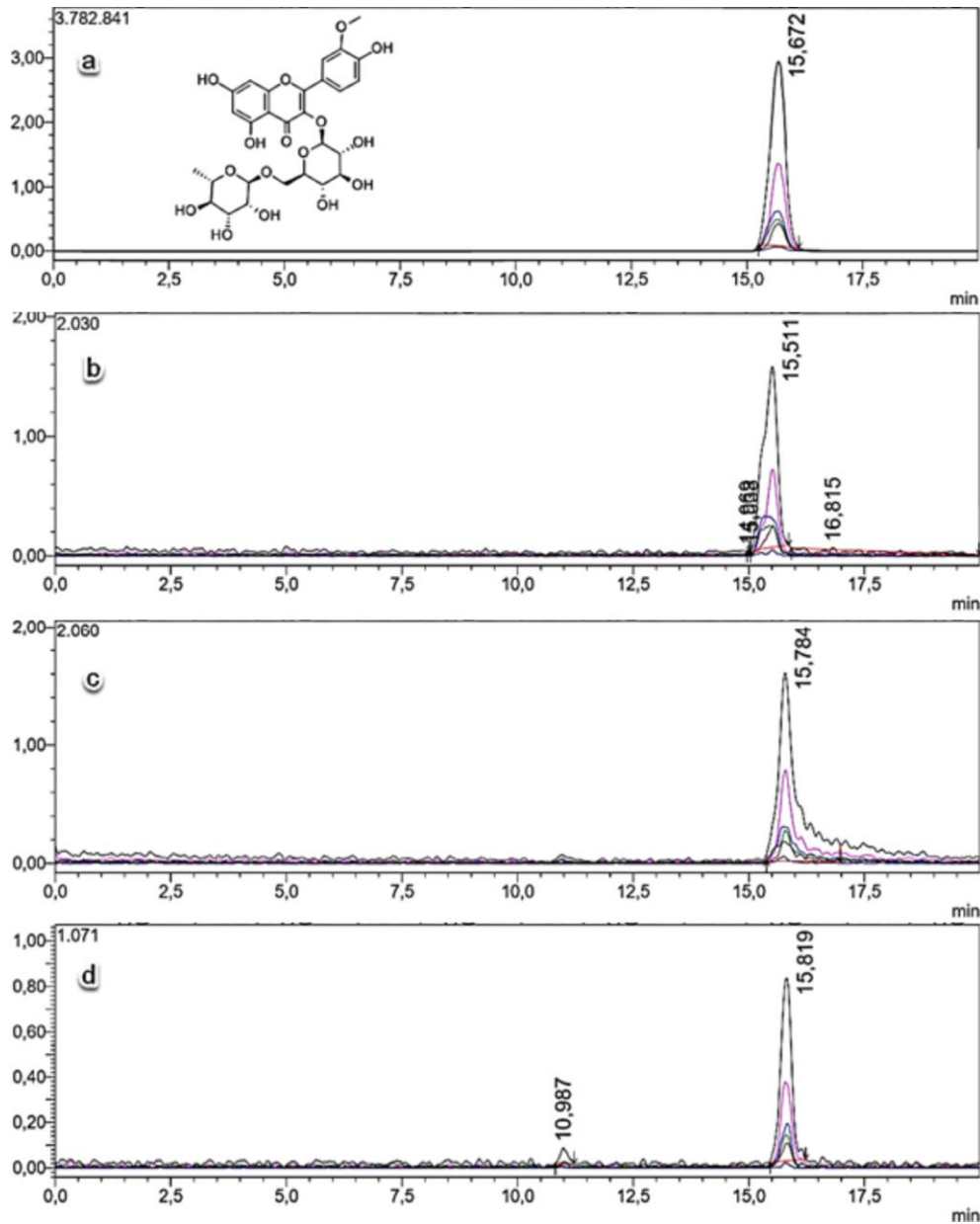
Pik No	CD MeOH Rt/dk	CF MeOH Rt/dk	CR MeOH Rt/dk	CS MeOH Rt/dk	(M-H) ⁻	Ana Fragment ionlar (m/z)	Bileşik/Kaynak
1	39,60	40,60	39,18	40,43	133	133, 115, 71	Malik asit (González ve diğerleri, 2011)
2	42,45	41,50	42,00	42,42	269	269, 183, 159, 151, 149, 117, 107, 83, 65	Apigenin (Prasain ve diğerleri, 2003)
3	44,00	44,30	44,76	44,37	461	285	Luteolin-7-O-glukuronit (Lin ve diğerleri, 2000)
4	45,00	45,05	44,38	44,76	593	285, 284, 331, 593	Kemferol-7-O-neohesperidozit (Hvattum ve Ekeberg, 2003)
5	45,80	45,57	46,02	45,46	479	317, 316, 287, 271	Mirisetin 3-O-glikozit (Downey ve Rochfort, 2008)
6	46,40	46,10	46,50	46,80	317	-	Mirisetin aglikon (De Brito ve diğerleri, 2007)
7	47,60	47,41	47,66	48,78	515	353, 191, 179, 173, 135	Di-kafeoilkinik asit türevi (Downey ve Rochfort, 2008)
8	48,60	48,73	49,18	48,62	623	315	İzoramnetin 3-O-rutinozit (Lin ve diğerleri 2000)
9	52,20	52,90	52,34	52,99	161	161, 101, 99, 57	Metilglutarik asit türevi (Horai ve diğerleri, 2010)
10	53,80	53,38	53,07	53,38	377	341, 215, 179, 161,119	Kafeik asit türevi (Maoka ve diğerleri, 2002)
11	54,60	54,03	55,05	55,09	353	191, 179, 173, 135	Kafeoilkinik asit (Lin ve diğerleri 2000)
12	55,10	55,07	55,37	55,75	191	191, 93, 85	Kinik asit (Clifford ve diğerleri, 2015)
13	56,80	56,86	56,18	57,55	179	135, 87	Kafeik asit (Horai ve diğerleri, 2010)
14	64,10	63,78	64,17	64,12	609	301	Rutin (Karaçelik ve diğerleri, 2015)

Çizelge 4.6. Fr:3 fraksiyonunda tespit edilen bileşiklerin MS/MS fragmanları

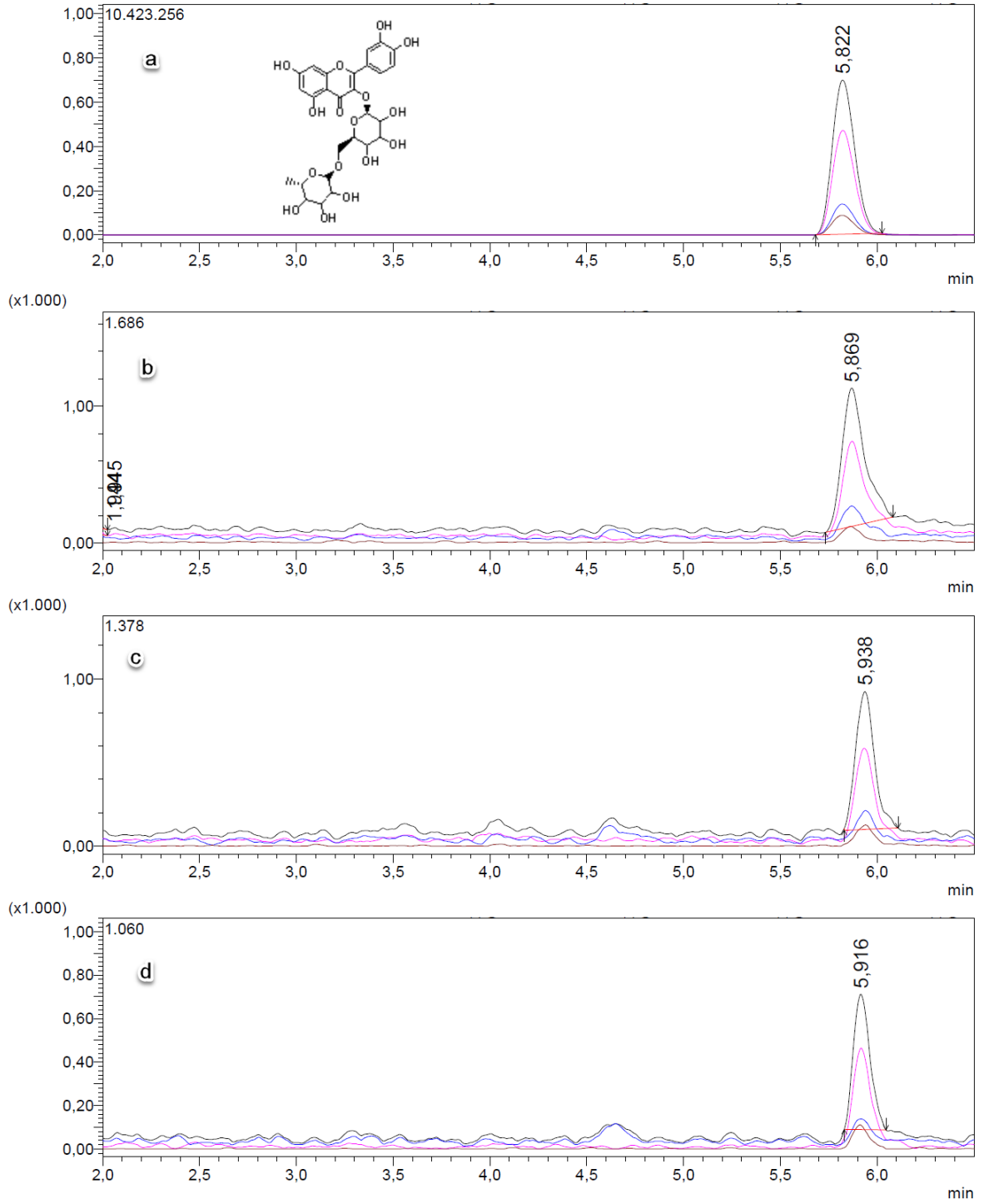
Pik No	(M-H) ⁺	Ana Fragment ionlar (m/z)	Bileşik/Kaynak
1	319	287, 271,179,151,137	Mirisetin (Regazzoni ve diğerleri, 2013)
2	519	325,163	Kafeik asit esterleri (Atoui ve diğerleri, 2005)
3	561	271	Apigenin 7-apiozilglikozit (Atoui ve diğerleri, 2005)
4	607	287	Flavon glikoziti (Mansouri ve diğerleri, 2005)

