T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

Pastinaca erzincanensis Endemik Türünün Fitokimyasal İçeriğinin Belirlenmesi ve Antioksidan, Antialzheimer, Antidiyabetik ve Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi

Proje No: **FBA-2023-914**

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Ahmet ALTAY
FEF/ KİMYA

Araştırmacılar:
PROF. Dr. Ali KANDEMİR
FEF/BİYOLOJİ
Esma Kübra KAĞAN YENİÇERİ
FBE/ KİMYA

Ağustos 2024

ERZİNCAN

Önsöz

Proje kapsamında; 1) *Pastinaca erzincanensis* endemik bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin fitokimyasal içerikleri sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC/MS-MS) analizleriyle kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. 2) Bu ekstrelerin *in vitro* antioksidan kapasiteleri toplam fenolik miktarı, toplam flavonoid miktarı, DPPH radikal giderme aktivitesi ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) metodları üzerinden karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. 3) Ekstrelerin antidiyabetik ve Antialzheimer potansiyelleri sırasıyla α-glucosidase ve Acetylcholinesterase (AChE)/Butyrylcholinesterase (BChE) enzimlerinin inhibisyonları üzerinden değerlendirilmiştir. 4) Ekstrelerin insan rahim ağzı (HeLa), kolon (HT-29) ve prostat (LnCap) kanser hücre hatları üzerinden XTT yöntemiyle incelenmiş ve akabinde metanol ekstresi'nin HeLa hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi flow sitometre analizleriyle incelenmiştir.

Bu proje, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (EU-BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası: FBA-2023-914)

Özet

Proje kapsamında, Erzincan yöresine endemik *Pastinaca erzincanensis (P. erzincanensis)* türünden elde edilen faklı ekstrelerin fitokimyasal içerikleri ve antioksidan, antiproliferatif, antialzhemier ve antidiyabetik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, türün toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin fitokimyasal içerikleri LC/MS-MS analizleriyle incelenmiş ve sırasıyla kinik asit, fumarik asit ve gentisik asid'in ekstrelerin ana bileşenleri olduğu saptanmıştır. Toplam fenolik ve toplam flavonoid bakımından en zengin ekstrenin metanol ekstresi olduğu, demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) bakımından su ekstresinin ön plana çıktığı ve DPPH radikal giderme aktivitesi bakımından ise ekstrelerin birbirine yakın IC_{50} değerlerine sahip oldukları gözlenmiştir. Ekstrelerin antidiyabetik ve Antialzheimer potansiyelleri sırasıyla α-glucosidase ve Acetylcholinesterase enzimlerinin inhibisyonları üzerinden değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular ekstrelerin test edilen enzimler üzerinde standart ilaç olarak kullanılan akarboz ve takrinden daha düşük IC_{50} değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Ekstrelerin sitotoksik aktiviteleri insan rahim ağzı (HeLa), kolon (HT-29) ve prostat (LnCap) kanser hücre hatları üzerinden XTT yöntemiyle incelenmiş ve tüm ekstrelerin en güçlü sitotoksik etkiyi HeLa hücre hattına karşı sergiledikleri ve ekstreler arasında da en güçlü aktiviteyi 20,98 µg/mL IC_{50} değeriyle metanol ekstresinin gösterdiği görülmüştür. HeLa hücre hattı üzerinden flow sitometri analizleriyle gerçekleştirilen çalışmalarda kontrol grubuna kıyasla metanol ekstresinin istatiksel olarak kaydadeğer bir apoptotik etki göstermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen tüm veriler *P. erzincanensis* türünün güçlü derecede *in vitro* antioksidan ve antikanser aktivite sergilediğini ve ayrıca diyabet ve Alzheimer hastalıklarında değerlendirilebilecek zengin fitokimyasal içeriğine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: *Pastinaca erzincanensis*, Fitokimyasal, Antioksidan, Antidiyabet, Anti-alzhemier, Antikanser.

Abstract

The aim of the project was to determine the phytochemical content and the antioxidant, antiproliferative, antihypertensive and anti-diabetic properties of different extracts from *Pastinaca erzincanensis*, which is endemic to Erzincan region. In this regard, phytochemical contents of the extracts obtained from aerial parts of *P. erzincanensis* were studied by LC/MS-MS analysis and it was determined that quinic acid, fumaric acid and gentisic acid were the main components of the plant. The methanol extract was the richest in total phenolics and total flavonoids the water extract was the richest in ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), and all extracts had IC_{50} values close to each other in terms of DPPH radical scavenging activity. The antidiabetic and anti-Alzheimer potentials of the extracts were evaluated by inhibition of α-glucosidase and acetylcholinesterase enzymes, respectively, and the results showed that the extracts had a stronger inhibitory effect on the tested enzymes with lower IC_{50} values than acarbose and tacrine. The cytotoxic activities of the extracts were investigated on human cervical (HeLa), colon (HT-29) and prostate (LnCap) cancer cell lines and it was seen that all the extracts exhibited the strongest cytotoxic effect against HeLa cells. In studies using flow cytometry analysis on the HeLa cells, it was found that the methanol extract did not show a statistically significant apoptotic effect compared to the control group. In conclusion, all the data obtained showed that *P. erzincanensis* with its rich phytochemical content could be evaluated in different metabolic diseases.

Keywords: *Pastinaca erzincanensis*, Phytochemicals, Antioxidant, Antidiabetes, Antialzhemier, Anticancer.

İçindekiler

Önsöz i
Özet ii
1. Giriş 1
2. GEREÇ VE YÖNTEM 5
2.1. Gereç 5
2.1.1. Kimyasallar 5
2.1.2. Kullanılan Cihazlar 6
2.2. Yöntem 6
2.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması 6
2.2.2. Ekstraksiyon 6
2.2.3.Fitokimyasal Çalışmalar (LC-MS/MS) 7
2.2.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları 7
2.2.5. Enzim Aktivite Çalışmaları 9
2.2.6. Antikanser Çalışmaları 10
2.2.7. İstatistiksel Analiz 13
3. ARAŞTIRMA BULGULARI 14
3.1. Bitki Ekstrelerinin Eldesi 14
3.2. LC-MS/MS Analiz Sonuçları 14
3.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları 18
3.4. Enzim Aktivite Sonuçları 20
3.4.1. α-Glikozidaz İnhibisyonu 20
3.4.2. Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibisyonu 21
3.4.3. Bütirilkolinesteraz (BChE) İnhibisyonu 21
3.5. Antikanser Aktivite Sonuçları 21
3.5.1. Sitotoksik Aktivite 21
3.4.2. Apoptotik Aktivite 23
SONUÇLAR 24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hemositometre ile canlı hücre sayımı. 12
Şekil 2. XTT tetrazolyumun fenazin meto sülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazana indirgenmesi. 12
Şekil 3. P. erzincanensis türünün sırasıyla etil asetat, metanol ve su ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramları. 15
Şekil 4. P. erzincanensis'den elde edilen ME'nin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. A) Kontrol grubu HeLa hücreleri, B) Muamele grubu HeLa hücreleri. 24

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz aktivite tayininde küvet içeriği..... 9
Tablo 2. P. erzincanensis türünden elde edilen ekstrelerin LC–MS/MS analiz sonuçları..... 16
Tablo 3. P. erzincanensis ekstrelerinin antioksidan aktivite sonuçları. 20
Tablo 4. P. erzincanensis ekstrelerinin α-glikozidaz, Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz üzerindeki IC_{50} değerleri. 20
Tablo 5. *P. erzincanensis* ekstrelerinin HeLa, HT-29, LnCap ve 3T3-L1 hücre hatları üzerindeki IC_{50} değerleri. 22

1. Giriş

Çağımız hastalıklarından biri olan ve insanlık için önemli bir sağlık sorunu olan kanser, özellikle kanser hastaları için önemli bir süreçtir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO-World Health Organization) verilerine göre 2018 yılında 9,6 milyon insanın kanser sebebiyle yaşamını yitirdiği değerlendirilmektedir. Kanser, dünya üzerinde meydana gelen ölümlerin sebebi olarak ikinci sırada yer almakta ve 2012 yılından günümüze kadar kanser sebebiyle ölümlerde artış olduğu gözlemlenmektedir [1].

Son yıllarda en çok görülen kanser türleri; meme, deri, tiroid, mide, endometrium, kolon, akciğer, over, lenfoma serviks ve non-hodgkin lenfoma şeklinde sıralanabilir. Rahim ağzı kanseri (HeLa), rahmin serviks (boyun) adı verilen alt kısmındaki hücrelerde görülür ve dünyada en sık görülen jinekolojik kanserlerin başında gelir. Kanser çeşitleri arasında en sık görülen 14. kanser türü olup kadınlarda tespit edilen en sık kanser türlerinde ise 4.sıradadır [2]. Serviks, rahmin vajinaya bağlanan boyun şeklindeki kısmıdır. Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlara neden olan insan papilloma virüsünün (HPV) çeşitli türleri, rahim ağzı kanserine en sık neden olan biyolojik etkendir [3]. Çoğu kadında virüse maruz kalındığında, bağışıklık sistemi vücudun virüsten zarar görmesini engeller. Ancak küçük bir grup kadında virüs, yıllarca hayatta kalır. Bu virüsler, serviksin yüzeyindeki bazı hücrelerin, kanser hücreleri haline gelmesine neden olan süreci başlatabilir [3].

HeLa hücreleri, estradiol, estrojen ve estrojen reseptörleri gibi steroid hormonlarının yanı sıra quercetin gibi östrojen benzeri bileşikler ve kanseri azaltan özelliklerini içerenler de dahil olmak üzere bir dizi kanser çalışmasında kullanılmıştır [4]. HeLa hücreleri, flavonoidler ve estradiol ile antioksidanların kanser hücresi çoğalması üzerindeki etkileri üzerine de çalışmalar yapılmıştır. HeLa hücreleri, fotodinamik terapinin bir parçası olarak apoptozu indüklemek için fullerenleri içeren araştırmalarda ve ayrıca hücre dizilerini kullanan in vitro kanser araştırmalarında kullanılmıştır [5]. Diğer HeLa hücreleri de RNA'daki kanser belirteçlerini tanımlamak için kullanılmış ve RNAi tabanlı tanımlama sistemi ve spesifik kanser hücrelerinin etkileşimini oluşturmak için kullanılmıştır [6]. HeLa ile 2014 yılında yapılan bir başka çalışmada ise C57BL/6 farelerdeki tümör ksenogreftleri için uygun bir hücre dizisi olduğu gösterilmiştir [7].

Prostat kanseri eril üreme sisteminde yer alan bir bez olan prostatta gelişen bir kanserdir. Prostat kanserlerinin çoğu yavaş gelişim gösterir; bununla beraber, görece hızlı gelişim gösterenleri de vardır [1]. Prostat kanseri hücreleri prostattan vücudun diğer kısımlarına, özellikle kemiklere ve lenf düğümlerine yayılabilir [8]. Başlangıçta hiçbir belirti vermeyebilir [1]. İlerleyen

aşamalarda ise idrarda zorlanma, idrarda kan ya da pelviste, sırtta veya boşaltım sırasında ağrıya sebep olabilir [1]. İyi huylu prostat büyümesi olarak bilinen hastalık da benzer belirtiler verebilir. İleri aşamada ortaya çıkan diğer belirtiler arasında düşük alyuvar hücresi sayısından kaynaklanan yorgunluk hissi sayılabilir [1].

Kolorektal kanser dünyada en sık gözlenen 4. kanser türüdür. Hastalığın insidansı ve mortalitesi yıllar içinde azalmaktadır. Bu iyileşmenin nedeni tarama ve etkin tedavi yöntemleriyle açıklanmaktadır. Ancak hastalığın nedeni henüz geniş verilerle desteklenmeyen 50 yaş altı ve 20-34 yaş grubunda arttığı gözlemlenmektedir. Kolon kanseri her yaşta görülmesine karşın, hastaların % 90'ından fazlası, kırk yaş ve üzerindedir. Bu yaştan itibaren her on yılda risk yaklaşık iki katına çıkmaktadır. Bu grup hastalarda hastalığın farklı genetik ve klinik-patolojik yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir ve bu da beraberinde bu hasta grubuna özel tedavilerin gerekliliğini doğurmuştur [9]. Son yıllarda metastatik kolon kanseri (mKRK) tedavisinde yeni tedavi protokolleri oluşturulmaktadır. Kanser hücrelerinde mismatch repair protein (MLH-1, MSH2, MSH6 ve PMS2) yetersizliği, çok sayıda somatik mutasyonlara ve tümör ilişkili neoantijenlere neden olarak immun cevabı tetikleyerek immunoterapinin etkin olmasına zemin hazırlamaktadır [9].

Kanser tedavisi hem sıkıntılı hem de maliyetli bir süreçtir. Bu hastalığın tedavi edilebilmesi için cisplatin, doxorubicin, docataxel gibi bazı ilaçlar geliştirilmiştir. Bu ilaçlar aynı zamanda kemoterapide antikanser ajan olarak büyük ölçüde kullanılmıştır ve kullanılmaktadır. Fakat bu sentez ilaçlarının ciddi yan etkilere sahip olması, kanserli olmayan hücreler üzerinde de toksisiteye neden olması gibi problemlerle karşılaşıldığı için kemoterapideki etkili ve başarılı uygulamaları sınırlanmaktadır. Bu nedenlerden dolayı dünya genelindeki birçok araştırma grubu, tümörlerin tedavisi için daha etkili ve daha az yan etkiye sahip anti-proliferatif etkiye sahip olan etnobotanik bitkilerden elde edilecek sekonder metabolitlere odaklanmıştır [10].

Diabetes Mellitus [11], genetik ve çevresel faktörlerin bir kombinasyonu sonucu oluşan, kan glukoz seviyesinin yükselmesiyle (hiperglisemi) karakterize edilen bir metabolik bozukluktur. İnsülin hormonunun salgılanmasındaki yetersizlik veya etkisindeki bozukluk, bu hastalığın temel sebeplerindendir. DM, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açar ve hem akut hem de kronik komplikasyonlara neden olabilir. Dünya genelinde ve Türkiye'de diyabetin görülme sıklığı hızla artmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun verilerine göre, 1985'ten 2014'e kadar dünya genelinde diyabetli sayısı katlanarak artmış ve bu artışın 2035 yılına kadar devam etmesi beklenmektedir. Türkiye'de de benzer bir artış eğilimi gözlemlenmiştir [12-14].

α-Glukozidazlar (E.C.3.2.1.20, α-D-glukozit glukohidrolaz, ekzo-α-1,4-glukozidaz) hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda karbohidrat metabolizması sırasında anahtar rol oynarlar. α-glukozidazlar, nişasta ve glikojen gibi kompleks karbonhidratların monomerlerine parçalanmasında rol oynayan enzimlerdir. Alfa veya beta bağlantılı glukoz polimerleri de dahil olmak üzere çeşitli glikokonjugatlardan ayrı ayrı glukozil kalıntılarının bölünmesini katalize ederler. Bu enzimler, karmaşık şekerleri daha basit olanlara dönüştürürler. Mikroorganizma hücrelerinde oldukça yaygın olup, çeşitli maya, bakteri ve küflerden hücre içi, hücre dışı veya hücreye bağlı şekilleri saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Mikroorganizmalar tarafından nişasta molekülün parçalanmasının son aşaması α-glukozidaz enzimler ile gerçekleştirilir [15]. Bulaşıcı olmadığı halde salgın yapan bu hastalık tüm ülkelerde genellikle erişkin yaş grubunu etkilemekte hem doğrudan hem de dolaylı etkileri ile sağlık sistemlerini ve toplumsal yaşamı tehdit etmektedir [16]. Tüm bu veriler kapsamında Diyabet'in hastalık sürecinde ciddi problemler oluşturması, çoğu bilim insanını Diyabetin önlenebilmesi veya tedavi sürecine katkıda bulunabilecek destek kaynakların var olup olmadığı arayışına sürüklemiştir.

