ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ASTERACEAE FAMİLYASINA AİT BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Ali Rıza TÜFEKÇİ

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ali Rıza TÜFEKÇİ tarafından hazırlanan **"Asteraceae Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi"** adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman **: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ**

Jüri Üyeleri

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

Üye **: Prof. Dr. Tevfik ÖZEN**

Üye **: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR**

Üye **: Doç. Dr. Şevki ADEM**

Üye **: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cenk ANDAÇ**

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Asteraceae Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (09.07.2020)

Ali Rıza TÜFEKÇİ

ÖZET

Doktora Tezi

ASTERACEAE FAMİLYASINA AİT BAZI BİTKİ TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Ali Rıza TÜFEKÇİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu çalışmada, Çankırı ilinde yetişen ve Asteraceae familyasına ait endemik *Centaurea* türlerinin (*Centaurea paphlagonica* ve *Centaurea cankiriense*) fitokimyasal içeriğinin yanında, antiproliferatif, antioksidan, insektisit ve enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri incelendi. HeLa kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkiye sahip ekstrelerden aktivite yönlendirmeli izolasyon işlemleri yapıldı. *C.paphlagonica* çiçek (CPÇ) kısmından; bir tane yeni azotlu bileşik [**CPÇ-12 (Paphlagonica-1);** 5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on**]** ve onüç tane bilinen bileşik, *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) kısmından; bir tane yeni [**CPGY-8 (Paphlagonica-2);** 5,7,4'-trihidroksi-3,3'-dimetoksi 6-*O*-β-D glukozit**]** ve onbir tane bilinen bileşik ve *C. cankiriense* çiçek (CCÇ) kısmından; iki tane yeni [**CCGY-5 (Cankiriense-1);** morelosin 3-*O*-β-D glukozit ve **CCGY-9 (Cankiriense-2);** jaceosidin 7-*O*-β-D glukoz-[1→3]-*O*-β ksiloz**]** ve yedi tane bilinen bileşik izole edildi. İzole edilen bileşiklerin yapıları ^{1}H, ^{13}C, DEPT, HMBC, HSQC, COSY, NOESY, ROESY NMR, FTIR ve MS gibi spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. En güçlü antiproliferatif etkiyi sırasıyla 26.0 μM (CPGY-12), 50.0 μM (CPGY-10), 103.0 μM (CPGY-11) ve 153.0 μM (CPGY-7) kodlu bileşiklerin gösterdiği belirlendi. Ayrıca CPÇ (UY) ve CPÇ (EA) ekstrelerinin *Sitophilus granarius* böceğine karşı çok yüksek insektisit aktivite, CCGY ve CCK ekstrelerinin CA-I'e ve CPÇa (M/K) ektresinin CA-II enzimine karşı çok iyi hidrataz aktivite ve CPÇ (EA), CPÇ (He_3), CCGY (EA) ve CCGY (n-Bu) ekstrelerinin standartlara yakın hatta antioksidan aktivite çalışmasına bağlı olarak yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

2020, 212 sayfa

ANAHTAR KELİMELER*:* *Centaurea paphlagonica*, *Centaurea cankiriense*, Antiproliferatif aktivite, İnsektisit aktivite, Enzim aktivite, Antioksidan aktivite

ABSTRACT

PhD. Thesis

INVESTIGATION OF THE PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SOME PLANT SPECIES BELONG TO ASTERACEAE FAMILY