4.3.1. Elde edilen saf maddelerin diğer ekstrelerde varlığının LC-MS/MS ile belirlenmesi

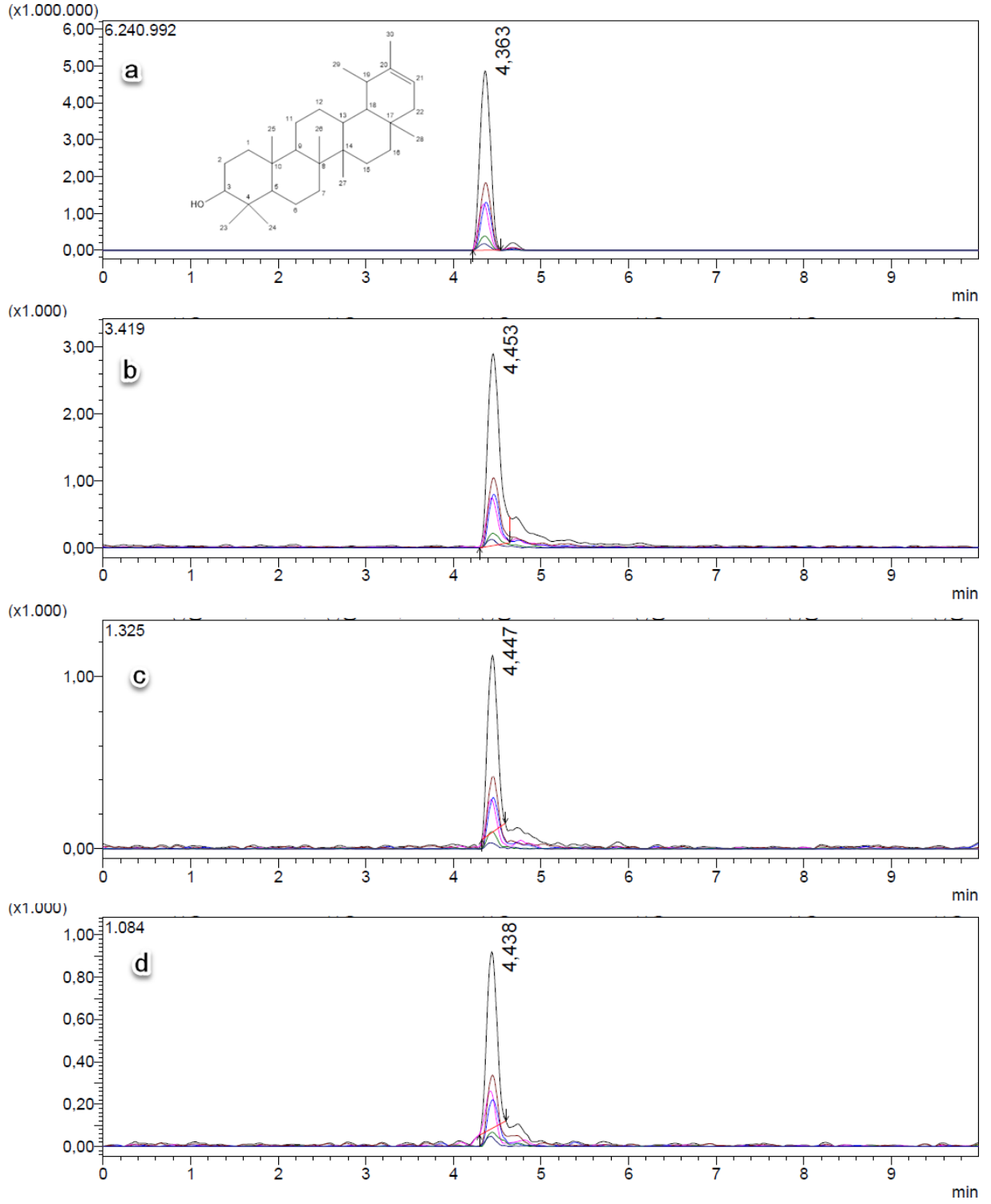
C. stenocephala bitkisinden (LE-4) ve *C. davisiana*' dan izole edilen bileşiklerin (L15 ve L33) diğer 3 türde de var olup olmadığının belirlenmesi amacıyla elde edilen saf maddeler için negatif iyonlaşma modunda MRM (multiple reaction monitoring) çiftleri oluşturuldu. Saf maddeler ile oluşturulan bu MRM metodu diğer türlerin metanol ekstrelerine (CS, CR ve CF) uygulandı. Maddelerin kolonda tutunma zamanları (RT) da göz önünde bulundurulduğunda Şekil 4.27'-4.29'da görüldüğü üzere *C. stenocephala* ve *C. davisiana*'dan izole edilen bileşiklerin diğer 3 türde de mevcut olduğu belirlendi.



Şekil 4.27. L15 'in negatif MRM iyon kromatogramı a) L15; b) CR; c)CF d) CS. CF: *C. foliosa*, CR: *C. ramosissima*, CS: *C. stenocephala*



Şekil 4.28. L33 'ün negatif MRM iyon kromotogramı a) L33; b) CR; c)CF d) CS. **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*, **CS:** *C. stenocephala*



Şekil 4.29. LE-4 'ün negatif MRM iyon kromatogramı a) LE-4; b) CR; c)CF d) CD.
CD: *C. davisiana*, **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*

4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına ait Bulgular

4.4.1. Hücre kültürü çalışmaları

CD, CF, CR ve CS kodlu ekstreler ve CS'den elde edilen alt ekstreler, CSD alt ekstresinden elde edilen fraksiyonlar ve saf maddelerin sitotoksik etkileri A549, Colo 205 ve BEAS hücre hatlarında SRB yöntemi kullanılarak ölçüldü. Ekstreler ve fraksiyonlar 125-1000 µg/mL, saf maddeler ise 6,25-100 µg/mL konsantrasyon aralığında test edildi. Ekstrelerden CS kodlu ekstre nin kanser hücre hatlarında özellikle Colo 205 hücre hattında anlamlı inhibisyon etki gösterdiği görüldü. Sonuçlar % hücre canlılığı olarak Şekil 4.30 'da ve IC₅₀ değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.



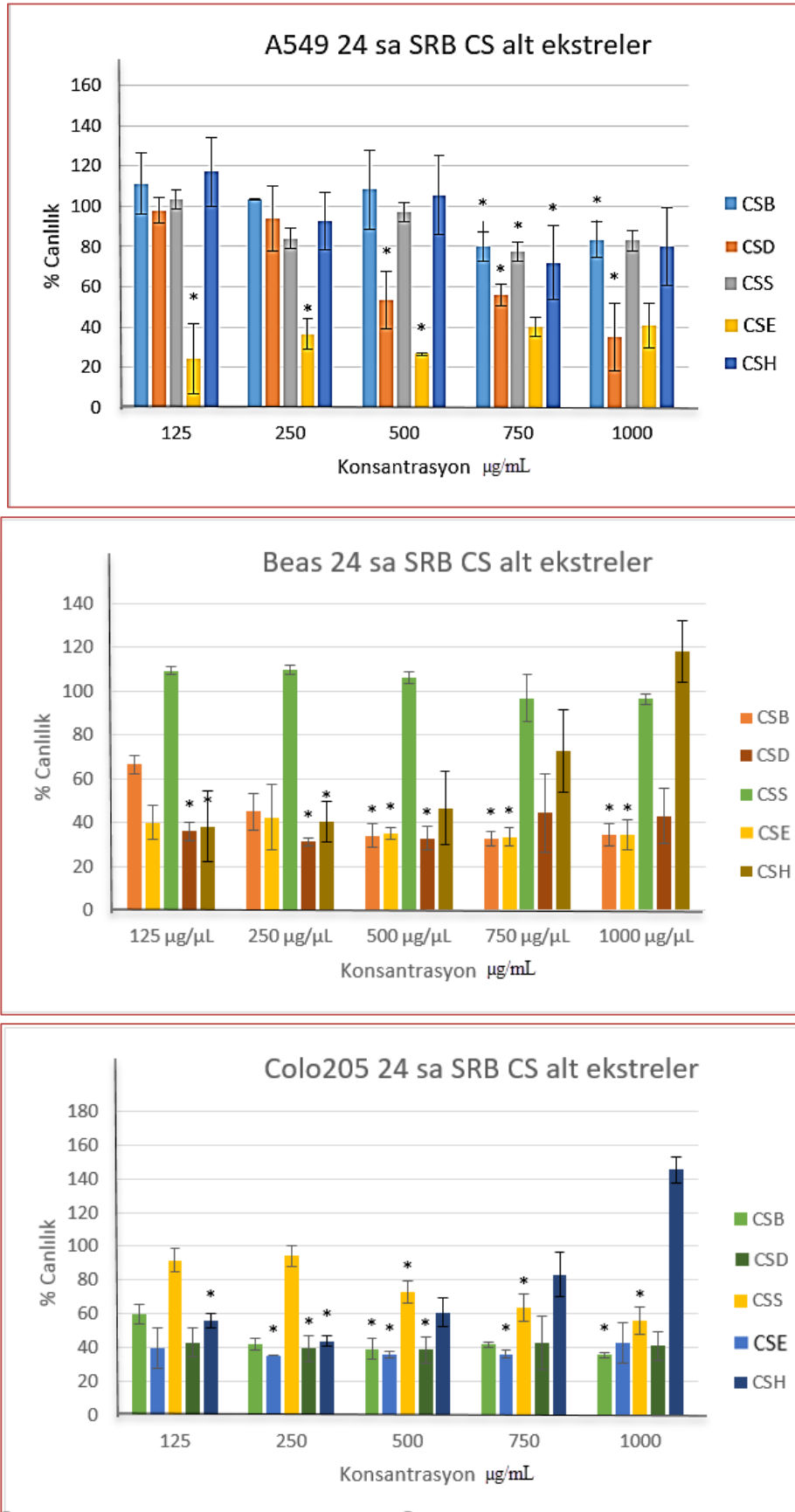


Şekil 4.30. CD, CF, CR ve CS kodlu metanol ekstralarının sitotoksosite sonuçları. One-way Anova anlamlılık değeri $*p < 0,05$; çoklu karşılaştırma testi (Dunnett) anlamlılık değeri $*p < 0,05$

Çizelge 4.7. CD, CF, CR ve CS kodlu metanol ekstralarının IC₅₀ (µg/mL) değerleri

Ekstre	IC ₅₀ (µg/mL)		
	A549	Colo205	BEAS
CD	-	306	165
CF	-	-	696
CR	-	286	251
CS	990	130	169

CS kodlu ekstreden hazırlanan alt ekstraların (CSB, CSD, CSE, CSH ve CSS) sitotoksik etkisi iki kanser ve sağlıklı hücre hatlarında ölçüldü. Sonuç olarak CSD kodlu ekstrenin Colo 205 hücre hattında daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği görüldü. Sonuçlar % hücre canlılığı olarak Şekil 4.31’da ve IC₅₀ değerleri Çizelge 4.8’de verilmiştir.

