T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tanacetum alyssifolium BİTKİSİNİN SU EKSTRESİNDEN AKTİF BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Taha BAYRAKTAR

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

KİMYA
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2019
Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında, Taha BAYRAKTAR tarafından hazırlanan bu çalışma 05/09/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği/~~oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN	İmza:
Üye	: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL	İmza:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY	İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun 11 / 09 / 2019 tarih ve 37/9 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa Fatih ERTUGAY
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

"*Tanacetum alyssifolium* Bitkisinin Su Ekstresinden Aktif Bileşiklerin İzolasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi" isimli "Yüksek Lisans" tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.05/09/2019

Taha BAYRAKTAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tanacetum alyssifolium BİTKİSİNİN SU EKSTRESİNDEN AKTİF BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Taha BAYRAKTAR

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

Bu çalışma, Asteraceae familyasının bir üyesi olan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin su ekstresinde mevcut olan sekonder metabolitlerin kromatografik yöntemle (kolon kromatografisi) izolasyonu, izole edilen bileşiklerin spektroskopik metotlarla yapılarının belirlenmesi, antikanserojen etkisi ve antioksidan aktivitesinin incelenmesi amacı ile yapılmıştır. Bu amaçla, *Tanacetum alyssifolium* bitkisi toplanıp gün ışığı görmeyecek şekilde oda şartlarında kurutuldu. Bitki n-bütanol, etil asetat, ve su fazı olmak üzere üç farklı çözücü ile hazırlanarak su ekstraktına kolon kromatagrafisi uygulandı. Su ekstraktından iki bileşik izole edilerek bu bileşiklerin yapısı spektroskopik metotlarla (1D-NMR ve 2D-NMR) aydınlatıldı. İzole edilen bileşiklerin 1D-NMR ve 2D-NMR sonuçlarına göre yapılarının Rutin ve İzofraksetin olduğu belirlendi. Antioksidan aktiviteleri $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ serbest radikallerini giderme ve metal iyonlarını şelatlama metotları kullanılarak belirlendi. Standart antioksidan olarak troloks ve EDTA kullanıldı. Antiproliferatif aktiviteleri ise MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatları üzerinde anti-kanser ilaç olarak kullanılan Karboplatin ile on farklı dozda karşılaştırılarak incelendi. Sonuç olarak her iki bileşikte antioksidan aktivite göstermiş olup, standart olarak kullanılan yapılara göre daha az, antiproliferatif aktivite ise sadece İzofraksetin bileşiğinde tespit edilmiş olup, aktivite değerleri standarttan daha düşük bulunmuştur.

2019, 86 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antiproliferatif aktivite, antioksidan aktivite, izolasyon, sekonder metabolit, *tanacetum alyssifolium*.

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM WATER EXTRACT OF *Tanacetum alyssifolium* PLANT AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES

Taha BAYRAKTAR

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL

The aim of this study was to isolate the secondary metabolites present in the water extract of *Tanacetum alyssifolium* which is a member of Asteraceae family by chromatographic method (column chromatography), to determine the structure of the isolated compounds by spectroscopic methods, to investigate the anticarcinogenic effect and antioxidant activity. For this purpose, the *Tanacetum alyssifolium* plant was collected and dried under room conditions to avoid daylight. The plant was prepared with three different solvents: n-butanol, ethyl acetate, and water phase and the column was subjected to column chromatography. Two compounds were isolated from the water extract and their structure was determined by spectroscopic methods (1D-NMR and 2D-NMR). According to 1D-NMR and 2D-NMR results of the isolated compounds, it was determined that their structures were Routine and Isofracsetine. Antioxidant activities were determined using $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ free radical scavenging and chelating metal ions. Trolox and EDTA were used as standard antioxidants. Its antiproliferative activities are in ten different doses with Carboplatin, which is used as an anti-cancer drug on MCF-7 and MDA-MB-453 cell lines and examined. As a result, both compounds showed antioxidant activity, less than the standard structures, and antiproliferative activity was detected only in the compound of Isofracsetin, activity values were lower than the standard.

2019, 86 pages

Keywords: Antiproliferative activity, antioxidant activity, isolation, secondary metabolite, *tanacetum alyssifolium.*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi, deneyim ve desteğini eksik etmeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bilgi, tecrübe ve manevi destekleriyle yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT'e, Öğr. Gör. Samed ŞİMŞEK'e, Araştırma Görevlisi Yakup ULUTAŞ'a,

Antikanser çalışmalarındaki bilgi, deneyim ve yardımlarından dolayı hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet ALTAY'a ve arkadaşım Abdullah Alpkan'a,

Bu süreçte benden maddi, manevi yardımlarını eksik etmeyen ve her zaman yanımda olan çok değerli ve kıymetli aileme,

Son olarak motivasyon kaynağım, yol arkadaşım, canım eşime,

En içten şükranlarımı sunarım…

Taha BAYRAKTAR
Eylül, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER LİSTESİ vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
SİMGELER VE KISALTMALAR ix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 4
2.1. Botanik Bilgiler 4
2.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası 4
2.1.2. Tanacetum cinsi 5
2.2. Sekonder Metabolitler 7
2.2.1. Flavonoidler 9
2.2.1.1. Flavonoidlerin doğada bulunuşu ve kullanım alanları 11
2.2.1.2. Flavonoidlerin tanınmaları 13
2.2.2. Glikozitlerin genel özellikleri 17
2.2.2.1. Glikozitlerin sınıflandırılması 19
2.3. Antikanserojen Aktivite 26
2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar 28
3. MATERYAL ve YÖNTEM 35
3.1. Materyal 35
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler 35
3.1.2. Kullanılan malzeme, alet ve cihazlar 36
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması 37
3.1.3.1. DPPH• serbest radikal giderme 37
3.1.3.2. ABTS•+ serbest radikal giderme 37
3.1.3.3. Metal şelatlama kapasitesi 37
3.1.3.4. İTK'da kullanılan belirteç çözeltisinin hazırlanması 37
3.1.3.5. Tripsin EDTA çözeltisinin hazırlanması 37
3.2. Yöntem 38
3.2.1. *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toplanması ve kurutulması 38

3.2.2. *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin ekstraksiyonu ve su ekstresinin hazırlanması....38
3.2.3. Kromatografik yöntemler....40
3.2.3.1. Kolon kromatografisi....40
3.2.3.2. İnce tabaka kromatografisi....44
3.2.4. Antikanserojen aktivite testleri....45
3.2.4.1. Hücre kültürü....45
3.2.4.2. Hücre kültürü koşulları....45
3.2.4.3. Hücrelerin çözdürülmesi....46
3.2.4.4. Hücrelerin pasajlanması....46
3.2.4.5. Hücrelerin dondurulması....47
3.2.4.6. Hücrelerin sayılması işlemi....47
3.2.5. Ekstrelerinin hazırlanması....48
3.2.5.1. XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü....48
3.2.6. Antioksidan aktivite testleri....50
3.2.6.1. DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini....50
3.2.6.2. ABTS•+ katyon radikal giderme aktivitesi tayini....50
3.2.6.3. Metal şelatlama kapasite tayini....51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI....52
4.1. Rutin ve İzofraksetin Bileşiklerinin Yapı Analizi....52
4.2. Antikanserojen Aktivite Araştırma Bulguları....59
4.3. Antioksidan Aktivite Araştırma Bulguları....61
4.3.1. $DPPH^{\bullet}$ serbest radikal giderme aktivitesi bulguları....61
4.3.2. $ABTS^{\bullet+}$ radikal giderme aktivitesi bulguları....63
4.3.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları....65
5. SONUÇ VE TARTIŞMA....67
KAYNAKLAR....70
EKLER....81
Ek-1. Rutin Bileşiğine Ait HMBC Spektrumu....82
Ek-2. Rutin Bileşiğine Ait COSY Spektrumu....83
Ek-3. Rutin Bileşiğine Ait HETCOR Spektrumu....84
Ek-4. İzofraksetin Bileşiğine Ait HETCOR Spektrumu....85
Ek-5. İzofraksetin Bileşiğine Ait COSY Spektrumu....86
ÖZGEÇMİŞ....87

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Doğal ürünlerin ilaç sanayindeki yeri 2
Şekil 1.2. *Tanacetum alyssifolium* 3
Şekil 2.1. Papatyagiller familyasından 12 alt tür 5
Şekil 2.2. Tanacetum alyssifolium'un Türkiye haritasındaki yeri 6
Şekil 2.3. Sekonder metabolitlerin oluşumu 8
Şekil 2.4. Flavonoid iskeletinin kimyasal yapısı 9
Şekil 2.5. Flavonoid iskeletleri 10
Şekil 2.6. Pelargonidin ve siyanidin bileşikleri 11
Şekil 2.7. Bant I ve bant II'yi veren gruplar 13
Şekil 2.8. Glikozit oluşumu 18
Şekil 2.9. D-glikopiranozit diastreoizomerlerinin yapısı, R:Aglikon 18
Şekil 2.10. Flavon glikozitler 21
Şekil 2.11. Flavonoidlerin aromatik halka sübstütientine göre sınıflandırılması 22
Şekil 2.12. Çalkon ve auron iskeletleri 24
Şekil 2.13. Kumarin yapısı 25
Şekil 2.14. Normal ve kanser hücresi arasındaki fark 27
Şekil 2.15. Serbest radikalin nötralizasyonu 31
Şekil 2.16. Antioksidanların sınıflandırılması 34
Şekil 3.1. Bitkisel materyalin hazırlanma şeması 39
Şekil 3.2. Vakum altında süzülmesi ve klorofillerin ayrılması 39
Şekil 3.3. Etilasetat ile ekstraksiyon 40
Şekil 3.4. İnce tabaka kromatografisi 45
Şekil 3.5. Hücrelerin çökeltilmesi ve çözülmesi 46
Şekil 3.6. Besi yerlerin hücre kültür kaplarına alınması (Pasajlama) 46
Şekil 3.7. İnkübatör ve ınverted (ters) mikroskop 47
Şekil 3.8. Hemositometre ile hücre sayımı 48
Şekil 3.9. Numunelerin XTT analizinin 96 kuyucuklu plaka gösterimi 49
Şekil 4.1. Tanacetum alyssifolium'dan izole edilen moleküllerin kimyasal yapısı 52
Şekil 4.2. Rutin ^{1}H-NMR spektrumu 52
Şekil 4.3. Rutin ^{13}C-NMR spektrumu 53
Şekil 4.4. Rutin ^{13}C- DEPT-135 spektrumu 54

Şekil 4.5. Rutin ^{13}C- DEPT-90 spektrumu.....55
Şekil 4.6. İzofraksetin ^{1}H-NMR spektrumu.....57
Şekil 4.7. İzofraksetin ^{13}C-NMR spektrumu.....58
Şekil 4.8. İzole edilen izofraksetinin MCF-7 hücre hattı antiproliferatif aktivitesi.....60
Şekil 4.9. İzole edilen izofraksetinin MDA-MB-453 hücre hattı antiproliferatif aktivitesi.....60
Şekil 4.10. Antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi.....62
Şekil 4.11. İzole edilen rutin ve izofraksetinin farklı konsantrasyonlardaki (5-40µg/mL) DPPH serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi.....62
Şekil 4.12. İzole edilen rutin ve izofraksetinin farklı konsantrasyonlardaki (10-50 µg/mL) $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile karşılaştırılması.....64
Şekil 4.13. Metal iyonunun EDTA tarafından şelatlanması.....65
Şekil 4.14. İzole edilen rutin ve izofraksetinin farklı konsantrasyonlardaki (10-40 µg/mL) metal şelatlama kapasitelerinin EDTA ile karşılaştırılması.....65

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları..... 14

Tablo 2.2. Flavonoid yapısı ve renk reaksiyonları..... 14

Tablo 2.3. Bazı flavonoid C- ve O- glikozitlerin şeker karbonlarının ^{13}C NMR rezonansları..... ….16

Tablo 2.4. Radikal ve radikal olmayan türler..... 30

Tablo 3.1. Su ekstresinin C-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri
…….……42

Tablo 3.2. C-2 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri.....43

Tablo 3.3. S-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri……..44

Tablo 4.1. Rutin bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri…….....56

Tablo 4.2. İzofraksetin bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri.....59

Tablo 4.3. İzofraksetin ve antikanser ajanı olarak kullanılan karboplatin bileşiğinin meme kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerindeki IC_{50} değerleri.....61

Tablo 4.4. Bileşiklerin DPPH• serbest radikali giderme IC_{50} değerleri.....63

Tablo 4.5. Bileşiklerin $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikali giderme IC_{50} değerleri.....64

Tablo 4.6. Bileşiklerin metal şelatlama kapasiteleri IC_{50} değerleri.....66

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde Değer
^oC	Santigrat Derece
δ	Kimyasal Kayma
d	Dublet
J	Etkileşme Sabiti (Coupling Constant)
m	Multiplet
t	Triplet

Kısaltmalar

$ABTS^{\cdot+}$	2,2′-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) radikali
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPPH•	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil Radikali
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
F3'H	Flavonoid 3'-Hidroksilaz
$FeCl_3$	Demir (III) Klorür
FRAP	Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü
H_2SO_4	Sülfürik Asit
HCI	Hidroklorik Asit
Hz	Hertz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NA	Naturstoffreagenz difenil borikasit β-aminoetilester
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit Radikali
OH•	Hidroksil Radikali
PAL	Fenilalanin Amonyum Liyaz
PG	Propil Galat

POD	Peroksidaz
ppm	Milyonda Bir Birim
R•	Organik Radikali
RNS	Reaktif Azot Türleri
RO•	Alkoksi Radikali
ROO•	Peroksit Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RS•	Tiyil Radikali
RSO•	Sülfenil Radikali
RSO_2•	Tiyil Peroksit Radikali
IC_{50}	%50 İnhibisyon Konsantrasyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
SD	Standart Sapma
SIAL	Sigma Aldrich-Germany
TROLOKS	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

İnsanın varoluşundan bugüne kadar bitkiler ilaç, yiyecek ve kozmetik olarak kullanılmış ve hala kullanılmaya devam edilmektedir. Ayrıca tıbbi ve aromatik bitkiler fitoterapi gibi tamamlayıcı tedavilerin temelini oluştururlar. Aromatik bitkiler ayrıca tüm dünya mutfaklarında gıda katkı maddeleri olarak da kullanımı bulunmaktadır. Beslenme ve sağlık ile doğrudan irtibatlı olan bu bitkilerin beklenen fizyolojik etkileri göstermesi, sahip oldukları sekonder metabolitlerden dolayıdır (Kürkçüoğlu, 2010).

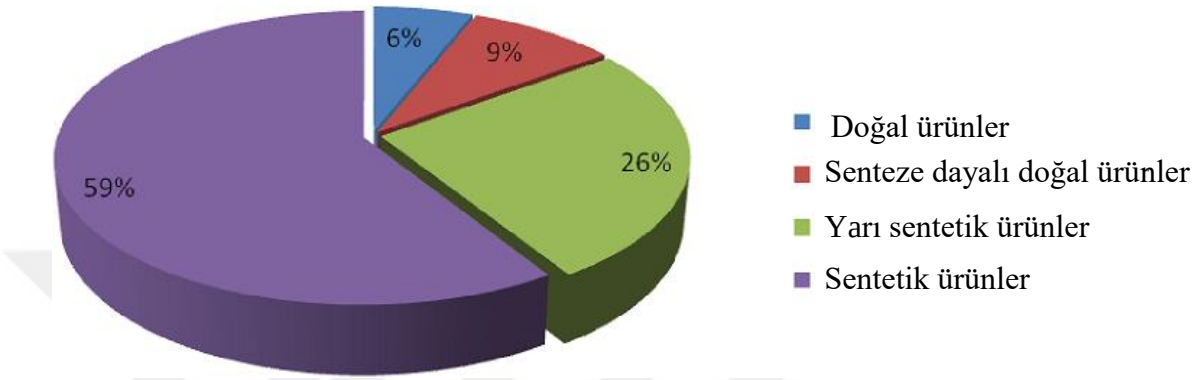
Bitkiler geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılan doğal ilaçların en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Bitkilerden ekstrelerin hazırlanıp tedavi amaçlı kullanılması, M.Ö. 2700 yıllarına kadar dayanmaktadır. Ülkemizde 1933'ten itibaren tıbbi bitkiler üzerine araştırmalar başlamıştır. Türk farmakopisine kayıtlı bitki sayısı yaklaşık 140 civarında olmasına rağmen halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısının bu sayıdan daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Günümüzde bitkisel metabolik ürünlerin çoğunlukla ilaç hammaddesi olarak kullanımı bulunmaktadır. Gelişmiş ülkelerin birçoğu tedavi amaçlı olarak bitkisel kaynakları kullanmaktadır. Dünya nüfusunun %80'i sağlık gereksinimleri için geleneksel ilaçlardan yararlanmaktadır (Tiwari, 2008). Dünya nüfusunun % 63' ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır. Gelişen ve gelişmekte olan ülkelerde reçete ile verilen ilaçların % 25' i bitkisel kökenlidir (Richard, 2011).

Türkiye'de olduğu gibi diğer ülkelerde de bitkilerin mikroorganizmaları bertaraf edici ve sağlık için hayati olan özellikleri bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve bitkiler üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır (Dülger, 1999).

1983-1994 yılları arasında üretilen 520 yeni ilacın, yaklaşık % 39'u mikrobiyal menşelidir. Yaklaşık 23.000'in üzerinde olduğu anlaşılan mikrobiyal sekonder metabolitin %42'si funguslar, % 42'si aktinomisetler, ve % 16'sı da başka bakteri çeşitlerinden elde edilmektedir (Oskay ve Tamer 2009). Geniş bir kullanım alanına sahip olan bitkiler, biyolojik olarak aktif bileşiklerin elde edilmesinde önemli bir kaynak oluştururlar (Wang vd., 2011).

Sekonder metabolitler büyük yapısal farklılığa sahiptir ve bitkide sekonder metabolizma yollarının ara yapılarından oluşurlar. Yapılan araştırmalar sonucunda bitkilerin çok az miktarlarda sekonder metabolit ürettiği anlaşılmıştır. Ayrıca doğal gıda ve ilaç etken maddeler bulmak için sekonder metabolitler üzerinde yapılan çalışmalar çoğalmakta ve dolayısıyla iktisadi önemi artmaktadır (Başer, 1990; Baytop, 1999; Ahıskalıoğlu, 2007).



Şekil 1.1. Doğal ürünlerin ilaç sanayindeki yeri (Cragg vd., 1997)

Modern bilimlerin gelişmesiyle halk arasında ilaç olarak kullanılan birçok bitkinin kimya, biyoloji, farmakoloji, toksikoloji gibi alanların ortak çalışmasıyla, yapılarında bulunan sekonder metabolitlerin, fitokimyasal yapıları tespit edilmekte ve biyolojik aktiviteleri incelenmektedir (Baykal, 1997; Dülger, 1999; Tadeg, 2005).

Tıbbi bitkilerden tamamlayıcı tıp, alternatif tıp ya da geleneksel tedavi yöntemlerinde olduğu gibi modern tıp ve eczacılık bilimlerinde de yararlanılmaktadır (Mainardi vd., 2009). Ülkemizde tıp alanında kullanılan bitkilerin sayısı yaklaşık 500 civarında olup bu bitkilerin hemen hemen tamamı doğal olarak yetişmektedir. Güncel olarak kullanılan ilaçların büyük bir kısmı bitkisel kaynaklıdır. İçerdiği aktif bileşiklerden dolayı bitkisel kaynaklı besinler, insan sağlığının korunmasında etkilidir. Bu bağlamda başta kanser olmak üzere birçok hastalığa karşı olan koruyucu etkilere sahip olduklarından dolayı meyve, sebze ve baharatları da içeren doğal besinlere hem halk hem de bilimsel kesim tarafından büyük önem verilmektedir (Shukla ve Singh, 2007).

Dünyanın 750.000 ile 1.000.000 arasında bitki türüne ev sahipliği yaptığı tahmin edilmektedir. 500 bin kadarı belirlenen bitki türlerine her yıl yaklaşık 2000 kadar yeni bitki türleri katılmaktadır. Günümüzde 20000 den fazla bitkinin tedavi amaçlı kullanımları bulunduğu bilinmektedir (Çalışkan, 2006).

Kanser yakın, hatta uzaktaki dokulara nüfus edebilen neoplazma haldeki hücrelerin anormal büyümeleri ile karakterize edilen sonuç olarak ölüme sebep olabilen bir seri hastalık olarak tanımlanabilir (Mathur vd., 2006).

Vücutta meydana gelen serbest radikaller, kanser hastalığının önemli kaynaklarından birisidir. Serbest radikaller hücre içinde çeşitli tahribatlara sebep olurlar. İnsan vücudunda serbest radikallerin etkisini azaltan koruyucu sistemler bulunmaktadır. Ama yoğun stres altındayken bu sistemler görevlerini yapamazlar. Bu türler hücrelerin DNA yapısına etki ederek kanser başta olmak üzere birçok hastalığa yol açarlar. Oldukça kararsız olan serbest radikaller canlı sistemlerde bulunan maddeler ile kolay bir şekilde reaksiyona girme eğilimindedirler. Bu reaksiyon neticesinde oluşan yeni ürünler hücre yıkımı, erken yaşlanma, hücre ölümü ve kanser gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır. Serbest radikaller kalp damar hastalıkları, kanser, DNA hasarı, bağışıklık sistemi yetmezliği, Parkinson hastalığı gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Akkuş, 1995; Ashwood ve Burtis, 1999; Dawn vd., 1996).

Bu çalışmada doğal ürünler alanında endemik bir tür olan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin etil asetat, n-bütanol ve su ekstreleri hazırlanarak, su ekstraktından Rutin ve İsofraxetin flavonoidi kromatografik yöntemle (kolon kromatografisi) izole edilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin yapısı spektroskopik metotlarla (1D-NMR, 2D-NMR,) belirlenmiştir. İzole edilen saf bileşiklerin antiproliferatif ve antioksidan aktiviteleri incelenip ilaç olma potansiyelinin araştırılması hedeflenmiş ve çalışmalar bu yönde yapılmıştır.

Şekil 1.2. *Tanacetum alyssifolium*

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Asteraceae (Compositae) familyası

Çiçekli bitkilerin en büyük ailesi olarak bilinen *Asteraceae*, iki çenekliler sınıfından olup genellikle otsu, çok azı çalı, ağaç ve lian formundadırlar. Familya ismini yıldız şeklinde çiçekleri bulunan bir cins olan *Aster* türünden almıştır. Çiçek durumunun kompozit yapısı bu bitkileri taksonomistlerin *Compositae* olarak belirtmesine neden olmuştur. Yapraklar basit veya bileşik, stipulsuz, alternat, rozet biçimindedir. Çiçekler baş veya kapitulum halindedir. Kozmopolit bir familya olan bu tür, dünyada yaklaşık 1100 cins ve 25000 civarında çeşitle temsil edilmektedir. Türkiye 133 cins ve 1156'dan fazla türe ev sahipliği yapmaktadır (Simpson, 2006).

Başka bir kaynağa göre, ülkemizde Asteraceae familyası 136 cins ve 1.345 tür ile temsil ediliyor ve en çok endemik tür de Asteraceae' de bulunuyor. Toplam 489 endemik türe sahip olduğu belirtilmektedir (Güner, 2013).

Şekil 2.1. Papatyagiller familyasından 12 alt tür

Asteraceae familyasına ait birçok tür farmakolojik aktiviteye sahiptir. Bu familyada bulunan bitkiler flavonoid ve diterpenlerin yanı sıra ağırlıklı olarak antibakteriyel, antihelmintik, antifungal, , antienflamatuar, insektisit ve antitümör gibi birçok biyolojik aktivite gösteren sekonder metabolitleri içermektedir (Grierson, 1975; Koçak, 2008).

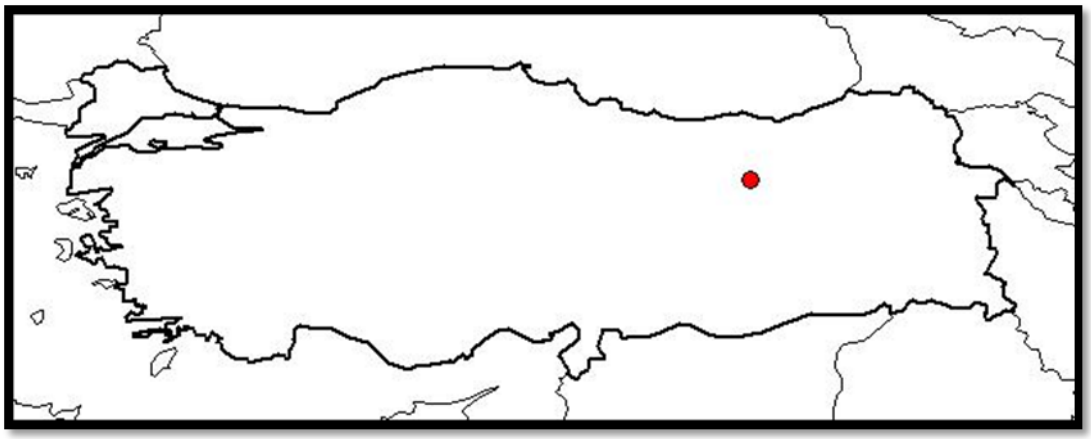
Kimyasal içerik bakımından birçok farklılık gösteren Asteraceae familyası üyelerinin bir kısmı da zehirlidirler. Asteraceae familyası zengin uçucu yağ ve terpenoit yapılarını da içerir. Asteraceae familyası fenolik bileşiklere ve terpenlere sahip olmalarından dolayı tıp ve eczacılık alanında da kullanım alanına sahiptir (Mucciarelli ve Maffei, 2002).

Etken madde ve uçucu yağ içerdiklerinden tıbbi alanda kullanılan Asteraceae familyası üyeleri, süs bitkisi ve sebze olarak kullanılmanın yanı sıra inulin ve sabit yağ taşıdıkları için gıda sektöründe, kauçuk taşıdıklarından dolayı da sanayi alanında kullanım alanı bulmaktadır (Baytop, 1991).

2.1.2. *Tanacetum* cinsi

Tanacetum cinsi Compositae familyasında bulunmaktadır ve ülkemizde bu cinsin 18'i endemik olmak üzere 60 takson, 44 türü mevcuttur (Davis, 1988; Güner, 2000). Bu bitki türü küçük, orta boyda veya uzun, rizomlu veya yarı çalımsı şeklindedir. Tüy durumu seyrek veya yoğun kısa ve sık yumuşak veya basit tüylüdür. Bazılarında sapsız salgı tüyleri bulunmakla beraber bazılarında tüylere raslanmaz. Gövde genellikle yapraklı ve dallanmış, dik veya yükselicidir. Kapitulum heterogamous (çiçeklerin farklı eşeylere sahip olması) veya homogamous (tüm çiçeklerin aynı eşeyde olması), tek veya daha sıklıkla seyrek veya yoğun korimbus biçimindedir. Kenarları ve uç kısımları genellikle zarımsıdır. Dişi çiçekler az çok belirgin şekilde beyaz, sarı veya pembe dilsi şeklindedir. Korona kısa veya hiç bulunmamaktadır. Genellikle düzensiz dişli veya lobludur (Grierson, 1975).

Haziran ve Temmuz aylarında çiçeklenme göstermektedir. Genellikle kireçtaşı uçurumlar ve kayalarda yetişme alanı bulmaktadır. Habitatı bulunduğu toprakların yağmurda kolaylıkla çözünmesiyle oluşan doğal erozyonla gittikçe azalmaktadır ve yok olma tehlikesiyle yüz yüzedir. Populasyonlar ciddi şekilde bölünmüş olup, alanda ki dağılım devamlılık göstermemektedir (Kandemir, 2015).