Alzheimer hastalığı, günlük yaşamsal etkinliklerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulmayla karakterize edilmiş, nöropsikiyatrik belirtilerin ve davranış değişikliklerinin eşlik ettiği nörodejeneratif bir hastalıktır. Bu hastalığı ilk olarak Alois Alzheimer tanımlamıştır. Erken belirtilerden biri hafıza kaybıdır. Bu hafıza kaybı, geçmiş hafızanın korunduğu, hastalığın ilerlemesi ile birlikte sıklıkla yinelemeye başlayan küçük unutkanlıklar görülmeye başlanır. Bozukluğun ilerlemesi ile bilişsel (kognitif) yeteneklerde yitim, frontal ve temporal lob işlevleri ile ilişkili, dil alanlarında işlev yitimi (afazi), beceri gerektiren hareketlerde işlev yitimi (apraksi) ve tanıma işlevlerinde bozulmaya doğru uzanım göstermeye başlar. Alzheimer hastalığı (AH) genellikle yavaş başlayan ve giderek kötüleşen nörodejeneratif bir hastalıktır ve demans vakalarının %60-70'inin ise nedenini oluşturmaktadır [17]. En yaygın erken semptom, son olayları hatırlamakta güçlük çekmektir [18]. Hastalık ilerledikçe semptomlar arasında dil ile ilgili sorunlar, oryantasyon bozukluğu (kolayca kaybolma dahil), ani ruh hali değişimleri, motivasyon kaybı, kendini ihmal etme ve davranış sorunları yer alabilir [17]. Erken belirtilerden biri hafıza kaybıdır. Bu hafıza kaybı, geçmiş hafızanın korunduğu, hastalığın ilerlemesi ile birlikte sıklıkla yinelemeye başlayan küçük unutkanlıklar görülmeye başlanır. Altta yatan patolojik sürecin yansıması olarak beyinde limbik sistem ile frontal ve temporal loblar arasındaki bağlantılarda kopmalar olur. Patolojik süreç temporoparietal korteksin yoğun bir şekilde tutulduğu ancak frontal lobu da etkileyen amiloid plak ve nörofibriler yumaklarla karakterize inflamatuvar yanıtın birlikteliğinde nöron kaybı ve atrofisini içerir. 65 yaş üzerindeki grubun %2-4'ünde, 85 yaş üzerinde ise %20 oranında görülmektedir [19].

Alzheimer hastalığı, anormal şekilde katlanmış amiloid beta proteininin amiloid plaklarında ve tau proteininin beyindeki nörofibriler yumaklarda birikmesinden kaynaklanan bir protein yanlış katlanma hastalığı, bir proteopati olarak tanımlanmıştır [20]. Plaklar, amiloid beta (Aβ) adı verilen 39-43 amino asit uzunluğunda küçük peptitlerden oluşur. Amiloid beta, nöronun zarına nüfuz eden bir transmembran protein olan daha büyük amiloid-beta öncü proteininden (APP) bir fragmandır. APP, nöron büyümesi, hayatta kalması ve yaralanma sonrası onarım için kritik öneme sahiptir [21]. Alzheimer hastalığında, gama sekretaz ve beta sekretaz, APP'nin daha küçük parçalara bölünmesine neden olan bir proteolitik süreçte birlikte hareket eder [22].

Asetilkolin esteraz enzimi (AChE) (E.C. 3.1.1.7), vücutta merkezi ve periferal, kolinerjik ve adrenerjik, sinir ve kas dokusunda, eritrositlerde ve plasental dokuda bulunmaktadır. Asetilkolin esteraz enzimi sinaptik boşluklardaki asetilkolini asetat ve koline parçalayarak inaktive eden enzimdir [23]. Eğer sinaptik ortamlardaki asetilkolin molekülü çok fazla inaktive olursa sinir iletimi bloke olur ve insanda Alzheimer hastalığı ortaya çıkar. Halihazırda günlük kullanılan böcek ilaçları içerisinde karbamatlar ve organofosfatlar önemlidir. Organofosfatlı insektisitler özellikle sinir sisteminde asetilkolin ilgili enzim üzerinde tasirlerini gösterirler. Asetilkolin maddesi sinir impulslarının sinapslar ortamından geçmesini kolaylaştıran bir nörotransmitter moleküldür [24].

Bütirilkolinesteraz (BChE, E.C.3.1.1.8) diğer bir kolinesteraz türüdür. BChE karaciğerde sentezlenir ve kana salınır. Ayrıca bu enzim yağ dokusu, ince barsak, akciğer ve beyin ak maddesi gibi pekçok dokuda da bulunur. Beyinde ve plazmada çözünmüş olarak bulunur. Bunun yanında bazı balıklarda ve kas dokusunda da önemli boyutta BChE aktivitesi olduğu saptanmıştır. BChE ise metabolizmada bütirilkolini (BCh), bütirat ve koline hidrolizleyerek katalizler. BChE, memelilerde bilinen biyolojik substratı olmayan bir enzimdir. Ama bütiriltiyokolin, BCh, propiyoniltiyokolin, propiyonilkolin ve farmakolojik açıdan önemli bir yeri olan süksinilkolin gibi kolin esterlerini hidroliz eder. BChE yaklaşık olarak 342 KDa ağırlığında tetramerik bir glikoproteindir [25]. Son yıllarda hem dünyada hem de ülkemizde gittikçe artan alzaymır hastalığı, hem hastaya hem de hasta yakınlarına çok ciddi problemler oluşturmaktadır. Yapılan pek çok çalışma neticesinde çoğu bilim insanı alzaymır'a neden olduğu düşünülen kolinesterazlar üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır.

Bitkisel kaynaklı ilaçların yan etkilerinin yok denilecek kadar çok az olması, bitkisel etken maddelere karşı patojenlerin dayanıklı ırklar oluşturamaması ve ayrıca bitkisel maddelerin sentetik ilaçların başlangıç maddesi olması ve sentetik ilaçlara model oluşturması, kullanıldıktan sonra vücutta birikmemesi ve zararlı etki oluşturmaması, ucuz ve kolay elde edilebilirlikleri gibi üstünlükleri dolayısıyla günümüzde tıbbi ve aromatik bitkilerin

tüketilmesinde hızlı bir artış görülmektedir [26]. Türkiye florası incelendiğinde çok sayıda endemik bitki türü barındırdığı görülmektedir. Türkiye'deki endemik bitki tür sayısı 3800 civarında olup endemizm oranı %34.5'dir [27]. Bütün bu bilgiler göz önüne alındığında, ülkemizde bitkilerle ilgili büyük bir çalışma potansiyeli olduğu gözükmektedir.

Pastinaca erzincanensis Apiaceae familyasına ait Erzincan'a endemik bir bitki olup bu bitki ailesine mensup bitkilerle çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yaban Havucu adıyla da bilinen *Pastinaca sativa*, farklı ülkelerde çeşitli beslenme ve tedavi uygulamalarına sahiptir. Örneğin bazı ülkelerde yaban havucu iştah açıcı, sindirim ve idrar söktürücü olarak kullanılır [28]. Yaban havucundaki en önemli aktif bileşenler arasında kumarinler, furanokumarinler, ksantotoksin, bergapten, isopimpinellin, angelisin, psoralen, sfondin, imperatorin, poliasetilenler, uçucu yağlar, terpenler ve flavonoidler bulunur [29]. Yaban havucunun toprak üstü kısımları ksantotoksin, bergapten ve imperatorin içerir. İbni Sina'nın El Kanun Fit-tıb kitabında baş ağrısı, stomatit, göz iltihabı, dermatit ve ateşin tedavisi için yaban havucunun topikal ve oral kullanımı önerilmektedir [30]. İran tıbbında bahsedilen yaban havucunun diğer özellikleri mide toniği, müshil, böbrek taşı kırıcı ve idrar söktürücüdür. Öksürük gibi akciğer hastalıklarının ve obstrüktif karaciğer hastalıkları ve asit gibi karaciğer rahatsızlıklarının tedavisinde de kullanılır. Yaban havucu kaynatmasının topikal kullanımının, soğuk ısırmasından kaynaklanan morluklar için faydalı olduğu belirtilir [31, 32].

Bu proje kapsamında ele alınan *Pastinaca erzincanensis* türünün biyolojik özellikleriyle ilgili yeterli bilgi literatürde mevcut olmayıp, fitokimyasal içeriği ise nispi olarak sunulmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, Erzincan İli'nden toplanan *Pastinaca erzincanensis* bitkisinden elde edilen farklı ekstrelerin fitokimyasal içeriklerinin LC-MS/MS analizleriyle belirlenmesi ve mevcut ekstrelerin *in vitro* antioksidan, antidiyabetik, antialzymer ve antikanser özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kimyasallar

Penisilin-Streptomisin solüsyonu (A2213) Biochrom GmbH (Leonorenstraße 2, 12247 Berlin, Almanya). Trypsin-EDTA solüsyonu (T4049) (Saint Louis, Missouri, USA). Fetal Sığır Serumu ((1524134) Biological Industries). RPMI 1640 Medium (BE12-719F) ve McCoy's Medium (BE12-611F) (Lonza, Basel, İsviçre). Dimetilsülfoksit (Sigma-Aldrich-Germany). XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (Biological

Industries, İsrail). Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich-Germany), $AlCl_3$ (Sigma-Aldrich-Germany), $NaNO_2$ (Sigma-Aldrich-Germany), Gallik asit (Sigma-Aldrich-Germany), Trolox (Sigma-Aldrich-Germany), DPPH· (Sigma-Aldrich-Germany), Etanol (Sigma-Aldrich-Germany), EDTA (Sigma-Aldrich-Germany), K2S2O8 (Merck-Germany), Folin Ciocalteu reaktifi (Merck-Germany), NaOH (Merck-Germany), EDTA (Fluka, Switzerland), Ferrozin (Sigma-Aldrich-Germany), $FeCl_2$ (Sigma-Aldrich-Germany), CH3COONH4 (Merck-Germany), troloks (Merck-Germany), 5-Fluorouracil (Sigma-Aldrich-Germany). Tripan mavi boyası (Biological Industries, İsrail).

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Araştırma Mikroskopu (Olympus, Japonya), Eppendorf Santrifüj 5810 R (Isolab), CO_2 inkübatör (Nüve, EC160), Olympus CKX41 ters faz kontrast mikroskopu (Nikon Eclips Tİ-U), PH ölçer (Mettler Toledo, ABD), WiseMix Vortex (WisMix DaihanVM10), -80 °C dondurucu (Haier, DW-86L628), -20 °C (Haier, DW-40L508), ELISA plaka okuyucusu (Multiskan ™ GO- Thermo Scientific, ABD), Çalkalayıcı Su Banyosu (Nüve, ST30-22), Laminer Akış ve Biyogüvenlik Kabinleri (Bilser BLF 200).

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması

Çalışmada kullanılan *Pastinaca erzincanensis* türü Erzincan İlinin Tatlı su köyü dağ yamaçlarından, çiçeklenme döneminde doğal yaşam alanlarına ve üremelerine zarar vermeyecek şekilde ve sınırlı miktarda toplanmış ve toplanan örneklerin bir herbaryum koleksiyonu hazırlanmıştır. Bitki tür tayini Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali KANDEMİR tarafından gerçekleştirilmiştir (Kandemir, 10616).

2.2.2. Ekstraksiyon

Çiçeklenme döneminde toplanarak uygun koşullar altında kurutulan bitkinin toprak üstü kısımları ile aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır. Bunun için ilk önce 250 g öğütülerek toz haline getirilen bitki n-hekzan (300- 400 mL) ile 5 kez 3 saat boyunca çalkalanmış ve akabinde hekzan çözülü kısım farklı kaba aktarılarak rotary evaporatör ile hekzan uzaklaştırılmış ve neticede yağımsı (apolar) kısımlar uzaklaştırılmış polar kısımlar geriye kalmıştır. Kalan bitki posası üzerine 300-400 mL etil asetat çözücüsü ilave edilerek 6 saat çalkalayıcıda karıştırılmıştır ve akabinde etil asetatlı kısım başka bir kaba aktarılarak rotary evaporatör ile çözücü uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 defa gerçekleştirilmiştir. Kalan bitki posası üzerine 300-

400 mL metanol ilave edilmiş ve çalkalayıcıda 6 saat karıştırılmıştır. Süre tamamlandığında çözücülü kısım süzülerek başka bir kaba alınmış ve akabinde rotary evaporatör ile çözücü uzaklaştırılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Arta kalan posa kısmına 300-400 mL saf su ilave edilmiş ve 6 saat karıştırılmıştır ve akabinde sulu kısım freeze dryer ile tamamen uzaklaştırılmıştır. Sonuç olarak, *Pastinaca erzincanensis* türünden farklı polaritelere sahip üç (3) farklı ekstre elde edilmiştir; Etilasetat ekstresi (EAE), Metanol ekstresi (ME) ve Su ekstresi (SE).

2.2.3. Fitokimyasal Çalışmalar (LC-MS/MS)

Pastinaca erzincanensis bitkisinden elde edilen ekstrelerin (etil asetat, metanol ve su ekstreleri) fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi Sıvı Kromatografisi/ Kütle-Kütle Spektrometresi (LC/MS-MS) ile gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan sistem Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC/ESI-QTOF-MS) sistemidir. Analiz, bir Çift Sprey Agilent Jet Stream elektrosprey iyonizasyon kaynağı (Agilent Technologies, Inc., CA, ABD) ile bir Agilent G6550A iFunnel Dörtlü Uçuş Süresi LC/MS ile donatılmış bir Agilent 1260 Serisi LC sistemi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Cihaz, iki farklı yöntemle pozitif veya negatif elektrosprey iyonizasyonu ile 2 GHz Genişletilmiş Dinamik Aralık modunda çalıştırılıp, ayırma işlemi, ters fazlı Poroshell 120 EC-C18 kolonu (3.0 mm x 150 mm x 2.7 um) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Veriler Agilent MassHunter yazılımı ile analiz edilmiştir. Kütle spektrometresi ve kromatograf koşulları, standart fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı ve analitik yöntem doğrulama parametreleri ekler kısmında verilmiştir.