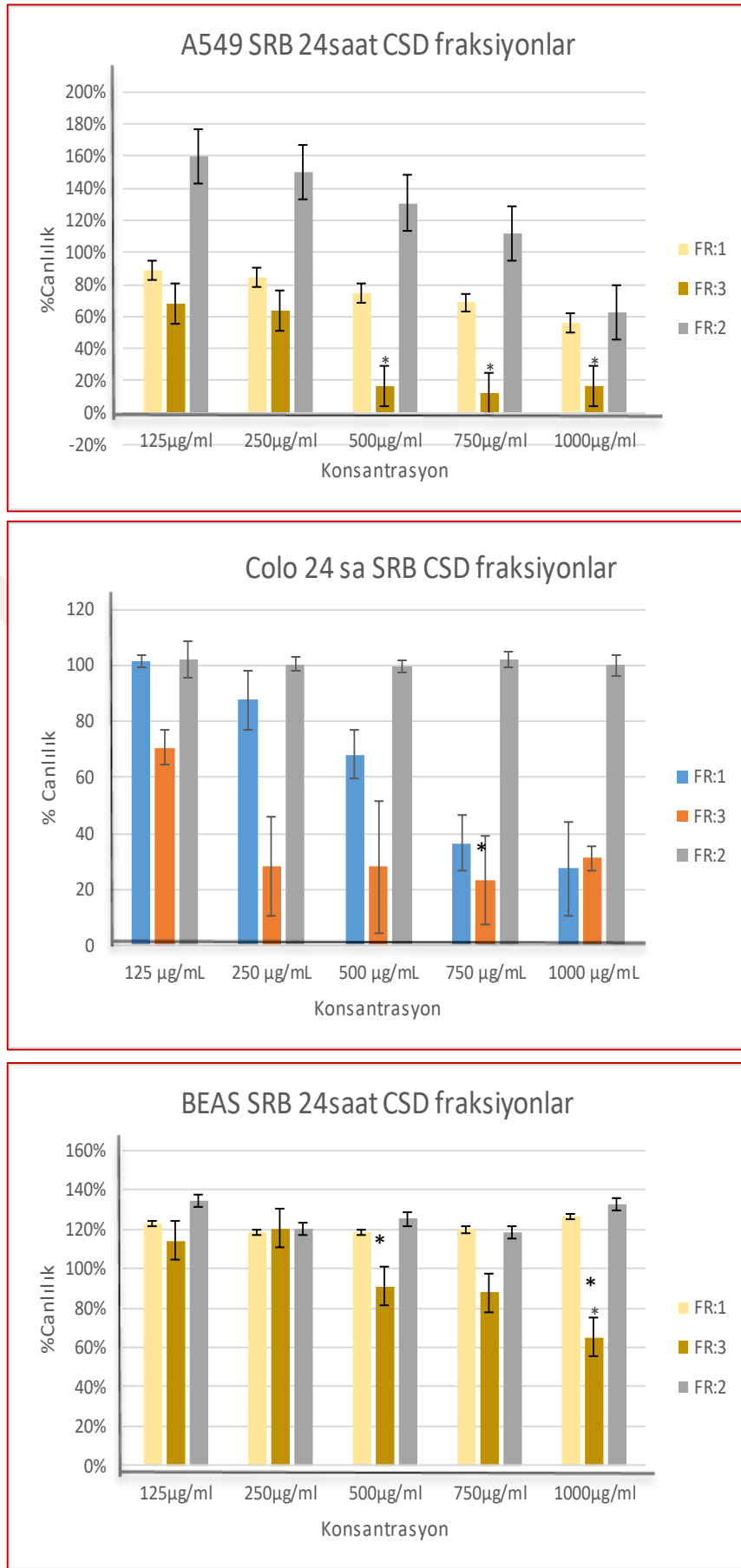


Şekil 4.31. CSB, CSD, CSE, CSH ve CSS kodlu alt ekstrere sitotoksosite sonuçları One-way Anova anlamlılık değeri $*p<0,05$; çoklu karşılaştırma testi (Dunnett) anlamlılık değeri $*p<0,05$

Çizelge 4.8. CSB, CSD, CSE, CSH ve CSS kodlu alt ekstrelerin IC₅₀ (µg/mL) değerleri

Alt Ekstre	IC ₅₀ (µg/mL)		
	A549	Colo205	BEAS
CSB	-	210	219
CSD	389	115	669
CSE	708	141	483
CSH	-	-	-
CSS	-	-	-

Sitotoksik etkinin daha çok gözlemlendiği CSD kodlu ekstreten elde edilen fraksiyonların (FR:1, FR:2 ve FR: 3) sitotoksosite sonuçları değerlendirildiğinde FR: 3'ün daha etkili olduğu gözlemlendi.

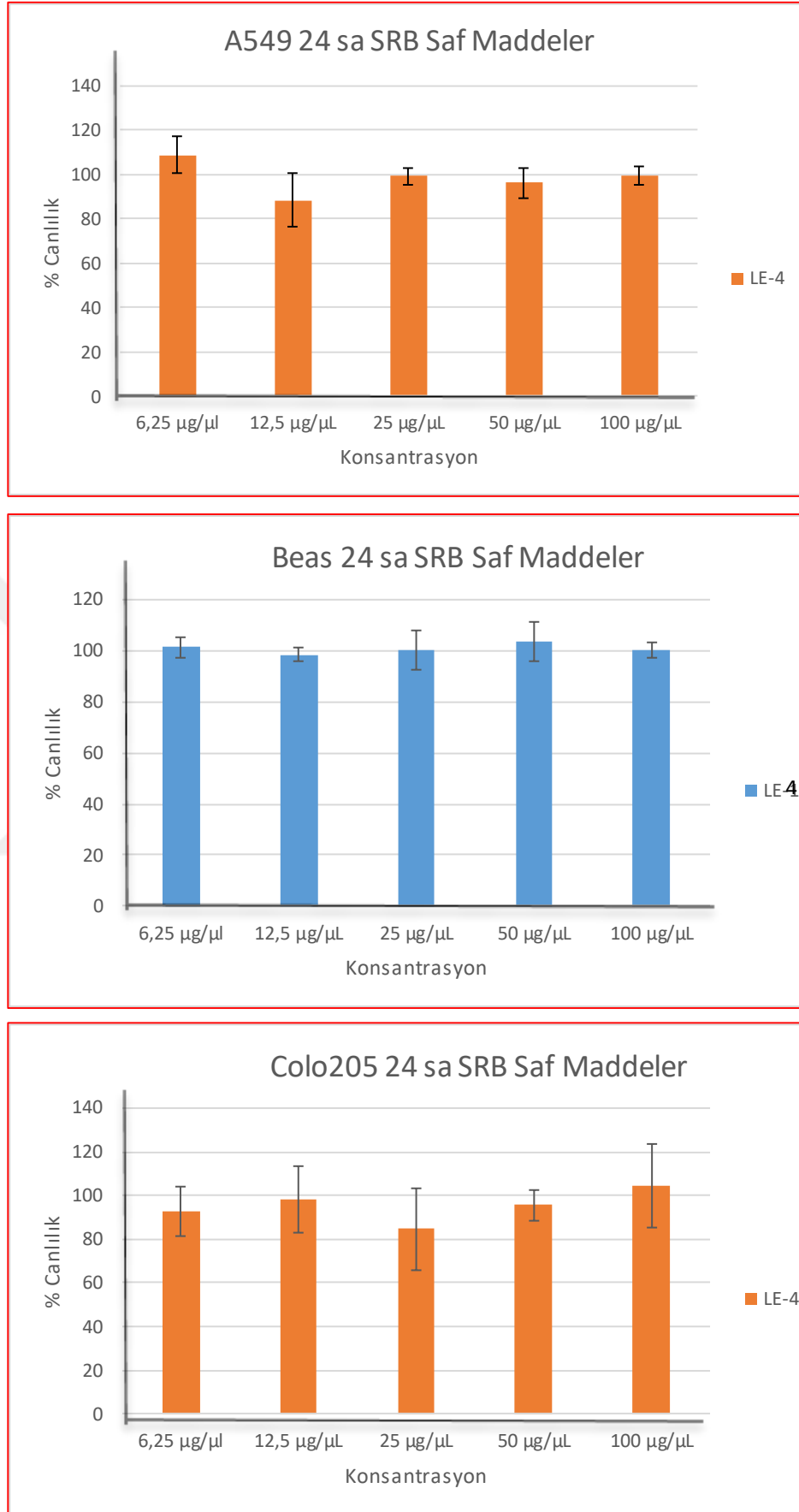


Şekil 4.32. CSD kodlu alt ekstreden elde edilen fraksiyonların sitotoksosite sonuçları

Çizelge 4.9. FR:1, FR:2, FR:3 kodlu fraksiyonların IC₅₀ (µg/mL) değerleri

Fraksiyonlar	IC ₅₀ (µg/mL)		
	A549	Colo205	BEAS
FR: 1	-	635	-
FR: 2	-	-	-
FR: 3	264	194	-
Sisplatin	18,9	51,3	31,2

Sitotoksik etkinin daha yüksek gözlendiği CSD kodlu ekstreden elde edilen saf maddenin sitotoksikite sonuçları değerlendirildiğinde canlılığı %50'nin altına düşürmediği görüldü.