Şekil 2.2. *Tanacetum alyssifolium*'un Türkiye haritasındaki yeri

Dünyada geleneksel yöntemlerle bazı hastalıkların tedavisinde veya ağrıların giderilmesinde *Tanacetum* türlerinden uzun zamandır yararlanılmaktadır. Yüzyıllardır halk ilacı olarak çeşitli amaçlar için kullanılan *Tanacetum* türlerinden; *Tanacetum* parthenium adet düzenleyici ve ateş düşürücü, kulak çınlaması, baş ağrısı ve baş dönmesine karşı yararlanılmaktadır (Newall, 1996; British Herbal Pharmacopoeia, 1996).

Yaygın olarak kullanılan *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. bitkisinin ateş düşürücü ve *Tanacetum vulgare* L. bitkisinin antihelmintik kullanımları önde gelse de diğer türler, antibiyotik, antiseptik, antioksidan, antienflamatuar etkili kullanımlar da tespit edilmiştir (Gören vd., 2002; Kumar ve Tyagi, 2013).

Tanacetum türleri üzerinde yapılan fitokimyasal araştırma ve inceleme sonucunda bitki içeriklerinin çoğunlukla seskiterpenoit ve flavonoitlerden oluştuğu anlaşılmıştır (Gören vd., 2002). Bitki türleri açısından Türkiye'nin en önemli şehirlerinden birisi Erzincan'dır. Sahip olduğu doğal bitkilerinin % 30.62 si endemik özellik göstermektedir (Kandemir, 2006).

Tanacetum alyssifolium (Asteraceae) Erzincan'a has bir türdür. 1890 yılında İliç ilçesi Kuruçay Köyü çevresinden ilk kez toplanmıştır (Davis, 1975). Uzun seneler boyunca toplanamayan tür Türkiye Bitkileri Kitabı'na göre DD kategorisinde değerlendirilmiştir (Ekim vd., 2000). Tür son zamanlarda tekrar toplanmıştır (Kandemir ve Makbul, 2004).

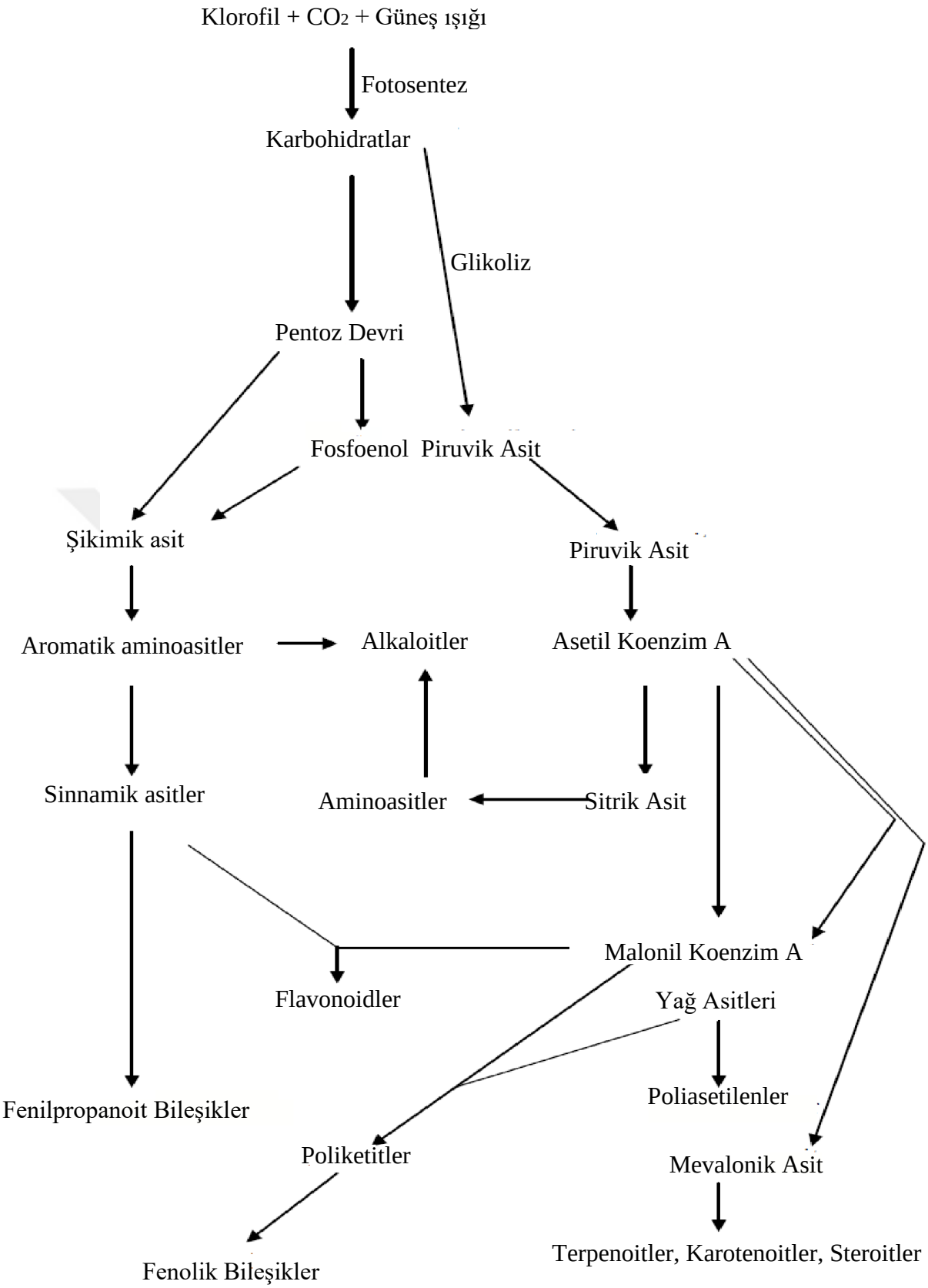
2.2. Sekonder Metabolitler

İlk olarak sekonder metabolit terimi A. Kossel (1891) tarafından ifade edilmiş; bundan otuz yıl sonra F. Czapek (1921) birincil metabolitlerden modifiye olan bu metabolitleri 'endproduckt (son ürün)' terimi ile nitelendirmiştir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Bitkilerde bulunan sekonder ve primer metabolitler doğal bileşikler olup primer metabolitler; hormonlar, lipitler (trigliserit, fosfolipit), karbohidratlar (nişasta, selüloz vb.), proteinler ve mineraller (tuzlar, anyonlar, katyonlar vb.) gibi temel fonksiyonlar olan büyüme, gelişme ve üreme için gereksinim duyulan ana ürünlerdir. Bitkilerin çevreyle uyumunu sağlamak, koruma, taşınma, çoğalma gibi işlevlerinden ise sekonder metabolitler sorumludurlar. Terpenler, fitosteroller, alkaloidler, terpenoidler, fenolikler ve flavonoidler bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerden bazılarıdır. Günümüzde çoğu alanda hammadde olarak kullanılan sekonder metabolitler, bitkinin ana yaşamsal fonksiyonlarıyla direkt irtibatı olmamasına rağmen en az primer metabolitler kadar değerlidir (Sökmen ve Gürel, 2001; Bourgaud vd., 2001; Zarate vd., 2003).

Sekonder metabolitler koku, tat, renk vb. özellikleri ile farklılık göstermektedirler (Vining, 1990). Günümüzde kimyasal yapı zenginliğine sahip sekonder metabolit sayısı 215.000'i geçmiş olup, her geçen gün yeni doğal maddeler bulunmaktadır (Kürkçüoğlu, 2010).

Sekonder metabolitler birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilip, çoğunlukla biyosentez süreçlerine göre kategorilendirilirler (Bourgaud vd., 2001). Yapılan araştırmalarda sekonder metabolitlerin, bitkiler tarafından çok az miktarlarda üretildiği belirlenmiştir. Buna mukabil başta tıp ve gıda sektörü olmak üzere birçok endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılmaları (farmasötikler, boyalar, gıda katkı maddeleri, koku vericiler, yapıştırıcılar, tatlandırıcılar, pestisidler vb.) sebebiyle bu metabolitlere duyulan ihtiyaç giderek çoğalmakta ve bunun sonucunda da ekonomik olarak önemi artmaktadır (Sökmen, 2001).



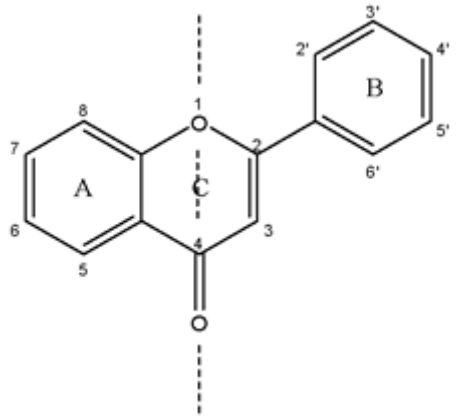
Şekil 2.3. Sekonder metabolitlerin oluşumu (Hacıbekiroğlu, 2009)

2.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler en gelişmiş bitki türlerinden basit mantarlara kadar hemen her bitki çeşitinde genel olarak rastlanan sekonder metabolitlerdir. Doğal olarak bulunan en büyük fenol grupları bu sebeple flavonoidlerden meydana gelmektedir. Sahip oldukları biyolojik fonksiyonlarından dolayı flavonoidler, bitkilerin sekonder metabolitleri içerisinde önemli bir kısmı oluşturmaktadır (Guliyev ve Harmandar, 1999).

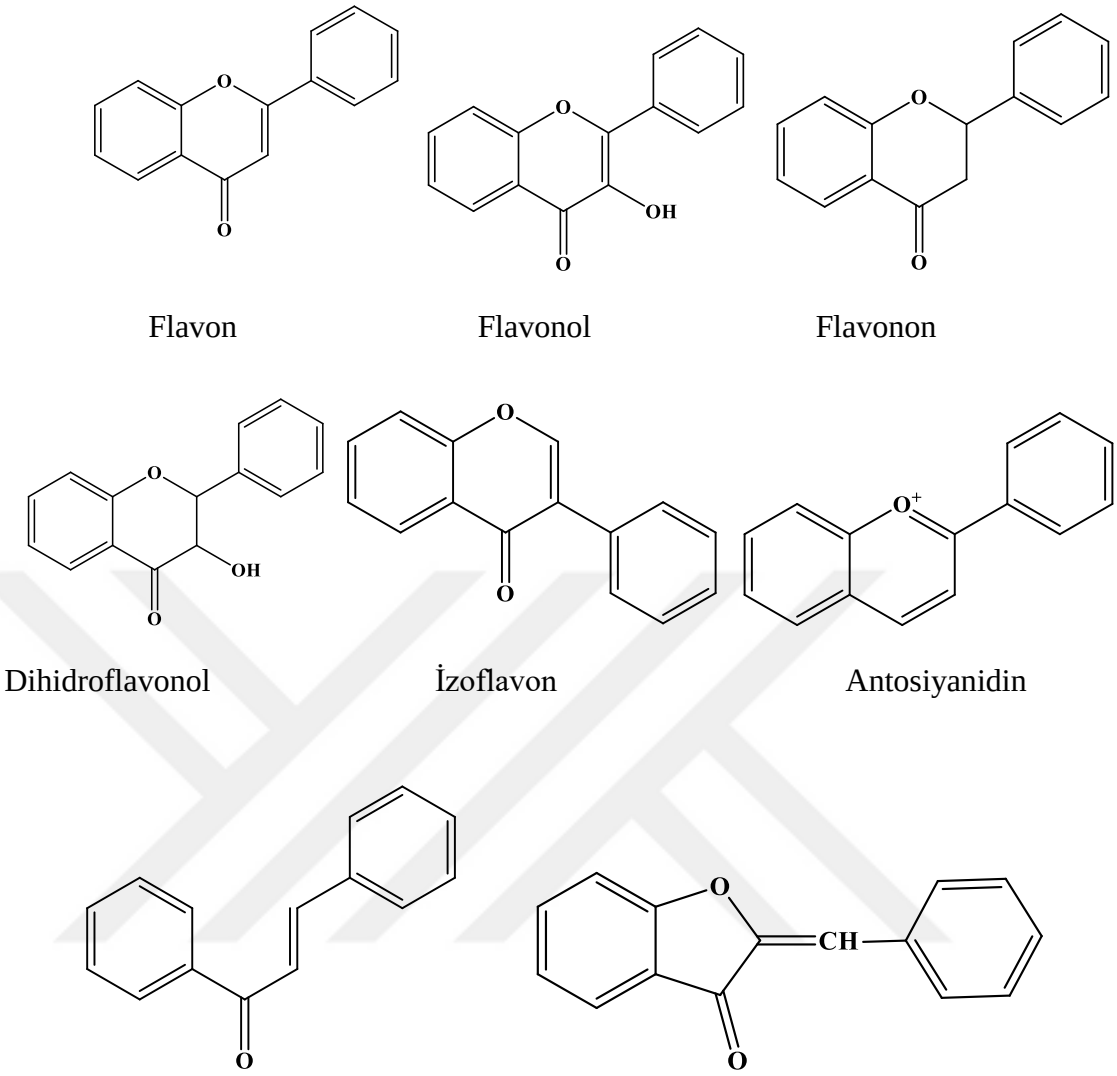
Karbon iskeleti (C6–C3–C6) şeklinde olan flavonoitlerin ana iskeletinde 15 karbon olup, 2-fenil benzopiran yapısındadırlar. Flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, heterohalka ise C ile ifade edilmektedir (Hatipoğlu, 2010).

A ve C halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomlarına oksijen atomundan başlayarak numara verilirken, B halkasındaki atomlar ise üssü (‘) rakamlarla ifade edilmektedir (Hatipoğlu, 2010).



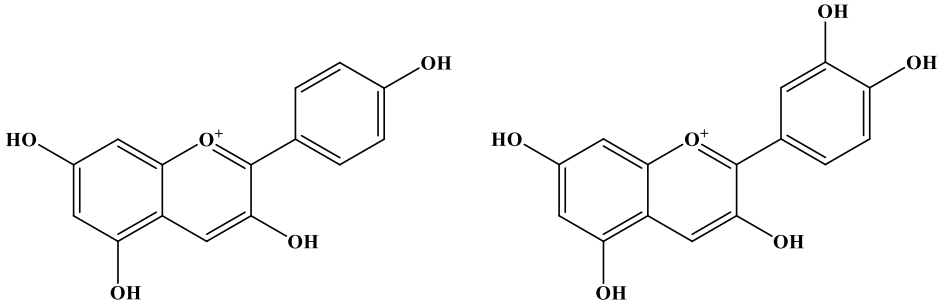
Şekil 2.4. Flavonoid iskeletinin kimyasal yapısı

Flavonoidlerin önemli özelliklerini heterosiklik halka belirlemektedir (Kocabaş, 2008). Flavonoidlerin çeşitliliğine, üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka meydana getirmesi, aromatik halkalara bağlı sübstitüentlerin sayısı, türü ve konumları sebep olmaktadır. Flavonoid çeşitleri yapısal olarak; proantosiyanidinler, antosiyaninler, izoflavonlar, flavonlar, flavonoller, biflavoniller, flavononlar, kalkon ve auronlar olarak sınıflandırılırlar.



Şekil 2.5. Flavonoid iskeletleri

Bitkilere rengini veren gruplar antosiyanidinler olup, mühim bir sınıfı oluştururlar. Meyvelerde ve yapraklardaki pembe, mavi, kırmızı, mor renklerinin hepsinin oluşumunu sağlayan ve su ile çözünebilen renk pigmentleridirler. Kimyasal olarak tek aromatik yapı üzerine dayanır, siyanidine hidroksil yapılarının katılıp ayrılması, glikozillenmesi veya metillenmesi biçiminde meydana gelir (Harborne, 1988).



Pelargonidin Siyanidin

Şekil 2.6. Pelargonidin ve siyanidin bileşikleri

2.2.1.1. Flavonoidlerin doğada bulunuşu ve kullanım alanları

Flavonoidler çoğunlukla bitkilerin gövde, kabuk, çiçek, yaprak, kök, dal, meyve gibi organlarında bulunmaktadır (Geçibesler, 2009). Flavonlar bitkilerde hem serbest hem de glikozitleri halinde bulunurlar (Harborne, 1988).

Flavonoidler, bitkilerde enzim inhibitörü, antioksidan, ışıktan koruma, enerjinin dönüşümü ve büyüme hormonları üzerine de etki üretmektedirler (Harborne vd., 1975; Harborne ve Mabry, 1982).

Flavon bileşiklerinin antioksidan özellik göstermelerinin üç sebepten kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Oğuz, 2008).

1. Aromatik halka, yapılarındaki hidroksil grupları vasıtasıyla hidrojen vererek redoks reaksiyonuna girebilmektedirler ve dolayısıyla serbest radikalleri yok edebilme niteliği kazanırlar.

2. Heterosiklik, aromatik ve çoklu doymamış bağlar dolayısıyla stabil bir delokalizasyon sistemine sahip olurlar.

3. Metal şelatlama kapasitesi bulunan yapısal grupları vasıtasıyla $O^{2\cdot}$ ve $OH^{\cdot}$ gibi reaktif oksijen çeşitlerinin meydana gelmesini önleyebilmektedirler. Tıbbi açıdan önemli kabul edilen birçok bitki türünde flavonoitlerin etken ingrediyentler olduğu sanılmaktadır (Oğuz, 2008).

Flavonoidlerin, bitkilerde azotun tutulmasını sağlayan bakteriyel genlerin aktifleştirilmesinde rol oynadığını belirten çalışmalar, flavonoidlerle genlerin önemli bir bağlantı içinde olduğunu açıklamaktadır (Firmin vd., 1986; Peters vd., 1986).

Antioksidan ve serbest radikal yakalama özellikleri sayesinde, koroner kalp hastalıkları ve değişik kanser türlerinin önlenmesinde etki gösterdiği pekçok araştırma ile belirtilmiştir (Chen vd., 1996; Serafini vd., 2006).

Flavonoidler genellikle insan beslenmesi üzerine direkt etki göstermemekle birlikte, insan sağlığına olan faydalarından dolayı önemi giderek artmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan, antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerinden dolayı insan sağlığına yardımcı bileşikler olduğu anlaşılmaktadır (Hertog vd., 1993). Flavonoidlerden flavon, flavonoller, ve flavanonların kılcal damarların tedavisinde yarar sağladıkları anlaşılmıştır (Vogel, 1971).

Flavonoidler kan damarlarına tesirleriyle ile birlikte, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddeler olarak da tanınırlar. Başka bir araştırma sonuçlarına göre kersetin, rutin ve bazı flavonoller zayıf (hipodinamik) kalbi güçlendirme, nabzı normalleştirme özelliğine haizdirler (Jeney ve Uri, 1954).

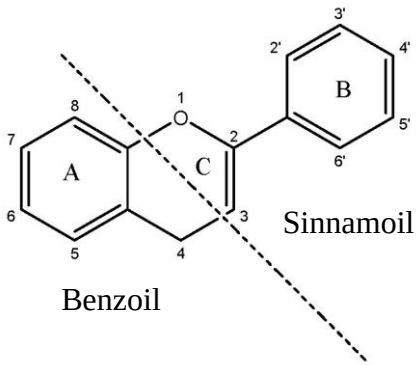
Yapılan araştırmalarda flavonoid içeren meyve ve sebze tüketimi ile daha düşük kanser riski arasında bağlantı olduğu belirlenmiştir. Flavonoidce zengin diyetle beslenen kadınlarda yapılan gıda sıklığı anketi ile akciğer kanserine yakalanma riskinin azaldığı anlaşılmıştır (Ben Sghaier vd., 2011). Proantosiyanidinler ve diğer flavonoidlerin pankreas kanseri ile bağlantısını anlatan bir çalışmada, her gün proantosiyanidince zengin gıda tüketen şahıslarda, pankreas kanseri olmanın %25 düzeyinde azaldığı görülmüştür (Rossi vd., 2012).

Osteoporoz tedavisindeki kullanımı flavonoid kullanım alanlarının en ilgi çekici olanlarından biridir. Flavonoidlerden olan ipriflavonun, kemik mineral densitesinde artışa neden olduğu, resorbsiyon markırlarında anlamlı düzelmeye neden olduğu ve ağrı üzerine de düşürücü etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, ipriflavonun mineral kompozisyonunda değişiklik oluşturmadan, erişkin rat kemiklerinin biyomekanik özelliklerinde gelişme sağladığı da belirlenmiştir (Civitelli vd., 1995)

2.2.1.2. Flavonoidlerin tanınmaları

Flavonoidler UV ışığında flouresans etki göstermektedir. Diğer taraftan fenolik yapılardan dolayı NH_3 ile renk değişimine uğrarlar. Bu özellikleri nedeniyle, ince tabaka ve kağıt kromatografisinde UV ışığı (254 ve 366) ile bakılmaktadır. Hidroksil gruplarının konumlara göre UV altında, NH_3 buharında ve NA (Naturstoffreagenz reaktifi) belirteciyle oluşturdukları renkler farklılık göstermektedir.

UV spektrumunda flavonoid bileşiklerinin bulunması durumunda iki absorpsiyon bandı oluşmaktadır. Bu bantların biri uzun diğeri ise ona göre daha kısa dalga boyunda görünmektedir. Uzun dalga boyunda olan banta Bant I denilir ve Bant I flavonoid yapısının B halkasının absorpsiyonu ile (sinnamoil grubu) alakalıdır. Kısa dalga boyunda oluşan bant ise Bant II olarak nitelendirilir ve flavonoid yapısının A halkasının absorpsiyonu (benzoil grubu) ile ilgilidir (Mabry ve Markham, 1975).



Şekil 2.7. Bant I ve Bant II'yi veren gruplar (Hacıbekiroğlu, 2009)

Bant I, B halkasındaki oksijenin fonksiyonuna, Bant II ise A halkasında 6 ve 8 konumunda bulunan oksijen fonksiyonuna bağlı olarak uzun dalga boyuna kaymasına yol açmaktadır. Ave B halkasındaki hidroksil gruplarının yokluğu, bantların şiddetinin zayıf olmasına sebep olur. İzoflavonlarda Bant II, 245-270 nm ve Bant I, 300- 340 nm de omuz şeklinde gözlenirken, C-6, C-7 dioksijene izoflavonlar olabildiğince kuvvetli Bant II absorpsiyonu verirler. (Mabry vd., 1970).

Flavonoid bileşiklerin yapısı hakkında, UV spektroskopisi önemli bilgiler vermektedir. Bileşiğin metanoldeki çözeltisine ayrı ayrı NaOMe, susuz $AlCl_3$, $AlCl_3$/HCl, susuz NaOAc ve NaOAc/H_3BO_3 düşük miktarda eklenerek alınan spektrumlarda gözlenen

kaymalar, piklerin şiddeti ve yapısı arasındaki farklar flavonoid bileşiğinin ana iskeleti ve moleküldeki hidroksil gruplarının konumları hakkında bilgi verir (Marbry vd., 1970).

Tablo 2.1. Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bantları

	Bant I	**Bant II**
Flavon	304-350 nm	250-270 nm
Flavonol	352-385 nm	250-270 nm
Flavonon	310-330 nm	275-290 nm
Kalkon	360-390 nm	240-260 nm
Auron	390-430 nm	240-260 nm
Antosiyanidin	475-560 nm	275-280 nm
Izoflavon	300-340 nm	245-270 nm

NaOMe kuvvetli baz olduğu için, flavon çekirdeğindeki bütün hidroksil gruplarını iyonlaştırmaktadır. 4'-OH taşıyan flavonoidler Bant I de 45-60 nm lik batokromik kayma gösterdikleri için bant şiddeti çoğalmaktadır. 7-OH flavon ve flavonollerde 305-345 nm arasında düşük şiddette bir bant izlenmekte ve bu Bant II olarak isimlendirilmektedir.

Alüminyum klorür, A halkasındaki C-3 ve C-5 konumunda bulunan serbest OH grupları ve B halkasındaki orto-dihidroksi grupları ile şelat meydana getirmektedir. B halkasındaki orto-dihidroksi yapıları ile meydana gelen şelat, seyreltik HCl eklenmesiyle bozunur.

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf bir baz olduğu için asit karakterdeki fenolik hidroksilleri iyonize eder. C-7 de serbest OH grubunun varlığı Bant II nin 5-20 nm uzun dalga boyuna kaymasına neden olmaktadır. Eğer C-6 veya C-8 de oksijen bulunursa flavonlarda 4-8 nm lik bir kayma belirlenmekte yada hiç görünmemektedir (Marbry vd., 1970).

Flavon ve flavonollerde B halkasında orto-dihidroksi grupları bulunursa bunlar borikasit ile şelat meydana getirmektedirler. Bu durumda Bant I, $NaOAc/H_3BO_3$ ile 12-30 nm

uzun dalga boyuna kaymaktadır. 3'-4' serbest OH grubu bulunmaması durumunda, spektrum MeOH spektrumu ile aynı gözlenmektedir (Marbry vd., 1970).

Tablo 2.2. Flavonoid yapısı ve renk reaksiyonları

Öğrenme Alanları	**UV**	**UV/ NH_3**	**UV\NA**
Flavon, 5-OH ve 4'-OH	Koyu Mor	Sarı	Sarı
Flavonol, 5-OH ve 4'-OH, 3-OR	Koyu Mor	Sarı-yesil	Sarı
Flavon, 5-OH ve 3', 4'-OH	Koyu Mor	Sarı-yesil	Oranj
Flavonol, 5-OH ve 3',4'-OH, 3OR	Koyu Mor	Sarı-yesil	Oranj
Flavon, 5-OH ve 4'-OR	Koyu Mor	Renk degişmez	Kahve-mor
Flavonol, 5-OH ve 4'-OR, 3-OR	Koyu Mor	Kahve-mor	Kahve-mor
Flavonol, 5-OH ve 4'-OH, 6-OH	Koyu Mor	Kahve-mor	Mor
Flavonol, 3-OH ve 5-OH, ya da 5-OR	Soluk Sarı	Renk degismez	Sarı
Flavonol, 3-OH ve 3', 4'-OH	Soluk Sarı	Renk degismez	Oranj
Flavon, 5-OR	Açık Mavi	Sarı-yesil	Sarı-yesil
Flavonol, 5-OR, 3-OR	Açık Mavi	Mavi-Yeşil	Sarı
Flavonol, 5-OR ve 3', 4'-OH	Açık mavi	Fluoresans	Oranj

Flavonoidlerin ^{1}H-NMR spektrumu, aromatik halka protonları ve sübstitüentlerin pozisyonu hakkında bilgi vermektedir. Flavonoidlerde, aromatik halka protonları 5.00-8.00 ppm arasında gözlenirken, metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak izlenmektedir. Eğer bir şeker grubu bağlı ise monoglikozitlerde şeker protonları 3,0-4,0 ppm arasında görünmekte olup, şekerin anomerik protonu H-1" daha aşağı alanda 4.8-6.0 ppm de dublet olarak izlenmektedir.

Flavonoid aglikon ve glikozitlerin yapılarının aydınlatılmasında kütle spektrumu önemli bilgiler vermektedir. Flavonoid aglikonların çoğunda şiddetli moleküler iyon piki $[M]^+$ gözlenmektedir. Moleküler iyon pikine ilave olarak, flavon aglikonları $[M-H]^+$ ve $[M-CO]^+$ piklerini de gösterirler. Metoksi flavon olması durumunda ise $[M-CH_3]^+$ ve $[M-COCH_3]^+$ pikleri izlenmektedir (Harbone vd., 1975).