2.2.4. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

2.2.4.1. Toplam Fenolik Miktarı Tayini

Bitki ekstrelerinin toplam fenolik miktar içerikleri Folin-Ciocalteu kolorimetrik metodu temelinde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir [33]. Özetle, 96-kuyucuklu plaka içerisine 200 µL %2'lik Na_2CO_3 eklendi. Üzerine 0,031-1mg/mL konsantrasyonları arasında hazırlanan ekstrelerinden 10 µL (kör için 10 µL metanol) eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra 10 µL % 20'lik Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 750 nm'de absorbans okuması gerçekleştirildi. Standart olarak gallik asit kullanıldı. Oluşturulan gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiğinden ekstrelerin sahip olduğu toplam fenolik miktarı tespit edildi. Toplam fenolik miktarı mg GAE/g ekstre

olarak ifade edildi. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar standart sapma (±SD) değerleriyle birlikte verilmiştir.

2.2.4.2. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini

Bitki ekstrelerinin toplam flavanoid miktarları alüminyum klorür kolorimetrik metodu temelinde gerçekleştirilen bazı küçük revizyonlarla belirlenmiştir [33]. Özetle, 96-kuyucuklu plaka içerisine 128 µL saf su konuldu. Üzerine 0,25-2mg/mL konsantrasyonları arasında ekstrelerinden 10 µL (kör için 10 µL metanol) eklendi. 6 µL %5 $NaNO_2$ eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 6 µL %10 $AlCl_3$ eklendikten sonra tekrar 6 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak 40 µL 1 M NaOH eklendi ve 415 nm'de absorbans okuması gerçekleştirildi. Standart olarak kuarsetin kullanıldı. Oluşturulan kuarsetin kalibrasyon eğrisi grafiğinden ekstrelerin sahip olduğu toplam flavonoid miktarı tespit edildi. Toplam flavonoid bileşik miktarı mg QE/g ekstre olarak ifade edildi. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar standart sapma (±SD) değerleriyle birlikte verilmiştir.

2.2.4.3. DPPH Radikali Giderme Aktivite Testi

Bitki ekstrelerinin DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderme güçleri Blois metoduna göre gerçekleştirilmiştir [33]. Bu yöntem doğal ve sentetik bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir. Metod ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi yüksek serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Özetle, 96-kuyucuklu plakanın farklı kuyucuklarına 210 µL (0,1 mM) etanol içerisinde hazırlanmış DPPH çözeltisi konulmuş ve üzerine metanol ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstrelerinden 15 µL eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edilmiş ve 517 nm'de absorbansları kaydedilmiştir. Ekstrelerin sahip oldukları IC_{50} (DPPH radikalini'nin %50'ni süpüren ekstrenin konsantrasyonu) değerleri eliza tabaka okuyucusunda absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. Her bir deney 3 kez tekrarlanmış ve sonuçlar standart sapma (±SD) değerleriyle birlikte verilmiştir.

2.2.4.4. Demir (III) İyonlarını İndirgeme Gücü (FRAP)

Bitki ekstraktlarının demir (III) iyonlarını indirgeme kapasiteleri Oyaizu metoduna göre çalışılmıştır [33]. Bunun için, 96-kuyucuklu tabakanın farklı kuyucuklarına farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktlarından 37,5 µL konulmuş ve üzerlerine sırasıyla

sodyum fosfat tamponu (62,5 µL, 0,2 M, pH:6,6) ve potasyum ferrosiyanür çözeltisi (62,5 µL, %1) eklenmiş ve 50 ºC de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklar içerisine sırasıyla trikloroasetik asit (62,5 µL, %10) ve $FeCl_3$ çözeltisi (25 µL, %0,1) eklenip karıştırılmış ve 700 nm' de eliza tabaka okuyucusunda absorbansları kaydedilmiştir. Her bir deney 3 kez tekrarlanmış ve sonuçlar standart sapma (±SD) değerleriyle birlikte verilmiştir.

2.2.5. Enzim Aktivite Çalışmaları

2.2.5.1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibisyon Testleri

Bitki ekstraktların asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri Ellman metoduna göre araştırıldı [34]. Bu metodun esası kolinesterazlar, asetilkolin ve bütirilkolin'in tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizlerler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonuyla oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşturur ve 412 nm'de absorbans verir. Bu doğrultuda hazırlanan ekstrelerin ve kör küvetlerinin içeriği Tablo 1'e göre hazırlandı ve karışımların absorbansları 412 nm de 5 dakikada boyunca ölçüldü (Tablo 1). Elde edilen konsantrasyon-absorbans grafiklerinden ekstrelerin IC_{50} değerleri hesaplandı. Takrin standart ilaç olarak değerlendirildi. Her deney 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve sonuçlar standart sapmaları (±SD) ile verildi.

Tablo 1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz aktivite tayininde küvet içeriği

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µL)	Numune Tüpü (µL)
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
Örnek	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Asetilkolintiyoiyodür/	50	50
Bütirilkolintiyoiyodür	50	50

2.2.5.2. α-Glikozidaz İnhibisyon Testleri

Bitki ekstraktlarının α-Glikozidaz enzim inhibisyon aktivitesi, Tao ve arkadaşlarının prosedürüne göre gerçekleştirildi. Özetle ekstrelerin 20 mg'ı 2 mL ($EtOH:H_20$) de çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. İlk olarak 75 uL fosfat tamponu (0.15 U / mL, pH 7.4) 20 uL enzim çözeltisi ile karıştırıldı ve 35°C'de 10 dakika ön inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 20 uL p-NPG ilave edildi ve 35°C'de tekrar 10 dakika inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası çözeltilerin absorbansları 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen konsantrasyon-absorbans grafiklerinden ekstrelerin IC_{50} değerleri hesaplandı. Akarboz pozitif

kontrol olarak kullanıldı. Her deney 3 tekrarlı gerçekleştirildi ve sonuçlar standart sapmaları (±SD) ile verildi.

2.2.6. Antikanser Çalışmaları

2.2.6.1. Hücre Hatları ve Kültürü

Hücre kültürü, laboratuvar şartlarında hücrelerin belirli şartlar altında kontrollü bir şekilde çoğaltılması işlemidir. Hücre kültürleri sayesinde hücrelerin daha çabuk büyümesi ve çoğalması sağlanmakta ve de *In vivo* (canlı ortam) olarak yapılamayan çalışmalar belirli bir hücre hattından çoğaltılabilen hücreler sayesinde *in vitro* (laboratuvar şartları) olarak yapılabilmektedir. Kanser hücrelerinin, besin maddeleri ile oksijensiz ortam, insan vücut sıcaklığı ve nem gibi fizyolojik koşullarda beslenerek, hücre bölünmesi yapabilmeleri ve canlılıklarını sürdürebilmeleri hücre kültürü ortamlarınca sağlanabilmektedir. Proje kapsamında çalışılan insan rahim ağzı kanseri hücre hattı (HeLa) %10 FBS ve %1 Pen-Strep çözeltisi ihtiva eden Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), insan kolon kanseri hücre hattı (HT-29) %10 FBS ve %1 Pen-Strep çözeltisi ihtiva eden McCoys' 5A Medium ortamında, insan prostat kanseri hücre hattı (LnCap) %10 FBS ve %1 Pen-Strep çözeltisi ihtiva eden RPMI 1640 Medium ortamında kültüre edilmiştir. Hücre kültürlerinin inkübasyonu, 37^{o}C'de %95 nem, %5 CO_2 içeren inkübatörde gerçekleştirildi. Hücre kültürü çalışmaları Class II Güvenlik Kabini içerisinde yapıldı.

2.2.6.2. Hücrelerin Çözdürülmesi

İlk olarak sıvı azot içerisinde muhafaza edilen cryotüp içerisindeki dondurulmuş hücreler, sıvı azot içerisinden alınarak 37°C'deki su banyosunda çözdürüldü. Çözülen hücreler, 37°C'deki su banyosunda bekletilen medium (hücre büyüme ortamı), hücre kültür kabinindeki T-75 flask içerisine 12 mL olacak şekilde konuldu. Hızlı bir şekilde T-75 flask içerisine alınan hücreler, 37°C'de ve %5 CO_2 ihtiva eden inkübatör içerisinde inkübe edildi. Bir günün sonunda T-75 flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve yeni besiyeri ilave edildi. DMSO'in ortamdan uzaklaştırılması amacıyla bu işlem gerçekleştirildi. Çalışılan tüm hücre hatları için aynı işlemler tekrar edildi.

2.2.6.3. Hücrelerin Pasajlanması

T-75 flask içerisindeki hücrelerin %75-80 oranında bir doluluğa ulaşmasının ardından flask içerisindeki medium ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler, 5 mL fosfat tamponu (PBS) ile yıkandıktan sonra üzerlerine 5 mL tripsin/EDTA ilave edilerek flask tabanına yapışarak gelişen

hücrelerin tabandan ayrılmasını sağlamak için yaklaşık 5-10 dk. kadar inkübe edildikten sonra flask içerisine tripsinin aktivasyonu için 10 mL medium eklendi ve pipet yardımıyla 2-3 kez karıştırıldı. Karıştırma sonrası zeminden kalkan hücreler 15 mL'lik falcon tüpe alınarak 800 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan kısım ortamdan uzaklaştırıldı. Falkon tüp dibine çöken hücre pelletinin üzerine 10 mL besiyeri ilave edildi ve 5 adet yeni T-75 flask içerisine eşit miktarlarda homojenize hücreler dağıtıldı. Son olarak pasajlanan hücre kültürleri 37°C, %5 CO_2 ve %95 nem ihtiva eden inkübatör içerisinde inkübe edildi.

2.2.6.4. Hücrelerin Dondurulması

T-75 flask içerisinde bulunan pasajlanan hücreler %80 doluluk oranına ulaştıktan sonra flask içerisindeki medium uzaklaştırılarak 5 mL PBS tamponuyla yıkandı. Yıkaması yapılan hücrelerin üzerine 5mL tripsin/EDTA ilave edilerek flask tabanına yapışarak gelişen hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Yaklaşık 5-10 dk. kadar inkübe edildikten sonra flask içerisine tripsinin aktivasyonu için 10 ml medium eklendi ve pipet yardımıyla 2-3 kez karıştırıldı. 15 mL'lik falcon tüpe alınan hücreler 800 x g'de 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım ortamdan dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra sonra kalan hücreler büyüme ortamı (%10 DMSO içeren besiyeri ortamı) ile yeniden süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler eşit miktarlarda cryotüplere aktarılarak vakit geçirmeksizin -80 ^{o}C'deki dondurucuya kaldırıldı. Bir hafta sonra, uzun süreli depolama için cryotüplerin yaklaşık -196 ^{o}C'deki sıvı azot tankına aktarımı gerçekleştirildi.

2.2.6.5. Hücre Sayımı

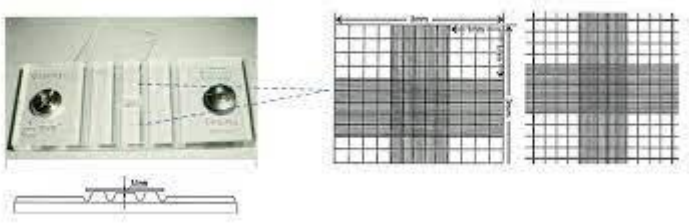
Hücre sayımının gerçekleştirilebilmesi için zeminden kaldırılarak besiyeri ile süspanse edilen hücre süspansiyonundan 100 µL alınarak 2 mL'lik ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 µL tripan mavisi konularak yavaş bir şekilde homojenize edildi. Homojenize edilen hücre-tripan mavisi süspansiyonundan 10 µL alınarak hemositometrenin her iki odacığına da ilave edildi. Inverted mikroskop ile canlı hücre sayısını tespit etmek maksadıyla canlı ve cansız hücrelerin hücre sayımı gerçekleştirildi. Bu işlemde tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı. Cansız hücreler mikroskop altında boyayı absorbe ederek mavi renkte görünürlerken, canlı hücreler boyayı absorbe etmediklerinden dolayı parlak olarak gözlemlenir (Şekil 1).
Hücrelerin sayımı sonrasında, iki odacığın da ortalaması alındı ve mL başına düşen hücre sayısı aşağıda anlatıldığı şekilde hesaplandı;

Hücre sayısı / mL = İki odacık ortalama hücre sayısı x DF x 10^4

DF = Trypan Blue ile yapılan seyreltme faktörü

10^4 = Hemositometre boyutlarından hesaplanan faktör

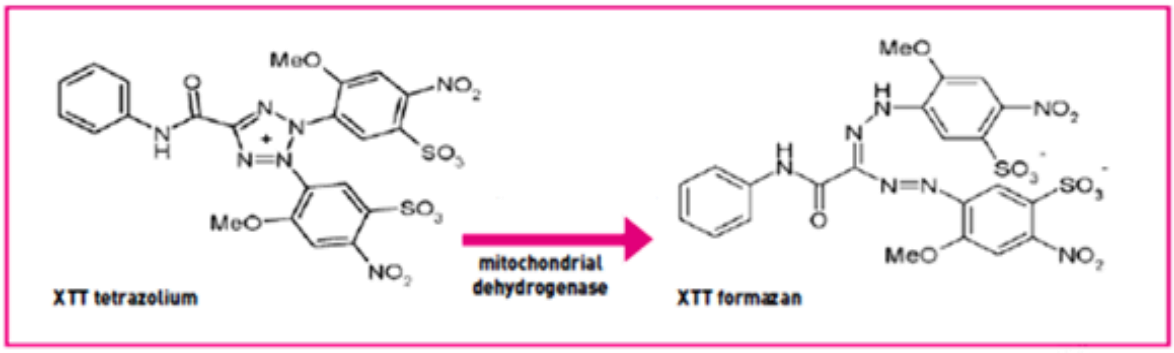
Hemositometrede bulunan her bir odacığın boyutu;
1 cm uzunluk, 1 cm en, 0,1 cm yükseklik, 0.1 cm^3 veya 10-4 mm^3 (10-4 mL) hacim şeklindedir.



Şekil 1. Hemositometre ile canlı hücre sayımı.

2.2.6.6. Sitotoksisite Testleri

Bitkilerden elde edilen ekstrelerin farklı konsantrasyonları (10-500 µg/mL) %0,2'lik DMSO içeren besiyeri ortamında hazırlandı ve tatbik edilecek kanser hücrelerine ilave edilmek üzere hazır hale getirildi. Her bir ekstrenin test edilecek hücre hatları (HeLa, HT-29 ve LnCap) üzerindeki sitotoksik aktiveleri üretici firma talimatları esas alınarak XTT metodu ile gerçekleştirildi (Hücre Proliferasyon XTT Kiti, BI). Belirtilen metod metabolik olarak faal olan hücrelerde mitokondriyal enzim aktivesiyle suda çözünmeyen XTT tetrazolyum tuzu suda çözünebilen turuncu renkli XTT formazan bileşiğine dönüşmekte ve oluşan XTT formazan bileşiğinin 450-490 nm'de vermiş olduğu absorbsiyona dayanmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. XTT tetrazolyumun fenazin meto sülfat varlığında mitokondriyal dehidrogenaz ile XTT formazana indirgenmesi.