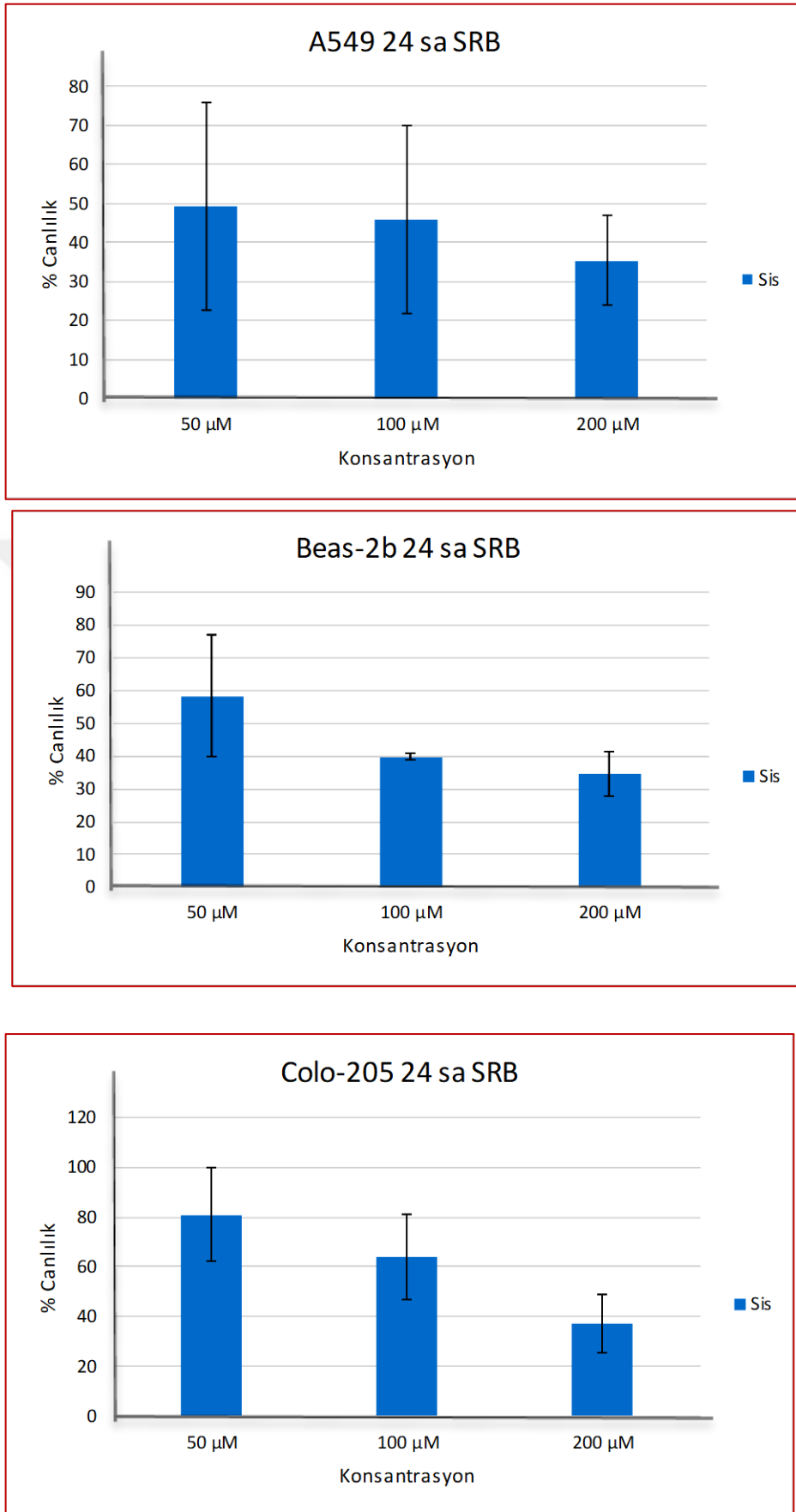


Şekil 4.33. CSD kodlu alt ekstreden elde edilen saf maddenin sitotoksisite sonuçları

Sitotoksik çalışmalarda pozitif kontrol olarak sisplatin (50, 100, 200 μM) kullanıldı. Her bir hücre hattı için IC_{50} değerleri Çizelge 4.10’da verilmiştir. Hücre canlılığı değerleri (%) negatif kontrol ile ekstre uygulanmış hücrelerin absorbensının kıyaslanması ile hesaplandı.

Çizelge 4.10. Sisplatin IC_{50} (μM) değerleri

Sisplatin	IC_{50} (μM)		
	A549	Colo205	BEAS
	63	171	104

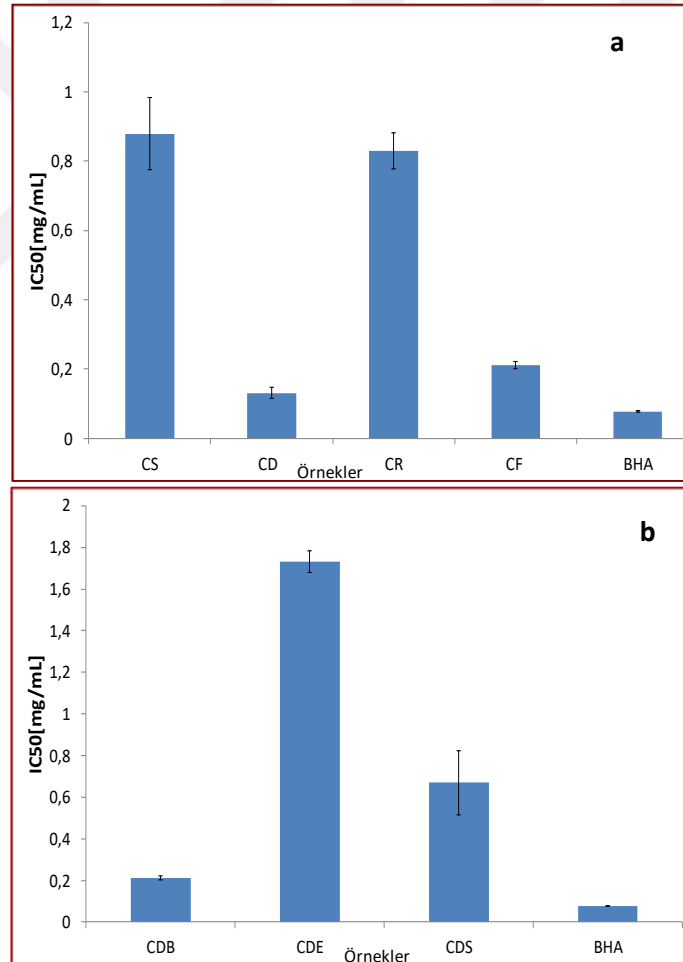


Şekil 4.34. Sisplatinin sitotoksosite sonuçları

4.4.2 Antioksidan kapasite çalışmalarına ait bulgular

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

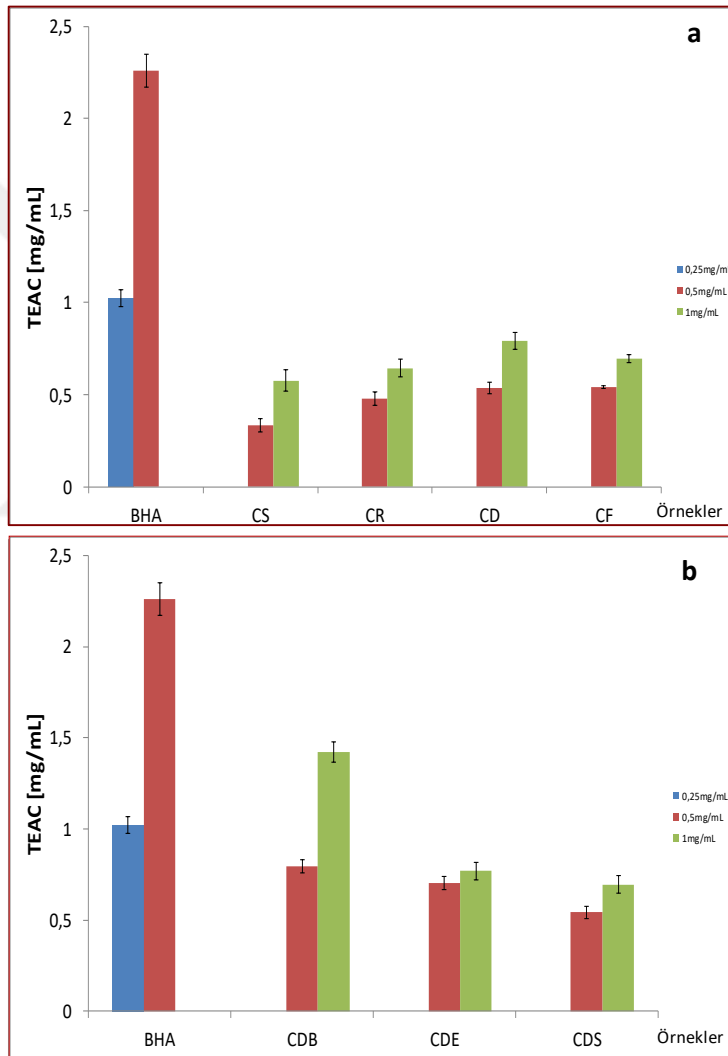
DPPH• radikal süpürücü etki tayini deney sonuçları Şekil 4.34'te verilmiştir. Sonuçlara göre hiçbir ekstre ya da alt ekstrenin standart antioksidan olarak kullanılan BHA (IC_{50} $0.077 \pm 0,001$ mg/mL) kadar aktif olmadığı görüldü. Ancak metanol ekstreleri kendi aralarında kıyaslandığında en yüksek DPPH• radikali süpürücü etki CD kodlu metanol ekstresinde (IC_{50} : $0,130 \pm 0,016$ mg/mL) gözlemlendi. Bu sonuçtan yola çıkarak CD metanol ekstresinden partisyon yöntemiyle elde edilen alt ekstrelerin antioksidan etkisi ölçüldü ve en yüksek DPPH• radikali süpürücü etki CDB kodlu alt ekstrede (IC_{50} 0.211 ± 0.010 mg/mL) gözlemlendi.



Şekil 4.35. **a)** Dört *Cousinia* türünden elde edilen metanol ekstrelerin DPPH• radikali süpürücü etki tayini. **b)** CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstrelerin DPPH• radikali süpürücü etki tayini. **BHA:** bütil hidroksi anizol, **CD:** *C. davisiana*, **CDB:** *C. davisiana* n-butanol ekstresi, **CDE:** *C. davisiana* etilasetat ekstresi **CDS:** *C. davisiana* su ekstresi, **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*, **CS:** *C. stenocephala*.