Ali Rıza TÜFEKÇİ

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

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this study, phytochemical contents and antiproliferative, antioxidant, insecticidal and enzymatic activities of some endemic *Centaurea* species (Asteraceae) from Cankiri province (*Centaurea paphlagonica* ve *Centaurea cankiriense*) were investigated. Bioactivity guided isolation procedures were performed on their extracts with antiproliferative activity against HeLa cells. One new nitrogen containing [**CPÇ-12** (**Paphlagonica-1**); 5-amino-1-diazenyl-3,4-dihydroxy-1,5-dihydro-2H-pyyrole-2-one] and thirteen known compounds from flower part of *C.paphlagonica* (CPÇ); one new [**CPGY-8 (Paphlagonica-2);** 5,7,4'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-6-*O*-β-D-glucoside] and eleven known compounds from stem part of *C. paphlagonica* (CPGY), and two new [**CCGY-5 (Cankiriense-1);** morelosin 3-*O*-β-D-glucoside and **CCGY-9 (Cankiriense-2);** jaceosidin-7-*O*-β-D-glucose-[1→3]-*O*-β-xylose**]** and seven known compounds from flower part of *C. cankiriense* were isolated. Molecular structures of the isolated compounds were revealed by spectroscopic methods like ^{1}H, ^{13}C, DEPT, HMBC, HSQC, COSY, NOESY, ROESY NMR, FTIR and MS. CPGY-12, CPGY-10, CPGY-11 and CPGY-7 showed the highest activities against HeLa cells with IC_{50} values of 26.0, 50.0, 103.0 and 153.0 μM, respectively. Additionally, CPÇ (EO) and CPÇ (EA) extracts showed high insecticidal activities against *Sitophilus granarius*, whereas CCGY and CCK extracts showed very good hydratase activity against CA-I enzyme and CPÇa (M/K) extract showed very good hydratase activity against CA-II enzyme. CPÇ (EA), CPÇ (He_3), CCGY (EA) and CCGY (n-Bu) extracts were determined to have antioxidant activities similar to, in some tests hihger than, the positive controls.

2020, 212 pages

Keywords: *Centaurea paphlagonica*, *Centaurea cankiriense*, Antiproliferative activity, Insecticial activity, Enzyme activity, Antioxidant activity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca maddi ve manevi bütün imkanları sağlamasının yanında; bitmek bilmez enerjisi, çalışma arzusu ve çalışmaya teşviki ile bilimsel bir yolda yürümemi sağlayan yönlendiren ve destekleyen danışman hocam Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a, doktora çalışmalarımda değerli bilgilerini paylaşan ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde değerli vaktini benden esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tevfik ÖZEN'e (Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü), tez izleme komitesinde bulunarak kıymetli ve değerli bilgilerini bu süre zarfında paylaşan Doç. Dr. Şevki ADEM'e, hiçbir karşılık beklemeden antikanser çalışmalarının yapılmasını sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Şevki ARSLAN'a (Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), doktora çalışmaları süresince her bilimsel çalışmada gece gündüz beraber olduğum, tezim için gerek bitki toplanması gerekse laboratuvar çalışmaları boyunca değerli bilgilerini paylaşan Arş Gör. Serkan KOLDAŞ ve Öğr. Gör. Fatih GÜL'e, doktora tezimin her anında zaman kavramı olmaksızın arayıp bilgisini aldığım ve özellikle kromatografi, izolasyon ve bileşiklerimin yapılarının çözülmesinde yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT'e teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım. Tez çalışmam için laboratuvar ve p-HPLC cihazını kullanma imkanı sunan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Kimya Bölümünden Prof. Dr. Ekrem KÖKSAL ve değerli çalışma ekibine teşekkür ederim.

Ayrıca; bu aşamaya gelmemi sağlayan ve bu yolda sevinciyle hüznüyle çok büyük emek ile desteklerini esirgemeyen aileme, çalışmalarım boyunca çok zaman ayıramadığım fakat sabır ve desteğini esirgemeyerek hayatını kayıtsız şartsız bana armağan eden eşim Ebru DERELLİ TÜFEKÇİ'ye, önce rabbimin sonra eşimin armağanı olan ve varlığı ile hayatıma anlam katan biricik kızım Defne Alya TÜFEKÇİ'ye sonsuz şükranlarımı sunarım.

2013-16 nolu BAP projesini destekleyerek mekan ve maddi kaynak sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi'ne, BAP birimi yönetici ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Ali Rıza TÜFEKÇİ

Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ÖZETLERİ 8
2.1 Çalışılan Bitkilere Ait Genel Özellikler 8
2.1.1 Asteraceae (Papatyagiller) familyası botanik özellikleri 8
2.1.2 *Centaurea* L. cinsi genel özellikleri 9
2.1.3 *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz 10
2.1.4 *Centaurea cankiriense* A. Duran & H. Duman 11
2.2 *Centaurea* L. Türlerinin Genel Kimyasal İçerikleri 12
2.2.1 Flavonoidler 13
2.2.2 Terpenler 19
2.2.2.1 Hemiterpenler 22
2.2.2.2 Monoterpenler 23
2.2.2.3 Seskiterpen ve seskiterpen laktonlar 25
2.2.2.4 Diterpenler 34
2.2.2.5 Triterpenler 36
2.2.3 Alkaloidler 38
2.3 *Centaurea* L. Türlerinin Farmakolojik Özellikleri 41
2.3.1 *Centaurea* L. türlerinin halk arasındaki tıbbi özellikleri 42
2.3.2 *Centaurea* L. türlerinin biyoaktivite çalışmaları 43
3. MATERYAL ve YÖNTEM 47
3.1 Bitkisel Materyal 47
3.2 Özütleme (Ekstraksiyon) 48
3.2.1 Bitki ekstraktlarının elde edilmesi 48
3.3 İzolasyon Çalışması 52
3.3.1 *C. paphlagonica* çiçek (CPÇ) ekstresi üzerine izolasyon çalışması 52
3.3.2 *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) ekstresi üzerine izolasyon çalışması 56
3.3.3 *C. cankiriense* gövde-yaprak (CCGY) ekstresi üzerine izolasyon çalışması 61
3.4 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* Bitkilerinden Uçucu Yağ Eldesi 64
3.5 Ekstraktların Kimyasal Bileşen Analizleri 65
3.4.2 GC-MS analizi 65
3.4.3 Uçuş zamanlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-TOF/MS) 65
3.5 Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Belirteçler 66
3.6 Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler 67
3.7 Bitki Ekstrelerinin *In vitro* Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları 68
3.7.1 xCELLigence RTCA-SP cihazı 68
3.7.2 Hücre sayım cihazı (Cedex HiRes analizör) 70
3.7.3 HeLa hücresinin hücre kültürü 71
3.7.3.1 Hücrelerin dondurulması ve saklanması 71

3.7.3.2 Hücrelerin sayılması işlemi 71
3.7.3.3 DMEM çözeltisinin hazırlanması 72
3.7.3.4 DMEM katkılı çözeltisinin hazırlanması 72
3.7.3.5 Tripsin EDTA çözeltisi 72
3.7.3.6 Penicilin streptomycin çözeltisi 72
3.7.3.7 DPBS tampon çözeltisinin hazırlanması 72
3.7.4 Örneklerin hazırlanması 73
3.7.5 Tümör hücresi (HeLa) proliferasyon deneyi (Kolorimetrik, *in vitro*) 73
3.8 Saf bileşiklerin *in vitro* Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları 73
3.8.1 Hücre kültürü 74
3.8.2 Sitotoksisite testi 74
3.8.3 Sonuçların değerlendirilmesi 75
3.9 *In vitro* Antioksidan Aktivite Çalışmaları 75
3.9.1 Toplam antioksidan kapasite 75
3.9.2 İndirgeme gücü tayini 76
3.9.3 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini 77
3.9.4 $ABTS^{\cdot+}$ Radikali giderme aktivitesi tayini 77
3.9.5 Süperoksit anyonu radikali giderme aktivitesi tayini 78
3.10 İnsektisit Aktivite Çalışmaları 79
3.10.1 Kontak toksisite etki çalışmaları 79
3.10.2 Tek doz fumigant etki çalışmaları 80
3.11. Enzim Aktivitesi Çalışmaları 81
3.11.1 Hidrataz aktivitesi 81
3.11.2 Esteraz aktivitesi 82
4. BULGULAR 83
4.1 *Centaurea* Türlerinde Antikanser Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular 83
4.2 *Centaurea* Türlerinde Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular 87
4.2.1 Toplam antioksidan kapasite tayini bulguları 88
4.2.2 İndirgeme gücü aktivitesi bulguları 88
4.2.3 Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi bulguları 88
4.2.4 $DDPH^{\cdot}$ radikali giderme aktivitesi bulguları 89
4.2.5 $ABTS^{\cdot+}$ radikali giderme aktivitesi bulguları 89
4.3 *Centaurea* Türlerinde Enzim Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular 90
4.4 *C. paphlagonica* (CPÇ) Bitkisinin Uçucu Yağ Bileşenleri 92
4.5 *Centaurea* Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları 94
4.6 *Centaurea* Türlerine Ait Ekstrelerin İnsektisit Aktivite Sonuçları 97
4.7 *C. cankiriense* Gövde-Yaprak (CCGY) Kısmından İzole Edilen Bileşikler 99
4.7.1 (CCGY-5) Bileşiği (Cankiriense-1) 99
4.7.2 CCGY-9 Bileşiği (Cankiriense-2) (Jaceosidin 7-*O*-β-D glukoz-[1→3]-*O*-β ksiloz) 111
4.7.3 CCGY-2 Bileşiği (Klorojenik asit) 119
4.7.4. CCGY-4 Bileşiği (Kafeik asit) 124
4.8 *C. paphlagonica* Bitkisinin Çiçek (CPÇ) Kısmından İzole Edilen Bileşikler 130
4.8.1 CPÇ-12 Bileşiği (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) (Paphlagonica-1) 130
4.8.2 CPÇ-9 Bileşiği (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) 137
4.8.3 CPÇ-8 Bileşiği (1,3-dikafeoilkuinik asit) 144
4.9 *C. paphlagonica* Bitkisinin Gövde-Yaprak (CPGY)'dan İzole Edilen Bileşikler 153