Özetle, 96-kuyucuklu plakalara ekimi yapılacak hücrelerden 100'er µL (10.000 cell/mL) eklenerek 24 saatlik inkübasyon sürecine bırakıldı. Süreç bitiminde kuyucuklardaki

besi yeri ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar 50 µL PBS tamponuyla yıkanarak belirtilen tamponun tekrar uzaklaştırılması sağlandı. Bu hücrelerin üzerine 50'şer µL taze tam besi yeri ve 50'şer µL çeşitli konsantrasyonlarda (10-500 µg/mL) örnekler ilave edildi. Plakalar 24 saatlik inkübasyon için tekrar 37^{o}C'de %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübator içerisine konuldu. Sonrasında 470 nm'de plakalar elisa okuyucuda kolorometrik olarak okundu. Elde edilen sonuçlara göre her bir ekstrenin IC_{50} değeri GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego, CA) istatistik programı kullanılarak hesaplandı. IC_{50} değeri, hücre proliferasyonunu %50 azaltmak için gereken ekstre konsantrasyonudur. Negatif kontrol olarak muamele edilmeyen hücreler kullanıldı. Pozitif kontrol olarak 5-florourasil (5-FU) kullanıldı. Sonuçlar standart sapmaları (±SD) ile verildi.

Hücre proliferasyonundaki değişiklik aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı;
% Proliferasyon = [Abs $_{(\text{ekstreler ile muamele görmüş hücreler})}$ − Abs $_{(\text{hücresiz ortamdaki ekstre})}$] / [Abs$_{(\text{kontrol grubu hücreler})}$-Abs$_{(\text{hücresiz ortam})}$]x100.

2.2.6.7. Annexin V-FITC/PI Testi

Pastinaca erzincanensis bitkisinden elde edilen metanol ekstresi (ME)'nin HeLa hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi flow sitometre üzerinden Annexin V-FITC/PI çift boyama (Muse® AnnexinV/Dead cell assay kit, MCH100105) yöntemiyle araştırıldı. Bunun için hücreler ($3x10^5$ hücre/kuyu) 6 kuyucuklu kültür plakasına ekildi ve 5% CO_2 inkübatöründe 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda, hücreler ekstrelerin IC_{50} değerleri ile muamele edildi ve tekrar 24 saat 5%CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon süresi sona erdiğinde, hücreler tripsinize edildi ve 300 xg'de 5 dakika santrifüjlendi ve ardından pelet, %1 FBS ile takviye edilmiş 100 uL ortam içinde yeniden süspanse edildi. Eşit hacimde AnnexinV reaktifi eklendi ve karışım oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Muamele edilmemiş hücreler, negatif kontrol olarak kullanıldı. Analizler Muse Cell Analyzer (Merck Millipore) ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar standart sapmalar (±SD) ile ifade edildi.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen veriler istatistiksel program GraphPad Prism 6 (GraphPad, La Jolla, CA) Software 6.0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İki grup arasındaki istatistiksel fark Student's t-testi ve ayrıca gruplar arasındaki fark ise One-way ANOVA yöntemi kullanılarak belirlendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

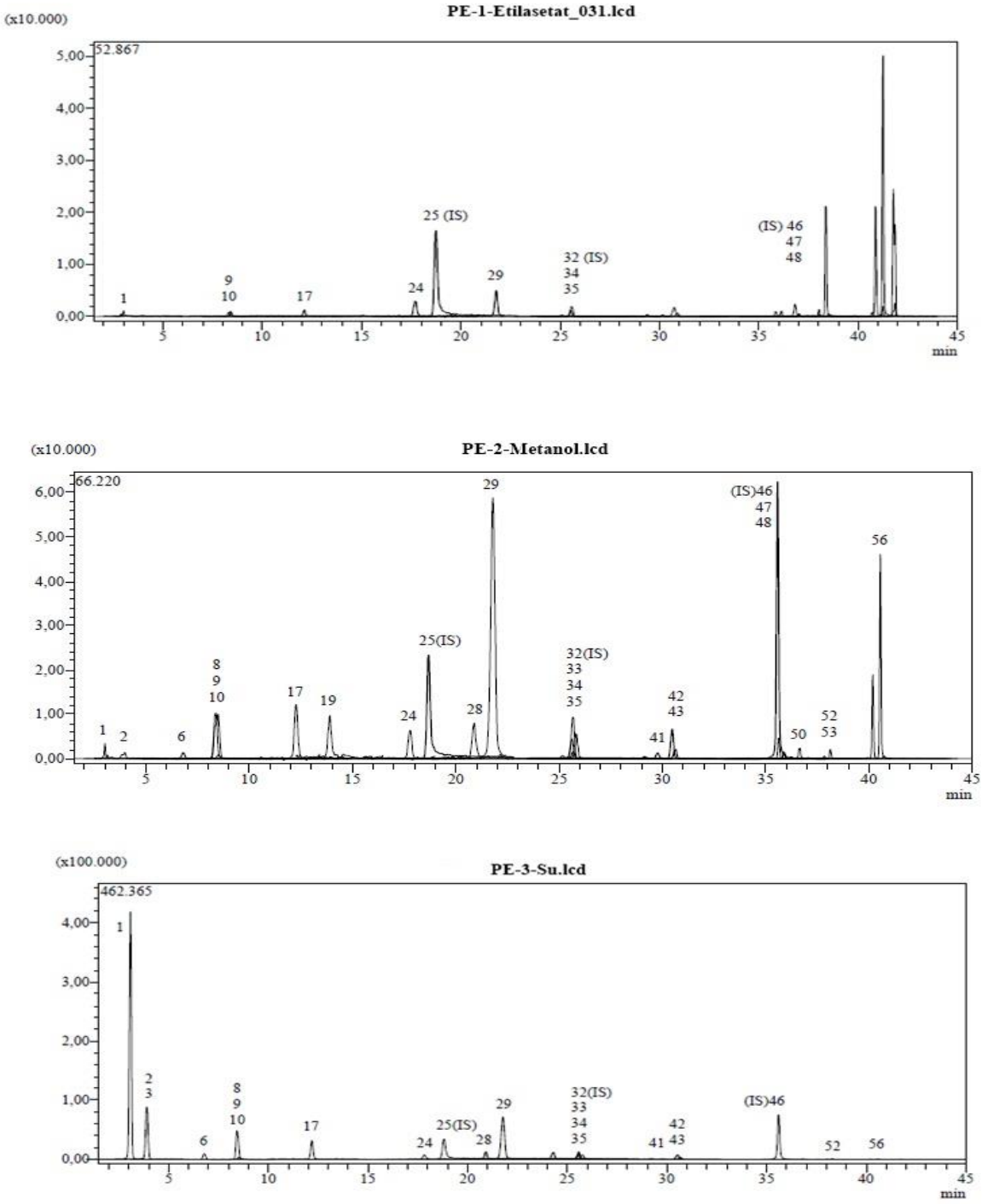
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Bitki Ekstrelerinin Eldesi

Çalışmada kullanılan *Pastinaca erzincanensis* türünün meteryal metod kısmında bahsedildiği üzere farklı polaritelere sahip çözücülerle ekstarksiyon işlemlerine tabi tutulmuş ve 3 farklı ekstre elde edilmiştir. Bunlar sırasıyla etil asetat ekstresi (EAE), metanol ekstresi (ME) ve su ekstresi (SE) dir.

3.2. LC-MS/MS Analiz Sonuçları

Gerçekleştirilen LC–MS/MS analizleri neticesinde *P. erzincanensis* türünden elde edilen etil asetat (EAE), metanol (ME) ve su (SE) ekstrelerine ait kromatogramlar Şekil 3'de verilmiştir. Ayrıca, standart bileşiklere ait LC-MS/MS kromatogramı da **ekler kısmında** verilmiştir.



Şekil 3. *P. erzincanensis* türünün sırasıyla etil asetat, metanol ve su ekstrelerine ait LC-MS/MS kromatogramları.

Tablo 2'de görüldüğü üzere *P. erzincanensis* 'in fitokimyasal ve özelliklede fenolik madde açısından oldukça zengin olduğu belirlendi. Öyleki, 56 standart fitokimyasal üzerinden taranan kromatogramda 23 adet fitokimyasal bu bitkinin etil asetat, su ve metanol ekstrelerinde tespit edilmiştir. Çözücü polaritesine bağlı olarak ekstraktlarda bulunan fenolik maddelerin

miktar ve türlerinde de farklılıklar tespit edildi. Etil asetat ekstresinde (EAE) 15 çeşit fitokimyasal tespit edilirken, Metanol ekstresinde (ME) 23 çeşit fitokimyasal ve su ekstresinde (SE) 19 çeşit fitokimyasal madde içerdiği belirlenmiştir. Etil asetat ekstresinde kalitatif olarak belirlenen bileşiklerin göreceli olarak düşük miktarlarda olduğu tespit edilmiştir. Metanol ekstresinin ana bileşenlerinin fumarik asit ve gentisik asit olduğu belirlenmiştir. Su ekstresi'nin majör bileşiklerinin kinik asit, fumarik asit ve gentisik asit olduğu saptanmıştır. Diğer birçok fitokimyasal bileşiğin ise değişen miktarlarda her bir ekstrede mevcut olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 2. *P. erzincanensis* türünden elde edilen ekstrelerin LC–MS/MS analiz sonuçları

No	Bileşik	Etil asetat (mg/g ekstre)	Metanol (mg/g ekstre)	Su (mg/g ekstre)
1	Kinik asit	0,081	0,251	25,707
2	Fumarik asit	N.D.	1,014	22,756
3	Akonitic asit	N.D.	N.D.	0,014
4	Gallik asit	N.D.	N.D.	N.D.
5	Epigallokateşin	N.D.	N.D.	N.D.
6	Protokatekuik asit	N.D.	0,04	0,158
7	Kateşin	N.D.	N.D.	N.D.
8	Gentisik asit	N.D.	1,056	4,009
9	Klorojenik asit	0,02	0,267	0,047
10	Protokatekuik aldehit	0,014	0,013	0,007
11	Tannic acid	N.D.	N.D.	N.D.
12	Epigallokateşin galat	N.D.	N.D.	N.D.
13	Sinarin	N.D.	N.D.	N.D.
14	4-OH Benzoik asit	N.D.	N.D.	N.D.
15	Epicateşin	N.D.	N.D.	N.D.
16	Vanilik asit	N.D.	N.D.	N.D.
17	Kafeik asit	0,035	0,095	0,141
18	Sirinjik asit	N.D.	N.D.	N.D.
19	Vanilin	N.D.	0,222	N.D.
20	Sirinjik aldeit	N.D.	N.D.	N.D.
21	Daidzin	N.D.	N.D.	N.D.
22	Epikateşin galat	N.D.	N.D.	N.D.
23	Piceid	N.D.	N.D.	N.D.
24	p-Kumarik asit	0,09	0,215	0,254
25	Ferulik asit-D3-IS[h]	N.A.	N.A.	N.A.
26	Ferulik asit	N.D.	N.D.	N.D.
27	Sinapik asit	N.D.	N.D.	N.D.
28	Kumarin	N.D.	0,057	0,069
29	Salisilik asit	0,053	0,294	0,362
30	Cyranoside	N.D.	N.D.	N.D.
31	Miquelianin	N.D.	N.D.	N.D.
32	Rutin-D3-IS	N.A.	N.A.	N.A.
33	Rutin	N.D.	0,084	0,096
34	İzokuersitrin	0,085	0,459	0,489
35	Hesperidin	0,017	0,12	0,164
36	o-Kumarik asit	N.D.	N.D.	N.D.
37	Genistin	N.D.	N.D.	N.D.

38	Rozmarinik asit	N.D.	N.D.	N.D.
39	Elajik asit	N.D.	N.D.	N.D.
40	Kosmozin	N.D.	N.D.	N.D.
41	Kuersitrin	N.D.	0,059	0,038
42	Astragalin	0,078	0,277	0,313
43	Nikotiflorin	0,028	0,102	0,14
44	Fisetin	N.D.	N.D.	N.D.
45	Daidzein	N.D.	N.D.	N.D.
46	Kuersetin-D3-IS	N.A.	N.A.	N.A.
47	Kuersetin	0,02	0,036	N.D.
48	Naringenin	0,004	0,019	N.D.
49	Hesperetin	N.D.	N.D.	N.D.
50	Luteolin	0,007	0,008	N.D.
51	Genistein	N.D.	N.D.	N.D.
52	Kaempferol	0,021	0,037	0,008
53	Apigenin	0,038	0,032	N.D.
54	Amentoflavon	N.D.	N.D.	N.D.
55	Krizin	N.D.	N.D.	N.D.
56	Akasetin	0,101	0,091	0,002

N.A.: Uygulanamadı
N.D.: Belirlenemedi

Tıbbi ve aromatik bitkilerin yapılarında barındırdıkları fitokimyasallar arasında fenolik asitler ve flavonoidler önemli bir orana sahiptir ve canlı sistemlerde dikkate değer biyolojik özellikler sergilemektedir. Mevcut çalışmada, *P. erzincanensis* bitkisinin LC-MS/MS analizleri neticesinde birçok fenolik asit ve flavonoid türü tespit edilmiştir. Bu fitokimyasalların sahip oldukları biyolojik aktivitelere sırasıyla bakıldığında öncelikle bir fenolik asit olan Kinik asid'in anti-inflamatuar aktivite [35], antioksidan aktivite [36], anti-hepatit B virüs aktivitesi [37] , antiviral aktivite, antinosiseptif etki [38, 39] , anti-diyabetik aktivite [40], sitotoksik, apoptotik ve anti-α-glukozidaz aktiviteleri [41] gibi birçok biyolojik özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Fumarik asit gıda, kimya, tarım ve özelliklede ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [42]. Gentisik asit ve türevlerinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler [43], fenoloksidaz [44] ve insan karbonik anhidraz [45] inhibitörleri gibi çeşitli biyolojik özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir. Kafeik asit, insan diyetinde bulunan çeşitli doğal antioksidanlardan ve kemoprotektif ajanlardan biridir [46]. p-Kumarik asit ve onun konjugatları, çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir, diyabet, obezite ve hiperlipemiye karşı hafifletici etkilerin yanı sıra antioksidan, kanser önleyici, antimikrobiyal, antivirüs, antiinflamatuar, antiplatelet agregasyonu, anksiyolitik, ateş düşürücü, analjezik ve anti-artrit aktiviteleri gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri için incelenmiştir [47].