2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) (ABTS^{•+}) radikalinin süpürücü etki tayini

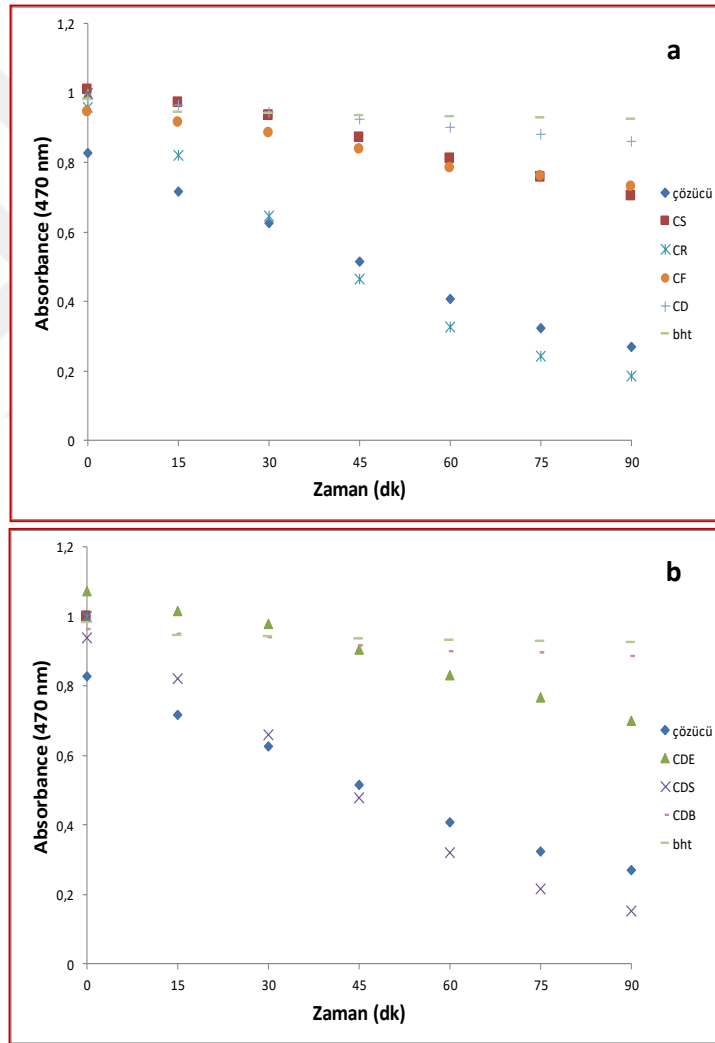
Deney sonuçları değerlendirildiğinde hiçbir ekstre ya da alt ekstrenin standart antioksidan olarak kullanılan BHA kadar aktif olmadığı görüldü. Ancak metanol ekstrelerinden CD kodlu ekstrenin 1 mg/ mL konsantrasyonda diğer metanol ekstrelerine kıyasla daha yüksek ABTS^{•+} radikal süpürücü etki gösterdiği belirlendi. CD kodlu ekstreden hazırlanan alt ekstreler arasında ise CDB kodlu butanol ekstresinin 1mg/mL konsantrasyonda diğer alt ekstrelerden daha yüksek ABTS^{•+} radikal süpürücü etkiye sahip olduğu belirlendi.



Şekil 4.36. **a)** Cousinia türlerinden elde edilen ana metanol ekstrelerin ABTS radikali süpürücü etki tayini. **b)** CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstrelerin ABTS radikali süpürücü etki tayini. **BHA:** bütil hidroksi anizol, **CD:** *C. davisiana*, **CDB:** *C. davisiana* *n*-butanol ekstresi, **CDE:** *C. davisiana* etilasetat ekstresi **CDS:** *C. davisiana* su ekstresi, **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*, **CS:** *C. Stenocephala*, **TEAC:** troloks eşiti antioksidan kapasite;

β -Karoten / linoleik asit birlikte oksidasyonu inhibe edici etki tayini

Dört metanol ekstresi ve en aktif ekstreten hazırlanan alt ekstrele ait β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayininden elde edilen sonuçlar Şekil 4.37’de verilmiştir. İncelenen örneklerin hepsinde belli oranlarda inhibitör aktivite görüldüğü ve bu aktivitenin BHT’nin aksine zamanla azaldığı tespit edildi. 90 dk sonunda metanol ekstrelerinden CD’nin, alt ekstrelerden ise CDB’nin BHT’ye daha yakın etki gösterdiği görüldü. Bu sonuçlar ile DPPH[•] radikal süpürücü etki tayini ve ABTS^{•+} radikalini süpürücü etki tayini deneylerinden elde edilen veriler birlikte değerlendirilerek CDB kodlu alt ekstreten saf madde izolasyonu yapılmasına karar verildi.



Şekil 4.37 **a)** 4 *Cousinia* türünden elde edilen ana metanol ekstrelerin β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini. **b)** CD kodlu metanol ekstrelerinden elde edilen alt ekstrelerin β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini. **BHT:** bütillenmiş hidroksi tolüen **CD:** *C. davisiana*, **CDB:** *C. davisiana* *n*-butanol ekstresi, **CDE:** *C. davisiana* etilasetat ekstresi **CDS:** *C. davisiana* su ekstresi, **CF:** *C. foliosa*, **CR:** *C. ramosissima*, **CS:** *C. stenocephala*.

Toplam Fenolik Madde ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini Sonuçları

Her dört ekstrenin Toplam Fenolik Madde ve Toplam Flavonoit Miktar Tayini Sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir. Sonuçlardan yola çıkarak toplam fenolik madde miktarı CDB’de ($242,811 \pm 12,89$ mgGAE/g ekstre) en yüksek bulunurken flavonoit miktarının CDE’de ($131,265 \pm 2,14$ mgGAE/g ekstre) en yüksek olduğu tespit edildi.

Çizelge 4.11. Dört *Cousinia* türünden elde edilen ana metanol ekstralarının ve CD kodlu metanol ekstresinden elde edilen alt ekstraların toplam fenolik madde ve toplam flavonoit miktarları (**BHA**: bütil hidroksi anizol, **CD**: *C. davisiana*, **CDB**: *C. davisiana* n-butanol ekstresi, **CDE**: *C. davisiana* etilasetat ekstresi **CDS**: *C. davisiana* su ekstresi, **CF**: *C. foliosa*, **CR**: *C. ramosissima*, **CS**: *C. stenocephala*)

Ekstre	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg _{GAE} /g _{ekstre})	Toplam Flavonoit Miktarı (mg _{RE} /g _{ekstre})
CD	146,036±5,36	88,700±1,083
CS	66,230±4,90	25,230±4,66
CR	109,630±11,44	62,305±0,68
CF	128,142±2,86	82,346±1,26
CDE	118,577±3,97	131,265±2,14
CDB	242,811±12,89	115,924±1,01
CDS	66,230±4,90	25,230±4,66



5. TARTIŞMA

Kanser bugün dünya ve Türkiye genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelen ölüm sebebidir. (Chu ve Sartorelli, 2007: 878-907). Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi veya bunların kombinasyonu kullanılmaktadır (Lebovits ve diğerleri, 1984). Bu nedenle doğal antikanser ajanlara ilişkin araştırmalar dünya çapında güncel araştırmaların önemli bir konusudur (Roopan ve diğerleri, 2009). Bu araştırmalarda sıklıkla kullanılan hücre kültürü ile yapılan *in vitro* sitotoksisite deneyleri, kanser kemoterapötiklerinin test edilmesinde kullanılan hızlı ve ekonomik yöntemlerdir (Roopan ve diğerleri, 2009). Antioksidanlar ise, oksidatif stresle sonuçlanan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı hücreleri koruyan ve bu nedenle neoplastik süreçlerin önleyicisi olarak görülen bileşiklerdir. (Roopan ve diğerleri, 2009; Bagchi ve diğerleri, 2000).

Çalışma kapsamında *Stenocephalae Bunge*. seksiyona dahil olan dört türün (*Cousinia davisiana*, *C. foliosa*, *C. ramosissima*, *C. stenocephala*) maserasyon yöntemiyle metanol ekstraktları hazırlandı ve bu ekstraktlar antioksidan aktivite ile 3 farklı hücre hattında (A549, CoLo 205 ve BEAS) sitotoksik etki bakımından incelendi. SRB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen sitotoksisite deneyinde *C. stenocephala* bitkisinden hazırlanan metanol ekstresinin Colo 205 hücre hattında 130 µg/mL IC₅₀ değeriyle diğer bitkilerden hazırlanan ekstraktlara göre daha sitotoksik ($p < 0,05$) olduğu tespit edildi. Antioksidan aktivite testlerinde ise DPPH• radikalini süpürücü etki (IC₅₀: 0,130±0,016 mg/mL) ile ABTS⁺• radikalini süpürücü etki tayini yöntemlerinde (1 mg/mL konsantrasyonda TEAC 0,793 mg/mL) *C. davisiana* metanol ekstresinin, diğer bitkilerden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. β-Karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini yönteminde ise dört bitkinin metanol ekstresi karşılaştırıldığında 90 dk sonunda BHT'ye en yakın inhibe edici etki yine *C. davisiana* metanol ekstresinde görüldü.

C. stenocephala bitkisindeki sitotoksik etkiden sorumlu, *C. davisiana* bitkisinde ise antioksidan aktiviteden sorumlu bileşikler tespit edebilmek amacıyla biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmaları yapılmasına karar verilmiş, bu nedenle *C. stenocephala* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresi su ile süspansiyon edilip sırasıyla hekzan, diklorometan, etilasetat ve *n*-butanol ile partisyon yöntemiyle ekstrakte edildi ve sonuç olarak hekzan, diklorometan, etilasetat, *n*-butanol ve su ekstresi elde edildi. Ayrıca *C. davisiana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ana metanol ekstresi ise su ile

süspande edilip sırasıyla etilasetat, *n*-butanol ile ekstre edildi. Böylece etilasetat, *n*-butanol ve su ekstraheleri elde edilmiş oldu.