Tablo 2.3. Bazı flavonoid C- ve O- glikozitlerin şeker karbonlarının ^{13}C NMR rezonansları

Glikozit tipi	**C-1**	**C-2**	**C-3**	**C-4**	**C-5**	**C-6**
7-*O*-glikozit	100,2	73,3	76,6	69,8	77,7	60,9
8-*C*-glikozit	73,9	71,4	78,8	70,8	81,4	61,5
3-*O*-galaktozit	102,3	71,3	73,4	68,0	75,8	60,8
8-*O*-galaktozit	73,9	68,5	75,4	69,1	80,5	61,3
3-*O*-α-ramnozit	101,9	70,4	70,6	71,5	70,1	1,3
3-*C*-α-ramnozit	77,3	75,0	75,5	72,2	72,2	18,1
2'-*O*-ksilozit	102,4	73,7	75,9	69,4	65,5	-
6-*C*-ksilozit	74,6	70,3	78,5	70,0	70,0	-
3-*O*-α-arabinozit	101,8	71,7	70,8	65,9	64,1	-
3-*O*-α-arabinofuranozit	108,1	82,1	77,2	86,2	61,0	-
8-*C*-arabinozit	74,4	68,2	74,5	68,9	71,0	-
3-*O*-glukuronit	101,1	73,7	75,9	71,3	75,9	169,7
3-*O*-allozit	99,9	71,6	71,6	67,2	75,1	61,3
2''-*O*-apiozit	109,0	76,5	79,1	74,0	64,4	-

2.2.2. Glikozitlerin genel özellikleri

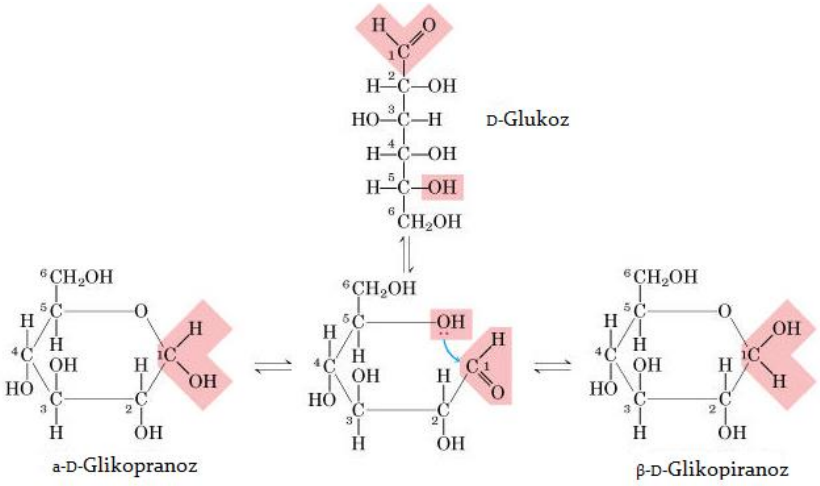
Doğada glikozitler bol miktarda bulunmaktadır. Glikozitler hayvan ve bitkilerden izolasyonla saf olarak elde edilebilmektedirler. Kendine özgü biyolojik aktif doğalarıyla bilinen bu bileşikler yaygın olarak ilaçlarda kullanılmaktadır. Dermatolojik ve damar hastalıklarının tedavisinde kullanımı günümüzde uygulanmaktadır (Kırmızıgül vd., 1996; Maul vd., 1999).

Bitkileri mikrobakteriyel saldırılardan koruyan glikozitler, ayrıca tarımsal alanlarda ve sığır yetiştiriciliğinde de kullanılmaktadır (Tschesche ve Wulff, 1973; Woitke vd., 1970). Glikozidlerin izolasyonu ve saflaştırılması için çok çeşitli kromotografik metodlar mevcuttur fakat saflaştırılmalarıda bir o kadar zordur. Bugün glikozid bileşiklerinden bazılarının izolesi hala gerçekleştirilememiştir (Barton, 1955; Kirmizigul, 1993).

Bitkilerde bulunan glikozitler genel itibariyle katıdır; amorf ve renksiz veya beyaz renkte bulunmaktadır. Kimyasal yapılarına göre; su, metanol, etanol, aseton, etilasetat ve piridinde çözünürken petrol eteri ve eter gibi çözücülerde çözünemezler. Çünkü polar bileşiklerdir. Fakat kloroform bazı glikozitleri çözebilmektedir. Farklı yapılara sahip olduklarından çözünürlükleri, kararlılıkları, ve polarize ışığa karşı davranışlarıda farklıdır. Glikozitler için genellikle çözücü sistemi olarak %70-90 etanol kullanılmaktadır. Oksijensiz organik çözücülerdeki çözünürlükleri çok az miktarda gerçekleşmektedir (Conn, 1980).

Bitkilerde çeşitli miktarlarda meyve, tohum, yaprak, kabuk, kök ve hücre öz suyunda çözünmüş olarak bulunurlar. Glikozit miktarının kış ve yaz aylarında miktar olarak farklılaştığı ve bitkinin yaşı ile alakalı olduğu bilinmektedir (Fang ve Lee, 1991).

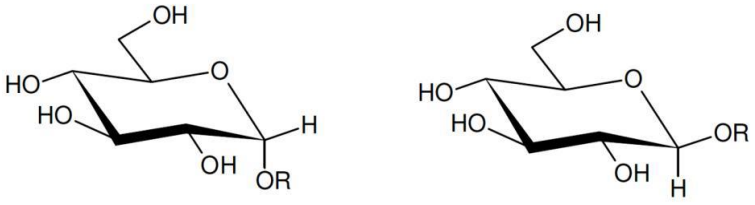
Monosakkaritlerin redüktör grubu ile karbonhidrat yapısında olmayan bir maddenin birleşmesinden, bir molekül su çıkışı ile meydana gelen bileşiklere glikozit denir. Asit veya enzim etkisi ile bir molekül su alıp hidrolize uğrayan glikozit bileşikleri şeker (glikon) ve aglikona (genin=genol=şeker olmayan kısım) ayrılırlar (Aksu, 1972).



Şekil 2.8. Glikozit oluşumu

Glikozidin şeker olmayan bileşeni "aglikon", şeker bileşeni ise "glikon" olarak isimlendirilir. Aglikon kısmının flavonoid, terpen, kumarin ya da herhangi bir doğal bileşik olma ihtimali vardır. Doğal glikozitlerde varolan şekerler arasında en yaygın olanı glukozdur. Ender olarak L-Ramnoz ve L-Fruktoz da bulunabilmektedir (Robbers vd., 1996).

Şekerin halkalı yapısı sebebiyle, anomerik karbonun konfigürasyonuna bağlı olarak 2 diastereoizomeri vardır. Bu diastereoizomerlere anomer denir ve α, β olarak isimlendirilir (Şekil 2.9).



α-anomer β-anomer

Şekil 2.9. D-glikopiranozit diastreoizomerlerinin yapısı, R:Aglikon

Günümüze kadar glikozidlerde D-glikoz, D-galaktoz, D-ramnoz, D-arabinoz, D-ksiloz, D-fruktoz, D-kinovoz, D-glikuronik asit, D-galakturonik asit ve D-riboz gibi birçok monosakkarit keşfedilmiştir. Glikozit bağlarının olağan konfigürasyonu D şekerlerde *β*, L şekerlerde *α*'dır. Fakat son yıllarda α-D-glikozidik, α-*D*-galaktozidik ve *β*-L-arabinozidik bağ tiplerininde mevcut olduğu ortaya çıkmıştır (Bukharov ve Karlin 1970; Chirva vd., 1971; Bukharov ve Karneeva, 1971).

2.2.2.1. Glikozitlerin sınıflandırılması

Glikozitlerin adlandırılması ve sınıflandırılması aglikonlarının yapısı, meydana geliş şekilleri ve şekerlerine göre gerçekleşmektedir. Meydana geliş şekillerine göre sınıflandırılmalarında aglikonun -OH (hidroksil grubu), -SH (tiyol grubu), -NH_2 (amin grubu), -CH grupları ile monosakkaritin -OH grubu arasında bir bağ meydana gelmesi durumuna göre ayrılırlar. Daha sonraki alt sınıflandırmalar aglikonun özelliğine göre yapılmaktadır (Aksu, 1972).

Glikozitlerin biyolojik aktivitelerinin, aglikon kısımları aynı olsa bile genel itibariyle şeker kısmından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Glikozitlerin, aglikona göre sudaki çözünürlüğünün daha iyi olduğu tespiti yapılmıştır. Moleküle glikozidik grubun bağlanması, molekülün hidrofilik özelliğinin artmasına neden olur. Bu durum, ilgili bileşiğin tıbbi özelliğine etki eder (Kren ve Martinkova, 2001).

Glikozitler değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Glikozidik bağlanmanın meydana gelmesinde söz sahibi atoma göre 4 ana grupta sınıflandırılabilir;

1. N-Glikozitleri (Glikozilaminler)
2. S-Glikozitleri (Tiyoglikozitler)
3. C-Glikozitleri
4. O-Glikozitleri

Fakat birçok bilimsel kaynakta aglikonlarının yapılarına göre glikozitlerin sınıflandırılması yapılmıştır. İçerdikleri aglikonların yapısına glikozidlerin dört ana grupta sınıflandırılması mümkündür. (Aksu, 1972);

1. Triterpenik ve Steroidal Glikozidler
2. Fenolik Glikozidler
3. Siyanogenetik Glikozidler
4. Sülfür Glikozidler

Fenolik glikozidler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir.

A. Flavonoid Glikozitler

a. Flavon ve flavonol glikozidler
b. C-glikozilflavonoidler
c. Çalkan ve aurone Glikozidler
d. Izoflavonoid Glikozidler

B. Basit Fenolik Glikozidler
C. Antosiyanin Glikozidler
D. Kumarin Glikozidler
E. Antrakinon Glikozidler

Triterpenik glikozidler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilirler.

A. Monodesmosidik Glikozidler

a. Nötral Glikozidler
b. Ester Glikozidler
c. Asidik Glikozidler
d. Açil Glikozidler

B. Bisdesmosidik Glikozidler

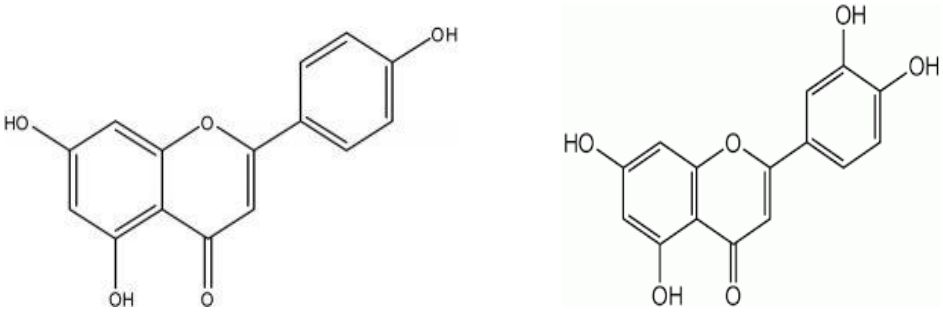
a. Nötral bisdesmosidik Glikozidler
b. Asidik bisdesmosidik Glikozidler

C. Hayvansal Glikozidler

Flavon ve flavonol glikozitler

Flavonoidler, bilindiği üzere fenolik bileşiklerdir. Sınıflandırılmalarında flavonoid bileşiklerini fenolik glikozitlerin bir mensubu olarak inceleyebiliriz.

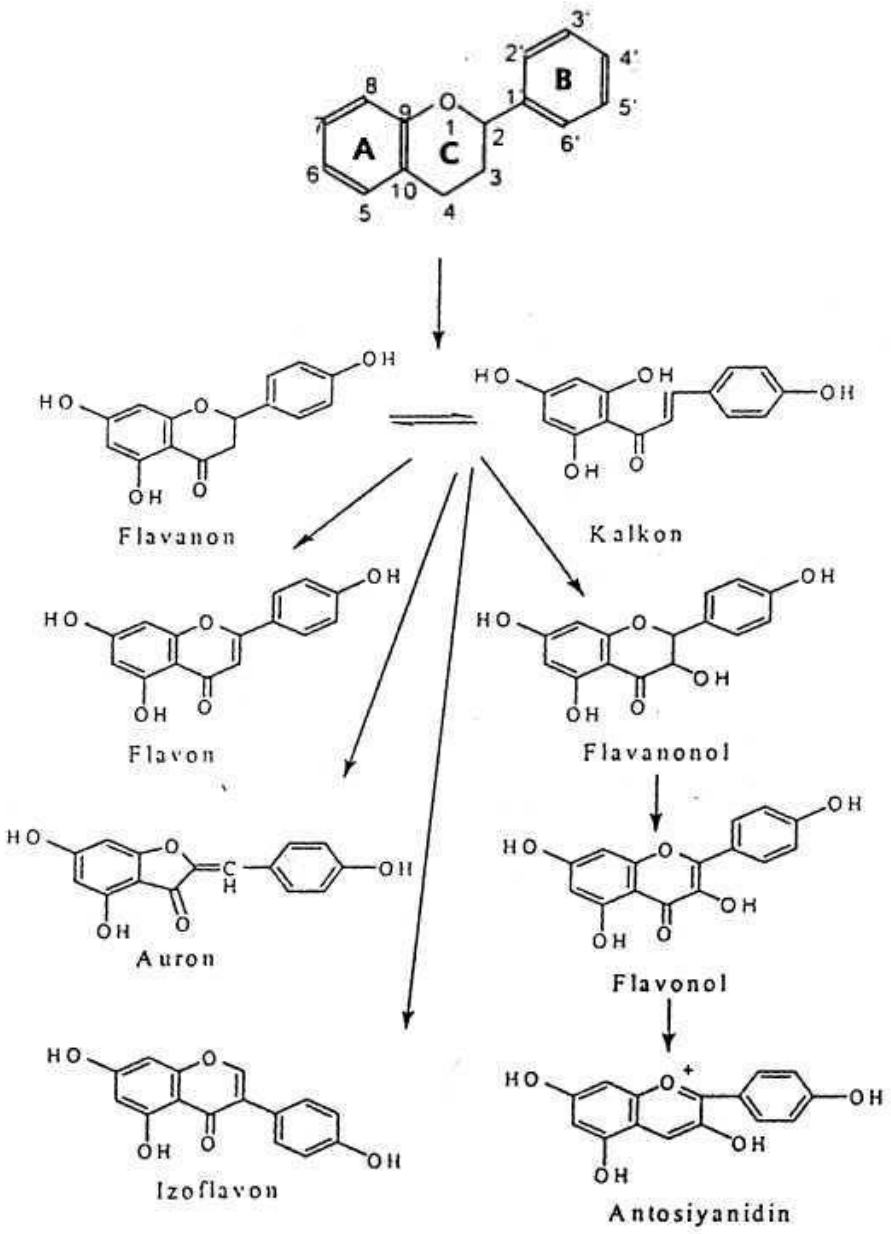
Flavonoid türleri içinde en yaygın olarak bulunan glikozit türleridir. Genel flavon yapısındaki A halkasında bulunan C-5 ve C-7 karbonlarına iki hidroksil grubu bağlanabilir. Kapalı tohumlu bitkilerde apigenin ve luteolin flavon glikozitlerden en çok bulunan yapılardır (Peterson ve Dwyer, 1998).



Apigenin Luteolin

Şekil 2.10. Flavon glikozitler

Flavonoidlerin yaklaşık %80'ini flavonlar ve flavonollar oluşturur. Flavonlar antioksidanlar olarak da bilinen sarı pigmentlerdir. Flavonlar doğal olarak serbest halde veya glikozit olarak bulunan moleküllerdir.



Şekil 2.11. Flavonoidlerin aromatik halka sübstütientine göre sınıflandırılması

Flavonların yapısını saptayan genel yöntem antosiyaninlerin yapısını gösteren yöntemle benzerlik gösterir. Önce serbest metoksi gruplarının sayısı ve fenolik grupların sayısı saptanır. Son olarak alkali füzyon veya hidroliz ile elde edilen maddeler araştırılır (Finar vd., 1983).

Doğada varolan flavonoid glikozitler genellikle monosakkarit grupları barındırır. Fakat yapılarında oligosakkarit (disakkarit, trisakkarit, vb.) bulunan glikozitlerde bitki

dünyasında genişçe yer bulur. Molekülünde monosakkarit, disakkarit veya trisakkarit bulunduran flavonoid glikozitlere, sırayla monozit, biozit ve triozit denilmektedir. Aglikon molekülünün iki hidroksil grubunun glikozillenmesinden meydana gelen glikozitler ise diglikozit veya bimonozitler olarak adlandırılır (Bilaloğlu vd., 1997).

Flavon ve flavonol glikozitler kumaş boyama gibi farklı bir kullanım alanında kullanılabildikleri gibi günümüzde diüretik etkilerinden de yararlanılmaktadır (Baytop, 1980).

C-glikozilflavonoidler

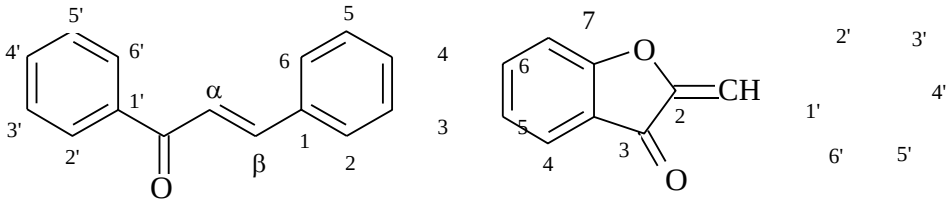
Flavonoid *C*-glikozitler, aglikonun aromatik halkasının 6-, 8- pozisyonlarına doğrudan şeker birimi veya birimlerinin, karbon-karbon bağı ile bağlanmasıyla meydana gelen yapılardır (Bilaloğlu vd., 1997). C-glikozilflavonoidler bir veya iki şeker molekülü bağlayabilir ve doğada O-glikozid şeklinde var olabilir (Harborne vd., 1975).

Şeker kalıntısının aglikona bağlanma tipine bağlı olarak *C*-glikozitler *O*-glikozitlerin hidrolizlenme koşullarında hidrolizlenmeyerek kimyasal olarak farklılık gösterirler (Harborne, 1967).

Şimdiye kadar flavonoid C-glikozitlerin yapılarında, β-D-glukopiranoz, β-D-ksilopiranoz, α-Dglukopiranoz, α-L-arabinopiranoz, β-D-galaktopiranoz ve β-Larabinopiranoz vb. şeker birimleri olduğu belirlenmiştir. Bitkilerden izole edilen di-C-glikozitlerin çoğunluğunu di-Cglikozilflavonlar meydana getirir. Flavonlar içinde ise, apigenin ve luteolin 6,8-di-Cglikozitleri daha geniş yer tutar (Bilaloğlu vd., 1997).

Çalkon ve aurone glikozidler

Çalkonlar, heterosiklik C halkasına sahip olmadıklarından flavonoidler içinde ender bir sınıfı meydana getirmektedirler. Antioksidan özelliklerine dair araştırmalar azdır. Bu çalışmalarda gösterilen antioksidan aktivite α, β arasında bir çift bağa sahip olmalarına ve halkasal yapılarında metoksi ve hidroksi gruplarına bağlanmıştır (Cioffi vd., 2003).



Şekil 2.12. Çalkon ve auron iskeletleri

Auronelar yukarıda olduğu gibi 2-benzilidenkumaranon yapısına benzerlik gösterir. Auronelarda karbonların pozisyonları B halkası için asal sayılar ve A halkası için asal olmayan sayılardan yararlanarak tanımlanır; bu nedenle avronlar normal flavonoidlerdir (Harborne, 1988).

Auronlar flavonoidler içerisinde en az karşılaşılan sınıftır. Doğada yaygın olarak bulunmazlar. Auronların analjezik etkiye sahip oldukları belirtilmektedir (Lawrence vd., 2003).

İzoflavonoid glikozitler

Bitkilerde yer alan doğal bileşikler içinde geniş bir sınıfı izoflavonoidler meydana getirmektedir. Bitkilerde belirlenen 3000'den fazla flavon ve 700'den fazla izoflavon mevcuttur. Yapıları 3-fenilbenzopiron'la (3-fenilkromon) benzerlik gösterir. Bu ana yapıda metilasyon, glikolizasyon ve hidroksilasyon derecelerinde değişkenlik vardır. Bitkilerde izoflavonların yapımı bir izoflavonoidin karbon iskeleti ve üç merkez atomunun oksidasyon derecesi ile ilgilidir (Cassidy vd., 1994; Klejdus, 1997; Wu Wang ve Simon, 2003).

Kumarinler

Kumarinler, birçok bitki türünde bulunan ve özellikle de yeşil bitkilerden izole edilen, doğal uçuculuğa sahip fitokimyasal sınıfta bir organik bileşiktir. Kumarin, parlak, beyaz kristal yapılı kapalı formülü $C_9H_6O_2$, molekül ağırlığı 146.15 g/mol olan bileşiklerdir (Maggi vd., 2011). Etanol, kloroform, metanol, dietil eter ve yağlarda kolay şekilde çözünmektedirler (Yao vd., 2011). Farmakolojik açıdan flavanoid grubu içerisinde yer almaktadır. Yaklaşık 1300 kadar kumarin türevinin doğal yollarla elde edildiği bilinmektedir. Hint baklası, böğürtlen, ahududu, tonka fasulyesi, lavanta, kayısı, vişne,

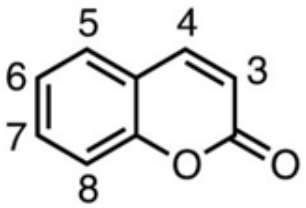
çilek, geyikdili, kiraz ve tarçını da içeren bir çok bitkide meyve, kabuk, gövde ve yaprak kısımlarında belli oranlarda doğal olarak bulunmaktadır (Robert vd., 1982).

Kumarin türevleri özellikle biyolojik aktiviteye sahip oldukları için ilaç endüstrisinde antiviral, antibiyotik, antimikrobiyal ve antikoagulant ajan olarak, biyolojik sistemlerde pH indikatörü olarak, bunun yanı sıra tıp ve kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır (Karaliota vd., 2001; Oıfe L.ve Richard O., 2004; Georgieva vd., 2010).

Kumarin ve kumarin türevleri tıpta kanın pıhtılaşmasını engellemesi nedeniyle kullanılırken, kanser tedavisinde ve HIV inhibitörü olarak AIDS hastalığının tedavisinde de kullanılmaktadır. Damarlardaki kan akış hızını artırmakta ve kapiler geçirgenliği azaltmaktadır. Kumarinin uzun süre ve yüksek dozda kullanılmasının toksik etki yarattığı ve karaciğeri tahrip ettiği anlaşılmıştır (Rodrigues vd., 2008). Hoş kokuları ile bilinen kumarinler, hoşa gitmeyen kokuları maskelemek amacıyla da kullanılmaktadır (Guenther, 1975).

1867 yılında Strecter, 1868 yılında ise Fitting kumarinin kimyasal yapısı hakkında ilk doğru yapıları ortaya atmıştır. (Sethna ve Shah, 1945). Kumarinler bitkilerden izole edilerek elde edilebildiği gibi sentetik ve yarı sentetik olarakta sentezlenebilmektedir. Kumarinler genel olarak Perkin, Pechmann, Knoevenagel, Wittig, Reformatsky ve reaksiyonlarından biri kullanılarak sentezlenir. Pechmann reaksiyonu iyi bir verimle kumarin sentezine olanak sağladığından en çok kullanılan metottur (Maggi vd., 2011).

Kumarin bileşiği altı noktadan sübstitüe olmaya elverişli olduğundan farklı noktalara farklı sübstitüentlerin bağlanması durumunda kumarin bileşikleri farklı özellikler kazanmaktadır. (Yao vd., 2011). Bu yüzden kumarin türevleri ile ilgili çalışmalar artarak günümüzde de devam etmektedir.



2H-1-benzopiran-2-on

Şekil 2.13. Kumarin Yapısı (Rodrigues vd., 2008)

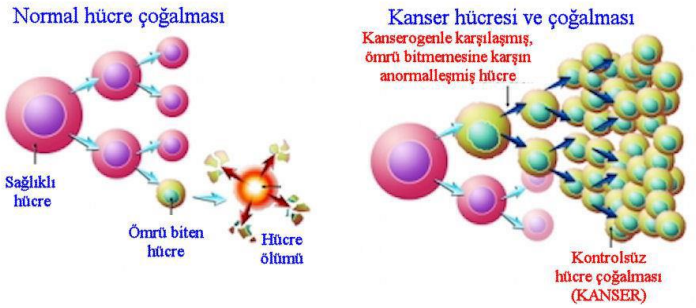
2.3. Antikanserojen Aktivite

Kanser, hücrelerde meydana gelen DNA hasarı sebebiyle hücrelerin kontrolsüz ve/veya anormal olarak büyümesi ve çoğalması olarak tanımlanan bir hastalıktır. İnsan vücudunda günde tahminen 10.000 DNA mutasyonu meydana gelmesine karşın bağışıklık sistemimiz her milisaniye vücudumuzu incelemekte ve kanserli hücreleri bertaraf etmektedir**.** Ölen hücrelerin yenilenmesi ve hasar gören dokuların onarılması için normal vücut hücreleri bölünebilme özelliklerini kullanmaktadırlar (Atıcı, 2007).

Hücrelerin sınırları dışında büyümesi, yakınında bulunan hücreleri istila etmesi ve diğer organlara da sıçraması kanserlerin en belirleyici özelliğidir. Bu tür aşamalar metastaz olarak tanımlanmaktadır ve metastaz; kanserden ölümlerin en önemli sebebidir (Dünya Sağlık Örgütü, 2011).

Kanser dünyada giderek artan önemli bir sorun olarak görülmektedir. Günümüzde moleküler onkoloji ve genetik biliminde kanserleşme sürecine ilişkin önemli gelişmeler sağlanmakla birlikte kanserin nedeni ve oluşma mekanizması diyabet gibi tam olarak belirlenememiştir. Kimyasallar, mesleki maruziyet, toksinler, iyonizan radyasyon, kronik enfeksiyöz ajanlar ve diyabet içinde risk faktörü olan yaş, cinsiyet, fiziksel aktivite, obezite, alkol, diyet, sigara kullanımı gibi pek çok etiyolojik ajan saptanmıştır (Boyle P vd., 2010).

İnsanlardaki kalıtsal farklılaşma (mutasyonlar), kimyasalları aktifleştiren ve düzenleyen enzimlerin durumu ve ekspresyonunu (karsinojen metabolizmasını) etkileyen bireysel genetik çeşitlilikler kanser riskinin artışına sebep olan en önemli faktörlerdir (Ekmekçi A vd., 2008).



Şekil 2.14. Normal ve kanser hücresi arasındaki fark (www.bestepebloggers.com)

Akciğer, göğüs, prostat ve serviks gibi pek çok kanser tipi bulunmaktadır. Özellikle göğüs ve serviks kanseri kadınlarda çoğunlukla rastlanılan kanser türleri olurken erkeklerde en çok karşılaşılan kanser türü prostat kanseridir. Göğüs kanseri kadınlar arasında görülen en geniş kanser çeşitlerinden biridir ve kanser ölümlerinin en sık karşılaşılan türünün ikincisidir (Merrill ve Weed, 2001).

Kanser hücrelerinde fizyolojik olarak altı önemli farklılık gözlenmiştir. Büyüme sinyallerinde yeterlilik, büyümeyi önleyen sinyallere karşı ilgisizlik, apoptoza direnme, daimi proliferatif potansiyel, devamlı anjiyogenez ve metastazdır. Kanser için tedavi yöntemlerinden biri, genel olarak kemoterapidir. Kemoterapi, kanser hücrelerinin yok edilmesine neden olurken, aynı zamanda sağlıklı hücrelerede zarar vererek dokuların hasar görmesine veya ilaç direncinin artmasına sebep olmaktadır (Hurley, 2002).

Kanser tedavisinde; tümörün bünyede meydana geldiği dokuya, tümörün özelliğine, geldiği aşamaya ve hastanın fizyolojik durumuna göre pek çok tedavi şekli vardır. Bu tedavi metodlarında kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, monoklonal antikor terapileri, gen terapisi ve cerrahi müdahale gibi birçok yöntem vardır (Seçme M, 2014).

Bütün hastalıkların tedavisinde temel rolü bağışıklık sistemi oluşturmaktadır. Bağışıklık sistemini zayıflatan sebeplerin yok edilmesi tedavinin ilk aşamasını oluşturur. Kanserli hücre ve/veya hücrelerin nereye ve ne ölçekte metastaz yaptığını belirlemek imkansız olduğu için kanser tedavisi alan hastanın bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesi ve yayılmış hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından etkisiz hale getirilmesi temel amaçtır (Atıcı, 2007; Sigerist, 1960).