Bitki özündeki flavonoidlere gelince, izokuersitrin'in antioksidan ve antiinflamatuar aktiviteler [48], antiviral aktivite [49], antihipertansif aktivite [50], antikanser aktivitenin yanı

sıra SK-Mel-2 melanom hücrelerinde mitokondriyal bağımlı apoptozu ve tip II diyabetik sıçanlarda anti-diyabetik aktiviteyi indüklemesi [51] gibi bazı önemli biyolojik özellikler sergilediği belirtilmiştir. En iyi bilinen flavonoidlerden biri olan kuersetin, antioksidan [52], antiobezite [53] , antikanserojen [54], antiviral, antibakteriyel [55] ve anti-inflamatuar etkileri [56] nedeniyle giderek artan bir ilgi görmüştür. Kuersetin örneğin fosfolipaz A2 ve C, tirozin protein kinazlar, lipoksijenaz, siklooksijenaz, siklik nükleotid fosfodiesteraz ve sitokrom P450 sistemleri gibi bazı anahtar enzimleri inhibe ettiği gösterilmiştir, bu sonuçlar ise onun antihistamin, antiinflamatuar ve antikanserojenik özelliklerinin var olduğunu göstermektedir [57]. Rutin'in kardiyoprotektif, sitoprotektif, nöroprotektif, vazoprotektif, antikanserojenik ve antioksidan aktiviteler gibi çok çeşitli biyoaktivitelere sahip olduğu bilinmektedir [58]. Doğal olarak oluşan flavonoidlerden biri olan astragalin (kaempferol 3-glukozit), nöroprotektif, kardiyoprotektif, anti-inflamatuar, antiobezite, antiosteoporotik, antiülser, antioksidan, antikanser ve antidiyabetik özellikler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik uygulamaları ile iyi bilinmektedir [59]. Oldukça biyoaktif bir flavonoid aglikon olan Naringenin'in antibakteriyel, antioksidan, antifungal, antiviral, antikanser, antiadipojenik ve kardiyoprotektif aktiviteler gibi birçok farmakolojik etki gösterdiği bildirilmiştir [60, 61]. Apigenin'in antikanser aktivite [62], anti-inflamatuar ve antioksidan aktiviteler [63], anti-diyabetik ve anti-alzheimer hastalık potansiyelleri [64] dahil olmak üzere önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu iyi bilinmektedir.

3.3. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada *P. erzincanensis* ‘in antioksidan aktiviteleri toplam fenolik içerik (TPC), toplam flavonoid içerik (TFC), radikal giderme kapasitesi (DPPH), ve metal iyonlarını indirgeme (FRAP) gücü üzerinden değerlendirilmiştir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antioksidan kapasitelerinin araştırılmasında bu bitkilerin içermiş olduğu fitokimyasal miktarı ve çeşidi özelliklede fenolik ve flavonoid oranları büyük öneme sahiptir [33]. Bu kapsamda, *P. erzincanensis* bitkisinden elde edilen etil asetat ekstresi (EAE), metanol ekstresi (ME) ve su ekstresi (SE)’nin toplam fenolik içerikleri (TPC) gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 3’de verilmiştir. *P. erzincanensis* ‘den elde edilen ekstrelerin TPC değerlerine bakıldığında 128.925 mg GAE/g ekstre değeriyle ME’nin en yüksek değere sahip olduğu ve bunu sırasıyla EAE (109,777 mg GAE/g ekstre) ve SE (80.444 mg GAE/g ekstre) takip etmiştir. (Tablo 3).

Bitki ekstrelerinin toplam flavonoid içerikleri (TFC) incelendiğinde sonuçların fenolik içerikleriyle paralellik gösterdiği belirlenmiştir. ME (231.191 mg QE/g ekstre)’nin en yüksek

miktarda TFC değerine sahip olduğu ve bunu sırasıyla EAE (133.331 mg QE/g ekstre) ve SE (32.619 mg QE/g ekstre)'nin takip ettiği gözlenmiştir.

Literatürde *Pastinaca* bitkisinin farklı türlerine ait antioksidan aktivite çalışmaları mevcuttur. Örneğin, Tosun ve ark. (2019), *Pastinaca sativa L. subsp urens* (Req. Ex Gordon) ile yaptıkları çalışmada metanol ekstresinin toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite için bitkinin toprak üstü kısımlarını kullanmışlardır. Bitki örneklerinin esansiyel yağları elde edildikten sonra yapılan toplam fenolik madde içeriği sırasıyla bitki meyvelerinden 50,40 mg/gr ekstre ve toprak üstü kısmından 67,86 mg/gr ekstre olarak belirlenmiştir [65]. Düşgün ve ark. (2021), Niğde iline endemik olan Pastinaca ailesine mensup *Pastinaca zozimoides* ile yaptıkları çalışmada *P. zozimoides*'in etanol ekstraktının toplam fenolik içeriği 28,79 mg GAE/gr ekstre olarak bulunmuştur [66].

Bu çalışmada *P. erzincanensis*'in TPC ve TFC değerleri literatürde sınırlı çalışmalarla belirtilen farklı Pastinaca türlerinde elde edilen TPC ve TFC değerleriyle kıyaslandığında farklılıklar gözlense de büyük oranda yakın sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bu farklılıklarında özellikle kullanılan bitki türünün tabiatı, toplanma zamanı, bitkinin kullanılan kısmı ve özelliklede ekstraksiyon metodu ve kullanılan çözücünün cinsinden kaynaklandığı belirlenmiştir.

Doğal veya sentetik bir bileşiğin antioksidan kapasitesinin araştırılmasında DPPH radikal giderme testleri yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, *P. erzincanensis*'in radikal süpürme aktivitesi incelemek için ekstrelerin farklı konsantrasyonları hazırlanarak DPPH radikalleri üzerinde test edilmiş ve sonuçlar standart antioksidan olarak kullanılan troloks ile karşılaştırılmıştır. *P. erzincanensis*'den elde edilen EAE, ME ve SE'nin doz bağımlı DPPH radikal süpürme aktivitesi IC_{50} değerleri olarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3'de gösterilmiştir. EAE en düşük IC_{50} (10.05 µg/mL) değeri ile en yüksek aktiviteyi göstermiş, bunu sırasıyla SE (IC_{50}:10.99 µg/mL) ve ME ($IC_{50:}$11.85 µg/mL) izlemiştir. Ayrıca, ekstreler standart antioksidan troloks ($IC_{50:}$12.80 µg/mL)'dan daha düşük IC_{50} değerleriyle daha güçlü bir radikal giderme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Bir bileşiğin veya doğal ürünün yapısındaki fitokimyasalların metal iyonu indirgeme gücü o bileşiğin veya doğal ürünün antioksidan kapasitesini değerlendirmek için önemli bir gösterge olarak değerlendirilmektedir [67]. Mevcut çalışmada, *P. erzincanensis* ekstrelerinin demir iyonu indirgeme güçleri (FRAP) belirlenmiş ve sonuçlar troloks eşdeğeri (TE) olarak Tablo 3'de verilmiştir. Elde edilen veriler, her iki bitkinin FRAP sonuçlarının DPPH sonuçlarıyla paralellik sergilediğini göstermiştir. En yüksek FRAP değerine 61,48 mgTE/g ekstre değeriyle SE sahip olurken bunu sırasıyla EAE (41,48 mgTE/g ekstre) ve ME (40,08

mgTE/g ekstre)'nin izlediği görülmüştür. Tüm bu verilerin LC-MS/MS sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, ekstrelerin yapılarında bulundurduğu sekonder metabolitlerin miktarından ziyade onların çeşitliliğinin ve sinerjik etkilerinin antioksidan güçlerine yön verdiği söylenebilir. Sonuç olarak bu çalışmayla birlikte ilk kez *P. erzincanensis*'in yüksek miktarda fitokimyasal (fenolik ve flavonoid) içerikleriyle güçlü bir antioksidan kaynağı olarak değerlendirilebilecek potansiyeli ortaya konmuştur.

Tablo 3. *P. erzincanensis* ekstrelerinin antioksidan aktivite sonuçları.

Ekstre/ Standart	**TPC (mg GAE/g ekstre)**	**TFC (mg QE/g ekstre)**	**FRAP (mg TE/g ekstre)**	**DPPH IC_{50} (µg/mL)**
Etil Asetat	109,78±2,10	133,33±1,76	41,49±1,10	10,05±0,24
Metanol	128,93±1,94	231,19±2,64	40,08±0,68	11,85±0,53
Su	80,44±1,05	32,62±0,82	61,49±0,44	10,99±0,80
Troloks	-	-	-	12,80±0,42

TPC: Toplam fenolik miktar
TFC: Toplam flavonoid miktar
FRAP: Demir indirgeme antioksidan gücü

3.4. Enzim Aktivite Sonuçları

3.4.1. α-Glikozidaz İnhibisyonu

Doygun substrat derişiminde α-glikozidaz enziminin standart inhibitörü olan akarboz ve *P. erzincanensis* ekstreleri ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için aktivite grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir numune için IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 4). *P. erzincanensis* ekstreleri'nin (EAE, ME, SE) α-glikozidaz enzimi üzerindeki IC_{50} değerleri sırasıyla 42,31 µg/mL, 12,06 ve 30,25 µg/mL olarak belirlendi. Bu değerler EAE hariç diğer iki ekstre'nin de standart Akarboz'dan daha yüksek inhibisyon etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Bu çalışmada standart olarak kullanılan Akarboz'un α-glikozidaz enzimi üzerindeki IC_{50} değeri 39,03 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. *P. erzincanensis* ekstrelerinin α-glikozidaz, Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz üzerindeki IC_{50} değerleri.

Ekstreler/ Standart	**α-glikozidaz** IC_{50} **(µg/mL)**	**AChE** IC_{50} **(µg/mL)**	**BChE** IC_{50} **(µg/mL)**
EAE	42,31±1,80	45,20±2,26	12,15±066
ME	12,06±0,76	20,05±1,10	4,96±0,24
SE	30,25±1,24	32,20±1,58	8,44±0,80
Akarboz	39,03±1,26	-	-
Takrin		38,50±0,86	14,74±0,52

3.4.2. Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibisyonu

Doygun substrat derişiminde AChE enziminin standart inhibitörü olan Takrin ve bitki ekstraktlar ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için aktivite grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir numune için IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 4). Tablo 4 göz önüne alındığında ekstreler arasında 20,05 µg/mL IC_{50} değeri ile en güçlü inhibisyon etkisine ME sahipken bunu sırasıyla SE (32,20 µg/mL) ve EAE (45,20 µg/mL) izlemiştir. Bu çalışmada AChE için standart (Takrin) IC_{50} değeri 38,50 µg/mL olarak belirlenmiştir. Buda özellikle ME'nin Takrinden oldukça yüksek bir inhibisyon etkisine sahip olduğu ortaya koymuştur.

3.4.3. Bütirilkolinesteraz (BChE) İnhibisyonu

Doygun substrat derişiminde BChE enziminin standart inhibitörü olan Takrin ve bitki ekstraktlar ile inhibisyon etkisine bakıldı ve her bir madde için aktivite grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden her bir numune için IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 4). BChE enzimi için ise ekstrelerin (EAE, ME, SE) IC_{50} değerleri sırasıyla 12,15 µg/mL, 4,96 µg/mL, ve 8,44 µg/mL olarak belirlendi. Bu çalışmada BChE için standart ilaç Takrin'in IC_{50} değeri 14,74 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu veriler standart Takrin değeri ile kıyasladığında ekstrelerin daha güçlü inhibitör etki sergilediği görüldü. Sonuç olarak tüm enzim inhibisyon çalışmaları *P. erzincanensis* türünün hem diyabet hem de Alzheimer hastalığının tedavisinde faydalanılabilecek sekonder metabolitlere sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

3.5. Antikanser Aktivite Sonuçları

3.5.1. Sitotoksik Aktivite

Doğal ya da sentetik bir maddenin potansiyel toksisitesini araştırmak için sitotoksisite testleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada *P. erzincanensis* bitkisinden elde edilen etilasetat ekstresi (EAE), metanol ekstresi (ME) ve su ekstresi (SE)'nin sitotoksik aktiviteleri, insan rahim ağzı kanseri hücre hattı (HeLa), kolon kanseri hücre hattı (HT-29) ve prostat kanseri hücre hattı (LnCAP), ve fare sağlıklı hücre hattı (3T3-L1) üzerinde XTT yöntemiyle araştırıldı. Ekstrelerin ve kemoterapötik ilaç olarak kullanılan 5-Florourasil'in belirtilen hücre hatları üzerindeki IC_{50} (Hücre proliferasyonunu %50 azaltan ekstrenin konsantrasyonu) değerleri Tablo 5'de gösterilmektedir.

Tablo 5. *P. erzincanensis* ekstrelerinin HeLa, HT-29, LnCap ve 3T3-L1 hücre hatları üzerindeki IC_{50} değerleri.

Ekstreler/ Standart	**HeLa** IC_{50} **(**µg/mL)	**HT-29** IC_{50} **(**µg/mL)	**LnCap** IC_{50} **(**µg/mL)	**3T3-L1** IC_{50} **(**µg/mL)
EAE	41,61±1,30	>250	>250	>500
ME	20,98±0,86	167,11±2,83	>250	>500
SE	145,04±2,74	>250	>250	>500
5-FU	35,14±1,94	23,2±0,98	29,60±1,60	44,30±2,35

Tablo 5 göz önüne alındığında, tüm ekstrelerin HeLa hücreleri ile 48 saat inkübasyon neticesinde doz bağımlı olarak sitotoksik aktivite sergilediği ve bu ekstreler içerisinde en güçlü sitotoksik aktiviteye en düşük IC_{50} değeriyle (20,98 µg/mL) ME gösterirken bunu sırasıyla EAE (41,61 µg/mL) ve SE (145,04 µg/mL) izlemiştir. Ayrıca, bu hücre hattı üzerinde ME'nin pozitif kontrol olarak kullanılan 5-FU (35,14 µg/mL)'dan da daha güçlü sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. HT-29 hattı üzerinde sadece metanol ekstresinin kaydadeğer sitotoksik etki gösterdiği diğer iki ekstrenin ise 250 µg/mL' den daha yüksek IC_{50} değerine sahip oldukları görülmüştür. LnCap hücre hattı üzerinde ise tüm ekstreler 250 µg/mL' den daha yüksek IC_{50} değerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu veriler ekstrelerin sitotoksik etkisine en duyarlı kanser hattının HeLa hücreleri olduğu, ekstrelere en dirençli hücre hattının ise LnCap hattının olduğunu göstermiştir. Öte yandan, ekstrelerin 3T3-L1 sağlıklı hücre hattı üzerinde çok daha yüksek IC_{50} (>500) değerlerine sahip oldukları görülürken, 5-FU (44,30 µg/mL)'nun bu hücre hattı üzerinde güçlü bir sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu da *P. erzincanensis* ekstreleri arasında özellikle ME yi antikanser aktivite potansiyeli açısından oldukça değerli kılmaktadır.