4.9.1 CPGY-8 Bileşiği (Paphlagonica-2) 153
4.9.2 CPGY-11 Bileşiği (deasilsinaropikrin) 163
4.9.3 CPGY-12 Bileşiği [8α-*O*-(2', 3'-dihidroksiizobütiril) desasiklinaropikrin] 169
4.10 İzole edilen bileşiklerin Antikanser Aktivite Sonuçları 177
5. TARTIŞMA 181
6. SONUÇ 210
KAYNAKLAR 213
EKLER 236
EK 1 CCGY bitkisinden izole edilen bileşiklere ait spektral veriler 236
EK 2 CPÇ bitkisinden izole edilen bileşiklere ait spektral veriler 252
EK 3 CPGY bitkisinden izole edilen bileşiklere ait spektral veriler 274
ÖZGEÇMİŞ 292

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

δ	Kimyasal Kayma
º	Derece (Lokasyon)
′	Dakika (Lokasyon)
″	Saniye (Lokasyon)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
MS	Kütle Spektroskopisi
p-HPLC	Preparatif Yüksek Basıçlı Sıvı Kromatografi
TOF/LC-MS	Uçuş Zamanlı Yüksek Başınçlı Sıvı Kromatografi Kütle Spektroskopisi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
COSY	Homonükleer Korelasyon Spektroskopisi
HMBC	Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu
HSQC	Heteronükleer Tek Kuantum Korelasyonu
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
EtOAc	Etil asetat
AA	Asetik asit
FA	Formik asit
n-BuOH	*n*-bütanol
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
Fr	Fraksiyon
DPPH$^{\bullet}$	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
AAPH$^{\bullet}$	2,2'-Azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür
AD	Alzeimer hastalığı (Alzheimer's disease)
Pre	Preperatif
EC_{50}	Başlangıç konsantrasyonunu %50 azaltacak konsantrasyon miktarı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Dünyada hastalıklara bağlı olarak insan ölümlerin nedenleri……..4
Şekil 2.1 *C. paphlagonica* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası…….....11
Şekil 2.2 *C. paphlagonica* bitkisinin genel görünümü……..11
Şekil 2.3 *C. cankiriense* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası……12
Şekil 2.4 *C. cankiriense* bitkisinin genel görünümü……..12
Şekil 2.5 Flavonoidlerin biyosentez yolakları…….....13
Şekil 2.6 Doğadaki bitkilerde bulunan sekonder bileşiklerin dağılımı…….20
Şekil 2.7 Terpenoidlerin biyosentez yolakları…….....21
Şekil 2.8 Bazı bitki türlerinden izole edilen hemiterpenoidler……..22
Şekil 2.9 Monoterpenlerin (monoterpenoid) biyosentezi ve bazı monoterpenler…….24
Şekil 2.10 Seskiterpenlerin biyosentezi ve bazı seskiterpenler……26
Şekil 2.11 Seskiterpen bileşiklerine ait bazı ana iskeletler……27
Şekil 2.12 Bazı seskiterpen lakton grupları…….....27
Şekil 2.13 Seskiterpen laktonların biyosentezi ve bazı seskiterpen laktonlar…….....28
Şekil 2.14 Diterpenlerin biyo-sentezi ve bazı diterpenler……35
Şekil 2.15 Triterpenlerin bio-sentezi ve bazı triterpenler……..36
Şekil 2.16 Alkaloidlerin temel olarak türedikleri biyosentez basamakları……39
Şekil 3.1 Biyolojik aktivite için parçalanmış bitkilerin ekstraksiyon işlemi…….....49
Şekil 3.2 Bitki materyallerinden ham ekstrelerin elde edilme şeması…….....50
Şekil 3.3 CPÇ ekstrelerinin elde edilme şeması……51
Şekil 3.4 CPGY ekstrelerinin elde edilme şeması…….....51
Şekil 3.5 CCGY ekstrelerinin elde edilme şeması……52
Şekil 3.6 CPÇ (EtOAc ekstresi) izolasyon şeması…….....55
Şekil 3.7 CPÇ (n-BuOH ekstresi) izolasyon şeması……..56
Şekil 3.8 CPGY (EtOAc ekstresi) izolasyon şeması…….....59
Şekil 3.9 CPGY (n-BuOH ekstresi) izolasyon şeması……..60
Şekil 3.10 CCGY (EtOAc ekstresi) izolasyon şeması…….....62
Şekil 3.11 CCGY (n-BuOH ekstresi) izolasyon şeması……64
Şekil 3.12 Uçucu yağ (Neo clavenger) aparatı……..65
Şekil 3.13 xCELLigence RTCA-SP cihazı ve temel bileşenleri…….....69
Şekil 3.14 Cedex HiRes Analizörü……70
Şekil 3.15 DPPH radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon…….....77
Şekil 3.16 ABTS radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon…….....78
Şekil 3.17 İnsektisit aktivite çalışmasına ait görüntü……80
Şekil 3.18 *p*-nitrofenilasetatın, *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması……..82
Şekil 4.1 CCÇ ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği……..84
Şekil 4.2 CCGY ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği…….....84
Şekil 4.3 CCK ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği……..84
Şekil 4.4 CPÇ ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği……..85
Şekil 4.5 CPGY ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği…….....85
Şekil 4.6 CPK ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği……..86
Şekil 4.7 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin CA-I izoenzimine karşı hidrataz aktivitesi grafikleri…….....91
Şekil 4.8 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin CA-II izoenzimine karşı