Kanserin tamamen ortadan kaldırılmasının mümkün olmadığı durumlarda sitotoksik ilaçlar kanserin gelişmesini durdurur ve yayılmasını engeller. Eğer kanser son aşamada ise kesin tedavisini ve yayılmasını önleyemeyebilir. Böyle durumlarda, hastalığın özelliklerine göre tedavi ve yaşam kalitesini artırmak temel amaç olmaktadır (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Mycek, 2001).

Kanser tedavisinde ilaçlar genellikle hastalarda önemli derecede yan etkilere sebep olmakta ve suboptimal seviyelerde kullanılma ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, doğal bileşiklerden elde edilen kimyasal önleyici maddeler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır (Tomasz vd., 2018).

Daha etkili antikanser etki gösteren ajanlarının geliştirilmesi için devam eden çeşitli araştırmalar ve tedavi yöntemleri vardır. Kanser tedavisi için istifade edilen ilaçların yaklaşık %75'ini doğal ürünler oluşturmaktadır. Günümüzde kullanılan ilaçlarının etkilerine göre daha seçici, daha güçlü ve daha az toksik bileşikler bulmak maksadıyla, farklı kaynaklardan gelen yeni doğal ürünler incelenmektedir (Gao vd., 2018).

Wu ve arkadaşları *T. parthenium* bitkisinin etanol ekstresinin iki farklı insan meme kanseri hücresi ve serviks kanseri hücresi üzerine tesirini incelemişlerdir. Etanol ekstresinden elde edilen partenolitinin bütün kanser hücrelerinin büyümesini önlediğini bulmuşlardır (Wu vd., 2006).

2.4. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller en dış elektron kabuğundan bir elektron yitirmiş olduklarından bu elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşmaya meyillidirler (Halliwell vd., 1992).

Bir ya da birden çok ortaklanmamış elektronun var olması o maddenin magnetik bir alana sürüklenmesine yol açar ve bazende o maddenin oldukça aktif olmasına sebep olur. Bugün kimya ve biyolojide pek çok serbest radikal bulunmaktadır (Brent ve Rumack, 1991).

Canlı yaşamı için oksijen hayati derecede önemli bir elementtir. Solunum yoluyla havadan alınan oksijen daha sonra mitokondride kademeli olarak indirgenmekte ve suya metabolize olmaktadır (Cadenas ve Davies, 2000). Fakat bazen oksijen reaksiyonu sona ermeden vücudu terk eder ve geride reaktif ara ürünler bırakır. Bu ara ürünler genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak adlandırılmaktadır (Gülçin vd., 2003). ROS'lar canlı organizma için sakıncalı olan oksidasyon ürünlerini meydana getirebilirler. Bu durum "Oksidatif Stres" olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif strese genel olarak reaktif oksijen ve azot neden olmaktadır (Papas, 1996).

Reaktif oksijen türleri havayla solunum yapan bütün organizmalarda vardır ve bunlar süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit radikalini kapsamaktadır (Halliwel, 1999). Oksidatif stres; kanser, yaşlanma, kalp hastalıkları, diyabet ve diyabetin komplikasyonları olmak üzere pek çok patolojik tablonun ve de yaşlanmanın patogenezi ile alakalıdır (Atalay vd., 2002).

Serbest radikal meydana getiren kaynaklar radyasyon, UV ışınları, X-ışınları, fosil yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, sanayi atıkları, enfeksiyonlar, stres, hücre metabolizmasının toksik ürünleri ve birçok başka faktörlerdir. Radikal tepkimeleri biyoloji ve tıpta hayati bir öneme haizdir ve yaşayan canlılarda her an oluşmakta ve yok olmaktadır (Sies, 1991). Radikal yapılar aşağıda belirtilen üç yolla ortaya çıkabilirler:

a) ***<u>Kovalent bağların homolitik kırılması ile</u>:*** Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500 - 600 °C) kimyasal bağların kopmasına neden olmaktadır. Kopma esnasında bağ yapısındaki iki elektron eşit şekilde farklı atomların üzerine yerleşmektedir. Üzerlerinde eşleşmemiş elektron olmasından dolayı bu atomlar radikalik özellik gösterirler (Kılınç ve Kılınç, 2002).

$$A : B \longrightarrow A^{\bullet} + B^{\bullet}$$

b) ***<u>Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile</u>:*** Radikal olmayan bir molekülün elektron kaybetmesi sonucunda dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalmakta ve bunun sonucunda molekül radikal özellik sergilemektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

$$A : \longrightarrow A^{\bullet} + e^{-}$$

c) ***<u>Normal bir moleküle elektron transferi ile:</u>*** Radikal olmayan bir molekülün elektron alarak dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalmakta ve bunun sonucunda molekül radikal özellik sergilemektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

$$B + e \longrightarrow B^{\bullet}$$

Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri eşleşmemiş elektron bulundurmalarına rağmen serbest radikal özellik göstermezler. Ancak serbest radikallerin meydana gelmesinde önemli payları vardır (Altınışık, 2000).

Tablo 2.4. Radikal ve radikal olmayan türler

Radikal Türler	**Radikal olmayan Türler**
Moleküler oksijen, O_2	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Süperoksit, $O_2^{\bullet -}$	Hipokloröz asit, HOCl
Hidroksil, $OH^{\bullet}$	Ozon, O_3
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Singlet oksijen
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Peroksinitrit
Hidroksiperoksil, $HO_2^{\bullet}$	Nitröz Asit (HNO_2)
Azot Oksit ($NO\bullet$)	Nitroksi Anyonu (NO^-)

Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) radikali moleküler oksijenin (O_2) bir elektron almasıyla oluşmaktadır (Halliwell, 1989).

$$O_2 \quad + \quad e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -}$$

Hidrojen peroksit Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) meydana getirmekte ve UV ışınlarının etkisiyle de $OH^{\bullet}$'e dönüşmektedir (Asad vd., 2004; Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

$$H_2O_2 \xrightarrow{UV} 2OH^{\bullet}$$

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{Süperoksit dismutaz}} H_2O_2 + O_2$$

Hidroksi radikali ($OH^{\bullet}$), Fenton reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksidin indirgenmesiyle ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda hidrojen peroksidin süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) ile reaksiyonundan oluşmaktadır (Choe ve Min, 2006).

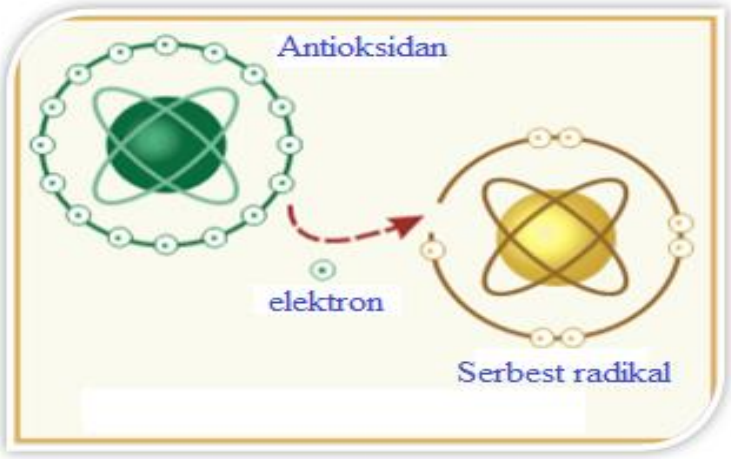
Fenton reaksiyonları:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$$

$$H_2O_2 + Cu^+ \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Cu^{2+}$$

Haber-Weiss reaksiyonu:

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{H^+} OH^{\bullet} + O_2 + H_2O$$



Şekil 2.15. Serbest radikalin nötralizasyonu (Engin, 2007)

Serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyonunu engelleyen, yavaşlatan, durduran bileşikler antioksidanlar olarak nitelendirilirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid oksidasyonunu inhibe etmektedirler (Halliwel vd., 1992; Halliwell, 1994).

Canlı organizmalarda antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin var olması yaşam için önemli bir gereksinimdir. Antioksidan özellikteki maddeler antimutajenik,

antikarsinojenik, yaşlanmayı geciktirici gibi birçok etki oluştururlar (Cook ve Saman, 1996). Antioksidan maddelerin yetersizliğinde reaktif oksijen ve azot türleri kanser, diabet, kireçlenme, parkinson, AIDS, beyin ve kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın görülmesine neden olur (Packer ve Cadenoas, 2002).

Dışarıdan alınan antioksidan maddeler, doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sentetik olanlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ), troloks ve diğer sentetik antioksidan maddelerden oluşmaktadır (Mavi, 2005). Doğal antioksidanlar ise bitkilerin bütün kısımlarında vardır. Bu bitkiler, karotenoitler, fenolik bileşikler, vitaminler, glutatyon ve endojen metabolitler içerirler (Larson, 1988). Doğal antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen en sık bulunan maddelerdir. Sentetik antioksidanların istenmeyen zararlı yan etkileri olduğundan kullanımları son zamanlarda önemli ölçüde azalmıştır (Gülçin, 2005). Bundan dolayı doğal antioksidanlara olan eğilimler artmış ve bitki merkezli araştırmalar yoğunlaşmıştır.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

-Temizleyici (Scavenging effect): Serbest radikallere etki ederek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle dönüştürme.

- Bastırıcı etki (Quencher effect) : Serbest radikallerle etkileşime girip onlara bir hidrojen vererek aktivitelerini güçlendirme.

-Onarıcı etki (Repair effect): Serbest radikallerin oluşturdukları zararın tamir edilmesi.

- Zincir kırıcı etki (Chain breaking effect) : Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını önleme (Keleştemur, 2011).

Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

-Radikal süpürme kapasitesi

-Hidrojen veya elektron donör olarak sergilemiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)

-Metal şelatlama kapasitesi

-Diğer antioksidanlarla olan iletişim durumu (Castellani vd., 2006)

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan yöntemler ise ikiye ayrılır:

1) Elektron transferine dayanan yöntemler: Oksidan maddenin indirgenmesi sonucu oluşan renk farklılığı ile antioksidan maddenin ölçümü yapılır. Renk değişiminin düzeyi örnekteki antioksidan maddenin konsantrasyonu ile ilişkilidir (Castellani vd., 2006). Bu yöntemlerden bazıları:

- DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest radikal giderim yöntemi

- FRAP-ferric reducing antioxidant power- (Demir iyonu indirgeme gücü metodu)

- CUPRAC-Cupric reducing antioxidant capacity- yöntemi

- TEAC/ABTS-Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi

2) Hidrojen atomu trasferine dayanan yöntemler: Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar meydana gelir. Genellikle azotlu grup taşıyan maddelerin bozulup peroksil radikalleri oluşumu ilkesine dayanmaktadır (Castellani vd., 2006). Bu yöntemlerden bazıları:

- Düşük dansiteli lipoprotein otooksidasyonunun neden olduğu inhibisyon

- Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC)

- Toplam radikal yakalama parametresi (TRAP)

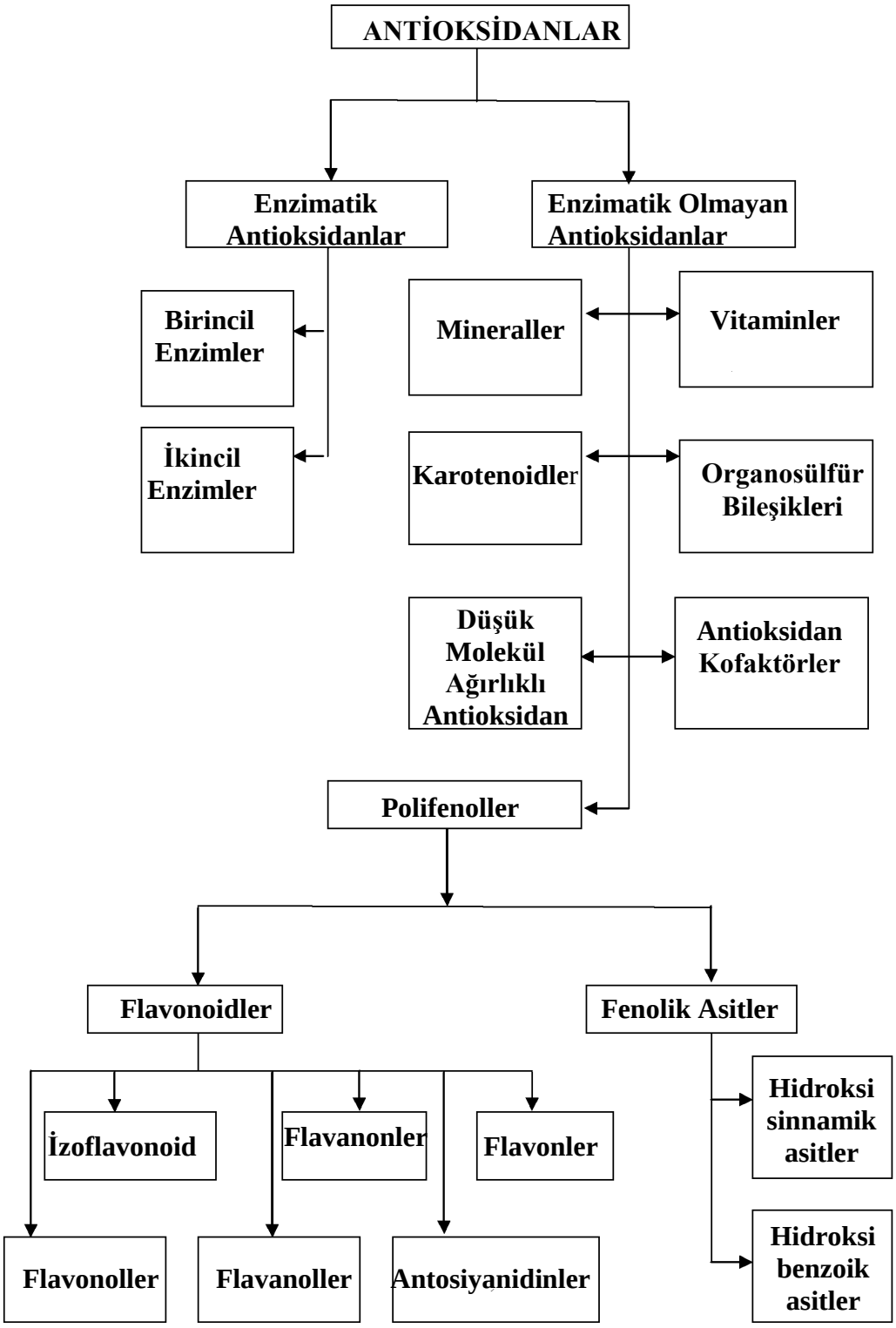
- Luminol yöntemi

- Fikoeritrin esaslı yöntemler

- DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi

- Krosin yöntemi

- TOSC (Toplam oksiradikal) yöntemi



Şekil 2.16. Antioksidanların sınıflandırılması (Çakar, 2010)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

- Diklorometan (SIAL)
- Etil alkol (SIAL)
- Metil alkol (SIAL)
- Bütanol (SIAL)
- Hekzan (SIAL)
- Etilasetat (SIAL)
- Aseton (SIAL)
- Sülfürik asit
- Kloroform (SIAL)
- DPPH radikali (SIAL)
- İnce Tabaka Kromatografisi hazır alüminyum plakları (Slica gel 60 F_{254})
- Kolon Dolgu Maddesi (silikajel 70-230 mesh Merck)
- Kolon Dolgu Maddesi (sephadex LH-20 Merck)
- C-18 (50µm Spherical, EcoFlex)
- $FeCl_3$ (SIAL)
- DMSO (SIAL)
- Trolox (SIAL)
- ABTS· (SIAL)
- EDTA (SIAL)
- $K_2S_2O_8$ (Merck-Germany)
- Ferrozin (SIAL)
- $FeCl_2$ (SIAL)
- Tripsin EDTA (SIAL)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose (DMEM, SIAL)
- İnsan Meme Kanser Hücre Hattı (MCF-7) (American Type Culture Collection, LGC Promochem, UK)

- İnsan Meme Kanser Hücre Hattı (MDA-MB-453) (American Type Culture Collection, LGC Promochem, UK)
- %1 L- Glutamine (Lonza, Belgium)
- %10 Fetal Bovine Serum (Lonza, Belgium)
- %1 Penicillin–Streptomycin (Pen Strep)
- PBS (Lonza, Belgium)
- XTT Kiti (Biological Industries, Israel)
- Tripan Mavi Boyası (Biological Industries, Israel)
- Karboplatin (Sigma-Aldrich-Germany)

3.1.2. Kullanılan malzeme, alet ve cihazlar

- Hassas terazi (Shimadzu, ATX224)
- Otomatik pipetler (Isolab, Eppendorf, Axygen)
- Vorteks (WiseMix Wisd VM-10)
- Evaporatör (Heidolp)
- Magnetik karıştırıcı (MR Hei-Standart)
- Etüv (WiseVen)
- UV lamba (Camag)
- CO_2 inkübatör (Nüve, EC160)
- Peristaltik Pompa (Ismatec Mcp)
- Orbital Çalkalayıcı (WiseShake Wisd SHO-2D)
- Santrifuj (H-2050R)
- Ters Faz Kontrast Mikroskopu (Nikon Eclips Tİ-U)
- -80 °C dondurucu (Haier, DW-86L628)
- ELISA Plaka Okuyucusu (Epoch, BioTek)
- Su Banyosu (Memmert)
- Ultrasonik Banyo (Isolab)
- Biyogüvenlik Kabini (Bilser Class II)
- ^{1}H NMR (Agilent 400 MHz Spektrometre)
- ^{13}C NMR (Agilent 400 MHz Spektrometre)
- Çeşitli Cam Malzemeler

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.1. DPPH$^{\bullet}$ serbest radikal giderme

1. 5 mg DPPH$^{\bullet}$ Radikal çözeltisi: 5 mg DPPH$^{\bullet}$ Radikali alınarak 100 ml etanol içerisinde çözündü ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında iki saat karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3.2. ABTS$^{\bullet+}$ serbest radikal giderme

1. 20 mL 7 mM ABTS çözeltisi: 76,8 mg ABTS alınarak saf suda çözündü. Daha sonra toplam hacmi 20 mL olacak şekilde saf su ilavesi ile hazırlandı.

2. 20 mL 2,45 mM $K_2S_2O_8$ çözeltisi: 13,25 mg $K_2S_2O_8$ alınarak saf suda çözündü. Daha sonra toplam hacmi 20 mL olacak şekilde saf su ilavesi ile hazırlandı.

3. ABTS$^{\bullet}$ serbest radikal çözeltisi: 20 mL 7 mM ABTS ve 20 mL 2,45 mM $K_2S_2O_8$ alınarak 1:1 oranında eklendi ve 734 nm'de yaklaşık 0,60-0,70 birim absorbans verinceye kadar (yaklaşık 1/120 oranında) metanol ilavesi ile derişimi ayarlandı.

3.1.3.3. Metal şelatlama kapasitesi

1. 50 mL 2 mM $FeCl_2*4H_2O$ çözeltisinin hazırlanması: 19,8 mg $FeCl_2*4H_2O$ alınarak saf suda çözündü ve toplam hacmi 50 mL olacak şekilde saf su ilavesi ile hazırlandı.

2. 50 mL 5 mM Ferrozin çözeltisinin hazırlanması: 123 mg Ferrozin alınarak saf suda çözündü ve toplam hacmi 50 mL olacak şekilde saf su ilavesi ile hazırlandı.

3.1.3.4. İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisinin hazırlanması

1. Sülfürik Asit (H_2SO_4) çözeltisinin hazırlanması: 10 ml derişik H_2SO_4 üzerine 90 ml etil alkol ilavesi ile hazırlandı.

3.1.3.5. Tripsin EDTA çözeltisinin hazırlanması

1. Oda sıcaklığında ya da 37 ^{o}C'de çözünen Tripsin EDTA çözeltisi steril kabinde 10 ml hacimli steril tüplere alınarak -20 ^{o}C'de muhafaza edildi.

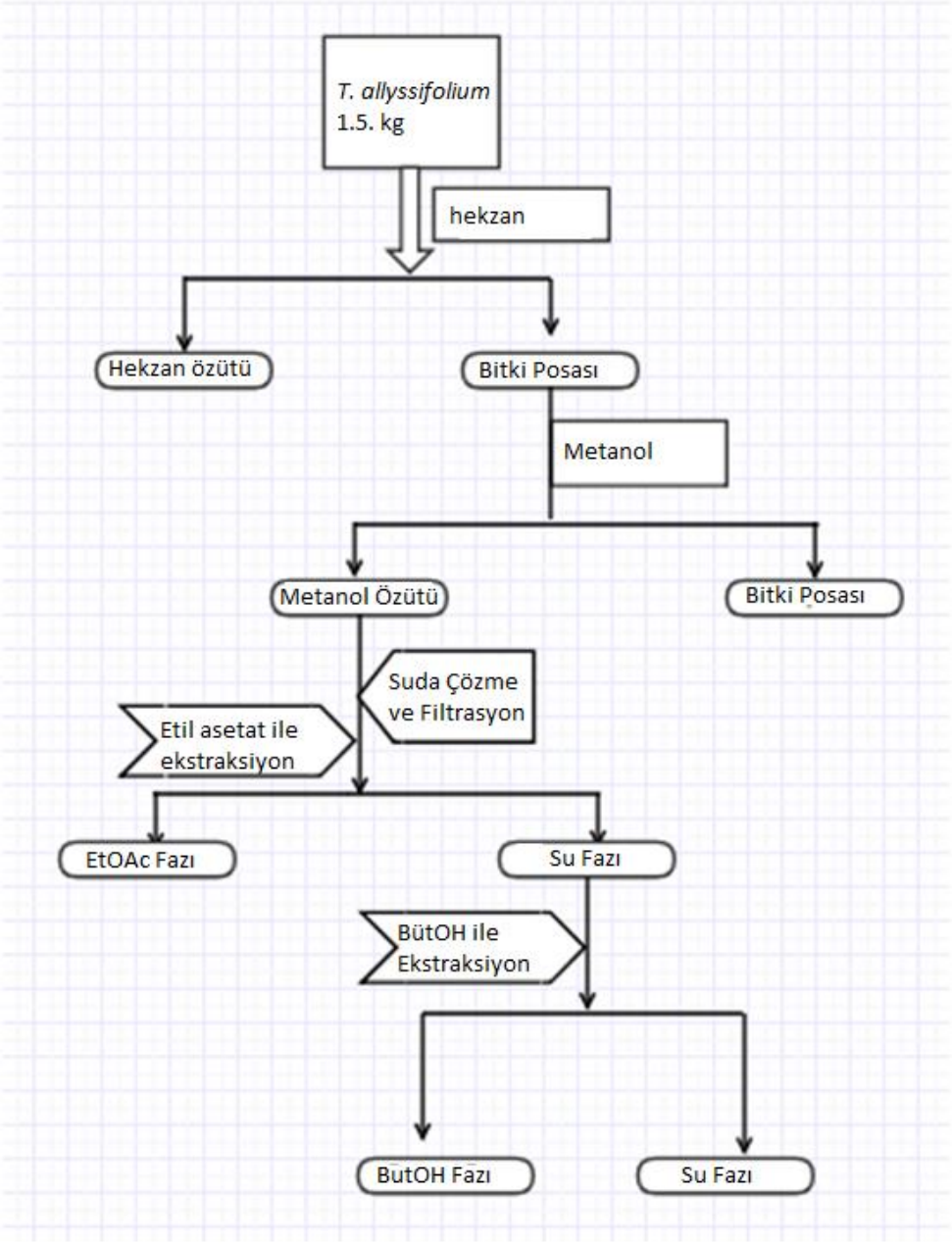
3.2. Yöntem

3.2.1. *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toplanması ve kurutulması

Tanacetum alyssifolium bitkisi 2014 yılı haziran ayında Erzincan'ın İliç ilçesinden bitki popülasyonuna zarar vermeyecek şekilde toplandı. Bitkisel materyalin tanısı Erzincan Üniversitesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali Kandemir tarafından yapıldı. Toplanan bitkisel materyaller oda sıcaklığında güneş ışığı almayacak şekilde kurutuldu.

3.2.2. *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin ekstraksiyonu ve su ekstresinin hazırlanması

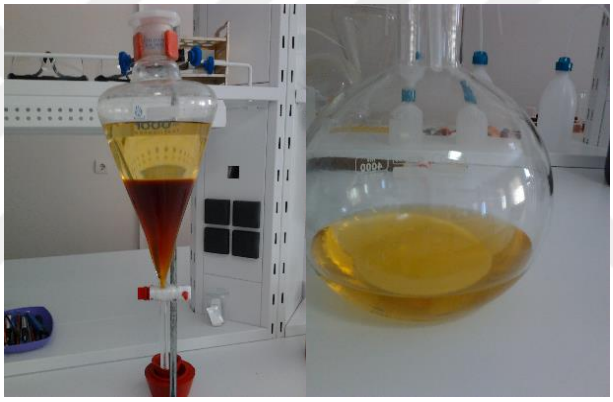
Toplanıp kurutulan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin toprak üstü kısımları blenderde öğütülerek 4L lik iki cam balona konuldu ve yaklaşık 4 L hekzan ilavesi ile ağzı kapatılarak 24 saat boyunca oda şartlarında bekletildi. Hazırlanan ekstre süzgeç kağıdı ile süzüldü ve üzerine tekrar hekzan eklendi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrarlandı ve organik fazlar birleştirilerek hekzan evaporatörde uzaklaştırıldı. Geride kalan bitki ekstresi tekrar oda şartlarında kurutuldu. Kurutulan bitki tekrar 4L lik iki cam balona konuldu ve yaklaşık 4 L metanol ilavesi ile 24 saat boyunca oda şartlarında bekletildi. 24 saat bekletildikten sonra ekstre süzgeç kağıdı ile süzüldü ve üzerine tekrar metanol ilave edildi. Bu işlem aynı şekilde 5 kez tekrarlandı ve elde edilen ekstre süzüntüleri temiz bir şişede birleştirildi. Birleştirilen fazlar ve metanol evaporatörde uzaklaştırıldı. Metanolü uzaklaştırılan ekstreye 60 ^{o}C saf su ilave edildi ve vakum altında süzülerek bitkide bulunan klorofiller uzaklaştırıldı. Klorofiller arındırıldıktan sonra koyu kırmızı renkte sulu ekstrakt elde edildi.



Şekil 3.1. Bitkisel materyalin hazırlanma şeması.

Şekil 3.2. Vakum altında süzülmesi ve klorofillerin ayrılması

Klorofillerinden arındırılan koyu kırmızı renkteki sulu ekstrakt tekrar ayırma hunisine alındı. Daha sonra etil asetatın miktarı sulu ekstraktın miktarından fazla olacak şekilde ayırma hunisine etil asetat ilave edildi. Etil asetat eklenince üstte etil asetat fazı altta sulu faz olmak üzere iki faz meydana geldi. Etil asetat fazı alınarak sulu faz tekrar ayırma hunisine konularak etil asetat eklendi. Bu işlem 5 kez aynı şekilde tekrar edildi ve elde edilen etil asetat fazı alınarak temiz bir şişede toplandı. Daha sonra bütanol miktarı fazla olacak şekilde ayırma hunisine bütanol ilave edildi. Bütanol eklenince üstte bütanol fazı altta sulu faz olmak üzere iki faz meydana geldi. Bütanol fazı temiz bir şişeye alındı ve sulu faz tekrar ayırma hunisine konularak bütanol ilave edildi. Bu işlem 5 defa aynı şekilde tekrar edildi. Elde edilen bütanol fazıda ayrılarak sulu fazımız elde edilmiş oldu.



Şekil 3.3. Etilasetat ile ekstraksiyon

3.2.3. Kromatografik yöntemler

Tanacetum alyssifolium bitkisinden elde edilen su fazında bulunan saf maddeleri izole etmek için kolon kromatografisi ve ince tabaka kromografisinden yararlanıldı.