P. erzincanensis bitkinin mensup olduğu ailede bulunan diğer türlerinin hem insanlar hem de bazı hayvanlarda yara iyileştirme gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Ancak literatürde bu tür ile ilgili detaylı antikanser çalışmaları mevcut değildir. Literatürde Pastinaca ailesine mensup bazı türlerle yapılan sitotoksik aktivite çalışmaları sınırlı miktardadır. Düşgün ve ark. (2021), Niğde iline endemik olan *Pastinaca zozimoides* ile yaptıkları çalışmada bitkinin toprak üstü kısmından elde edilen metanol ekstresinin insan kolon kanseri hücre hatlarından biri olan Caco-2 hücreleri üzerinde uyguladıkları konsantrasyonlarda orta-yüksek değerde bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir [66]. Bir başka çalışmada, Madari ve Jakobs'un 2004'de yaptıkları bir araştırmada *Pastinaca sativa* bitkisinin

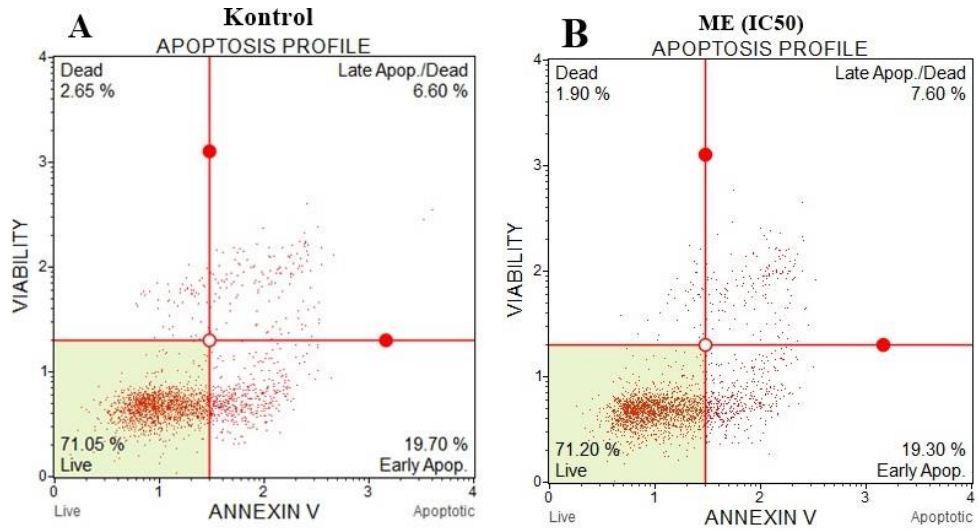
HeLaS3 kolon kanseri hücre hattında oldukça güçlü antiproliferatif etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir [68].

Tüm bu veriler birlikte düşünüldüğünde, Pastinaca türlerinin yetişme bölgeleri, aktivite için kullanılan bölgeleri, ekstraksiyon çeşidi ve özelliklede test edilen kanser hücre hattının sitotoksik aktivitede önemli yere sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ilk kez kullanılan *P. erzincanensis* türünün de literatürdeki diğer türlerle sitotoksik aktivite bakımından önemli ölçüde örtüştüğü görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmayla *P. erzincanensis* türünün *in vivo* antikanser çalışmalarında değerledirilebilecek potansiyele sahip sekonder metabolitlere sahip olduğu ve bu yönüyle de bu metabolitlerin bitkiden izolasyonuna ve bireysel yada kombine halde antikanser çalışmalara tabii tıtulması için önemli veriler sağlanmıştır.

3.4.2. Apoptotik Aktivite

Birçok kemoterapötik ajan sergilemiş olduğu apoptotik etkiler nedeniyle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat, çoğu kemoterapötik ajanın kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de sitotoksik etki ve istenmeyen yan etkilere de sahip oldukları bilinmektedir [69]. Bu nedenle, son yıllarda sentetik ilaçların yanı sıra gittikçe artan bir oranda tıbbi bitkilerden hazırlanan ham ekstre veya onlardan izole edilen sekonder metabolitlerin antikanser etkileri üzerine çalışmalar hız kazanmıştır [33]. Kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmaları, kanser insidansının önlenmesini engellemek için önemli bir yaklaşım olmuştur [70, 71].

Çalışmanın bu aşamasında, *P. erzincanensis* ekstrelerinden test edilen kanser hücreleri arasında en yüksek sitotoksik etkiye sahip metanol ekstreleri (ME)'nin HeLa hücreleri üzerinde ki en etkili sitotoksik aktivitesinden dolayı antikanser etki mekanizmalarının mitokondriyal membran yoluyla gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmıştır. Bu kapsamda, *P. erzincanensis*'in antikanser etkisini incelemek için HeLa hücreleri ME'in IC_{50} değerine 48 saat süreyle maruz bırakıldı ve süre sonunda yöntem kısmında belirtildiği gibi deney prosedürleri uygulandı ve ME nin HeLa hücrelerinde meydana getirebileceği apoptotik etkiler flow sitometre yardımıyla analiz edildi (Şekil 4).



Şekil 4. P. erzincanensis'den elde edilen ME'nin HeLa hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. A) Kontrol grubu HeLa hücreleri, B) Muamele grubu HeLa hücreleri.

Şekil 4'de de görüldüğü üzere kontrol grubu hücre popülasyonuna bakıldığında hücrelerin %71,05'inin canlı, %19,70'inin erken apoptoza, %6,60'ının geç apoptoza yönlendiği görülmektedir. Öte yandan, 48 saat süresince ME'nin IC_{50} değeri ile inkübe edilmiş HeLa hücrelerinde de canlı hücrelerin yaklaşık %71,20, erken apoptoza uğrayan hücre popülasyonunun %19,30 ve %7,60 oranında da geç apoptoz görülmüştür. Bu veriler kontrol grubuyla muamele grubu arasında anlamlı bir değişimin olmadığını ortaya koymuştur. Bu da bize *P. erzincanensis* türünün HeLa kanser hücre hattı üzerinde sergilemiş olduğu sitotoksik etkinin antikanser etki mekanizmalarından biri olan intrinsik yoldan ziyade ekstrinsik yollarla olabileceği düşüncesini kuvvetlendirmiştir.

SONUÇLAR

1. Proje kapsamında çalışılan *P. erzincanensis* bitkisi çiçeklenme dönemlerinde toplanarak uygun şartlar altında kurutulmuş, ve kurutulan bitkinin de toprak üstü kısımlarından farklı polaritelere sahip çözücülerle etilasetat ekstresi (EAE), metanol ekstresi (ME) ve su ekstresi (SE) olarak üç farklı ekstre elde edilmiştir.
2. Bitki ekstrelerinin fitokimyasal içeriklerinin belirlenmesi için LC-MS/MS analizleri gerçekleştirilmiş ve bu analizler sonucunda taranan 56 farklı bileşik içerisinde kalitatif ve kantitatif olarak 23 fitokimyasal (özellikle fenolik asitler ve flavonoidler) belirlenmiştir. Bitkinin ana bileşenlerinin kinik asit, fumarik asit ve gentisik asit olduğu saptanmıştır.

3. *İn vitro* antioksidan aktivite testleri neticesinde bitki ekstreleri arasında en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğine ME'nin sahip olduğu, demir iyonlarını indirgeme güçleri bakımından en güçlü SE'nin olduğu ve DPPH serbest radikallerini giderme bakımından da en yüksek potansiyele sahip olanın EAE olduğu görülmüştür. Ayrıca, ekstrelerin standart antioksidan olarak kullanılan troloks'dan göreceli olarak daha güçlü olduğu belirlenmiştir.
4. Enzim aktivite testleri sonucunda *P. erzincanensis* bitkisinin tüm ekstrelerinin diyabetle ilişkili α-glikozidaz enzimi üzerinde standart ilaç akarboz dan daha düşük IC_{50} değerine sahip olduğunu, bu durumunda ekstrelerin α-glikozidaz enzimini çok daha güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Benzer şekilde, Alzheimer ile ilişkili AChE ve BChE enzimleri üzerinde ME ve SE'nin standart ilaç takrinden daha düşük IC_{50} değerlere sahip olarak ondan daha güçlü bir inhibisyon etkisine sahip oldukları görülmüştür.
5. *İn vitro* sitotoksisite testleri sonucunda, *P. erzincanensis* ekstrelerinin HeLa hücre hattı üzerinde doz bağımlı sitotoksik aktivite sergilerken HT-29 ve LnCap hücrelerine karşı düşük sitotoksisite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca ekstreler arasında HeLa hücreleri üzerinde en güçlü sitotoksik aktiviteye en düşük IC_{50} değeriyle ME'nin olduğu görülmüştür. Öte yandan, ekstrelerin hepsi 3T3-L1 sağlıklı hücre hattı üzerinde çok daha düşük sitotoksik aktivite sergilemişlerdir.
6. Flow sitometre ile HeLa hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen apoptozis testleri neticesinde ME'nin kontrol grubuna kıyasla kanser hücrelerini apoptoza yönlendiremediği görülmüştür. Bu durumunda ekstrenin kanser hücrelerini apoptozdan ziyade farklı bir kanser mekanizmasıyla ölüme sürüklediğini ortaya koymaktadır.

Referanslar

[1] WHO, prostate cancer, (2014).

[2] C. Eyüpoğlu, Korelasyon Temelli Özellik Seçimi, Genetik Arama ve Rastgele Ormanlar Tekniklerine Dayanan Yeni Bir Rahim Ağzı Kanseri Teşhis Yöntemi, Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi (19) (2020) 263-271.

[3] E.F.Ö. Pehlivanoğlu, H.B. Sarı, H. Balcıoğlu, İ. Ünlüoğlu, Aile hekimliği polikliniğine başvuran kadın hastaların Human Papilloma Virüs aşılaması ve serviks kanseri hakkında bilgi, tutum ve davranışlarının değerlendirilmesi, Ortadoğu Tıp Dergisi 11(4) (2019) 456-460.

[4] P. Bulzomi, P. Galluzzo, A. Bolli, S. Leone, F. Acconcia, M. Marino, The pro-apoptotic effect of quercetin in cancer cell lines requires ERβ-dependent signals, Journal of cellular physiology 227(5) (2012) 1891-1898.

[5] T. Bräuner, D.F. Hülser, Tumor cell invasion and gap junctional communication. 2, Normal and malignant cells confronted in multicell spheroids, (1990).

[6] Z. Xie, L. Wroblewska, L. Prochazka, R. Weiss, Y. Benenson, Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells, Science 333(6047) (2011) 1307-1311.

[7] M. Arjomandnejad, A. Muhammadnejad, M. Haddadi, N. Sherkat-Khameneh, S. Rismanchi, S. Amanpour, S. Muhammadnejad, HeLa cell line xenograft tumor as a suitable cervical cancer model: growth kinetic characterization and immunohistochemistry array, Archives of Iranian Medicine 17(4) (2014) 0-0.

[8] R.W. Ruddon, Cancer biology, Oxford University Press2007.

[9] S. Karabulut, M. Karabulut, D. Taştekin, Metastatik Kolon Kanseri Tedavisindeki Yenilikler, Journal of Istanbul Faculty of Medicine 84(3) (2021) 425-429.

[10] G.M. Cragg, D.J. Newman, Plants as a source of anti-cancer agents, Journal of ethnopharmacology 100(1-2) (2005) 72-79.

[11] H.-J.S. Huang, J.-K. Yee, J.-Y. Shew, P.-L. Chen, R. Bookstein, T. Friedmann, E.Y.-H. Lee, W.-H. Lee, Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells, Science 242(4885) (1988) 1563-1566.

[12] I. Satman, B. Omer, Y. Tutuncu, S. Kalaca, S. Gedik, N. Dinccag, K. Karsidag, S. Genc, A. Telci, B. Canbaz, Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults, European journal of epidemiology 28 (2013) 169-180.

[13] G. Coşansu, Diyabet: Küresel bir salgın hastalık, Okmeydanı Tıp Dergisi 31 (2015) 1-6.

[14] W.-P. You, M. Henneberg, Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth, BMJ open diabetes research

care 4(1) (2016) e000161.

[15] P. Taslimi, H.E. Aslan, Y. Demir, N. Oztaskin, A. Maraş, İ. Gulçin, S. Beydemir, S. Goksu, Diarylmethanon, bromophenol and diarylmethane compounds: Discovery of potent aldose reductase, α-amylase and α-glycosidase inhibitors as new therapeutic approach in diabetes and functional hyperglycemia, International journal of biological macromolecules 119 (2018) 857-863.

[16] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, Diabetes care 27(5) (2004) 1047-1053.

[17] W.H. Organization, 'WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all'. (2020.).

[18] A. Berkowitz, Lange clinical neurology and neuroanatomy: a localization-based approach, McGraw-Hill Education2016.

[19] J. Laurén, D.A. Gimbel, H.B. Nygaard, J.W. Gilbert, S.M. Strittmatter, Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-β oligomers, Nature 457(7233) (2009) 1128-1132.

[20] M. Hashimoto, E. Rockenstein, L. Crews, E. Masliah, Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, Neuromolecular medicine 4 (2003) 21-35.

[21] C. Priller, T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H.A. Kretzschmar, J. Herms, Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein, Journal of Neuroscience 26(27) (2006) 7212-7221.

[22] N. Hooper, Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein, Biochemical Society Transactions 33(2) (2005) 335-338.

[23] P. Taslimi, A. Sujayev, E. Garibov, N. Nazarov, Z. Huyut, S.H. Alwasel, İ. Gulçin, Synthesis of new cyclic thioureas and evaluation of their metal-chelating activity, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase inhibition profiles, Journal of biochemical

molecular toxicology 31(7) (2017) e21897.

[24] N. Öztaskın, P. Taslimi, A. Maraş, İ. Gülcin, S. Göksu, Novel antioxidant bromophenols with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions, Bioorganic chemistry 74 (2017) 104-114.

[25] M. Rezai, C. Bayrak, P. Taslimi, İ. Gülçin, A. Menzek, The first synthesis and antioxidant and anticholinergic activities of 1-(4, 5-dihydroxybenzyl) pyrrolidin-2-one derivative bromophenols including natural products, Turkish journal of chemistry 42(3) (2018) 808-825.

[26] M. Tanker, N. Tanker, Farmakognozi cilt 1, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2003.

[27] H. Malyer, A new record for the Flora of Turkey, Turkish Journal of Botany 20(5) (1996) 473-477.

[28] J.S. Matejić, A.M. Džamić, T. Mihajilov-Krstev, V.N. Ranđelović, Z.Đ. Krivošej, P.D. Marin, Antimicrobial potential of essential oil from Pastinaca sativa L, Biologica Nyssana 5(1) (2014) 31-35.

[29] N. Harper, S. Orpin, A. Mehta, The root cause of a blistering eruption, Archives of disease in childhood 100(1) (2015) 72-72.

[30] A.S. Atyabi, F. Nejatbakhsh, H.M. Kenari, F. Eghbalian, M.H. Ayati, L. Shirbeigi, Persian medicine non-pharmacological therapies for headache: phlebotomy and wet cupping, Journal of Traditional Chinese Medicine 38(3) (2018) 457-464.

[31] H.M. Kenari, G. Kordafshari, M. Moghimi, F. Eghbalian, D. TaherKhani, Review of pharmacological properties and chemical constituents of Pastinaca sativa, Journal of pharmacopuncture 24(1) (2021) 14.

[32] S. Mahdizadeh, M.K. Ghadiri, A. Gorji, Avicenna's Canon of Medicine: a review of analgesics and anti-inflammatory substances, Avicenna journal of phytomedicine 5(3) (2015) 182.

[33] A. Altay, E. Yeniceri, P. Taslimi, T. Taskin-Tok, M.A. Yilmaz, E. Koksal, LC-MS/MS analysis and diverse biological activities of Hypericum scabrum L.: In vitro and in silico research, South African Journal of Botany 150 (2022) 940-955.

[34] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr, R.M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochemical pharmacology 7(2) (1961) 88-95.

[35] K. Zeng, K.E. Thompson, C.R. Yates, D.D. Miller, Synthesis and biological evaluation of quinic acid derivatives as anti-inflammatory agents, Bioorganic & medicinal chemistry letters 19(18) (2009) 5458-5460.

[36] T.M. Hung, M. Na, P.T. Thuong, N.D. Su, D. Sok, K.S. Song, Y.H. Seong, K. Bae, Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of Dipsacus asper Wall, Journal of ethnopharmacology 108(2) (2006) 188-192.