C. stenocephala metanol ekstresinden hazırlanan alt ekstrahelerin (CSH, CSD, CSE, CSB VE CSS) sitotoksik etkilerini kendi aralarında karşılaştırmak ve en aktif ekstreyi belirlemek amacıyla yine 3 hücre hattında yaptığımız deneyler sonucunda (A549, Colo 205 ve BEAS) CSD ekstresi Colo 205 hücre hattında 115 µg/mL IC₅₀ değeriyle diğer alt ekstrahelere göre daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği belirlendi. Bunun yanında CSD'nin A549 (IC₅₀: 389 µg/mL) ve BEAS hücre hattına karşı Colo 205 hücrelerinden daha az toksik olması bu ekstrenin seçici olarak kolon kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini düşündürmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda CSD kodlu ekstresinin etkidenden sorumlu bileşiğini elde etmek amacıyla izolasyon çalışmaları yapıldı. Bu ekstreden elde edilen FR:1,2 ve 3 fraksiyonları sitotoksik taramaya tabi tutuldu ve FR:3'de 194 (µg/mL) IC₅₀ değeri ile kolon kanseri hücre hattında daha güçlü etki görüldü. Bu veriler göz önünde bulundurularak sitotoksik etkidenden sorumlu maddeyi tespit etmek amacıyla FR:3 üzerinden izolasyona devam edildi ve sonuç olarak pentasiklik triterpen yapısında LE-4 kodlu “*ψ*-taraksasterol” maddesi elde edildi. Elde edilen bu bileşiğin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla aynı hücre hatlarında taramaya tabi tutuldu. Ancak hiçbir hücre hattında etki görülmedi. Bu da bize bitkinin sitotoksik etkisinin fraksiyon bazında olduğunu ve bu etkinin fraksiyondan izolasyonu yapılan *ψ*-taraksasterol maddesi ile LC-MS/MS çalışmaları ile belirlenen mirisetin, kafeik asit esteri, apigenin 7-apiozilglikozit maddelerinin sinerjistik etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürdü.

C. davisiana' dan hazırlanan alt ekstrahelerle (CDE, CDB ve CDS) ise tüm antioksidan aktivite çalışmaları tekrarlandı, *n*-butanol ekstresi (CDB) antioksidan aktivite çalışmalarında en etkili ekstre olarak tespit edildi. Bu ekstrenin DPPH• radikalini süpürücü etki tayini yönteminde IC₅₀ değeri 0.130±0.016 mg/mL, ABTS^{•+} radikalini süpürücü etki tayini yönteminde IC₅₀ değeri 1,420±0,076 mg/mL, β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini yönteminde 90 dk sonunda BHT'ye en yakın inhibe edici etki gösterdiği görüldü. Folin-Ciocalteu yönteminde CDB ekstresi 242,811±12,89 mg_{GAE}/g_{ekstre} değeri ile toplam fenolik madde miktarı bakımından ve CDE ekstresi 131,265±2,14mg_{GAE}/g değeri ile flavonoid içeriği bakımından en zengin ekstraheler olarak bulundu. Bütün antioksidan aktivite deneyleri göz önünde bulundurularak CDB ekstresi izolasyon çalışmalarına tabi tutuldu. İzolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen L-33 kodlu maddenin “**rutin**” ve L-15 kodlu maddenin ise “**izoramnetin 3-O-rutinozit**”

olduğuna çeşitli yapı tayini yöntemleri ile karar verildi. Birçok bitkide yaygın olarak bulunan bu bileşiklerin her ikisinin de güçlü radikal süpürücü etkiye sahip olduğu literatürde belirtilmektedir (Heim ve diğerleri, 2002; Benavente-Garcia ve diğerleri, 2000; Salem ve diğerleri, 2011; Shibano ve diğerleri, 2008).

L-15 kodlu madde, daha önce *Cousinia* türlerinden izole edilmemekle birlikte yapılan literatür araştırmalarında daha çok antioksidan etkisinin olduğu görölmektedir. Yapılan bir çalışmada *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. bitkisinin topraküstü kısımlarının metanol ekstresinden elde edilen izoramnetin-3-O-rutinozitin güçlü süperoksit radikali süpürücü etki gösterdiği belirlenmiştir ($IC_{50}=24\pm1,0\text{ }\mu\text{M}$). Aynı çalışmada bileşiğin önemli derecede DPPH• radikal süpürücü etki ve antiproliferatif etki gösterdiği de tespit edilmiştir (sırasıyla $IC_{50}=21,3\pm1,00\text{ }\mu\text{M}$, $IC_{50}=70\pm2\text{ }\mu\text{M}$) (Salem ve diğerleri, 2011).

Yapılan başka bir çalışmada ise *Commelina communis* L. bitkisinin etanol ekstresinden elde edilen “**izoramnetin-3-O-rutinozit**”in önemli DPPH• radikal süpürücü etki gösterdiği görölmüştür ($EC_{50}=150>\text{ }\mu\text{M}$) (Shibano ve diğerleri, 2008).

L-33 kodlu madde, daha önce *Cousinia* türlerinden izole edilmemiştir ancak yapılan literatür incelemesi neticesinde çeşitli bitkilerden elde edilen bu bileşiğin antioksidan aktivitesi açısından önemli olduğu görölmektedir. Yapılan bir çalışmada *Teucrium polium* bitkisinin metanol ekstresinden elde edilen “**rutin**” DPPH• radikal süpürücü ve β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini deneylerine tabi tutulmuş ve önemli antioksidan etkiye (sırasıyla $IC_{50}=23,7\pm1,9\text{ }\mu\text{g/mL}$, $IC_{50}=26,7\pm1,9\text{ }\mu\text{g/mL}$) sahip olduğu belirtilmiştir (Heim ve diğerleri, 2002).

Yapılan başka bir çalışmada *Olea europaea* L. bitkisinden elde edilen “**rutin**”in ABTS^{•+} radikal süpürücü etkisi araştırılmış ve $2,75\pm0,05\text{ }\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değerleri ile önemli etki gösterdiği bildirilmiştir (Benavente-Garcia ve diğerleri, 2000).

Nitraria retusa (Forssk.) Asch. bitkisinin topraküstü kısımlarının metanol ekstresinden elde edilen “**rutin**”in güçlü süperoksit süpürücü etki ($IC_{50}=20\pm2,0\text{ }\mu\text{M}$) gösterdiği yapılan bir çalışma ile belirlenmiştir. Aynı çalışmada bileşiğin önemli derecede DPPH• radikal süpürücü etki ($IC_{50}=5,5\pm0,02\text{ }\mu\text{M}$) gösterdiği de tespit edildiği belirtilmiştir (Salem ve diğerleri, 2011).

Ayrıca tez çalışması kapsamında dört *Cousinia* türünden elde edilen metanol ekstraktları ve ψ -taraksasterol bileşiğinin elde edildiği fraksiyon LC-MS/MS ile kimyasal içerik açısından incelendi. Ekstrelerin daha çok kafeik asit ve kinik asit türevleri içerdiği, fraksiyonun ise mirisetin, kafeik asit esteri, apigenin 7-apiozilglikozit içerdiği bulundu. Bunun yanında

ekstreler arasında belirgin bir farklılık görülmemekle birlikte yalnızca madde miktarlarında farklılık olabileceği düşünüldü.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar doğrultusunda Stenocephalae seksiyonuna dahil olan (*C. davisiana*, *C. foliosa*, *C. ramosissim*, *C. stenocephala*) türler sitotoksite ve antiokasidan aktiviteleri yönünden ilk kez incelenmiş ve bu bitkilerle ilk kez biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, bunun yanında ekstrelerin kimyasal kompozisyon analizi de bu türlerle ilk kez yapılmıştır. ψ -taraksasterol, rutin ve izoramnetin-3-O-rutinozit isimli bileşiklerin de *Cousinia* türlerinde varlığı ilk kez tespit edilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Her yıl dünya genelinde 6 milyondan çok insanın kanser nedeniyle yaşamlarını yitirdiği bilinmektedir.

Bazı *Cousinia* türlerinin ve onunla aynı tribusda yer alan cinslere dahil diğer bazı türlerin farklı hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin olabileceği ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmada *Cousinia* cinsinin *Stenocephalae* Bunge. seksiyonuna dahil türlerden elde edilen ekstrater, fraksiyon ve saf bileşikler insanlar arasında en çok ölüme sebep olan akciğer kanseri (A549), kolon kanseri (Colo 205) ve aynı zamanda sağlıklı akciğer (BEAS) hücre hatlarında biyoaktivite rahberli fraksiyonlama yöntemiyle sitotoksik ve antioksidan aktivite taramasına tabi tutulmuş, elde edilen bileşiklerin, seksiyona dahil olan diğer bitkilerde bulunup bulunmadığı kontrol edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu nedenle bu çalışmada öncelikli olarak *Cousinia* cinsinin şimdiye kadar sitotoksik aktivite yönünden hiç incelenmemiş *Stenocephalae* Bunge. seksiyonuna dahil olan (*C. davisiana*, *C. foliosa*, *C. ramosissim*, *C. stenocephala*) türlerinin sitotoksik etkisini araştırarak etkiden sorumlu saf maddeleri belirlemek amaçlanmış sitotoksikite ve antioksidan etki açısından incelenmiştir.

Organizmada, serbest radikallerin üretilmesi ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki denge bozulduğu zaman çeşitli dokularda hasar oluşmaktadır. Flavonoitlerin yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmekle beraber bu aktivitelerde, B halkasındaki orto 3'4'-dihidroksi, A halkasındaki meta 5,7-dihidroksi grupları, C halkasında C-2 ve C-3 arasındaki çift bağ ile birlikte C-4 keto grubunun varlığı, C-3 ve C-5 hidroksillerinin C-4 keto grubuyla birlikte bulunuşu belirleyici olmaktadır. Benzer şekilde fenolik asitler de taşıdıkları hidroksil gruplarının konumlarına göre değişen düzeylerde antioksidan aktivite göstermektedirler (Rice-Evans ve diğerleri 1997; Rice-Evans ve diğerleri, 1996). Bu nedenle, yüksek antioksidan etkiye sahip maddelerin elde edildiği CDB alt ekstrelerinin tüm antioksidan test yöntemlerinde en yüksek aktiviteyi göstermesi de beklenen bir durumdur. Bunun dışında *C. davisiana* metanol ekstresi üzerinde yapılan İTK ve LC-MS/MS analiz sonuçları incelendiğinde bu etkiden sorumlu flavonoit yapısındaki bileşiklerin (L-15 ve L-33) miktarının bu ekstre ve alt ekstraterde daha çok olduğu gözlenmektedir. Bu durum da antioksidan aktivite tayin deneylerinin sonucunu destekler niteliktedir. Aynı zamanda sonuçlar incelendiğinde en az antioksidan etkinin *C. stenocephala* ekstresinde olduğu görülmektedir. Yine İTK ve LC-MS/MS sonuçlarına bakıldığında L-15 ve L-33 kodlu

bileşiklere ait piklerin bu ekstrede nerdeyse görülmediği gözlenmektedir. Bu da antioksidan etkinin bu ekstrede az ve bu etkinin tam tersi sitotoksik etkinin daha çok olması durumunu izah etmektedir (CSD kodlu ekstre).