3.2.3.1. Kolon kromatografisi

Su ekstresinde bulunan saf bileşiklerin izolasyonunda ve ekstrenin fraksiyonlandırılmasında kolon kromatografisinden yararlanıldı. Kolonda ayrımı yapılacak materyalin özelliğine bağlı olarak çeşitli kolon dolgu maddeleri kullanılabilir. (Örneğin; silika, sephadex, C-18, alümina vb.) İlk olarak ekstre kolona verilmeden önce İTK ile kolonun hareketli fazı saptandı. Kolonun hareketli fazı belirlendikten sonra

kolonun alt kısmına kullanılacak dolgu maddesi geçmeyecek şekilde pamuk koyuldu. Kolon dolgu maddesi hareketli faz ile karıştırılarak bulamaç halinde kolona yüklendi. Daha sonra birbiri ardına kullanılacak olan silikajelin ve sephadexin kolona tamamen yerleşmesi ve boşluk olmaması için alttan çözücü alınıp tekrar kolona eklenmek suretiyle şartlandırılması yapıldı. Ekstre kolonun üst kısmından homojen olacak şekilde kolona yüklendi. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayrımına göre apolar çözücüden polara doğru ya da polar çözücüden apolara doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisine uygulandı. Elde edilen fraksiyonların miktarına göre daha küçük boyuttaki kolonlardan faydalanarak uygun yeni kolonlar hazırlandı.

Su ekstresinin fraksiyonlandırılması:

Tanacetum alyssifolium bitkisine bölüm 3.2.2'deki işlemlerin uygulanması neticesinde bitkiden 40 gram su ekstresi elde edildi. Bu ekstre kolona verilmeden önce saf su çözüldü ve ince tabaka kromatografisi yöntemi ile değişik çözücü sistemlerinde incelendi. İnce tabaka kromatografisinde meydana gelen bantların ve renklerin yardımıyla hareketli faz saptandı. İTK sonuçlarına göre C-1 kolonunda başlangıç çözücüsü olarak saf su kullanıldı. C-18 kolonu saf su ile şartlandırıldı, kolon dengelendi. 40 gram su ekstresi 5'er gram alınmak suretiyle saf su ile çözündü ve kolona peristaltik pompa vasıtasıyla yüklendi. C-18 kolonunda sabit faz apolardır. Bu yüzden mobil faz, polardan başlayarak apolara doğru hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemlerinden oluşturuldu. Peristaltik pompa vasıtasıyla hazırlanan çözücü sistemleri kolon kromatografisine uygulandı.

Tablo 3.1. Su ektresinin C-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı (mL)
1-10	%100 Saf Su	1000
11-15	%2,5 MeOH- Saf Su	1000
16-17	%5 MeOH- Saf Su	1000
18-20	%10 MeOH- Saf Su	1000
21-25	%15 MeOH- Saf Su	1000
26-31	% 20 MeOH- Saf Su	1000
32-36	%30 MeOH- Saf Su	1000
37-42	%35 MeOH- Saf Su	1000
43-45	%40 MeOH- Saf Su	1000
46-48	%50 MeOH- Saf Su	1000
49-50	%55 MeOH- Saf Su	1000
51-52	%60 MeOH- Saf Su	1000
53-54	%70 MeOH- Saf Su	1000
55-60	%75 MeOH- Saf Su	1000
61-70	%100 MeOH	1000

C-1 kolonundan elde edilen Tablo 3.1'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar birleştirildi. Bu işlemler sonucunda su ekstresinin C-1 kolonundan 3-5, 6-14, 15-24, 25-41, 42-51 ve 52-70 olmak üzere 6 fraksiyon elde edildi. Bu işlem 8 kez tekrar edildi.

C-1 kolonundan elde edilen 4. grup (25-41) fraksiyonuna C-2 kolonu yapıldı. Bu ekstre kolona tatbik edilmeden önce % 25 MeOH- Saf su ile çözüldü ve ince tabaka kromatografisi yöntemi ile değişik çözücü sistemlerinde incelendi. İnce tabaka kromatografisinde oluşan bantların ve renklerin yardımıyla kolon kromatografisi için hareketli faz saptandı. İTK sonuçlarına göre C-2 kolonunda hareketli faz olarak %25 MeOH-Saf su kullanıldı. Kolon şartlandıktan sonra 4. grup (25-41) fraksiyonu % 25 MeOH- Saf su ile çözünerek peristaltik pompa yardımıyla kolona yüklendi. C-2 kolonunda saf su ve methanol çözücüleri ile hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemleri kullanıldı. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayrımına göre polaritesi

yüksek çözücüden polaritesi düşük çözücüye doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisine uygulandı.

Tablo 3.2. C-2 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı (mL)
1-9	%25 MeOH- Saf Su	200
10-32	%40 MeOH- Saf Su	200
33-36	%50 MeOH- Saf Su	200

C-2 kolonundan elde edilen Tablo 3.2'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar bir araya toplandı. Bu işlemler neticesinde su ekstresinin C-2 kolonundan 2-8, 13-20, 22-30 ve 31-36 olmak üzere 4 fraksiyon elde edildi. C-2 kolonundan elde edilen 2. grup (13-20) fraksiyonuna S-1 kolonu yapıldı. 100 gram silikajel (70-230 mesh Merck) etil asetat ile bulamaç haline getirildikten sonra kolona yüklendi ve kolon dengelendi. Bu ekstre kolona tatbik edilmeden önce metanolle çözüldü ve ince tabaka kromatografisi yöntemi ile çeşitli çözücü sistemlerinde gözlemlendi. İnce tabaka kromatografisinde oluşan bantların ve renklerin yardımıyla kolon kromatografisi için hareketli faz saptandı. İTK sonuçlarına göre S-1 kolonunda hareketli faz olarak etil asetat (EtOAc) kullanıldı. 2. grup (13-20) fraksiyonu metanolle çözüldükten sonra kolona yüklendi. S-1 kolonunda etil asetat ve metanol çözücüleri ile hazırlanan farklı oranlardaki çözücü sistemlerinden yararlanıldı. Ekstrenin ince tabaka kromatografisindeki ayrımına göre polaritesi düşük çözücüden polaritesi yüksek çözücüye doğru çeşitli çözücü ve çözücü karışımları hareketli faz olarak kolon kromatografisinde tatbik edildi.

Tablo 3.3. S-1 kolonundan elde edilen eluatlar ve kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Mobil Faz Miktarı
1-9	%100 EtOAc	200
10-22	%10 EtOAc- MeOH	200
23-33	%20 EtOAc- MeOH	200
34-45	%25 EtOAc- MeOH	200

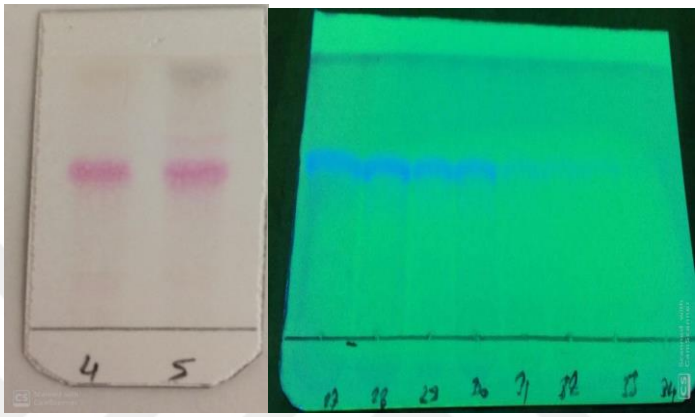
S-1 kolonundan elde edilen Tablo 3.3'deki eluatlar İTK ile incelendi ve benzer sonuçlar gösteren eluatlar bir araya toplandı. Bu işlemler neticesinde su ekstresinin S-1 kolonundan 1-15, 16-24 ve 35-45 olmak üzere 3 fraksiyon elde edildi.

Bu kolondan elde edilen 2. grup (16-24) fraksiyonuna Se-1 kolonu yapıldı. Bu sefer kolon dolgu maddesi olarak silika jel yerine sephadex (LH-20) kullanıldı. Çözücü sistemi olarak %100 metanol kullanıldı. Sephadex kolona yüklenilmeden önce metanol ile muamele edilerek karanlık bir ortamda 24 saat boyunca bekletildi. Daha sonra sephadex kolona yüklendi ve aynı çözücü sistemi kolondan geçirilerek kolon şartlandırıldı. Şartlandırılan kolona madde yüklenerek çözücü sistemi değiştirilmeden ayırma işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 4 defa tekrar edilerek toplamda 4 tane sephadex kolon yapıldı. Sephadex ile yapılan kolonlar sonucunda bileşik-1 (60mg) ve bileşik-2 (41mg) olmak üzere iki tane saf madde izole edildi.

3.2.3.2. İnce tabaka kromatografisi

Bir karışımın içerisinde bulunan bileşenlerin ayrılması, kalitatif olarak incelenmesinde ve benzer olan fraksiyonların belirlenmesi amacı ile uygulanan basit bir kromatografi yöntemidir. Kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonların saflık kontrolünde ve uygun çözücü sisteminin saptanmasında İTK yönteminden faydalanıldı. Fraksiyonlar miktarlarına göre Silikajel 60 F_{254} kaplı hazır alüminyum plakalara spotlandı ve uygun çözücü sistemlerinde yürütülerek gözlemlendi. Numuneler spotlandıktan sonra alüminyum plaklar uygun çözücülerin bulunduğu cam tankların içerisine koyularak yürütülmesi sağlandı. Alüminyum plakada değişik düzeylerde ilerleyen UV aktif

maddeler, UV ışık altında (254 ve 366 nm) gözlemlendi. Daha düşük dalga boylarında absorbans veren, UV aktif olmayan maddelerin belirlenebilmesi için alüminyum plakların üzerine sülfürik asit ve etanol karışımı püskürtülerek bantlar belirgin hale gelinceye kadar ısıtıldı (100-105 ^{o}C). R_f değerleri benzer olan maddeler aynı maddeler olarak nitelendirilerek birleştirildi. Kolon kromatografisinden alınmış fraksiyonların hepsine bu işlemler uygulanarak benzer fraksiyonların bir araya toplanması sağlandı.



Şekil 3.4. İnce Tabaka Kromatografisi

3.2.4. Antikanserojen aktivite testleri

3.2.4.1. Hücre kültürü

Hücrelerin laboratuvar şartlarında kontrollü olarak çoğaltılmasına hücre kültürü denilmektedir. Bu metotla hücrelerin daha hızlı bir şekilde büyütülmesi ve artması sağlanırken, birçok moleküler ve biyokimyasal çalışmanın da çoğaltılan bu hücreler üzerinde çalışılmasına imkân tanınmaktadır (King, 2013).

3.2.4.2. Hücre kültürü koşulları

Bu çalışmada insan meme kanserinin iki farklı hücre hattı kullanılmıştır; MDA-MB-453 ve MCF-7 (göğüs adenokarsinoma). MDA-MB-453 ve MCF-7 hücre hatları, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin (Pen-Strep) çözeltisini kapsayan DMEM besiyeri içerisinde kültüre edilerek, kültürler % 5 karbon dioksit (CO_2) ve % 95 nem ile 37 °C' de inkübe edildi. Hücre kültürü uygulamaları Biyo Güvenlik Kabininde (Sınıf II) gerçekleştirildi.

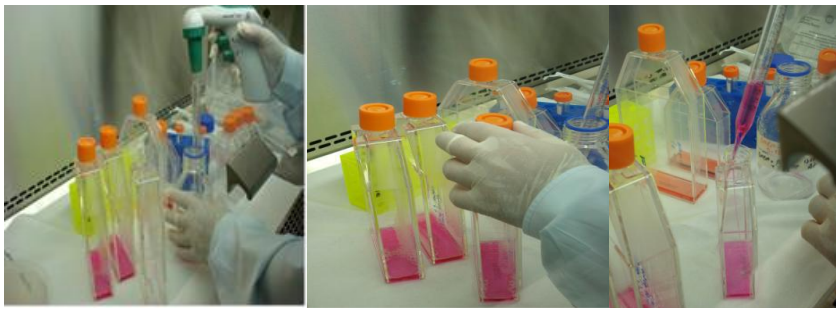
3.2.4.3. Hücrelerin çözdürülmesi

Sıvı azottan alınan kriyo tüpler 37ºC su banyosunda çözdürüldü ve T75 hücre kültürü flasklarına aktarılarak, üzerlerine büyüme ortamı oluşturmak için 7-8 mL taze besi yeri eklendi ve CO_2 inkübatöründe (37ºC) inkübasyona konuldu.

Şekil 3.5. Hücrelerin Çökeltilmesi ve çözülmesi (Şahin, 2010)

3.2.4.4. Hücrelerin pasajlanması

Belirli bir konfluense (% 80) erişen hücrelerin içerisindeki bulundukları besi yeri ortamı alındıktan sonra 4-5 ml PBS tamponu ile yıkama yapıldı. Sonrasında, flask içerisinde tabana ve çeperlere yapışık olarak gelişen hücrelerin flasktan kaldırılması için 3-4 ml tripsin/EDTA ilave edildi ve 5-7 dk. süresince CO_2 inkübatöründe beklemeye bırakıldı. İnkübasyon süresi sona erdiğinde tripsininin etkisini ortadan kaldırmak için 8 ml taze besiyeri eklendi. 800 x g de 5 dk. santrifüj edilen hücre süspansiyonundan süpernatan kısım alınarak uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 10 ml taze besiyeri ilave edilerek, 4 adet yeni T75 flask içerisine paylaştırıldı. Pasajlanan hücre kültürleri 37º C' de, % 95 nem içeren % 5 CO_2 inkübatöründe inkübe edilmek üzere bırakıldı.



Şekil 3.6. Besi yerlerin hücre kültür kaplarına alınması (Akdulum, 2011) (Pasajlama)

3.2.4.5. Hücrelerin dondurulması

Belirli bir doluluğa (%80) ulaşan hücreler deney aşamalarında kullanılmaları için dondurulurlar. Bunun için, CO_2 inkübatöründen alınan flasklar içerisindeki besi yeri uzaklaştırılır ve 4-5 ml PBS tamponu ile yıkanır. Flask içerisinde çeperlere yapışık olarak gelişen hücrelerin çeperlerden kalkması için üzerine tripsin/EDTA çözeltisinden 2-3 ml konularak ve hücre tipine bağlı olarak 5-10 dk CO_2 inkübatöründe inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi bittiğinde tripsinin etkisini bertaraf etmek için flask içerisine 8-10 ml taze besi yeri eklendi. Daha sonra, hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüplerine konularak ve 37º C de, 800 × g de 5 dk santrifüje bırakıldı. Santrifüj edildikten sonra süpernatan kısım alındı ve pelet tam bir büyüme ortamında (% 10 DMSO içeren 3 ml dondurma ortamı) yeniden süspansiye hale getirilerek, 1,5 ml'lik kriyotüplere konuldu ve hemen - 80 ºC dondurucuya kaldırıldı.

Şekil 3.7. İnkübatör ve Inverted (ters) mikroskop (Akdulum, 2011)

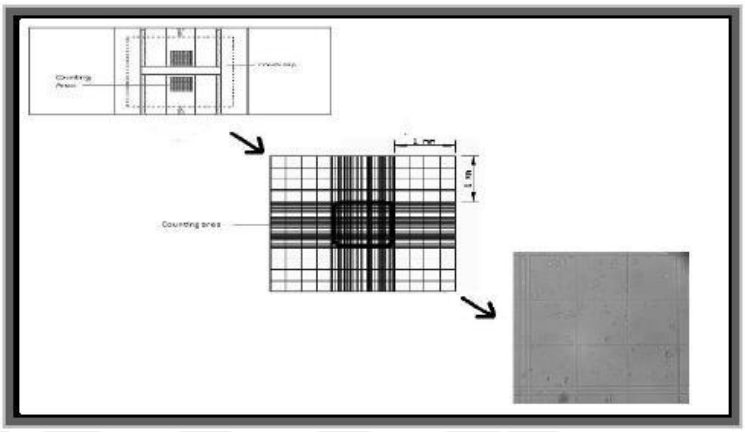
3.2.4.6. Hücrelerin sayılması işlemi

Tripan mavisi boya dışlama tekniği canlı ve cansız hücreleri birbirinden ayırmak ve hücre sayısını belirlemek için kullanılır. Cansız hücreler boyayı içine aldığından mavi renkli gözükürken canlı hücreler bu boyayı almadığından parlak renkli olarak görünmektedir. Sayımı yapılacak hücre süspansiyonundan bir miktar alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe konuldu ve tripan boyası ile yoğunluğa bağlı olarak belirli oranda karıştırıldı ve hemositometrenin her iki odacığına 10 µl konularak inverted mikroskop altında hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.8). Hücre konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

Hücre sayısı / ml = Odacıklardaki ortalama hücre sayısı × DF × 10^4

DF: Seyreltme faktörü.

10^4 : Toma lamındaki odacık boyutlarından kaynaklanan faktör. (Hemositometredeki her odanın boyutları 1 cm uzunluğunda, 1 cm eninde ve 0,1 cm yüksekliktedir. Hacim 0,1 cm^3 veya 1 mm^3 tür)



Şekil 3.8. Hemositometre ile hücre sayımı

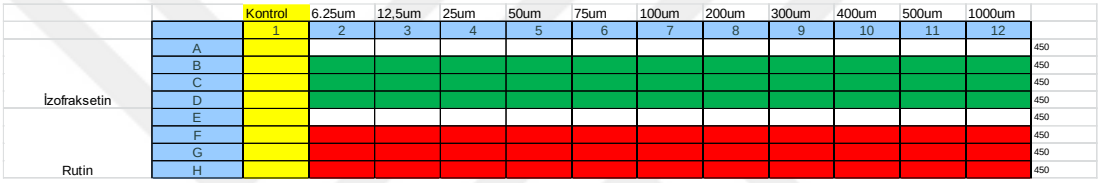
3.2.5. Ekstrelerinin hazırlanması

Bitkinin su ekstresinden elde edilen saf bileşiklerin antiproliferatif aktivitelerini belirlemek için ekstrelerden 1 mg/ml ana stok çözeltiler hazırlandı. Bunun için her bir ekstreden 5 mg tartıldı ve % 0,2 DMSO içeren 5 ml besi yeri içerisinde çözüldü. Daha sonra bu stoklar besi yeri ile seyreltilerek (500-250-200-150-100-75-50-25-12,5-6,25 µM) 10 farklı konsantrasyonda süspansiyonlar hazırlandı.

3.2.5.1. XTT yöntemi ile hücre canlılığı ölçümü

Numunelerin mevcut hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktiviteleri XTT kitiyle ve üretici firmanın prosesine göre gerçekleştirildi (Hücre Proliferasyon XTT Kiti, BI). Bu protokole göre metabolik olarak aktif hücrelerde mitokondriyal enzim aktivitesi ile suda çözünmeyen XTT tetrazolyum tuzu suda çözünebilen turuncu renkli formazan bileşiğine indirgenmekte ve meydana gelen bu yapı 450-490 nm aralığında ELISA okuyucuda kolaylıkla nicelleştirilebilmektedir.

Hücrelerden 100'er µl (10.000 cell/ml) alınarak 96 kuyucuklu plakalara konuldu ve 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bittiğinde kuyucuklardaki besi yerleri alındı, 50 µl PBS tamponu ile kuyucuklar yıkandı ve bu tampon tekrar bertaraf edildi. Daha sonra bu hücrelerin üzerine 50'şer µl taze tam besi yeri eklendi. Üzerlerine 50'şer µl farklı dozlarda hazırlanan (6,25-500 µM) örnekler konuldu. Kontrol kuyucuklarına ise 100 µl, % 0,2 DMSO içeren tam besiyeri konuldu. Plakalar 48 saat inkübasyon için tekrar 37 ^{o}C' de % 95 nem ve % 5 CO_2 içeren inkübatör içerisine bırakıldı. İnkübasyon sonrasında plakaların elisa okuyucuda 450 nm'de kolorimetrik olarak okuması yapıldı. XTT tahlillerinin 96 kuyucuklu plakada gösterimi Şekil 3.9' daki gibidir.



Şekil 3.9. Numunelerin XTT analizinin 96 kuyucuklu plaka gösterimi

A2-A12, E2-E12, arasındaki kuyucuklarda hücre yoktur. B2-B12, D2-D12 ve F2-F12, H2-H12 arasındaki kuyucuklar ise hücrelidir. A1-H1 kuyucukları kontrol grubu hücrelerinden meydana gelmektedir. Bu kuyucuklara 50 µl besiyeri ve % 0,1 DMSO içeren besiyeri ilave edildi. B2-B12, D2-D12 ve F2-F12, H2-H12 arasındaki kuyucuklara ise 50 µl besiyeri ve üzerlerine 50 µl hazırlanan numunelerden artan konsantrasyonlarda (6,25-500 µM) eklendi.

İnkübasyon süresi tamamlandığında plakalar içerisindeki herbir kuyucuğa 50'şer µl XTT kiti (5 ml XTT kitinin üzerine 100 µl aktivatöründen eklenerek hazırlandı) ilave edildi ve 5 saat inkübasyon olması için CO_2 inkübatörüne bırakıldı. İnkübasyon süresi bittiğinde, plakalar eliza okuyucu ile 450 nm'de okundu. Kuyucuklardaki mevcut hücre canlılığı aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplandı:

$$\% \text{ Hücre proliferasyonu} = \frac{[\text{Abs (muamele görmüş hücreler)}]}{[\text{ Abs (control hücreler)}]} \times 100$$

Elde edilen sonuçlar gereğince, numunelerin ve standart ajanın IC_{50} değerleri hesaplandı. (IC_{50} değeri, hücre canlılığını % 50 azaltmak için gereken numune konsantrasyonudur).

3.2.6. Antioksidan aktivite testleri

3.2.6.1. DPPH• serbest radikallerini giderme aktivitesi tayini

DPPH• serbest radikal giderme Blois yönteminde göre bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı (1958). Serbest radikal olarak DPPH•'in 0,1 mM'lık çözeltisi kullanıldı. 96 well microplate içerisine 210 µL DPPH• radikal ilavesi yapıldı. Daha sonra bunun üzerine etkisi gözlemlenecek numune 15 µL (kör için 10 µL metanol) olacak şekilde koyuldu. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve sonra 517 nm'de Microplate Reader' da absorbans okuması gerçekleştirildi. Azalan absorbans değeri geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme (süpürme) aktivitesini verdi. Standart olarak Trolox kullanıldı. Sonuçlar standart (trolox) ve ekstrelerin IC_{50} konsantrasyonu olarak ifade edildi. IC_{50} başlangıçtaki ilk DPPH• konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gereken antioksidan miktarını belirtmektedir. Her bir test üç kez tekrar edilerek yapıldı.

3.2.6.2. $ABTS^{\bullet+}$ katyon radikal giderme aktivitesi tayini

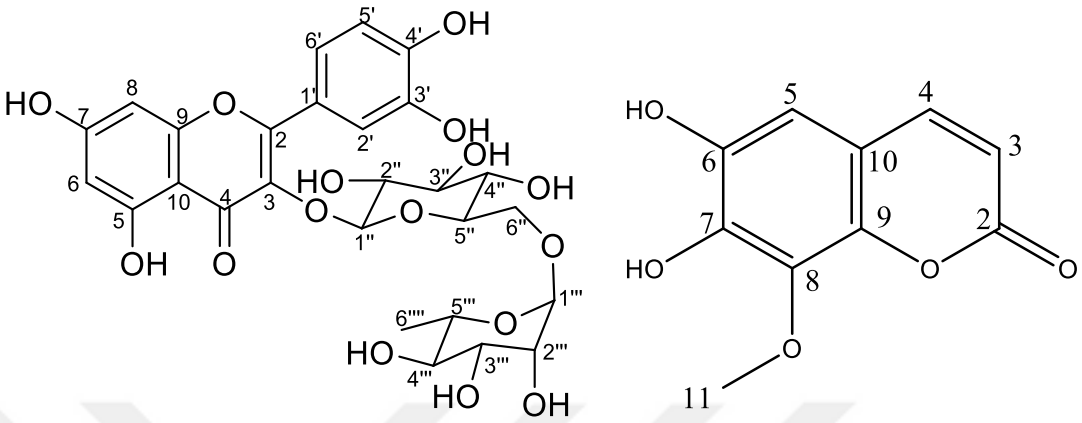
Bitki ekstrelerinden elde edilen saf bileşiklerin $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikal giderme aktivitesi tayini bazı modifikasyonlarla Re ve arkadaşlarının (1999) uyguladığı metoda göre çalışıldı. İlk önce $ABTS^{\cdot+}$ katyon radikalini meydana getirmek için 7 mM $ABTS^{\cdot+}$ çözeltisi ile 2,45 mM potasyum persulfat ($K_2S_2O_8$) çözeltisi bire bir oranında karıştırılarak hazırlandı. Oluşturulan karışım kullanılmadan önce 16 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Bu çalışmada standart olarak Trolox çalışıldı. 96 well microplate içerisine 2,5 µL numune, 2,5 µL standart konuldu ve üzerine seyreltilmiş $ABTS^{\cdot+}$ radikalinden 250 µL ilave edilerek karıştırıldı. 6 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 734 nm'de Microplate Reader' da absorbans okuması gerçekleştirildi. Sonuçlar IC_{50} konsantrasyonu olarak ifade edildi. Her bir test üç kez tekrar edilerek yapıldı.

3.2.6.3. Metal şelatlama kapasite tayini

Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre çalışıldı. Bu metotta standart olarak EDTA kullanıldı. 96 well microplate içerisine 50 µL numune ve EDTA eklendi. Üzerine 185 µL saf su ve 5 µL 2 mM $FeCl_2$ ilave edildi ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 µL 5 mM Ferrozin ilavesiyle 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 562 nm'de Microplate Reader' da absorbans okuması gerçekleştirildi. Sonuçlar EDTA ve numunelerin IC_{50} değerleri olarak ifade edildi. Her bir test üç kez tekrar edilerek yapıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

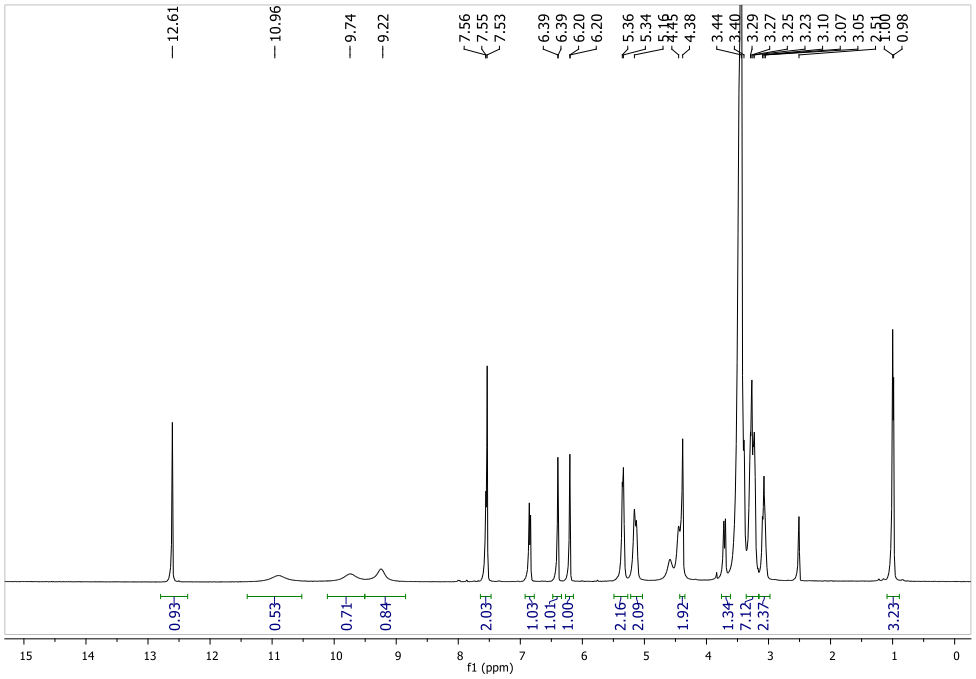
4.1. Rutin ve İzofraksetin Bileşiklerinin Yapı Analizi



Rutin İzofraksetin

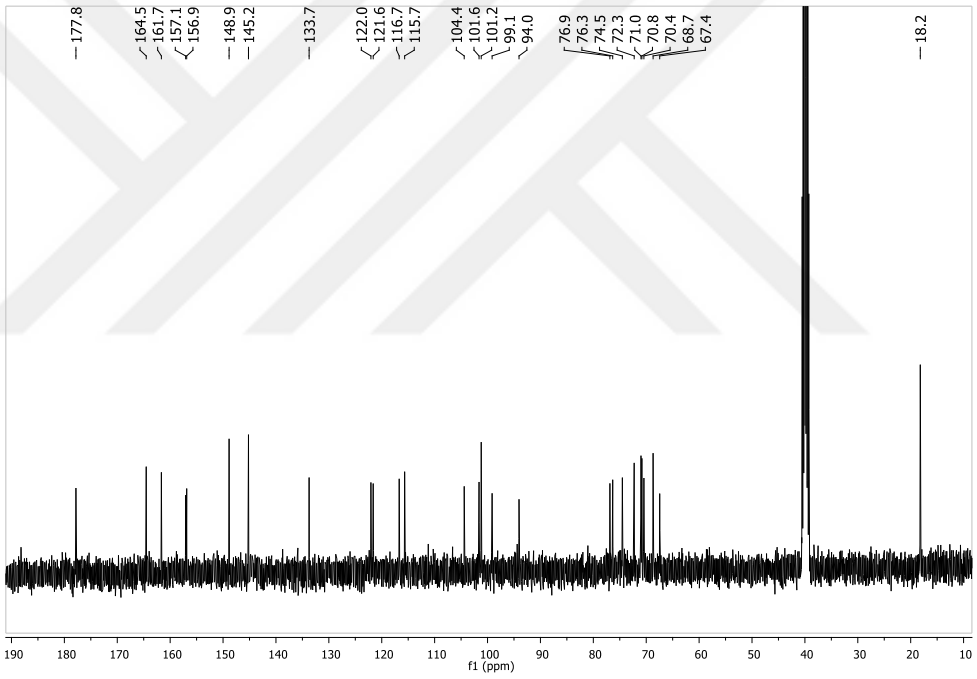
Şekil 4.1. *Tanacetum alyssifolium*'dan İzole Edilen Moleküllerin Kimyasal Yapısı

Tanacetum alyssifolium bitkisinden izole edilen rutin ve izofraksetin bileşiklerinin yapısı ^{1}H, ^{13}C-NMR, COSY, DEPT, HMBC ve HETCOR analizleri ile aydınlatılmıştır. İzole edilen rutin ve izofraksetin bileşiklerine ait spektrumlar Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 verilmiştir.