[37] G.-F. Wang, L.-P. Shi, Y.-D. Ren, Q.-F. Liu, H.-F. Liu, R.-J. Zhang, Z. Li, F.-H. Zhu, P.-L. He, W. Tang, Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro, Antiviral research 83(2) (2009) 186-190.

[38] M.-Y. Choi, H.-J.J.K.J.o.P.R. Park, Antinocicepetive effects of 3, 4-Dicaffeoyl Quinic acid of Ligularia fischeri var. spiciformis, 20(3) (2007) 221-225.

[39] M.-Y. Choi, H.-J. Park, Antinocicepetive effects of 3, 4-Dicaffeoyl Quinic acid of Ligularia fischeri var. spiciformis, Korean Journal of Plant Resources 20(3) (2007) 221-225.

[40] A. Arya, M.M.J. Al-Obaidi, N. Shahid, M.I.B. Noordin, C.Y. Looi, W.F. Wong, S.L. Khaing, M.R. Mustafa, Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ-induced diabetic rats: a mechanistic study, Food and Chemical Toxicology 71 (2014) 183-196.

[41] K.L. Ooi, T.S.T. Muhammad, M.L. Tan, S.F. Sulaiman, Cytotoxic, apoptotic and anti-α-glucosidase activities of 3, 4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of Elephantopus mollis Kunth, Journal of ethnopharmacology 135(3) (2011) 685-695.

[42] F. Guo, M. Wu, Z. Dai, S. Zhang, W. Zhang, W. Dong, J. Zhou, M. Jiang, F. Xin, Current advances on biological production of fumaric acid, Biochemical Engineering Journal 153 (2020) 107397.

[43] C.H. Kim, J.-E. Kim, Y.-J. Song, Antiviral activities of quercetin and isoquercitrin against human herpesviruses, Molecules 25(10) (2020) 2379.

[44] A.G. Junior, F.M. Gasparotto, E.L.B. Lourenço, S. Crestani, M.E.A. Stefanello, M.J. Salvador, J.E. da Silva-Santos, M.C.A. Marques, C.A.L. Kassuya, Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from Tropaeolum majus L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme, Journal of ethnopharmacology 134(2) (2011) 363-372.

[45] A. Hunyadi, A. Martins, T.-J. Hsieh, A. Seres, I. Zupkó, Chlorogenic acid and rutin play a major role in the in vivo anti-diabetic activity of Morus alba leaf extract on type II diabetic rats, PloS one 7(11) (2012) e50619.

[46] Ż. Arciszewska, S. Gama, M. Kalinowska, G. Świderski, R. Świsłocka, E. Gołębiewska, M. Naumowicz, M. Worobiczuk, A. Cudowski, A. Pietryczuk, Caffeic Acid/Eu (III) complexes: Solution equilibrium studies, structure characterization and biological activity, International Journal of Molecular Sciences 23(2) (2022) 888.

[47] L.A. Abdulkhaleq, M.A. Assi, M.H.M. Noor, R. Abdullah, M.Z. Saad, Y.H. Taufiq-Yap, Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer, Veterinary world 10(8) (2017) 869.

[48] J.W. Byun, S. Hwang, C.W. Kang, J.H. Kim, M.K. Chae, J.S. Yoon, E.J. Lee, Therapeutic effect of protocatechuic aldehyde in an in vitro model of Graves' orbitopathy, Investigative Ophthalmology & Visual Science 57(10) (2016) 4055-4062.

[49] A.A. Zanwar, S.L. Badole, P.S. Shende, M.V. Hegde, S.L. Bodhankar, Cardiovascular effects of hesperidin: A flavanone glycoside, Polyphenols in human health and disease, Elsevier2014, pp. 989-992.

[50] H.A. Al-Ashaal, S.T. El-Sheltawy, Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines, Pharmaceutical biology 49(3) (2011) 276-282.

[51] H. Park, M.-J. Kim, E. Ha, J.-H. Chung, Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4, Phytomedicine 15(1-2) (2008) 147-151.

[52] A. Hermawan, E. Meiyanto, R.A. Susidarti, Hesperidin increase cytotoxic effect of doxorubicin in MCF-7 cells, Indonesian Journal of Pharmacy 21(1) (2010) 8-16.

[53] S. Ahmed, A.J. Al-Rehaily, P. Alam, A.S. Alqahtani, S. Hidayatullah, M.T. Rehman, R.A. Mothana, S.S. Abbas, M. Khan, J.M. Khalid, Antidiabetic, antioxidant, molecular docking and HPTLC analysis of miquelianin isolated from Euphorbia schimperi C. Presl, Saudi Pharmaceutical Journal 27(5) (2019) 655-663.

[54] M.C. Santos, K.D. Soares, B.M. Beltrame, S.A. Bordignon, M.A. Apel, A.S. Mendez, A.T. Henriques, Cuphea spp.: antichemotactic study for a potential anti-inflammatory drug, Natural Product Research 35(24) (2021) 6058-6061.

[55] W. Piang-Siong, P. de Caro, A. Marvilliers, X. Chasseray, B. Payet, A.S.C. Sing, B. Illien, Contribution of trans-aconitic acid to DPPH scavenging ability in different media, Food Chemistry 214 (2017) 447-452.

[56] D.P. de Oliveira, T. do Valle Moreira, N.V. Batista, J.D. de Souza Filho, F.A. Amaral, M.M. Teixeira, R.M. de Padua, F.C. Braga, Esterification of trans-aconitic acid improves its anti-inflammatory activity in LPS-induced acute arthritis, Biomedicine & Pharmacotherapy 99 (2018) 87-95.

[57] A. Riaz, A. Rasul, G. Hussain, M.K. Zahoor, F. Jabeen, Z. Subhani, T. Younis, M. Ali, I. Sarfraz, Z. Selamoglu, Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities, Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences 2018(1) (2018) 9794625.

[58] K. Pei, J. Ou, J. Huang, S. Ou, p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities, Journal of the Science of Food and Agriculture 96(9) (2016) 2952-2962.

[59] P. Rattanachaikunsopon, P. Phumkhachorn, extracted from leaves of Psidium guajava, Journal of Medicinal Plants Research 4(5) (2010) 393-396.

[60] M.A. Yilmaz, Simultaneous quantitative screening of 53 phytochemicals in 33 species of medicinal and aromatic plants: A detailed, robust and comprehensive LC–MS/MS method validation, Industrial Crops and Products 149 (2020) 112347.

[61] J. Zhao, S. Zhang, S. You, T. Liu, F. Xu, T. Ji, Z. Gu, Hepatoprotective effects of nicotiflorin from nymphaea candida against concanavalin a-induced and d-galactosamine-induced liver injury in mice, International Journal of Molecular Sciences 18(3) (2017) 587.

[62] S. Gorinstein, Z. Zachwieja, E. Katrich, E. Pawelzik, R. Haruenkit, S. Trakhtenberg, O. Martin-Belloso, Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid, LWT-Food Science and Technology 37(3) (2004) 337-343.

[63] C.-L. Hsu, S.-L. Huang, G.-C. Yen, Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity, Journal of agricultural and food chemistry 54(12) (2006) 4191-4197.

[64] T. Kanno, B. Huettel, M.F. Mette, W. Aufsatz, E. Jaligot, L. Daxinger, D.P. Kreil, M. Matzke, A.J. Matzke, Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation, Nature genetics 37(7) (2005) 761-765.

[65] T. Karadoğan, B. Tosun, A. Şanlı, Determination of Essential Oil Content and Composition, Total Phenolic Content and Antioxidant Activities of Pastinaca sativa L. subsp urens (Req. Ex Gordon), Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants 2 (2019).

[66] C. Düşgün, T. Kankılıç, C. İşlek, D.F. Balı, Ö. Kankılıç, Antioxidant and Cytotoxic Potential of Local Endemic Plant Pastinaca zozimoides Fenzl, Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology 9(4) (2021) 646-649.

[67] T.T. Nguyen, S. Yoon, Y. Yang, H.-B. Lee, S. Oh, M.-H. Jeong, J.-J. Kim, S.-T. Yee, F. Crişan, C. Moon, Lichen secondary metabolites in Flavocetraria cucullata exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials, PloS one 9(10) (2014) e111575.

[68] H. Madari, R.S. Jacobs, An analysis of cytotoxic botanical formulations used in the traditional medicine of ancient Persia as abortifacients, Journal of natural products 67(8) (2004) 1204-1210.

[69] Y. Shi, Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis, Molecular cell 9(3) (2002) 459-470.

[70] B. Harurluoglu, A. Altay, S. Caglar, E.K.K. Yeniceri, B. Caglar, Z.S. Şahin, Binuclear silver (I) complexes with the non-steroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid: Synthesis, characterization, cytotoxic activity and evaluation of cellular mechanism of action, Polyhedron 202 (2021) 115189.

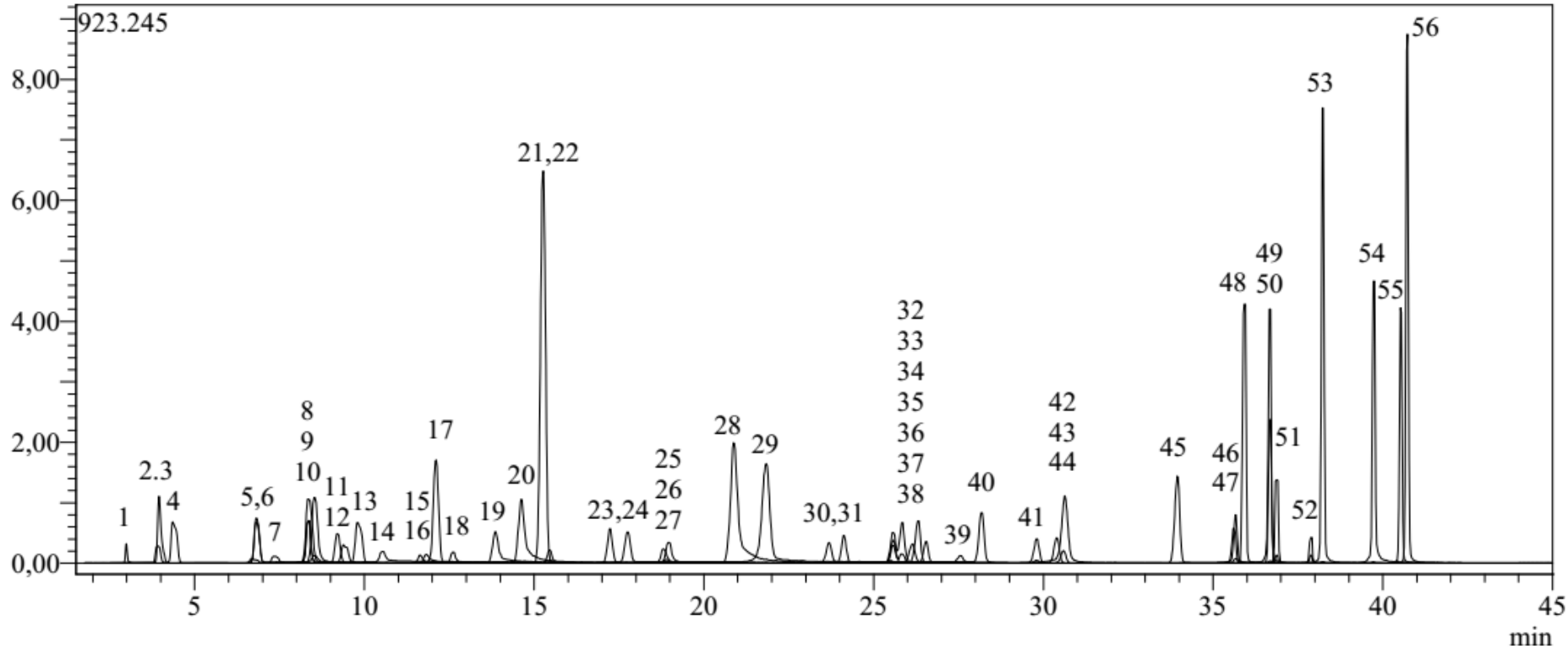
[71] C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P. Puig, C. Didelot, G. Kroemer, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, Cell Death & Differentiation 13(9) (2006) 1423-1433.

EKLER

Kütle spektrometresi ve kromatograf koşulları

53 fitokimyasalın kantitatif değerlendirmesini gerçekleştirmek için bir tandem kütle spektrometresi ile birleştirilmiş bir Shimadzu-Nexera modeli ultra yüksek performanslı sıvı kromatografı (UHPLC) kullanıldı. Ters fazlı UHPLC, bir otomatik numune alıcı (SIL-30AC modeli), bir kolon fırını (CTO-10ASvp modeli), ikili pompalar (LC-30AD modeli) ve bir gaz giderici (DGU-20A3R modeli) ile donatıldı. 53 fitokimyasal için optimum ayırma elde etmek ve baskılama etkilerinin üstesinden gelmek için kromatografik koşullar optimize edildi. Agilent Poroshell 120 EC-C18 modeli (150 mm×2.1 mm, 2,7 µm) ve RP-C18 Inertsil ODS-4 (100 mm×2,1 mm, 2µm) gibi farklı kolonlar, asetonitril gibi farklı mobil fazlar (B) ve metanol, amonyum format, formik asit, amonyum asetat, asetik asit gibi farklı mobil faz katkı maddeleri ile 25°C, 30°C, 35°C ve 40°C gibi farklı kolon sıcaklıkları denenmiş ve optimum koşullara kadar uygulandı. Sonuç olarak, kromatografik ayırma ters fazlı Agilent Poroshell 120 EC-C18 modeli (150 mm x 2.1 mm, 2.7 µm) analitik kolonu üzerinde gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C'ye ayarlandı. Elüsyon gradyanı, elüent A (su + 5 mM amonyum format + %0.1 formik asit) ve eluent B'den (metanol+ 5 mM amonyum format + %0.1 formik asit) oluşuyordu. Kullanılan gradyan elüsyon profili: %20-100 B (0-25 dakika), %100 B (25-35 dakika), %20 B (35-45 dakika). Ayrıca solvent akış hızı ve enjeksiyon hacmi sırasıyla 0,5 mL/dk ve 5 µL olarak belirlendi.

Kütle spektrometrik tespiti, hem negatif hem de pozitif iyonizasyon modlarında çalışan bir elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı ile donatılmış bir Shimadzu LCMS-8040 model tandem kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. LC-ESI-MS/MS verileri LabSolutions yazılımı (Shimadzu) tarafından alındı ve işlendi. Fitokimyasalların miktar tayini için MRM (çoklu reaksiyon izleme) modu kullanıldı. MRM metot, belirtilen öncü fitokimyasaldan parçaya iyon geçişlerinin taranmasına dayalı olarak fitokimyasal bileşikleri seçici olarak saptamak ve ölçmek için optimize edilmiştir. Çarpışma enerjileri (CE), istenen ürün iyonlarının optimal fotokimyasal parçalanmasını ve maksimum iletimini oluşturmak için optimize edildi. MS çalışma koşulları şu şekilde uygulandı: kurutma gazı (N2) akışı, 15 L/dak; nebulize edici gaz (N2) akışı, 3 L/dak; DL sıcaklığı, 250°C; ısı bloğu sıcaklığı, 400°C ve arayüz sıcaklığı, 350°C.