Sonuçlara bakıldığında *C. stenocephala* bitkisinden elde edilen ekstre ve alt ekstrelerin daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği elde edilen bileşiğin ise hücre canlılığını %50'nin altına düşüremediği görülmüştür. Bu da bize bitkinin sitotoksik etkisinin fraksiyon bazında olduğunu ve bu etkinin fraksiyondan izolasyonu yapılan ψ -taraksasterol maddesi ile LC-MS/MS çalışmaları ile belirlenen mirisetin, kafeik asit esteri, apigenin 7-apiozilglikozit maddelerinin sinerjistik etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürdü.

Cousinia cinsi genellikle taksonomik ve sistematik olarak araştırılmış olup fitokimyasal çalışmalar yok denecek kadar azdır. Literatürde mevcut bazı türler üzerinde yapılan kısıtlı sayıda çalışmalarda bu bitkilerin triterpen, seskiterpen (guayan ve bisobolen tip), flavonoit ve steroidlerce zengin olduğu görülmüştür (Rustaiyan ve diğerleri, 1986; Ulubelen ve diğerleri, 1986). Çalışmamız kapsamında, *C. stenocephala*'nın topraküstü kısımlarının diklorometan ekstresi üzerinden yürütülen izolasyon çalışmalarında 1, *C. davisiana*'nın topraküstü kısımlarının n-butanol ekstresinden ise 2 bileşik olmakla toplam 3 bileşik izole edilmiştir: *C. stenocephala*'dan elde edilen madde; triterpenik yapıda ψ -taraksasterol, *C. davisiana*'dan elde edilen maddeler: flavonoit yapıda izoramnetin 3-O-rutinozit L-15 ve rutin L-33.

LE-4, L-15 ve L-33 bileşikleri bu çalışma ile ilk kez bir *Cousinia* türünden izole edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma ile 2'si Türkiye'ye endemik olan 4 tür üzerinde ilk kez fitokimyasal bir çalışma yapılmış ve L-15, L-33 ve LE-4 bileşikleri bu bitkilerde ilk kez tespit edilmiştir. Bununla birlikte bileşiklerin diğer bitkilerde olup olmadığının araştırılmasının cinsin kemotaksonomisi açısından önemli olabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında bu türler üzerinde biyolojik aktivite çalışmaları da ilk kez bu çalışma ile yapılmıştır. Güçlü antioksidanlar olarak bildirilen rutin ve izoramnetin 3-O-rutinozit bileşiği için *Cousinia*'ların yeni bir kaynak teşkil edebilecekleri öngörülmektedir.

Literatürde çalışma konusu türlerle yapılmış kimyasal bileşimlerine ait çalışmalar yoktur. Bu çalışma kapsamında LC-MS/MS ile yapılan kompozisyon analizleri sonucunda bitkilerin daha çok kafeik ve kinik asit türevleri içerdiği belirlenmiştir. Bunun dışında çalışma ile yeni biyoaktif bileşikler açısından literatüre önemli katkı sağlanacağı da öngörülmüştür. Bu türlerden tez kapsamında elde edilmiş ancak etkinlikleri konusunda veri bulunmayan bileşiklerin etkilerinin tespiti, yarı sentetik ve/veya sentetik bileşiklerin

geliştirilmesi için model oluşturabilecektir. Bu da hem toplum sağlığına hem de ulusal ekonomiye katkıda bulunacaktır.

Bundan sonra yapılacaklar kapsamında sitotoksik ve antioksidan aktivite çalışmaları dışında farklı aktivite çalışmaları da yapılacaktır. Ayrıca elde edilen ψ -taraksasterol bileşiği üzerine fazla çalışmanın bulunmaması bu bileşiğin farklı aktivite yönünden incelenmesini de mümkün kılmaktadır. Kütle analizleri sonucunda tespit edilen maddelerin standartlarının temin edilerek kantitatif analizleri üzerine çalışmalar devam etmektedir.





KAYNAKLAR

- Agrawal, P. K. (2013). *Carbon-13 NMR of flavonoids* (Vol. 39). Elsevier, Amsterdam.
- Akkol, E. K., Süntar, I., Keles, H., Sezik, E. and Gürler, G. (2015). Bioassay-Guided Isolation and Characterization of Wound Healer Compounds from *Morus nigra* L.(Moraceae). *Records of Natural Products*, 9(4), 484.
- Almeida, A. (2005). Atividade anti-ulcerogenica e antiinflamatoria intestinal da *Arctium lappa*. 2004. 147f. Doctoral dissertation, Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular)–Curso de pósgraduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas).
- Al-Qudah MA, Al-Jaber HI, Abu-Zarga MH, Abu Orabi ST. (2014). Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. *Phytochemistry*, 99: 115-20.
- Atalay, M. and Laaksonen, D. E. (2002). Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science & Medicine*, 1(1), 1.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89(1), 27-36.
- Atrrog, A. A., Natic, M., Tosti, T., Milojković-Opsenica, D., Dorđević, I., Tesevic, V. and Tesic, Z. (2009). Lipophilicity of some guaianolides isolated from two endemic subspecies of *Amphoricarpos neumayeri* (Asteraceae) from Montenegro. *Biomedical Chromatography*, 23(3), 250-256.
- Awale, S., Lu, J., Kalauni, S. K., Kurashima, Y., Tezuka, Y., Kadota, S. and Esumi, H. (2006). Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Research*, 66(3), 1751-1757.
- Aydemir, B. ve Karadağ Sarı, E. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2 (2).
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A. and Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148(2), 187-197.
- Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 1999.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. and Del Rio, J. A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.

- Boyle, P. and Levin, B. (2008). *World cancer report 2008*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer. 85-95.
- Bremer, K. (1994). *Asteraceae, Cladistics and Classification*. Timber Press, Portland, Oregon, 85-95.
- Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S., Safder, M. and Bancheva, S. (2011). The metabolites of the genus *Onopordum* (Asteraceae): chemistry and biological properties. *Current Organic Chemistry*, 15(6), 888-927.
- Carvalho, C. C. D., Machado, K. N., Ferreira, P. M. P., Pessoa, C., Fonseca, T. H. S., Gomes, M. A. and Nascimento, A. M. D. (2013). Biological screening of extracts of Brazilian Asteraceae plants. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(28), 2000-2005.
- Celis E J. (2006). *Cytotoxicity and Cell Growth Assays*. In: *Cell Biology A Laboratory Handbook*, Elsevier Academic Press, 315-324.
- Chu, E. and Sartorelli, A. C. (2007). *Basic and clinical pharmacology*. Cancer chemotherapy. 10th ed. Boston: McGraw-Hill, 878-907.
- Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S. and Kuhnert, N. (2003). Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2900-2911.
- Csupor-Löffler, B., Hajdu, Z., Rethy, B., Zupko, I., Mathe, I., Redei, T. and Hohmann, J. (2009). Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part II. *Phytotherapy Research*, 23(8), 1109-1115.
- Çelik, K., Toğar, B., Turkez, H. ve Taşpınar, N. (2014). "In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative effects of acyclic sesquiterpene farnesene". *Turkish Journal of Biology*, 38, 253-259.
- Çubukçu, B., Meriçli, A.H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütlüoğlu, N., Meriçli, F. (2002). *Fitoterapi yardımcı ders kitabı*. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognazi Anabilim Dalı. İstanbul.
- Davis P. H and A. Huber M. (1975), *Cousinia* in *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 5, 350, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis, P. H. and Kupicha, F. K. (1975). *Serratula* in *Flora of Turkey and the east Aegean Islands*, Vol. 5, 452.
- De Brito, E. S., de Araújo, M. C. P., Lin, L. Z. and Harnly, J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew apple (*Anacardium occidentale*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 105(3), 1112-1118.
- Downey, M. O. and Rochfort, S. (2008). Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201(1), 43-47.

- Eberhart, C. E., Coffey, R. J., Radhika, A., Giardiello, F. M., Ferrenbach, S. and Dubois, R. N. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4), 1183-1188.
- Fakhoury I. and Gali-Muhtasib H. (2011). Salograviolide A: A Plant-Derived Sesquiterpene Lactone with Promising Anti-Inflammatory and Anticancer Effects, *Advances in Cancer Therapy*, Ed. Hala Gali-Muhtasib, Rijeka.
- Fotakis, G. and Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Fouche, G., Cragg, G. M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V. J. and Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 455-461.
- Frodin, D.G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53 (3), 753–766.
- Gonzalez, A. G., Bermejo, J., Amaro, J. M., Massanet, G. M., Galindo, A. and Cabrera, I. (1978). Sesquiterpene lactones from *Centaurea linifolia* Vahl. *Canadian Journal of Chemistry*, 56(4), 491-494.
- González, R. R., Fernández, R. F., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G., and Pérez, M. L. G. (2011). Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. *Journal of Neuroscience Methods*, 198(2), 187-194.
- Gu, Y., Qi, C., Sun, X., Ma, X., Zhang, H., Hu, L. and Yu, Q. (2012). Arctigenin preferentially induces tumor cell death under glucose deprivation by inhibiting cellular energy metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 84(4), 468-476.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T., (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Güran, Ş., AD, G. T. B. (2005). Kanserden korunma. *Gülhane Tıp Dergisi*, 47, 324-326.
- Gyamfi, M. A., Yonamine, M. and Aniya, Y. (1999). Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(6), 661-667.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.

- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K. and Oda, Y. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(7), 703-714.
- Huang, K., Li, L. A., Meng, Y. G., You, Y. Q., Fu, X. Y. and Song, L. (2014). Arctigenin promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the iNOS/NO/STAT3/survivin signalling. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115(6), 507-511.
- Hvattum, E. and Ekeberg, D. (2003). Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(1), 43-49.
- Iranshahy, M., Tayarani-Najaran, Z., Kasaian, J., Ghandadi, M., Emami, S. A., Asili, J. and Iranshahi, M. (2016). Highly Oxygenated Sesquiterpene Lactones from *Cousinia aitchisonii* and their Cytotoxic Properties: Rhaserolide Induces Apoptosis in Human T Lymphocyte (Jurkat) Cells via the Activation of c-Jun n-terminal Kinase Phosphorylation. *Phytotherapy Research*, 30(2), 222-226.
- Jassbi, A. R., Firuzi, O., Miri, R., Salhei, S., Zare, S., Zare, M. and Baldwin, I. T. (2016). Cytotoxic activity and chemical constituents of *Anthemis mirheydari*. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2044-2049.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A. and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153-164.
- Karaçelik, A. A., Küçük, M., İskefiyeli, Z., Aydemir, S., De Smet, S., Miserez, B. and Sandra, P. (2015). Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. *Food Chemistry*, 175, 106-114.
- Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V. and Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 131-144.
- Lebovits, A. H., Croen, L. G. and Goetzl, R. Z. (1984). Attitudes towards cancer. Development of the cancer attitudes questionnaire. *Cancer*, 54(6), 1124-1129.
- Lin, L. Z., He, X. G., Lindenmaier, M., Nolan, G., Yang, J., Cleary, M. and Cordell, G. A. (2000). Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *Journal of Chromatography A*, 876(1), 87-95.
- Machlin, L. J. and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- Malich, G., Markovic, B. and Winder, C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124(3), 179-192.

- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 89(3), 411-420.
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K. and Akimoto, N. (2002). Rapid Identification of carotenoids in a combination of liquid chromatography/UV-visible absorption spectrometry by photodiode-array detector and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/PAD/APCI-MS). *Journal of Oleo Science*, 51(1), 1-9.
- Marco, J. A., Sanz, J. F., Albiach, R., Rustaiyan, A. and Habibi, Z. (1993). Bisabolene derivatives and sesquiterpene lactones from *Cousinia* species. *Phytochemistry*, 32(2), 395-400.
- Martin, A. J. (1992). *Cytotoxicity testing in vitro: investigation of 5 miniaturized, colorimetric assays*. (Doctoral dissertation, Dublin City University), Dublin.
- Miller, Y. E. (2005). Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33(3), 216-223.
- Ming, D. S., Guns, E., Eberding, A. and Towers, G. H. (2004). Isolation and characterization of compounds with anti-prostate cancer activity from *Arctium lappa* L. using bioactivity-guided fractionation. *Pharmaceutical Biology*, 42(1), 44-48.
- Napolitano, J. G., Lankin, D. C., Chen, S. N. and Pauli, G. F. (2012). Complete ¹H NMR spectral analysis of ten chemical markers of *Ginkgo biloba*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 50(8), 569-575.
- Petit, D.P. (1997). Generic interrelationships of the Cardueae (Compositae): A cladistic analysis of morphological data. *Plant Systematics and Evolution*. 207, 173-203.
- Prasain, J. K., Jones, K., Kirk, M., Wilson, L., Smith-Johnson, M., Weaver, C., and Barnes, S. (2003). Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4213-4218.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rechinger, K. H. (1986). *Cousinia*: morphology, taxonomy, distribution and phytogeographical implication. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 89 (B), 45-58.
- Regazzoni, L., Arlandini, E., Garzon, D., Santagati, N. A., Beretta, G., & Facino, R. M. (2013). A rapid profiling of gallotannins and flavonoids of the aqueous extract of *Rhus coriaria* L. by flow injection analysis with high-resolution mass spectrometry assisted with database searching. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 202-207.

- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Reynolds, W. F., McLean, S., Poplawski, J., Enriquez, R. G., Escobar, L. I. and Leon, I. (1986). Total assignment of ^{13}C and ^1H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ^1H chemical shifts in structural investigations of complex natural products. *Tetrahedron*, 42(13), 3419-3428.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Riss, T. L., Moravec, R. A. and Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, 103-114.
- Rocha, D. D., Dantas, I. N., Albuquerque, M. R. J. R., Montenegro, R. C., Pessoa, C., de Moraes, M. O. and Costa-Lotufo, L. V. (2007). Studies on the cytotoxicity of miscellaneous compounds from *Eupatorium betonicaeforme* (DC) Baker (Asteraceae). *Chemistry & biodiversity*, 4(12), 2835-2844.
- Roopan, S. M., Khan, N. and Rahman, F. (2009). Synthesis, antioxidant, hemolytic and cytotoxicity activity of AB ring core of mappicine. *ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry*, (xiii), 161-169.
- Rustaiyan, A., Sharif, Z. and Sadjadi, A. S. (1987). Two farnesol derivatives from *Cousinia adenostica*. *Phytochemistry*, 26(9), 2635-2636.
- Sabbobeh, R., Hejaz, H., Jahajha, A., Al-Akhras, S., Al-Jaas, H. and Abu-Lafi, S. (2016). Antioxidant an Antimicrobial Activities of the Leaf Extract of *Salvia palaestina*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (01), 076-082.
- Sajjadi, S. E., Ghanadian, M., Haghighi, M. and Mouhebat, L. (2015). Cytotoxic effect of *Cousinia verbascifolia* Bunge against OVCAR-3 and HT-29 cancer cells. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 4(1).
- Salem, J. H., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Paris, C., Fick, M. and Humeau, C. (2011). Biological activities of flavonoids from *Nitraria retusa* (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives. *Food Chemistry*, 124(2), 486-494.
- Seaman, F. C. (1982). Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Botanical Review*, 48(2), 121-594.
- Shahverdi, A. R., Khoramizadeh, M. R., Ghahramani, M. H., Golyaee, A., Attar, F., & Ghahraman, A. (2007a). Chemopreventive Effect of *Cousinia Shulabadensis* Attar &

- Ghahraman ethanol extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(1), 12-16.
- Shahverdi, A. R., Khorramizadeh, M. R., Attar, F., Saadat, F., Vahid, S., and Ghahraman, A. (2007b). Concomitant chemopreventive and antibacterial effects of some Iranian plants from the genus *Cousinia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(3), 325-330.
- Shibano, M., Kakutani, K., Taniguchi, M., Yasuda, M. and Baba, K. (2008). Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their α -glucosidase-inhibitory activity. *Journal of Natural Medicines*, 62(3), 349.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Stewart, B. W. K. P. and Wild, C. P. (2014). World cancer report 2014. *Lyon CEDEX*, France.
- Suchý, M., Herout, V. and Šorm, F. (1960). On terpenes. CVI. On hydrogenation products of cynaropicrin, the bitter principle of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 25(2), 507-514.
- Tanker, M., Şarer, E., Atasü, E., Yenen, M., Özkal, N. ve Kurucu, S. (1986). *Farmakognozi uygulama örnekleri*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Trease, G. E., and Evans, W. C. (1983). *Drugs of biological origin. Pharmacognosy*, 12th ed., Balliere Tindall, United Kingdom, 309-540.
- Ul'chenko, N. T., Gigienova, E. I., Umarov, A. U. and Isamukhamedov, A. S. (1981). Hydroxy acids of the seed oils of five plants of the family Asteraceae. *Chemistry of Natural Compounds*, 17(1), 26-30.
- Ul'chenko, N. T., Mukhamedova, K. S. and Glushenkova, A. I. (1999). Lipids from seeds of two species of *Cousinia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(6), 680-681.
- Ulubelen, A. ve Tuzlaci, E. (1988). Flavonoids and terpenoids from *Cousinia eriocephala*. *Fitoterapia*, 59, 350.
- Ulubelen, A., Tuzlaci, E. ve Mericli, A. (1986). Triterpenic and steroidal compounds from *Cousinia canescens*. *Fitoterapia*, 57(1).
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Winawer, S. J. (2007). Colorectal cancer screening. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 21(6), 1031-1048.

- Yadav, R. N. S. and Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12).
- Zhang, S., Won, Y. K., Ong, C. N. and Shen, H. M. (2005). Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(3), 239-249.
- Zhao, Q., Ernst, J. T., Hamilton, A. D., Debnath, A. K. and Jiang, S. (2002). XTT formazan widely used to detect cell viability inhibits HIV type 1 infection in vitro by targeting gp41. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 18(14), 989-997.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.
- Ziegler, R. G., Hoover, R. N., Pike, M. C., Hildesheim, A., Nomura, A. M., West, D. W. and Hyer, M. B. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *Journal of the National Cancer Institute*, 85(22), 1819-1827.



EK 1. Bitki toplama alışmaları



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı : Paşayeva
Adı : Leyla
Uyruğu : Azerbaycan
Doğum tarihi ve yeri : 26.06.1986 Azerbaycan
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 312 207 66 66
e-posta : leypasayeva@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Biririmi	Mezuniyet
tarihi		
Doktora	Gazi Üniversitesi/ Eczacılık/Farmakognozi ABD	Devam ediyor
Yüksek lisans	Azerbaycan Tıp Üniversitesi/ Eczacılık/Farmakognozi ABD	2010
Lisans	Azerbaycan Tıp Üniversitesi/ Eczacılık Fakültesi	2008
Lise	31 No'lu Okul	2004

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2013-devam ediyor	Erciyes Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dili

Azerice, Çok İyi
İngilizce, İyi
Rusça, İyi
Almanca, Zayıf

Yayınlar

1. Gürbüz P., Doğan Ş.D., Paşayeva L., Paksoy M.Y., "Guaiane-type Sesquiterpene Lactones from *Chrysophthalmum montanum*", **Records of Natural Products**, vol.10, pp.714-720, 2016
2. Paşayeva L., Köngül E., Şeker Karatoprak G., Tugay O. , "*Eryngium Billardieri* Delar. Ekstrelerinin Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Kompozisyonlarının ve Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi", **Sağlık Bilimleri Dergisi**, cilt.26, ss.18-23, 2017
3. Paşayeva L., Tekiner H., "Türk-İslam Tıbbında Safranın Yeri", **Lokman Hekim Dergisi**, cilt.4, no.3, ss.11-15, 2014
4. İsayev C.İ., Kərimov.Y.B., Paşayeva L.N., "Adi zəfəran (*Crocus sativus* L.) bitkisinin yarpaqlarının bəzi farmakognostik tədqiqi", **AMEA-nın Botanika İnstitutunun Elmi əsərləri**, 31-ci cild, s. 323-329, 2011

Hobiler

Kitap Okuma, Örgü



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..