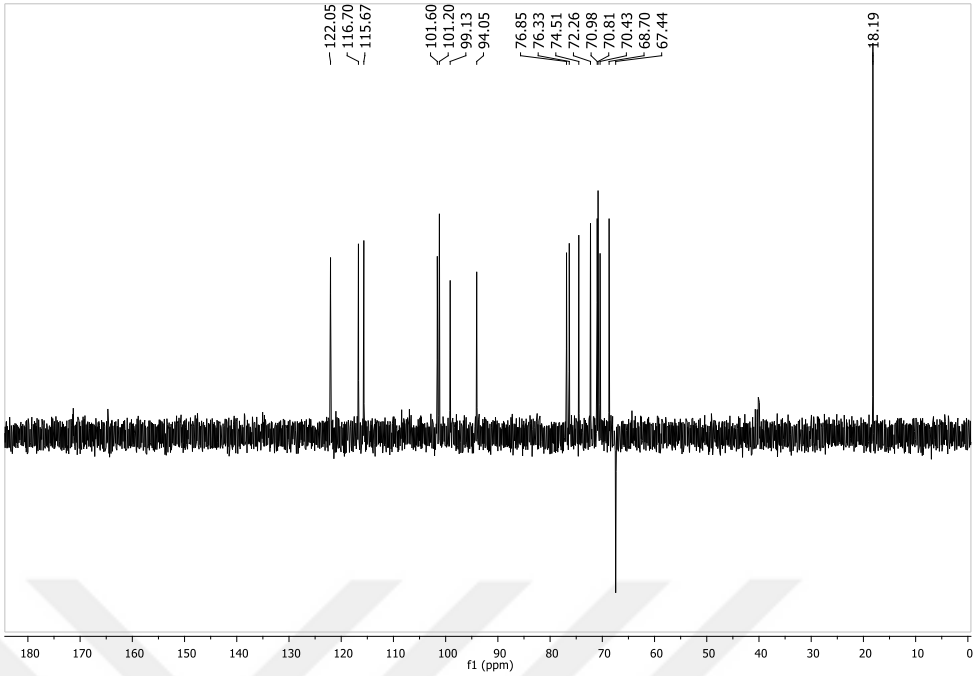
Şekil 4.2. Rutin ^{1}H-NMR spektrumu

Şekil 4.2'de verilen rutin bileşiğine ait ^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde; aromatik bölgede 5 tane aril protonu ve 4 tane fenolik hidroksi protonu görülmektedir. C-5 karbonuna bağlı olan hidroksil grubunun protonu 12,61 ppm'de görülmektedir. Yapıdaki diğer fenil halkalarına bağlı hidroksi protonları ise 9.22, 9.74 ve 10.96 ppm'de rezonans oldukları görülmektedir. Molekülde bulunan iki şeker grubuna ait anomerik protonlar 5.34 ppm'de *J*=7,07 Hz'lik dublet ve 4.38 brs olarak görülmektedir. Buradan glukoz grubunun *β*, ramnoz grubunun ise *α*-konfigürasyonda olduğu belirlenmiştir. Ramnoz halkasında bulunan metil protonu (H-6‴) ise 0.99 ppm de dublet olarak görülmektedir. Diğer alifatik protonlar ise 3-4 ppm arasında rezonans olmuştur.



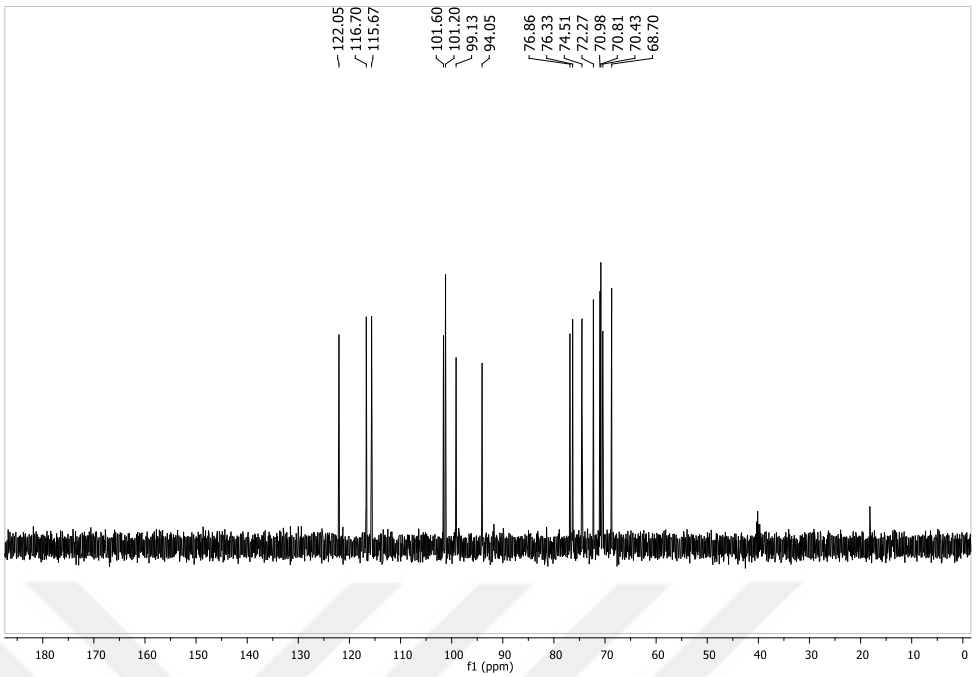
Şekil 4.3. Rutin ^{13}C-NMR spektrumu

Rutin bileşiğine ait olan 27 karbonun tümü spekturumda gözlenmiştir. Aromatik halka karbonları 100-180 ppm arasında 15 tane olarak görülmüştür. Flavon halkasındaki karbonil karbonunun $\delta_{C=}$ 177.8 ppm'de rezonans olduğu gözlenmiştir. Bileşikte bulunan iki şeker grubuna ait 12 adet karbonun ise alifatik bölgede sinyal verdiği görülmüştür. Ramnoz grubuna ait metilin ise 18.2 ppm'de rezonans olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. Rutin ^{13}C- DEPT-135 spektrumu

DEPT-135 spektrumunda CH_2 grupları negatif, CH ve CH_3 grupları ise pozitif olarak gözlenmekte iken kuaterner karbonlar bu spekturumda görünmemektedir. Bu sebeple DMSO ve kuartener karbon pikleri bu spekturumda gözlenmezler. Spekturumda 67.44 ppm'de negatif olarak gözlenen pik glukoz grubunun H6″ protonlarına aittir.



Şekil 4.5. Rutin ^{13}C- DEPT-90 spektrumu

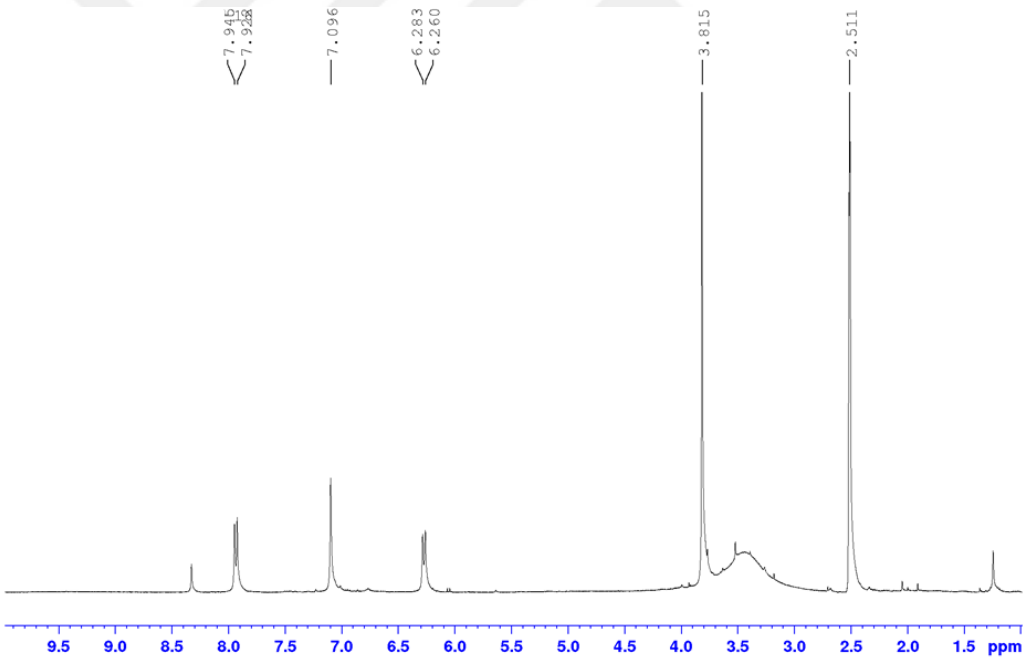
CH gruplarına ait pikler DEPT-90 spektrumunda pozitif olarak gözlenirken diğer karbonlar görünmezler. Pozitif olarak gözlenen 15 CH sinyali yapıdaki sayı ile uyumludur. Şekil 4.4'te verilen DEPT-135 spektrumu ile DEPT-90 sepktrumu karşılaştırıldığında; 18.2 ppm'de gözlenen CH_3 sinyali ve 67.4 ppm'de gözlenen CH_2 sinyalinin kaybolması yapıdaki CH_2 ve CH_3 karbonlarının varlığını doğrulamaktadır.

Tablo 4.1. Rutin bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri

Pozisyon	DEPT	δ_C(DMSO-d6)	δ_H (DMSO-d6)	HMBC (H→C)
2	C	156,9	-	-
3	C	133,7	-	-
4	C	177,8	-	-
5	C	161,7	-	-
6	CH	99,1	6,19 (d, 1.95 Hz, 1H)	C8, C10, C5, C7
7	C	164,5	-	
8	CH	94,0	6,38 (d, 1.95 Hz, 1H)	C6, C10, C9, C7
9	C	157,1	-	-
10	C	104,4	-	-
1'	C	122,0	-	-
2'	CH	116,7	7,60 – 7,48 (m, 1H)	C5', C1', C3', C4',C2
3'	C	145,2	-	-
4'	C	148,9	-	-
5'	CH	115,7	6,85 (d, 8,15 Hz, 1H)	C1', C3', C4', C2
6'	CH	121,6	7,60 – 7,48 (m, 1H)	C5', C1', C3', C4', C2
1''	CH	101,6	5,34 (d, 7,07, 1H)	C3, C3''
2''	CH	74,5	3,24 (m, 1H)	-
3''	CH	76,9	3,24 (m, 1H)	-
4''	CH	71,0	3,28-3,34 (m, 1H)	-
5''	CH	76,3	3,24 (m, 1H)	-
6''	CH_2	67,4	a) 3,71 (d, 10,2 Hz, 1H)	C1'''
			b) 3,23-3,29 (m, 1H)	
1'''	CH	101,2	4,38 (brs, 1H)	C6'', C3'''
2'''	CH	70,4	3,04-3,08 (m, 1H)	-
3'''	CH	70,8	3,35-3,42 (m, 1H)	-
4'''	CH	72,3	3,04-3,08 (m, 1H)	-
5'''	CH	68,7	3,28-3,34 (m, 1H)	-
6'''	CH_3	18,2	0,99 (d, 6,04 Hz, 3H)	C5''', C4'''

HMBC (Bkz. Ek-1) spektrumunda görülen 5,34 (H2″)→133,7 (C3) etkileşimi glikoz grubunun flavon iskeletine C-3 konumundan bağlı olduğunu göstermektedir. 4.38 (H1‴)→67,4 (C6″) etkileşimi ramnoz grubunun glukoza C6″ konumundan bağlı olduğu anlaşılmıştır. Flavon iskeletinin A halkasındaki AX sitemi ile B halkasındaki ABX sistemi COSY (Bkz. Ek-2) spektrumunda gözlenen etkileşimler ile doğrulanmıştır. Tablo 4.1'de verilen protonların kimyasal kayma değerleri moleküle ait HETCOR (Bkz. Ek-3) spektrumundan alınan verilerle oluşturulmuştur.

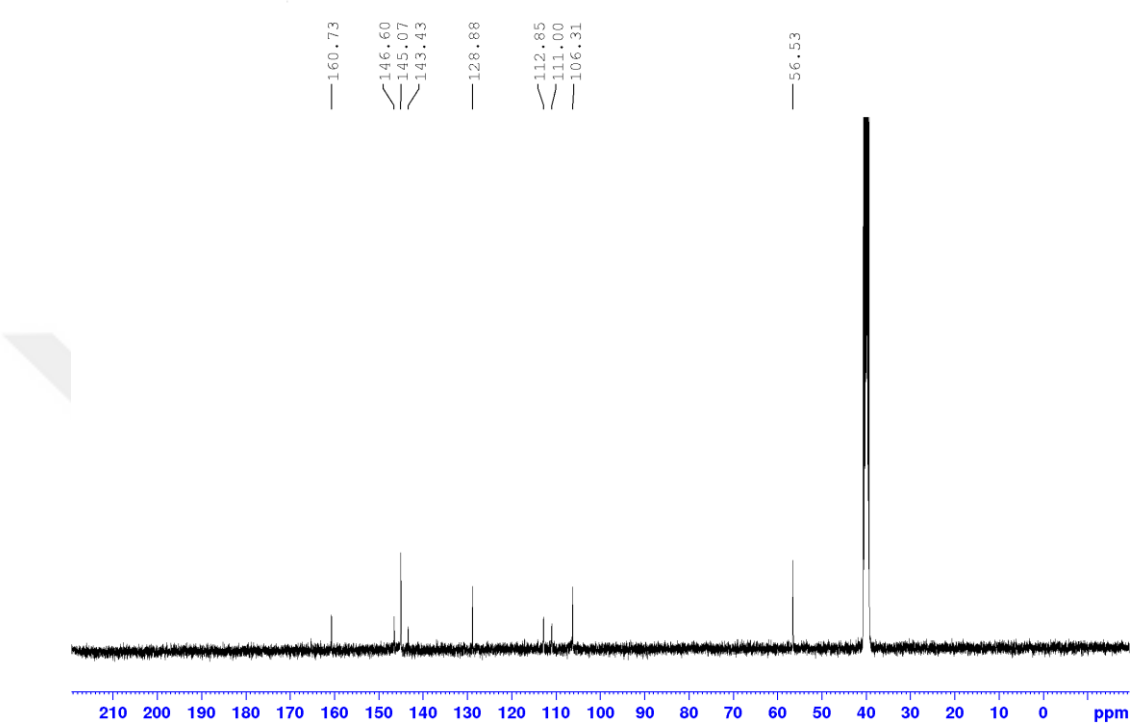
Rutin bileşiğine ait 1D ve 2D-NMR spektrumlarının yorumlanmasından sonra bileşiğin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır.



Şekil 4.6. İzofraksetin ^{1}H-NMR spektrumu

Şekil 4.6'da verilen izofraksetin'e ait ^{1}H-NMR spekturumu incelendiğinde aromatik bölgede 3 tane protonun varlığı görülmektedir. 3,81 ppm'de alifatik bölgede ise sadece molekülde bulanan –OCH_3 grubuna ait protonun varlığı gözlenmektedir. Aromatik bölgedeki 7,94 ve 6,26 ppm'de J=9,15 Hz'lik etkileşim sabiti ile dublet şeklinde rezonans olan iki sinyal moleküldeki α,β-doymamış sistemi gösterir. Bu etkileşim

bileşiğe ait COSY (Bkz. Ek-5) spektrumunda da görülmektedir. Buradan molekülün kumarin halkasına sahip olduğu anlaşılmaktadır. 7,09 ppm'de singlet şeklinde rezonans olan sinyal H5 protonuna aittir.



Şekil 4.7. İzofraksetin ^{13}C-NMR spektrumu

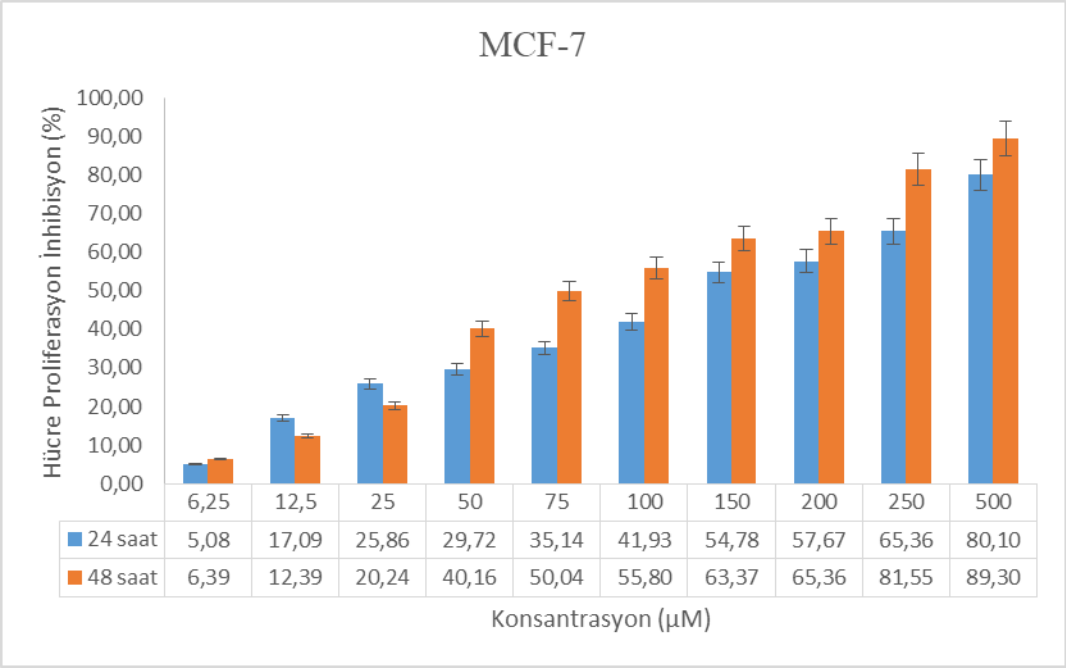
İzofraksetin ^{13}C-NMR spektrumu incelendiğinde 9 karbon piki görünmektedir. 145,0 ppm'de gözlenen kuarterner karbon sinyalinin diğer kuarterner karbonlara göre daha şiddetli olduğundan dolayı 10 karbonlu bileşiğin iki karbonunun üst üste pik verdiği düşünülmektedir. Moleküle ait NMR spektrumlarının incelenmesinden sonra üst üste gelen sinyallerin C6 ve C8'e ait olduğu tespit edilmiştir. Spektrumda 8 aromatik karbon sinyali gözlenmektedir. Alifatik bölgede ise metoksi grubuna ait sinyal 56,5 ppm'de gözlenmiştir. Spektrumdan elde edilen veriler yapıyı doğrulamaktadır. Moleküle ait ^{1}H ve ^{13}C-NMR kimyasal kayma değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. İzofraksetin bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C NMR kimyasal kayma değerleri

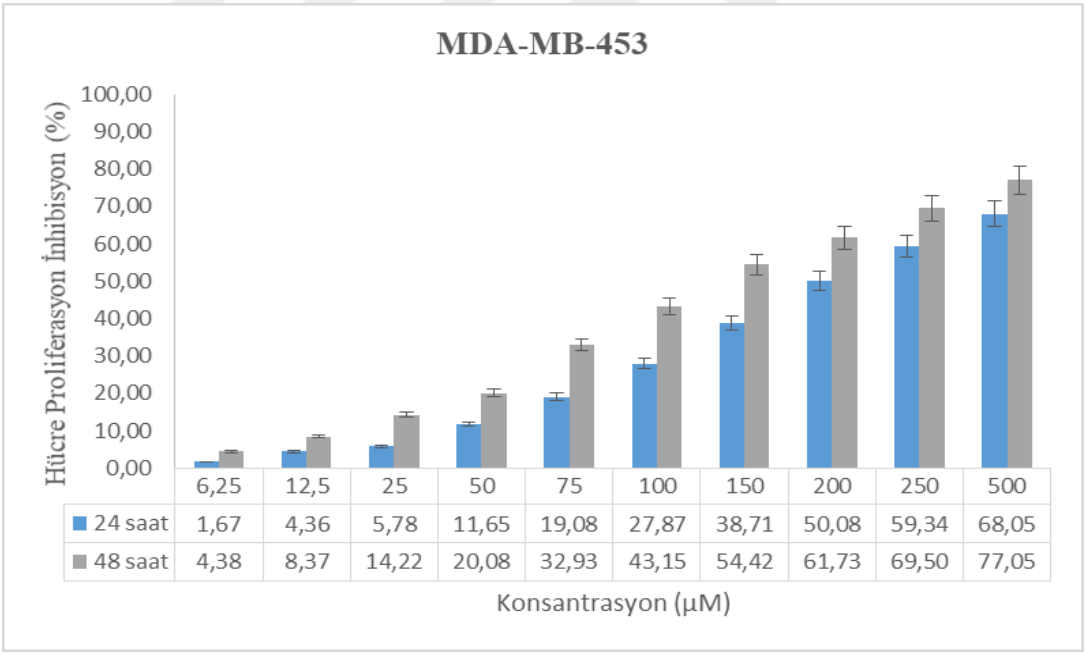
Pozisyon	DEPT	δ_C (DMSO-d6)	δ_H (DMSO-d6)
2	C	160,7	-
3	CH	112,9	6,27 (d, 9,15 Hz, 1H)
4	CH	143,4	7,94 (d, 9,15 Hz, 1H)
5	CH	106,3	7,09 (s, 1H)
6	C	145,0	-
7	C	128,9	-
8	C	145,0	-
8-OCH_3	CH_3	56,5	3,81 (s, 3H)
9	CH	128,9	-
10	CH	111,0	-

4.2. Antikanserojen Aktivite Araştırma Bulguları

Bu çalışmada *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin su ekstresinden izole edilen Rutin ve İzofraksetin bileşiklerinin MDA-MB-453 ve MCF-7 kanser hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri XTT yöntemi ile incelendi. Rutin bileşiğinin antiproliferatif etki göstermediği yapılan çalışmalardan anlaşılmıştır. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında izofraksetin bileşiğinin test edilen hücre hatları üzerindeki farklı konsantrasyonlarına karşı % hücre proliferasyon inhibisyonları Şekil 4.8 ve 4.9.'da verilmiştir. Ayrıca, ekstrenin ve pozitif kontrol olarak kullanılan Karboplatin'in IC_{50} değerleri Tablo 4.3.'de verilmiştir. Yapılan testler sonucunda tüm örneklerde doz ve inkübasyon süresindeki artışa paralel olarak aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.8.-4.9.). İzofraksetin bileşiğinin çalışılan tüm dozlarda pozitif kontrol olarak kullanılan Karboplatin'den daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. İzole edilen izofraksetinin MCF-7 hücre hattı antiproliferatif aktivitesi



Şekil 4.9. İzole edilen izofraksetinin MDA-MB-453 hücre hattı antiproliferatif aktivitesi

Tablo 4.3. İzofraksetin ve antikanser ajanı olarak kullanılan karboplatin bileşiğinin meme kanser hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-453) üzerindeki IC_{50} değerleri

	Hücre Hatları (IC_{50} µM)			
Bileşikler	MCF-7		MDA-MB-453	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
İzofraksetin	188,87±3,02	143,94±2,84	260,08±2,76	194,70±1,64
Karboplatin	23,55±2,35		32,24±1,82	

4.3. Antioksidan Aktivite Araştırma Bulguları

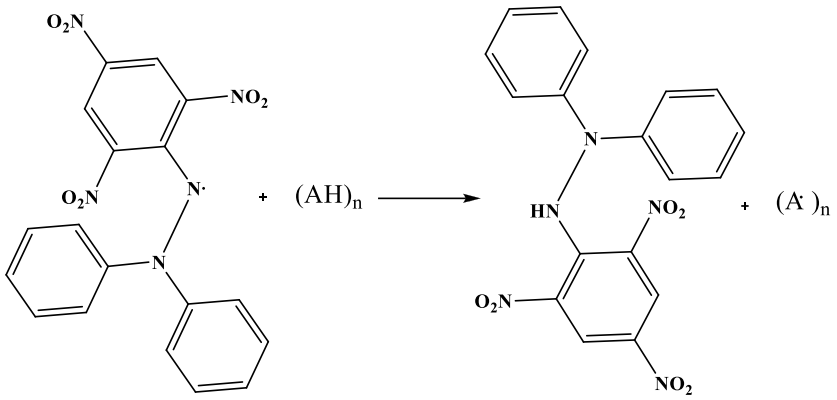
4.3.1. DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi bulguları

Hücrelerin hayatta kalması için oksidatif metabolizma şarttır. Bu bağlılığın bir yan etkisi de oksidatif değişikliklere neden olan, serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin meydana gelişidir (Antolovich vd., 2002). İzole edilen bileşiklerin DPPH• serbest radikalini giderme aktivitesi Blois metoduna göre saptandı.