Şekil S1. LC–MS/MS ile standart fenolik bileşiklerin toplam iyon kromatogramı.
1: Kinik asit, 2: Fumarik asit, 3: Akonitik asit, 4: Gallik asit, 5: Epigallokateşin, 6: Protokateşik asit, 7: Kateşin, 8: Gentisik asit, 9: Klorojenik asit, 10: Protokateşik aldehit, 11: Tannik asit, 12: Epigallokateşin gallat, 13: 1,5-dikaffeoilkinik asit, 14: 4-OH Benzoik asit, 15: Epikateşin, 16: Vanilik asit, 17: Kafeik asit, 18: Siringik asit, 19: Vanilin, 20: Siringik aldehit, 21: Daidzin, 22: Epikateşin gallat, 23: Piceid, 24: p-Kumarik asit, 25: Ferulik asit D3, 26: Ferulik asit, 27: Sinapik asit, 28: Kumarin, 29: Salisilik asit, 30: Cynaroside, 31: Miquelianin, 32: Rutin, 33: Rutin D3, 34: Isoquercitrin, 35: Hesperidin, 36: p-Coumarik asit, 37: Genistin, 38: Rosmarinic asit, 39: Ellagik asit, 40: Cosmosiin, 41: Quercetin, 42: Astragalin, 43: Nicotiflorin, 44: Fisetin, 45: Daidzein, 46: Quercetin D3, 47: Quercetin, 48: Naringenin, 49: Hesperetin, 50: Luteolin, 51: Genistein, 52: Kaempferol, 53: Apigenin , 54: Amentoflavon, 55: Chrysin, 56: Acacetin.

Tablo S1. LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri

No	Analitler	RT[a]	M.I. (m/z)[b]	F.I. (m/z)[c]	Iyon. mode	Denklem	r^2[d]	*RSD*%[e]		Doğrusallık Aralığı (mg/L)	*LOD*/*LOQ* (µg/L)[f]	Recovery (%)		*U*[g]	Gr. No[i]
								Interday	Intraday			Interday	Intraday		
1	Quinic acid	3.0	190.8	93.0	Neg	*y*=-0.0129989+2.97989×	0.996	0.69	0.51	0.1-5	25.7/33.3	1.0011	1.0083	0.0372	1
2	Fumaric aid	3.9	115.2	40.9	Neg	*y*=-0.0817862+1.03467×	0.995	1.05	1.02	1-50	135.7/167.9	0.9963	1.0016	0.0091	1
3	Aconitic acid	4.0	172.8	129.0	Neg	*y*=-0.7014530+32.9994×	0.971	2.07	0.93	0.1-5	16.4/31.4	0.9968	1.0068	0.0247	1
4	Gallic acid	4.4	168.8	79.0	Neg	*y*=0.0547697+20.8152×	0.999	1.60	0.81	0.1-5	13.2/17.0	1.0010	0.9947	0.0112	1
5	Epigallocatechin	6.7	304.8	219.0	Neg	*y*=-0.00494986+0.0483704×	0.998	1.22	0.73	1-50	237.5/265.9	0.9969	1.0040	0.0184	3
6	Protocatechuic acid	6.8	152.8	108.0	Neg	*y*=0.211373+12.8622×	0.957	1.43	0.76	0.1-5	21.9/38.6	0.9972	1.0055	0.0350	1
7	Catechin	7.4	288.8	203.1	Neg	*y*=-0.00370053+0.431369×	0.999	2.14	1.08	0.2-10	55.0/78.0	1.0024	1.0045	0.0221	3
8	Gentisic acid	8.3	152.8	109.0	Neg	*y*=-0.0238983+12.1494×	0.997	1.81	1.22	0.1-5	18.5/28.2	0.9963	1.0077	0.0167	1
9	Chlorogenic acid	8.4	353.0	85.0	Neg	*y*=0.289983+36.3926×	0.995	2.15	1.52	0.1-5	13.1/17.6	1.0000	1.0023	0.0213	1
10	Protocatechuic aldehyde	8.5	137.2	92.0	Neg	*y*=0.257085+25.4657×	0.996	2.08	0.57	0.1-5	15.4/22.2	1.0002	0.9988	0.0396	1
11	Tannic acid	9.2	182.8	78.0	Neg	*y*=0.0126307+26.9263×	0.999	2.40	1.16	0.05-2.5	15.3/22.7	0.9970	0.9950	0.0190	1
12	Epigallocatechin gallate	9.4	457.0	305.1	Neg	*y*=-0.0380744+1.61233×	0.999	1.30	0.63	0.2-10	61.0/86.0	0.9981	1.0079	0.0147	3
13	1,5-dicaffeoylquinic acid	9.8	515.0	191.0	Neg	*y*=-0.0164044+16.6535×	0.999	2.42	1.48	0.1-5	5.8/9.4	0.9983	0.9997	0.0306	1
14	4-OH Benzoic acid	10.5	137,2	65.0	Neg	*y*=-0.0240747+5.06492×	0.999	1.24	0.97	0.2-10	68.4/88.1	1.0032	1.0068	0.0237	1
15	Epicatechin	11.6	289.0	203.0	Neg	*y*=-0.0172078+0.0833424×	0.996	1.47	0.62	1-50	139.6/161.6	1.0013	1.0012	0.0221	3
16	Vanilic acid	11.8	166.8	108.0	Neg	*y*=-0.0480183+0.779564×	0.999	1.92	0.76	1-50	141.9/164.9	1.0022	0.9998	0.0145	1
17	Caffeic acid	12.1	179.0	134.0	Neg	*y*=0.120319+95.4610×	0.999	1.11	1.25	0.05-2.5	7.7/9.5	1.0015	1.0042	0.0152	1
18	Syringic acid	12.6	196.8	166.9	Neg	*y*=-0.0458599+0.663948×	0.998	1.18	1.09	1-50	82.3/104.5	1.0006	1.0072	0.0129	1
19	Vanillin	13.9	153.1	125.0	Poz	*y*=0.00185898+20.7382×	0.996	1.10	0.85	0.1-5	24.5/30.4	1.0009	0.9967	0.0122	1
20	Syringic aldehyde	14.6	181.0	151.1	Neg	*y*=-0.0128684+7.90153×	0.999	2.51	0.77	0.4-20	19.7/28.0	1.0001	0.9964	0.0215	1
21	Daidzin	15.2	417.1	199.0	Poz	*y*=9.45747+152.338×	0.996	2.25	1.32	0.05-2.5	7.0/9.5	0.9955	1.0017	0.0202	2
22	Epicatechin gallate	15.5	441.0	289.0	Neg	*y*=-0.0142216+1.06768×	0.997	1.63	1.28	0.1-5	19.5/28.5	0.9984	0.9946	0.0229	3
23	Piceid	17.2	391.0	135/106.9	Poz	*y*=0.00772525+25.4181×	0.999	1.94	1.16	0.05-2.5	13.8/17.8	1.0042	0.9979	0.0199	1
24	*p*-Coumaric acid	17.8	163.0	93.0	Neg	*y*=0.0249034+18.5180×	0.999	1.92	1.43	0.1-5	25.9/34.9	1.0049	1.0001	0.0194	1
25	Ferulic acid-D3-IS[h]	18.8	196.2	152.1	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	0.0170	1
26	Ferulic acid	18.8	192.8	149.0	Neg	*y*=-0.0735254+1.34476×	0.999	1.44	0.53	1-50	11.8/15.6	0.9951	0.9976	0.0181	1
27	Sinapic acid	18.9	222.8	193.0	Neg	*y*=-0.0929932+0.836324×	0.999	1.45	0.52	0.2-10	65.2/82.3	1.0031	1.0037	0.0317	1
28	Coumarin	20.9	146.9	103.1	Poz	*y*=0.0633397+136.508×	0.999	2.11	1.54	0.05-2.5	214.2/247.3	0.9950	0.9958	0.0383	1

[a]R.T.: saklama süresi, [b]MI (*m/z):* Standart analitlerin moleküler iyonları (m/z ratio), [c]FI (*m/z):* Fragment iyonlar [d]r^2: Determinasyon katsayısı, [e]*RSD*: Bağıl standart sapma, [f]*LOD*/*LOQ* (µg/L): Tespit/nicelendirme sınırı, [g]*U* (%): yüzde bağıl belirsizlik at 95% güven seviyesi (*k* = 2), [h]IS: Dahili standart, [i]Gr. No: Dahili standartların gruplandırılmasını temsil eder, bu sayılar hangi IS'nin hangi fenolik bileşiği temsil ettiğini gösterir.

Tablo S2. LC-MS/MS yöntemine ait analitik yöntem doğrulama parametreleri (Devamı)

No	Analytes	RT[a]	M.I. (m/z)[b]	F.I. (m/z)[c]	Ion. mode	Equation	r^2[d]	*RSD*%[e]		Linearity Range (mg/L)	*LOD*/*LOQ* (µg/L)[f]	Recovery (%)		*U*[g]	Gr. No
								Interday	Intraday			Interday	Intraday		
29	Salicylic acid	21.8	137.2	65.0	Neg	*y*=0.239287+153.659×	0.999	1.48	1.18	0.05-2.5	6.0/8.3	0.9950	0.9998	0.0158	1
30	Cynaroside	23.7	447.0	284.0	Neg	*y*=0.280246+6.13360×	0.997	1.56	1.12	0.05-2.5	12.1/16.0	1.0072	1.0002	0.0366	2
31	Miquelianin	24.1	477.0	150.9	Neg	*y*=-0.00991585+5.50334×	0.999	1.31	0.95	0.1-5	10.6/14.7	0.9934	0.9965	0.0220	2
32	Rutin-D3-IS[h]	25.5	612.2	304.1	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	2
33	Rutin	25.6	608.9	301.0	Neg	*y*=-0.0771907+2.89868×	0.999	1.38	1.09	0.1-5	15.7/22.7	0.9977	1.0033	0.0247	2
34	isoquercitrin	25.6	463.0	271.0	Neg	*y*=-0.111120+4.10546×	0.998	2.13	0.78	0.1-5	8.7/13.5	1.0057	0.9963	0.0220	2
35	Hesperidin	25.8	611.2	449.0	Poz	*y*=0.139055+13.2785×	0.999	1.84	1.35	0.1-5	19.0/26.0	0.9967	1.0043	0.0335	2
36	*o*-Coumaric acid	26.1	162.8	93.0	Neg	*y*=0.00837193+11.2147×	0.999	2.11	1.46	0.1-5	31.8/40.4	1.0044	0.9986	0.0147	1
37	Genistin	26.3	431.0	239.0	Neg	*y*=1.65808+7.57459×	0.991	2.01	1.28	0.1-5	14.9/21.7	1.0062	1.0047	0.0083	2
38	Rosmarinic acid	26.6	359.0	197.0	Neg	*y*=-0.0117238+8.04377×	0.999	1.24	0.86	0.1-5	16.2/21.2	1.0056	1.0002	0.0130	1
39	Ellagic acid	27.6	301.0	284.0	Neg	*y*=0.00877034+0.663741×	0.999	1.57	1.23	0.4-20	56.9/71.0	1.0005	1.0048	0.0364	1
40	Cosmosiin	28.2	431.0	269.0	Neg	*y*=-0.708662+8.62498×	0.998	1.65	1.30	0.1-5	6.3/9.2	0.9940	0.9973	0.0083	2
41	Quercitrin	29.8	447.0	301.0	Neg	*y*=-0.00153274+3.20368×	0.999	2.24	1.16	0.1-5	4.8/6.4	0.9960	0.9978	0.0268	2
42	Astragalin	30.4	447.0	255.0	Neg	*y*=0.00825333+3.51189×	0.999	2.08	1.72	0.1-5	6.6/8.2	0.9968	0.9957	0.0114	2
43	Nicotiflorin	30.6	592.9	255.0/284.0	Neg	*y*=0.00499333+2.62351×	0.999	1.48	1.23	0.05-2.5	11.9/16.7	0.9954	1.0044	0.0108	2
44	Fisetin	30.6	285.0	163.0	Neg	*y*=0.0365705+8.09472×	0.999	1.75	1.19	0.1-5	10.1/12.7	0.9980	1.0042	0.0231	3
45	Daidzein	34.0	253.0	223.0	Neg	*y*=-0.0329252+6.23004×	0.999	2.18	1.73	0.1-5	9.8/11.6	0.9926	0.9963	0.0370	3
46	Quercetin-D3-IS[h]	35.6	304.0	275.9	Neg	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	3
47	Quercetin	35.7	301.0	272.9	Neg	*y*=+0.00597342+3.39417×	0.999	1.89	1.38	0.1-5	15.5/19.0	0.9967	0.9971	0.0175	3
48	Naringenin	35.9	270.9	119.0	Neg	*y*=-0.00393403+14.6424×	0.999	2.34	1.69	0.1-5	2.6/3.9	1.0062	1.0020	0.0392	3
49	Hesperetin	36.7	301.0	136.0/286.0	Neg	*y*=+0.0442350+6.07160×	0.999	2.47	2.13	0.1-5	7.1/9.1	0.9998	0.9963	0.0321	3
50	Luteolin	36.7	284.8	151.0/175.0	Neg	*y*=-0.0541723+30.7422×	0.999	1.67	1.28	0.05-2.5	2.6/4.1	0.9952	1.0029	0.0313	3
51	Genistein	36.9	269.0	135.0	Neg	*y*=-0.00507501+12.1933×	0.999	1.48	1.19	0.05-2.5	3.7/5.3	1.0069	1.0012	0.0337	3
52	Kaempferol	37.9	285.0	239.0	Neg	*y*=-0.00459557+3.13754×	0.999	1.49	1.26	0.05-2.5	10.2/15.4	0.9992	0.9990	0.0212	3
53	Apigenin	38.2	268.8	151.0/149.0	Neg	*y*=0.119018+34.8730×	0.998	1.17	0.96	0.05-2.5	1.3/2.0	0.9985	1.0003	0.0178	3
54	Amentoflavone	39.7	537.0	417.0	Neg	*y*=0.727280+33.3658×	0.992	1.35	1.12	0.05-2.5	2.8/5.1	0.9991	1.0044	0.0340	3
55	Chrysin	40.5	252.8	145.0/119.0	Neg	*y*=-0.0777300+18.8873×	0.999	1.46	1.21	0.05-2.5	1.5/2.8	0.9922	1.0050	0.0323	3
56	Acacetin	40.7	283.0	239.0	Neg	*y*=-0.559818+163.062×	0.997	1.67	1.28	0.02-1	1.5/2.5	0.9949	1.0011	0.0363	3

[a]R.T.: saklama süresi, [b]MI (*m/z):* Standart analitlerin moleküler iyonları (m/z ratio), [c]FI (*m/z):* Fragment iyonlar [d]r^2: Determinasyon katsayısı, [e]*RSD*: Bağıl standart sapma, [f]*LOD*/*LOQ* (µg/L): Tespit/nicelendirme sınırı, [g]*U* (%): yüzde bağıl belirsizlik at 95% güven seviyesi (*k* = 2), [h]IS: Dahili standart, [i]Gr. No: Dahili standartların gruplandırılmasını temsil eder, bu sayılar hangi IS'nin hangi fenolik bileşiği temsil ettiğini gösterir.