Numunelerin antiradikal aktivitesi üzerine DPPH• analizi temel bilgi vermektedir. DPPH• stabil radikali ve antioksidan arasında var olan mevcut reaksiyon şöyledir:

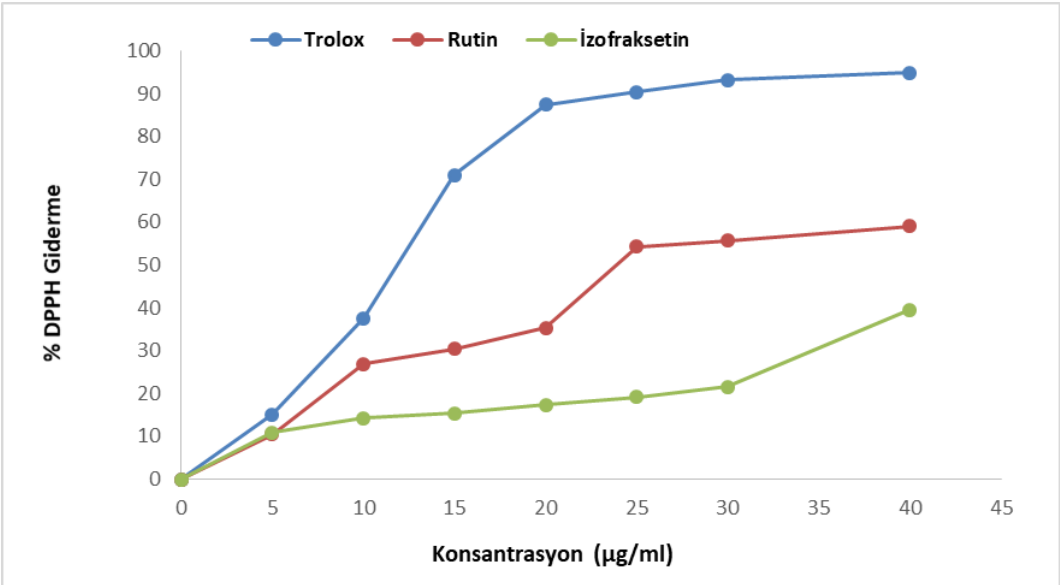
DPPH* + (AH)n = DPPH-H + (A*)n. Genellikle oluşan radikal (A*), molekülün yapısına bağlı olarak daha az reaktiftir veya stabil molekülü meydana getirebilmek için radikal radikal etkileşimini izlemektedir (Kim vd., 2011). DPPH• oda sıcaklığında stabil serbest radikaldir ve stabil diyamanyetik molekül hale dönüşmesi için elektron veya hidrojen radikalini almaktadır. DPPH•'in indirgenme kapasitesi antioksidanların neden olduğu 517 nm'deki absorbansın düşüşü ile ölçülmektedir (Shukla vd., 2009).

DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi metodu, DPPH• çözeltisinin koyu menekşe renginin ortamdaki antioksidanlar vasıtasıyla elektron transferi ile rengin açılması ve oluşan bu renk değişiminin UV spektrofotometre ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır.



Şekil 4.10. Antioksidan tarafından DPPH· radikalinin giderilmesi (Gülçin, 2002)

Tanacetum alyssifolium bitkisinin su ekstresinden izole edilen bileşiklerin DPPH• serbest radikal giderme aktiviteleri, farklı konsantrasyonlardaki (5-40 µg/mL) çözeltilerinin 517 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Bu bileşiklerin DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi standart olarak kullanılan troloksa karşı ölçülmüştür. Şekil 4.11 incelendiğinde bileşiklerin standart olarak kullanılan troloksdan daha az DPPH• serbest radikalini giderdiği görülmektedir. Rutin bileşiğinin izofraksetine göre daha fazla DPPH• serbest radikalini giderdiği görülmektedir. Fenolik grupların sayısı standart antioksidana göre az olduğu için bileşiklerin daha az DPPH• serbest radikalini giderdikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. İzole edilen rutin ve izofraksetinin farklı konsantrasyonlardaki (5-40 µg/mL) DPPH• serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile mukayese edilmesi

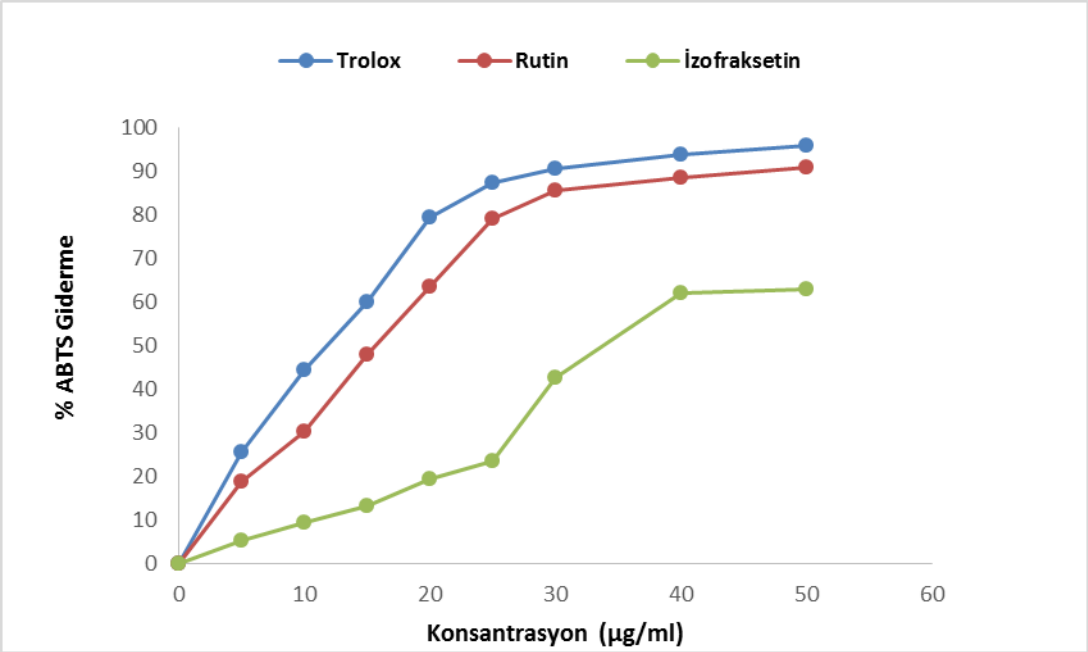
Serbest radikal giderme aktivitesi troloks > rutin > izofraksetin sıralaması ile oluşmaktadır.

Tablo 4.4. Bileşiklerin DPPH$^{\bullet}$ serbest radikali giderme IC_{50} değerleri

Örnekler	**DPPH Radikal Giderme IC_{50} (µg/mL)**
Rutin	28,5
İzofrasetin	63,2
Trolox	11,9

4.3.2.ABTS$^{\bullet+}$ radikal giderme aktivitesi bulguları

ABTS$^{\cdot+}$ serbest radikal giderme aktivitesi tayini Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği metoda göre çalışıldı. ABTS$^{\cdot+}$ katyon radikal giderme metodu, ABTS$^{\cdot+}$ çözeltisinin koyu yeşil renginin ortamda varolan antioksidanlar vasıtasıyla elektron transferi sonucu renginin açılmasına ve bunun akabinde oluşan absorbans değerindeki şiddet farklılığının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. ABTS$^{\cdot+}$ radikali antioksidan yapılar tarafından indirgendiği zaman absorbans değeri azalmaktadır. ABTS$^{\cdot+}$ çözeltisinin rengi ne kadar açılırsa test edilen numunenin o derece serbest radikal giderme gücüne sahip olduğu anlaşılmaktadır. ABTS$^{\cdot+}$ katyon radikalinin antioksidan kaynak tarafından giderilmesi Şekil 4.12' de ifade edilmiştir.



Şekil 4.12. İzole edilen rutin ve izofraksetinin farklı konsantrasyonlardaki (5-50 µg/mL) $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikali giderme aktivitesinin troloks ile karşılaştırılması

Tanacetum alyssifolium bitkisinin su ekstresinden izole edilen bileşiklerin $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikal giderme aktiviteleri, farklı konsantrasyonlardaki (5-50µg/mL) çözeltilerinin 734 nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Bu bileşiklerin $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikal giderme aktivitesi standart olarak kullanılan troloksa karşı ölçülmüştür. Şekil 4.12 incelendiğinde bileşiklerin standart olarak kullanılan troloksdan daha az $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikalini giderdiği görülmektedir. Rutin bileşiğinin izofraksetine göre daha fazla $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikalini giderdiği görülmektedir.

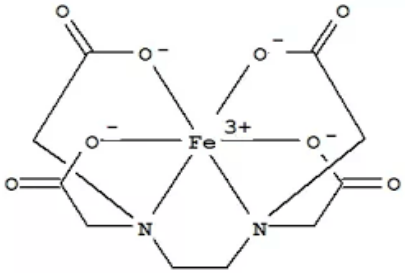
Tablo 4.5. Bileşiklerin $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikali giderme IC_{50} değerleri

Örnekler	**$ABTS^{\cdot+}$ Radikal Giderme IC_{50} (µg/mL)**
Rutin	16.52
İzofrasetin	38.01
Trolox	9.7

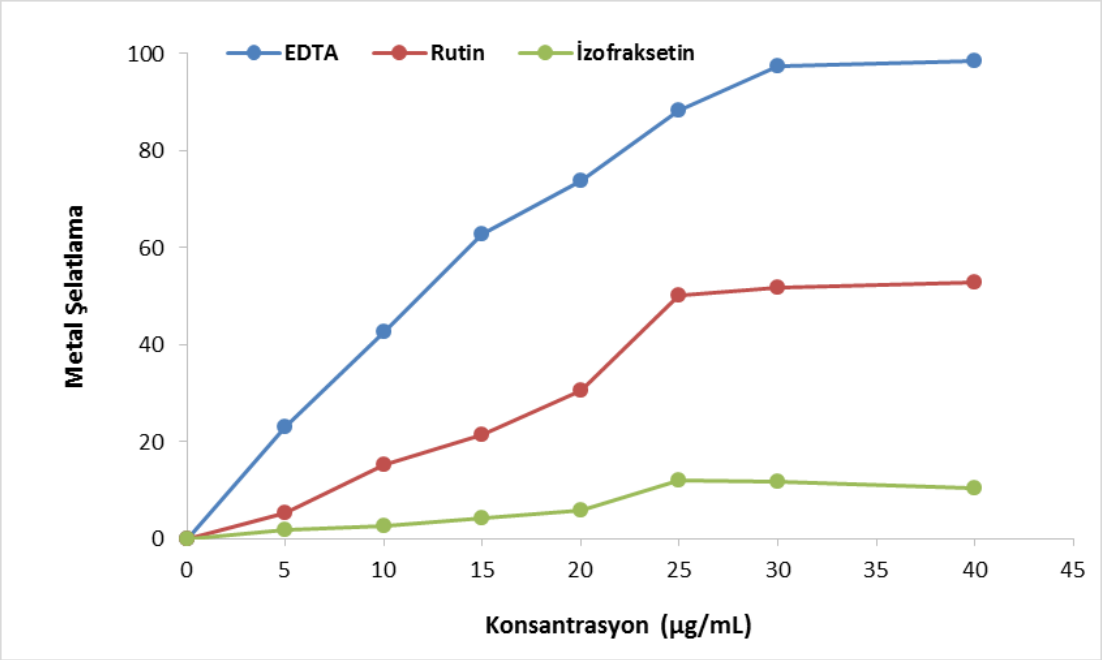
Serbest radikal giderme aktivitesi troloks > rutin > izofraksetin sıralaması ile oluşmaktadır.

4.3.3. Metal şelatlama kapasite tayini bulguları

Metal şelatlama kapasite tayini Dinis ve arkadaşlarının (1994) metoduna göre çalışıldı. Metal şelatlama metodu Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlama yeteneğine sahip ferrozin reaktifi ile ortamda varolan diğer metal bağlayıcı antioksidan bileşiklerinin rekabeti temeline dayanmaktadır. Antioksidan kaynağının şelatlama gücü ne kadar fazla ise kırmızı renkli Fe^{2+}/ferrozin kompleksinin meydana gelişide o derece engellenir.



Şekil 4.13. Metal iyonunun EDTA tarafından şelatlanması



Şekil 4.14. İzole edilen rutin ve izofraksetinin farklı konsantrasyonlardaki (5-40 µg/mL) metal şelatlama kapasitelerinin EDTA ile karşılaştırılması

Tanacetum alyssifolium bitkisinin su ekstresinden izole edilen bileşiklerin metal şelatlama kapasitelerinin, farklı konsantrasyonlardaki (5-40 µg/mL) çözeltilerinin 562

nm'deki absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. Bu bileşiklerin metal şelatlama kapasiteleri standart olarak kullanılan EDTA'ya (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) karşı ölçülmüştür. Şekil 4.14 incelendiğinde bileşiklerin standart olarak kullanılan EDTA'ya göre daha az metal şelatlama kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Rutin bileşiğinin izofraksetine göre daha fazla metal şelatlama kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Bileşiklerin metal şelatlama kapasiteleri IC_{50} değerleri

Örnekler	**Fe^{2+} Şelatlama IC_{50} (µg/mL)**
Rutin	32,26
İzofrasetin	157,05
EDTA	12,05

Metal şelatlama kapasitesi EDTA > Rutin > İzofraksetin sıralaması ile oluşmaktadır.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmasında, Asteraceae (Compositae) familyasına ait ve endemik bir tür olan *Tanacetum alyssifolium* bitkisinden hazırlanan su ekstresinde mevcut olan sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikanserojen aktivitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda biyolojik aktiviteye sahip birçok bileşik olduğu tespit edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Bu bitkilerin genellikle kök, yaprak, gövde, kabuk, çiçek ve meyvelerinde bol miktarda flavonoid, fenolik asit, lignan ve lignin gibi fenolik bileşikler mevcuttur. Bu fenolik bileşiklerin antikanserojen ve antioksidan aktivite gibi pek çok biyolojik etkileri bulunduğu bilinmektedir. *Tanacetum* türlerinin Türkiye'de bol miktarda bulunması, önemli derecede endemizm göstermesi ve biyolojik olarak aktif bileşikler içermelerinden dolayı ülkemiz için önemli bir kaynak oluşturduğu yadsınamaz bir gerçekliktir (Kılıç, 2007).

Tanacetum alyssifolium bitkisinde mevcut olan sekonder metabolitlerin izolasyon çalışması su ekstresine kolon kromatografisi uygulanmasıyla başlanıldı. Elde edilen fraksiyonlara İTK yapılarak sonuçlarına göre değişik kolonlarla çalışmalara devam edildi. Kolon kromatografisi sonucu elde edilen sonuçlara ilk önce İTK da bakıldı ve saf olduğu düşünülen bileşiklerin spektral analizleri (NMR) yapıldı. Bu çalışmada *Tanacetum alyssifolium* bitkisinden rutin ve izofraksetin bileşiği saf olarak izole edilmiştir.

Rutin ve izofraksetin bileşiklerinin antioksidan aktivite çalışmalarında, $DPPH^{\bullet}$ serbest radikal giderme aktivitesi, $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikal giderme aktivitesi ve metal şelatlama kapasite tayini çalışılmıştır. $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\cdot+}$ radikal giderme aktivite çalışmalarında trolox metal şelatlama kapasite tayininde ise standart olarak EDTA kullanılmıştır. Her üç yöntemde de elde edilen sonuçlara göre bileşikler standart olarak kullanılan trolox ve EDTA'dan daha az antioksidan etki göstermiştir. Rutin bileşiği izofraksetine göre daha fazla antioksidan etkiye sahiptir.

Son zamanlarda, artan ilaç kullanımına bağlı olarak görülen zararlı yan etkiler dolayısıyla antioksidan aktivite gösteren bitkilerin önemi giderek artmaktadır.

Karotenoit, flavonoid ve fenolik bileşik içeriği bakımdan zengin bitkilerin, gıda ve beslenme alanlarında kullanımları doğrultusunda çok sayıda çalışma mevcuttur (Kulkarni vd., 2006).

Tanacetum alyssifolium bitkisinin su ekstresinden izole edilen rutin ve izofraksetin bileşiklerinin antikanserojen aktivite çalışmaları bileşiklerin 10 farklı konsantrasyonu ile iki farklı hücre hattında 24 ve 48 saat uygulama yapılarak çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde rutin bileşiğinin antikanserojen etki göstermediği tespit edilmiştir. İzofraksetin bileşiğinin ise artan doz ve inkübasyon süresine paralel olarak antikanserojen aktivitesinde artış olduğu görülmüştür. 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında elde edilen sonuçlar Şekil 4.8 ve Şekil 4.9' da gösterilmiştir. MCF-7 hücre hattında 24 saat sonucunda maksimum konsantrasyonda (500 µM) hücre inhibisyonu % 80,10 iken minimum konsantrasyonda(6,25 µM) ise % 5,08 olarak ölçülmüştür. 48 saat inkübasyondan sonra elde edilen hücre inhibisyonu sonuçları ise maksimum konsantrasyonda (500 µM) % 89,30 iken minimum konsantrasyonda(6,25 µM) % 6,39 olarak ölçülmüştür. Çalışılan bir diğer hücre hattı MDA-MB-453'da ise 24 saat inkübasyon sonrasında hücre inhibisyonu maksimum konsantrasyonda (500 µM) % 68,05 iken minimum konsantrasyonda (6,25 µM) % 1,67 olarak ölçülmüştür. 48 saat inkübasyon sonrasında hücre inhibisyonu için elde edilen sonuçlar ise maksimum konsantrasyonda (500 µM) % 77,05 iken minimum konsantrasyonda (6,25 µM) % 4,38 olarak ölçülmüştür. Sonuçlar antikanser ajanı olarak kullanılan karboplatin bileşiği ile karşılaştırıldığında standarttan daha az antikanserojen etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. İzofraksetin bileşiğinin MCF-7 hücre hattında MDA-MB-453 hücre hattına göre daha fazla etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bunun sebebinin antikanser etki mekanizmaları ile ilgili olduğu söylenebilir. Apoptoz (programlı hücre ölümü) mekanizmasında ana rolleri, ölüm reseptörleri, adaptör proteinler, ve proteolitik enzimler (kaspazlar) oluşturmaktadır (Hetts, 1998). Ölüm reseptörleri, Tumour Necrosis Factor (TNF) reseptör gen ailesindendirler ve adaptör proteinlere bağlanarak dışarıdan gelen ölüm sinyallerini hücre içine aktarırlar (Büyükgebiz ve Caferler, 2001). Ölüm reseptörlerinden gelen sinyal sonrası adaptör proteinler devreye girerek kaspazlara bağlanıp onları aktif hale dönüştürürler. Sonrasında, bu adaptör proteinlerin etkisiyle kaspaz dizisi aktif hale gelir. Kaspazlar; "başlatıcılar" (kaspaz 2,8,10) ve "uygulayıcılar" (kaspaz 3,6,7) olmak üzere iki sınıftırlar (Budihardjo ve Oliver, 1999). Ölüm sinyali

veren başlatıcı kaspazlar adaptöre bağlanırlar ve uygulayıcı kaspazları aktif hale getirirler. Ölümü meydana getiren, uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Sonuçta aktif hale gelen DNAaz enzimi DNA yıkımına neden olur (Büyükgebiz ve Caferler, 2001).

Erzincan'a özgü bir bitki olan *Tanacetum alyssifolium*dan elde edilen bu sonuçlar, kanserin terapisinde bitkisel kaynaklı tedavi yaklaşımlarının arttığı günümüzde umut vericidir.

Sonuç olarak *Tanacetum alyssifolium* bitkisinin su ekstresinden elde edilen rutin ve izofraksetin bileşiklerinin antioksidan çalışmaları DPPH$^{\bullet}$ serbest radikal giderme, $ABTS^{\cdot+}$ serbest radikal giderme ve metal şelatlama kapasite tayini yöntemleri kullanılarak, izofraksetin bileşiğinin antikanserojen aktivitesi ise MCF-7 ve MDA-MB-453 hücre hatları kullanılarak belirlenmiş ve maksimum aktivite gösterdiği konsantrasyonlar tespit edilmiştir. Bu çalışma elde edilen sonuçların daha ileri çalışmalar yapılmak suretiyle yeni sentezlenecek kemoterapötikler için kaynak olabileceğini ve bitki ekstrelerinden ilaç geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Ahıskalıoğlu, A. (2007) ‘‘*Anemone Narcissiflora* Bitkisinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi’’, ***(Yüksek Lisans Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Trabzon, 35-42.

Akkuş, İ. (1995) ‘‘Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri’’, ***Mimoza Yayınları***, 38(5), 1-12.

Aksu, S. (1972) “Bitkisel Maddeler Kimya ve Teknolojisi”, ***Tekel Enstitü Yayınları***, A-12.

Atıcı, E. (2007) ‘‘Tıp tarihinde kanser ve lösemi’’, ***Türk Onkoloji Dergisi***. 22, 197-204.

Atalay, M. ve Laaksonen, D.E. **(**2002) ‘‘Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise’’, ***Journal of Sports Science and Medicine***, 1, 1-14.

Akkuş, İ. (1995) ‘‘Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri’’, ***Mimoza Yayınları***, 38(5), 1-12.

Altınışık, M. (2000) ‘‘Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar’’, http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf
Son erişim tarihi: 21.04.2008.

Asad, N. R., Asad, L. M. B. O., Bonacossa de Almeida, C. E., Felzenszwalb, I. Cabral-Neto, J. B. and Leitao, A. C. (2004) ‘‘Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the e. coli genome’’, ***Genetics and Molecular Biology***, 27 (2), 291-303.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. (2002) ‘‘Methods for testing antioxidant activity’’, ***Analyst***, 127,183-198.

Akdulum, B. (2011) ‘‘Echinacea Pallida’nın Köklerindeki Bileşiklerin İzolasyonu, Yapı Tayini ve Antiproliferatif Aktivitelerinin İncelenmesi’’, Yüksek Lisans Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Tokat, 33.

Başer, K. H. C. (1990) ‘‘Tıbbi Bitki ve Baharatların Dünyada ve Türkiye’deki Ticareti ve Talep Durumu’’, ***Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Dergisi***, 53, 18-22.

Baytop, T. (1999) ‘‘Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi’’, ***Nobel Tıp Kitapevi***, Ankara, 481-501.

Baytop, T. (1980) “Farmakognozi”, ***Fatih Yayınevi***, İstanbul, 93.

Barton, D.H.R. and Overton, K.H. (1955) “Triterpenoids”, ***Part XX. The Constitution and Sterochemistry of a Novel Tetracyclic Triterpenoid***, J. Chem. Soc., 2639-2652.

Baykal, T. (1997) "Doğal kaynaklı bileşiklerin biyolojik aktivite yönünden değerlendirilmesi ve tedavideki yeri", **GE**, 46, 21-22.

Baytop, T. (1991) ''Türkiye'de kullanılan tıbbi bitkiler'', ***Nobel Tıp Kitapevleri***, 371.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001) ''Production of plant secondary metabolites: A historical perspective'', ***Plant Science***, 161 (5), 839-851.

Ben Sghaier, M., Skandrani, I., Nasr, N., Franca, M. G., Chekir-Ghedira, L. and Ghedira, K. (2011) "Flavonoids and sesquiterpenes from Tecurium ramosissimum promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: a structure-activity relationship study", ***Environ Toxicol Pharmacol***, 32(3), 336- 348.

Bukharov, V.G., and Karlin, V.V. **(**1970) " Structure of Scabioside G.; Khim. Prir. Soedin. 6, 373" ***Chem. Abstr***, 73, 110059.

Bukharov, V.G. and Karneeva, L.N. **(**1971) "Triterpenoid Glycosides from Sanguisorba officinalis. Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim. 1970, 2402" ***Chem. Abstr***. 74, 121340.

Bilaloğlu, G. V. ve Harmandar, M. (1997) "Flavonoidler", ***Aktif Yayınevi***, İstanbul,749-760.

Burbulis, I. E., Iacobucci, M. and Shirley, B. W. (1996) "A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis", ***The Plant Cell***, (8) 1013-1025.

Budihardjo, I. and Oliver, H.L.M. (1999) "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis", ***Annual Review of Cell and Developmental Biology***, 15, 269-290.

Büyükgebiz, O. ve Caferler, J.S. (2001) "Apoptosis", ***Sendrom***, 13(1), 102-107.

Boyle P. and Bernard, L. (2010) ''World Cancer Report 2008. Cedex, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer; 2008'', http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/index.php.
Son erişim tarihi: 01.04.2008.

Bozkurt, A. (2000) ''Antineoplastik ilaçlar'', Farmakoloji Ders Kitabı (içinde), Bökesoy, T. A., Çakıcı, İ., Melli M. (Eds.), ***Gazi Kitabevi***, Ankara, 625-640.

Brent, J.A. and Rumack, H.H. **(**1991) ''Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Biochemistry'', ***Clinical Toxivology***, 31,139-171.

Cragg, G. M., Newman, D. J. and Snader, K. M. (1997) ''Natural products in drug discovery and development'', ***Journal of Natural Products***, 60(1), 52-60.

Castaneda-Ovando, A., De Lourdes Pacheco- Hernandez, M. A., Elena Paez Hernandez, M. A., Rodriguez, J. A. and Galan-Vidal, C. A. (2009) ‘‘Chemical studies of anthocyanins: a review’’, ***Food Chemistry***, 113, 859-871.

Civitelli, R., Abbasi-Jarhomi, S. H., Halstead, L. R. and Dimarogonas, A. (1995) “Ipriflavone improves bone density and biomechanical properties of adult male rat bones”, ***Calcified Tissue International***, 56(3),215-19.

Conn, E. E. (1980) “Cyanogenic compounds”, ***Annuel Review of Plant Biology***, 31, 433-451.

Cioffi, G., Escobar, L. M., Braca, A. and De Tommasi, N. (2003) “Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from Maclura(Chlorophora) tinctoria”, ***Journal of Natural Products***, 66, 1061-1064.

Calabresi, P. and Chabner, B. A. (2001) ‘‘Chemotherapy of neoplastic diseases’’, Goodman ve Gilman’s The Pharmocological Basis of Therapeutics (içinde), Hardman, J. G., Limbird, L. E. (Eds.), 10. Edition, ***McGraw-Hill***, New york, 1386.

Cadenas E. and Davies KJA. (2000) ‘‘Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging’’, ***Free Radical Biology and Medicine***; 29(3), 222-230.

Choe, E. and Min, D. B. (2006) ‘‘Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods’’, ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 46, 1-22.

Cook, N.C. and Saman, S. (1996) ‘‘Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources’’, ***The Journal of Nutritional Biochemistry***, 7, 66-76.

Castellani, R. J., Zhu X., Moreira PI., Perry G. and Smith M.A. (2006) “Amyloid-β and τ in Alzheimer Disease: What is the Neuropathology Trying to Tell Us? ”, ***Taylor& Francis Group***, LLC, 6.

Çakar, B. (2010) ‘‘Ferulago Idaea ve Ferulago Trojana bitkilerindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi’’, Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 9-10.

Çalışkan, E. (2006) ‘‘İğde çiçeği (Elaeagnus Angustifolia) ve Kedi nanesi (Nepeta Catoria) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi’’, Yüksek Lisans Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Tokat, 13-15.

Davis, P. H., Tan, K. and Mill, R. R. (eds.) (1988) ‘‘Flora of Turkey and the east aegean islands’’, Vol. 10, ***Edinburgh University Press***, Edinburgh, 92-94.

Davis, P. H., Matthews V. A., Kupicha F. K. and Parris B. S. (1975) “Flora of Turkey and east aegan islands”, Vol. 5, ***Edinburgh at the University Press***, Edinburgh, 452-482, 560.

Dünya Sağlık Örgütü, WHO, 2011.

Dülger, B., Larner, J. M. and Grosh, W. W. (2005) ‘‘Mechanisms of action of antineoplastic drugs’’, Broody’s Human Pharmacology (içinde), Minneman, K. P., Wecker, L. (Eds.), ***Elsevier Mosby***, Pennsylvania, 523.

Dülger B., Ceylan M., Alıtsaous M. ve Ugurlu E. (1999) “Artemisia absinthium l. (pelin)’un antimikrobiyal aktivitesi”, ***Turkish Journal of Biology***, 23(3), 377-384.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. (2000) ‘‘Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı’’, ***Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve YüzüncüYıl Üniversitesi Yayınları***, Barışcan ofset, Ankara, 537.

Ekmekçi A., Konaç E. ve Önen Hİ. (2008) ‘‘Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık’’, ***Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı***, Ankara, 282-295.

Engin, M. S. (2007) ‘‘Taflan (laurocerasus officinalis *roem.)* bitkisinin meyve, çekirdek ve yapraklarının mevsim değişikliğine göre antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve fenolik bileşik tayini’’, Yüksek Lisans Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Tokat, 22-25.

Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. (2013). “Tibbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. ***Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi***, 2(6); 233-265.

Fang, T. T. and Lee, Y. H. (1991) “Investigation on characteristics of Japanese apricot cultivars in Taiwan”, ***Journal of the Agricultural Association of China,*** 156, 69-82.

Finar, I.L. and Pincibat M.R. (1983) “Organic Chemistry”, Vol.2, ***Longman***, London and New York, 788.

Firmin, J. L., Wilson, K. E., Rossen, L. and Johnston, A.W.B. (1986) “Flavonoid activation of nodulation genes in rhizobium reversed by other compounds present in plants”, ***Nature***, 324, 90.

Gao, J., Yang X., Yin, W. and Li M. (2018) ‘‘Gallnuts A Potential Treasure in Anticancer Drug’’, ***Discovery***, 1-9.

Geçibesler, İ. H. (2009) ‘‘Stachys byzantina C. Koch. (dağ çayı) bitki ekstresinin antikanserojen ve insektisit aktivitelerinin incelenmesi ve aktif bileşenlerin izolasyonu’’, Yüksek Lisan Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Tokat, 5-13.

Georgieva I., Kostova I., Trendafilova N., Rastogı V. and Kiefer W. (2010) “DFT, IR, Raman and NMR study of the coordination ability of coumarin-3-carboxylic acid to Pr(III) ”, ***Journal of Molecular Structure***, 979, 1-3, 115-121.

Güner, A. (2013) "Türkiye Bitkileri Listesi", ***Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları Flora Dizisi 1***, İstanbul, 1290.

Gülçin İ, Oktay M, Kireçci, E. ve Küfrevioğlu Öİ. (2003) ''Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts'', ***Food chemistry***, 83(3), 371-382.

Gülçin, İ. (2005) ''The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (Piper nigrum) seeds'', ***International journal of food sciences and nutrition***, 56(7), 491-499.

Gülçin, İ. (2002) "Isırgan otunun (*urtica dioica*) antioksidan aktivitesinin belirlenmesi, oksidatif enzimlerinin karakterizasyonu ve bazı *in vivo* etkilerinin incelenmesi", ***Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü***, 114.

Grierson, A. J. C. (1975) "Tanacetum L., In: P. H. Davis, Ed. Flora of Turkey and east aegean islands'', Volume 5**, *Edinburgh University Press***, Edinburgh, 295-311.

Grierson, A.J.C., Yavin, Z., Anthemis, L., In (Ed.) and Davis, P. H. (1975) ''Flora of Turkey and the East Aegean Islands'', ***Edinburgh University Press***, Edinburgh. vol. 5; pp. 174-221.

Guenther, E. (1975) "The Essential Oils, Vol.II", ***D.Von Nostrand Company Ltd***, New York, USA, 42.

Guliyev, V.B. ve Harmandar, M. (1999) ''*Flavonoidler*'', ***Bakanlar Matbaacılık***, İstanbul, 369.

Güner A., Özhatay N., Ekim T. ve Başer K. H. C. (2000) "Flora of Turkey and east aegean islands", Vol.11, ***Edinburgh at the University Press***, Edinburgh, 158-159.

Gören, N., Arda, N. ve Çaliskan, Z. (2002) "Chemical characterization and biological activities of the genus *Tanacetum* (Compositae)", ***Studies in Natural Products Chemistry***, 27, 547-658.

Hacıbekiroğlu, I. (2009) ''Irıs suaveolens'ten elde edilen bileşiklerin yapı tayini ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi'', Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 17-24.

Hatipoğlu, S. **(**2010) ''*Salvia adenophylla* ve *Salvia verticillata subsp. amasiaca* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu ve Yarı Sentetik Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz aktivitelerinin İncelenmesi'', *Yüksek Lisans Tezi*. ***İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, Türkiye,7-16.

Harborne J. B. (1988) ''Phytochemical Methods'', ***A Guıde to Modern Techniques of Plant Analysis***, ***Third Edition***, Chapman&Hall, London, 67.

Harborne J. B. (1988) ‘‘Phytochemical Methods’’, ***A Guıde to Modern Techniques of Plant Analysis, Third Edition***, Chapman&Hall, London, 74.

Harborne, J.B., Mabry, T.J. and Mabry, H. (1975) ‘‘The Flavonoids’’, ***Chapman and Hall***, London, 197.

Harborne, J. B. and Mabry, T. J. (Eds.), (1982) ‘‘The Flavonoids’’, ***Advances in Research***, Vols., Chapmanand Hall, London, 1–2.

Harborne, J. B. (1967) “Comparative Biochemistry of the Flavonoids”, ***Academic Press***, London, 125.

Harborne, J. B. and Mabry T. J. (1975) “The Flavonoids”, ***Chapman and Hall ltd***.,USA, 669.

Harborne, J. B. (1988) “The Flavonoids Advances in Research Ed”, ***Chapman and Hall***, London, 329.

Halliwell, B., Gutteridge J. M. and Cross, E.C. (1992) ‘‘Free Radical, Antioxidants, and Human Disease: Where are we now? ’’, ***Journal of Laboratory and Clinical Medicine***, 119 (6), 598-620.

Halliwel, B. **(**1999) ‘‘Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept’’, ***Nutrition Reviews***, 57, 104-113.

Halliwell, B. (1994) ‘‘Free radicals and antioxidants: A personal view’’, ***Nutrition Reviews***, 52 (8), 253-265.

Halliwell, B. (1989) ‘‘Tell me about free radicals, doctor: a review’’, ***Journal of the Royal Society of Medicine***, 82, 747 -752.

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Vandeputte, B. (1993) “Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices”, ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 41(8), 1242-1246.

Hetts, S.W. (1998) “To die or not to die”, ***The Journal of The American Medical Association (JAMA)***, 279, 300-307.

Hurley LH. (2002) ‘‘DNA and its Associated Processes as Targets for Cancer Therapy’’, ***Nature Reviews Cancer***, 2, 188-200.

Jeney, E. and Uri, J. (1954) “Pharmacological effect of flavone dyes”, ***Pharmazie***, 9(7), 533- 546.

Kandemir, A., Sevindi, C., Korkmaz, M. ve Çelikoğlu, Ş. (2015) “Erzincan (Türkiye)’a Özgü Endemik Bitki Taksonlarının IUCN Tehdit Kategorileri”, ***Bağbahçe Bilim Dergisi,*** 2(1), 43-65.

Kandemir, A. (2006) "Türk*iye'nin BTC Boru Hattı Boyunca Önemli Bitki Alanları*", ***Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Ed. Dr. Neriman Özhatay***, İstanbul, 126-179.

Kandemir, A. ve Makbul, S. (2004) ''Erzincan'da yayılış gösteren bazı nadir bitki türleri üzerine gözlemler'', ***Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi***, 6(2), 37-49.

Karaliota, A., Kretsi, O., and Tzougraki, C. (2001) "Synthesis and characterization of a binuclear coumarin-3-carboxylate copper(II) complex", ***Journal of Inorganic Biochemistry***, 84, 1-2, 33-37.

Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2000) ''Biyokimya'', ***Aktif Yayınevi***, Erzurum, 377-380.

Keleştemur, T. G. (2011) "Balıklarda Antioksidan Savunma ve Oksidatif Stres", ***Bibad ; Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi***, 4(1), 69-73.

Kılınç, K. ve Kılınç, A. (2002) ''Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri'', ***Hacettepe Tıp Dergisi***, 33(2), 110-118.

Kim, I. S., Yang, M., Lee, O.H. and Kang, S.N. (2011) ''The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts'', ***LWT - Food Science and Technology***, 44,1328-1332.

Kumar, V. and Tyagi, D. (2013) "Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of Genus *Tanacetum"* ***Journal Pharmacogn Phytochem,*** 2(3), 155-159.

Kürkçüoğlu, M. (2010) ''Sekonder metabolitler'', Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri, ***TC. Anadolu Üniversitesi Yayını***, Eskişehir, 4-6.

Koçak, A. (2008) ''Elazığ ve çevresinde yetişen Tanacetum L. (asteraceae) taksonlarının taksonomik yönden araştırılması'', Doktora Tezi, ***Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Elazığ, 4-12.

Kocabaş, N. (2008) ''Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde quercetinin koruyucu etkisi'', Yüksek Lisans Tezi, ***Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Biyokimya A.B.D., Afyonkarahisar, 14-20, 30-36.

Kırmızıgül, S., Anıl, H., Uçar, F. ve Akdemir, K. (1996) "Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoic glycosides", ***Phytotherapy Research***, 10, 274-276.

Kırmızıgül S. (1993) "Master of Science Thesis", ***Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları,*** , İzmir, 171.

Kren, V. and Martinkova, L. (2001) "Glycosides in Medicine: The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity", ***Current Medicinal Chemistry***, 8,1313-1338.

Lawrence, N. J., Rennison, D., McGown, A. T. and Hadfield, J. A. (2003) "The total synthesis of an aurone isolated from Uvaria hamiltonii: Aurones an flavones as anticancer agents", ***Biorganic & Medicinal Chemistry Letters***, 13, 3759-3763.

Larson RA. (1988) ''The antioxidants of higher plants'', ***Phytochemistry***, 27(4), 969-978.

Mainardi, T., Kapoor, S. and Bielory, L. (2009) "Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their imminologic effects"**,** ***Clinical Reviews in Allergy and Immunology***, 123 (2), 283-294.

Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970) ''The Systematic Identification of Flavonoides, Springer-Verlag, New York. Ryzsnyak, S., and Szent-Greorgy, A., 1936'', ***Nature***, (138), 27.

Mabry, T. J. and Markham, K. R. (1975) ''Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids'', İçinde Harborne, J. B., Mabry, T. J., ve Mabry H. (Eds.), The Flavonoids, London, ***Chapman and Hall***, 46-47.

Maggi, F., Barboni, L., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Sagratini, G. and Vittori, S. (2011) "HPLC quantification of coumarin in bastard balm (Melittis melissophyllum L.,Lamiaceae) ", ***Fitoterapia***, 82, 8, 1215-1221.

Mathur R., Gupta S.K., Singh N., Sandeep M., Kochupillai V. and Velpandian T**. (**2006) ''Evaluation of the effect of *Withania somnifera* root extract on cell cycle and angiogenesis'', ***Journal of Ethnopharmacology***, 105(3): 336-344.

Maul, C., Sattler, I., Zerlin, M., Hinze, C., Koch, C., Maier, A., Grabley, S. and Thiericke, R. (1999) "Bimolecular-chemical screening: A novel screening approach for the discovery of biologically active secondary metabolites - III. new DNA-binding metabolites", ***Journal of Antibiotics***, 52 (12), 1124-1134.

Mavi, A. (2005) ''İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi'', ***Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Doktora Tezi, 52-53.

Merrill, R. and Weed, D. (2001) ''Measuring the public health burden of cancer in the United States through lifetime and oge-conditional risk estimates'', ***Annals of Epidemiology***, 11(8),547- 553.

Mucciarelli, M,. Maffei, M. and Wright, C.W., İn Editors. (2002) ''Introduction to the genus'', ***Taylo R & Francis Publishing***, Newyork, 1-51.

Mycek, M. J. and Harvey, R. A. (2001) ''Farmakoloji'', ***Güneş Kitabevi***, Ankara, 373-374.

Newall. (1996) ***British Herbal Pharmacopoeia***, 485.

Oskay, M. ve Tamer, A. (2009) ''Streptomyces kökenli antibiyotiklerin dünü, bugünü ve yarını'', ***Journal of New World Science Academy***, 4, 48-60.

Oğuz, A. (2008) ‘‘Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri’’, Yüksek Lisans Tezi, ***Gaziosmanpasa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı*** Tokat, 60.

Oıfe, L. and Richard, O. (2004) “Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer”, ***Current Pharmaceutical Desing***, 10, 3797-3811.

Papas, AM. (1996) ‘‘Determinants of antioxidant status in humans’’, ***Lipids***, 31(1), 77.

Packer, L. and Cadenoas E. (2002) ‘‘Oxidative Stress and Disease’’, ***Handbook of Antioxidants***. ***2nd Edn***,New York, Basel, USA, Marcel Dekker, 5-8.

Peters, N. K., Forst, J. W. and Long, S. R. (1986) “A plant flavone, luteolin, induces expression of rhizobium-meliloti nodulation genes”, ***Sience***, 233, 978.

Peterson, J. and Dwyer, J. (1998) “Flavonoids: Dietary occurence and biochemical activity”, ***Nutrition Research***, 18 (12), 1995-2018.

Rao, R. S. and Ravishankar, G. A. (2002) ‘‘Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites’’, ***Biotechnology Advances***, 20, 101-153.

Robbers, J.E., Speedie, M.K. and Tyler, V.E. (1996) “Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology”, ***Williams & Wilkins***, Baltimore, 1-144.

Robert, D.H.M., Jesus, M. and Stewart, A. B. (1982) “The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry, and Biochemistry”, ***Wiley***, 595-667.

Rodrigues, F.R., Tashima, A.K., Pereira, M.S.R., Mohamed R.S. and Cabral, F.A. (2008) “Coumarin solubility and extraction from emburana (Torresea cearensis) seeds with supercritical carbon dioxide”, ***The Journal of Supercritical Fluids***, 43, 3, 375-382.

Rossi, M., Lugo, A., Lagiou, P., Zucchetto, A., Polesel, J., Serraino, D., Negri, E., Trichopoulos, D. and La Vecchia, C. (2012) “Proanthocyanidins and other flavonoids in relation to pancreatic cancer: a case-control study in Italy”, ***Ann Oncol***, 23(6), 1488-1493.

Seçme, M. (2014) ‘‘Oleuropeinin Sh-Sy5y Nöroblastom Hücre Hattında Çeşitli Hücresel Yolaklardaki Etkisinin Belirlenmesi’’, ***Tıbbı Biyoloji Anabilim Dalı***, Denizli, 1-121.

Serafini, M., Bellocco, R., Wolk, A. and Ekstrom, A.M. (2002) “Total antioxidantpotential of fruit and vegetables and risk of gastric cancer”, ***Gastroenterology***, 123, 985– 991.

Seçme, M. (2014) ‘‘Oleuropeinin Sh-Sy5y Nöroblastom Hücre Hattında Çeşitli Hücresel Yolaklardaki Etkisinin Belirlenmesi’’, ***Tıbbı Biyoloji Anabilim Dalı***, Denizli, 1-121.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V., and Shukla, S. (2009) ‘‘İn vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert’’, ***Food and Chemical Toxicology***, 47,2338-2343.

Shukla, Y. and Singh, M. (2007) “Cancer preventive properties of ginger: ***A brief review. Food and Chemical Toxicology***”, 45, 683-690.

Simpson, M. G. (2006) ‘‘Plant Systematics’’, ***Elsevier Academic Pres***, California, 345-353.

Sigerist, H.E. **(**1960) ‘‘The historical development of the pathology and therapy of cancer”, ***In: Marti-Ibanez F, Editor. On the history of medicine***, New York: MD Publications Inc, 59-65.

Sies, H. (1991) ‘‘Oxidative Stres From Basic Research to Clinical Application’’, ***American Journal Medic***, 9, 31-37.

Sökmen, A., ve Gürel, E. (2001) ‘‘Sekonder Metabolit Üretimi’’, ***Bitki Biyoteknolojisi, Selçuk Üniversitesi Basımevi***, Konya, 211-261.

Şahin, A. (2010) ‘‘Bazı Centaurea Türlerinin Antiproliferatif Etkileri ve Aktif Bileşenlerin İzolasyonu’’, Doktora Tezi, ***Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Tokat, 252.

Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K. and Mariam, T. G. (2005) “Antimicrobial activities of some selected traditional ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders”, ***Journal of Ethnapharmacol***., 100 (1), 168-175.

Tschesche, R. and Wulff, G. (1973) “Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe”, ***Spinger-Verlag***, Wien, 30.

Tomasz, M., Nski, K. and Adamczak, A. (2018) ‘‘Anticancer Activity of Bacterial Proteins and Peptides’’, ***Pharmaceutics***, 10-54.

Vining, L.C. (1990) ‘‘Functions of secondary metabolites’’, ***Annual Review of Microbiology***, 44, 395-427.

Vogel, J.R., Beer, B. and Clody, D.E. (1971) “A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents”, ***Psychopharmacology***, 21, 1–7.

Yao, C. and Zeng, H. (2011) “Synthesis and Spectroscopic Study of Coumarin Derivatives”, ***UV-Vis absorption spectroscopy and fluorescence spectroscopy***, 27 (4), 599-603.

Zarate, R. and Yeoman, M.M. (2003) ‘‘Application of Recombinant DNA Technology to Studies on Plant Secondary Metabolism’’, ***Festschrift Neumann***, 1-7.

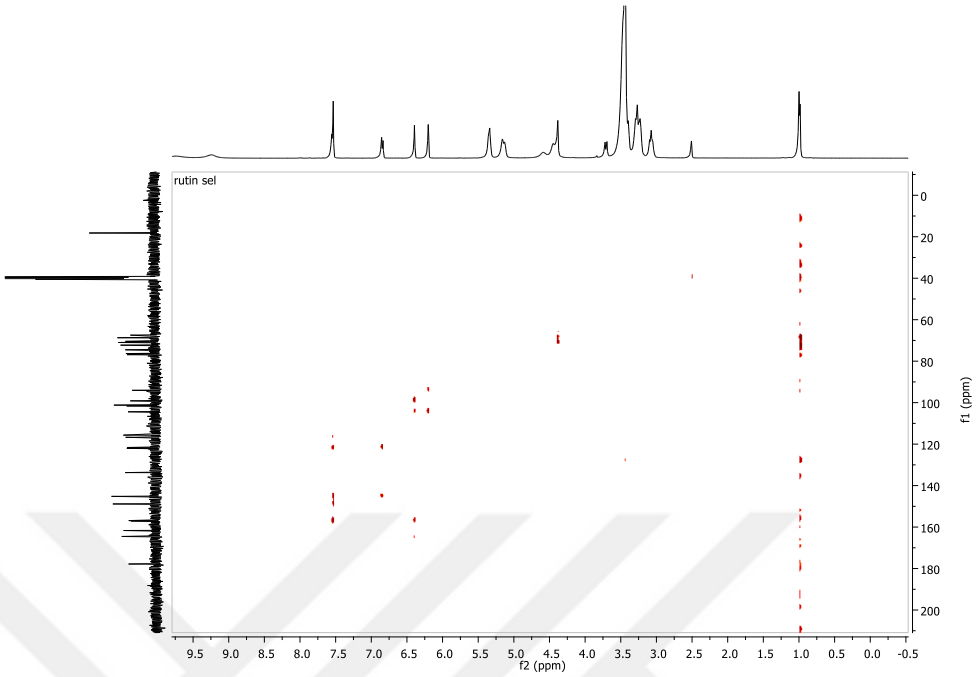
Wang, B. C., J. Deng, Y. M, Gao., L. C. Zhu., R, He. and Y. Q. Xu. (2011) ‘‘The screening toolbox of bioactive substances from natural products’’,***A review. Fitoterapia***, 82(8), 1141-1151.

Woitke, H.D., Kayser, J.P. and Hiller K. (1970) “Fortschritte in der Erforschung der Triterpensaponine”, ***Pharmazie***, Vol. 25, 133.

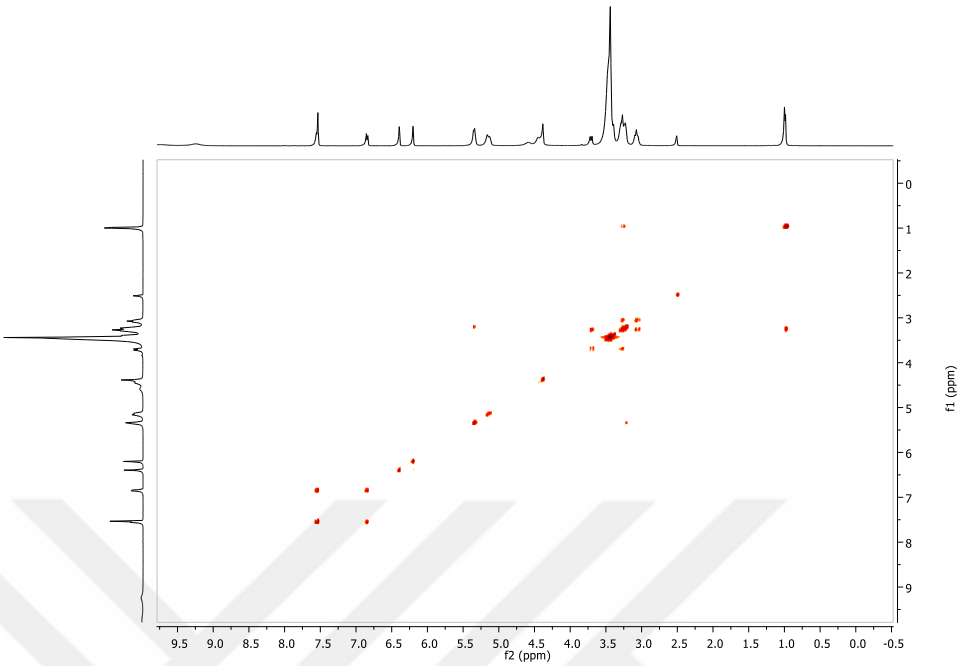
Wu, C., Chen, F., Rushing, J. W., Wang, X., Kim, H. J. and Huang, G. (2006) ‘‘Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines’’, ***J. Med Food***, 9(1), 55-61.

EKLER

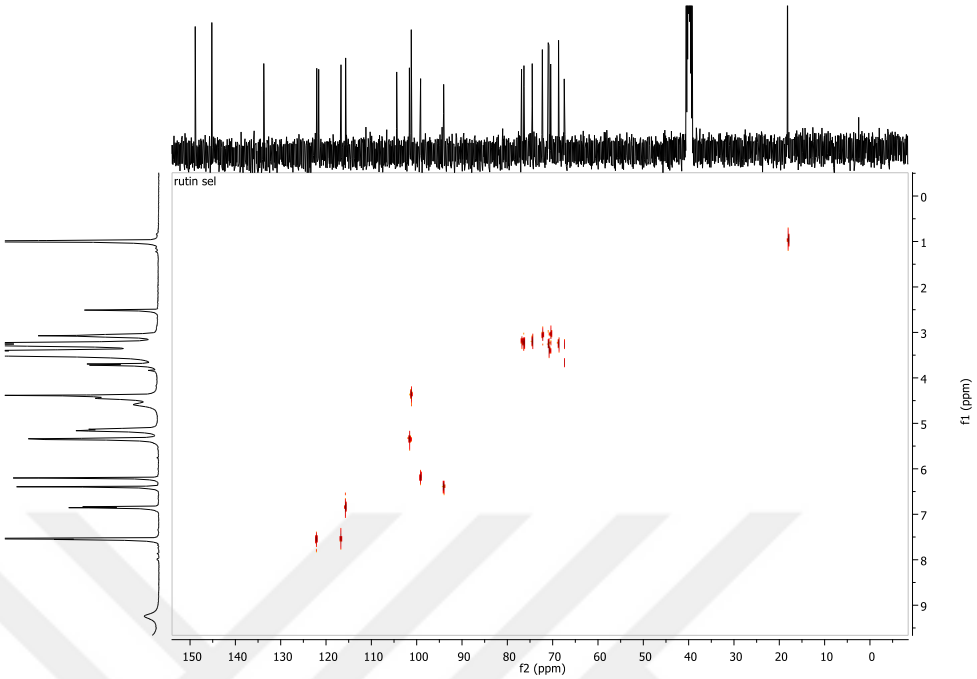
Ek-1. Rutin Bileşiğine Ait HMBC Spektrumu



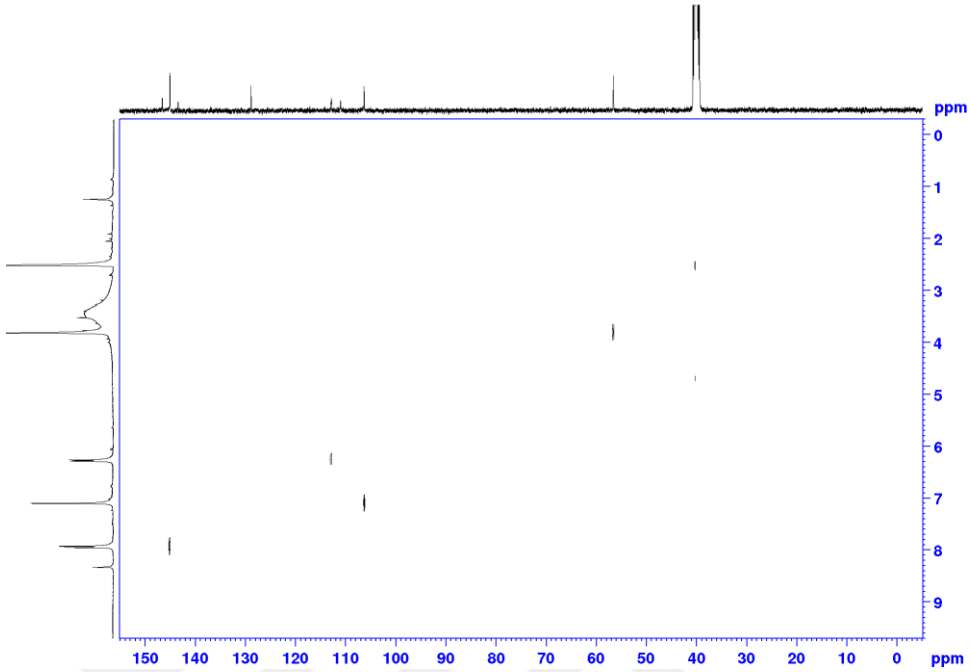
Ek-2. Rutin Bileşiğine Ait COSY Spektrumu



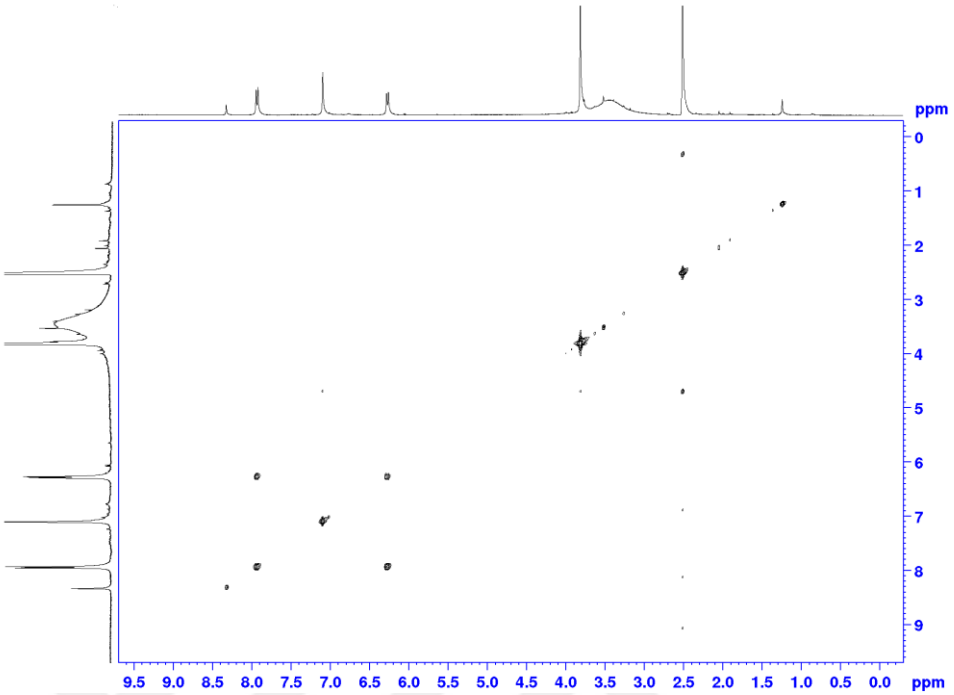
Ek-3. Rutin Bileşiğine Ait HETCOR Spektrumu



Ek-4. İzofraksetin Bileşiğine Ait HETCOR Spektrumu



Ek-5. İzofraksetin Bileşiğine Ait COSY Spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzincan'da doğdu. İlköğrenim, orta ve lise öğrenimini Erzincan'da tamamladı. İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2011 yılında mezun oldu. Kamu kurumunda memur olarak görev yapmaktadır. 2016 yılında, Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2018 yılında evlendi. Halen kimya anabilim dalın da yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.