hidrataz aktivitesi grafikleri…….....91
Şekil 4.9 CPÇ bitkisinin uçucu yağ bileşenlerine ait GC-MS kromatogramı…….....92
Şekil 4.10 CPÇ bitkisinin uçucu yağ içerisindeki ana bileşenler……..94
Şekil 4.11 HPLC-TOF/MS analizine göre *C. cankiriense* ekstrelerindeki ana bileşenler……..96
Şekil 4.12 HPLC-TOF/MS analizine göre *C. paphlagonica* ekstrelerindeki ana bileşenler……..97
Şekil 4.13 İnsektisit aktivite çalışma resmi…….....98
Şekil 4.14 Fumigant aktivite çalışma resmi…….....98
Şekil 4.15 CCGY-5 bileşiğinin (Cankiriense-1) MS spektrumu…….....100
Şekil 4.16 CCGY-5 bileşiğinin (Cankiriense-1) MS-MS parçalanma ürünleri……...101
Şekil 4.17 CCGY-5 bileşiğinin (Cankiriense-1) yapısı…….....102
Şekil 4.18 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)…....105
Şekil 4.19 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)…...106
Şekil 4.20 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……106
Şekil 4.21 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HSQC etkileşimi…….....107
Şekil 4.22 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……...107
Şekil 4.23 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğine ait HMBC etkileşimi……....108
Şekil 4.24 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……...108
Şekil 4.25 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğine ait COSY etkileşimi……109
Şekil 4.26 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……..109
Şekil 4.27 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (devam) (DMSO-d_6)……110
Şekil 4.28 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) MS spektrumu……111
Şekil 4.29 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) kimyasal yapısı……112
Şekil 4.30 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)……116
Şekil 4.31 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)…...116
Şekil 4.32 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……117
Şekil 4.33 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……117
Şekil 4.34 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……118
Şekil 4.35 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) yapısı……..120
Şekil 4.36 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)……121
Şekil 4.37 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)…..121
Şekil 4.38 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) COSY NMR spektrumu (MeOD-d_4) ……122
Şekil 4.39 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) HSQC NMR spektrumu (MeOD-d_4) ……122
Şekil 4.40 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) HMBC NMR spektrumu (MeOD-d_4) ……123
Şekil 4.41 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) yapısı……125
Şekil 4.42 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)……..125

Şekil 4.43 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)…….126
Şekil 4.44 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) DEPT NMR spektrumu (MeOD-d_4)……126
Şekil 4.45 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) HSQC NMR spektrumu (MeOD-d_4)……127
Şekil 4.46 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) HMBC NMR spektrumu (MeOD-d_4)…..127
Şekil 4.47 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) COSY NMR spektrumu (MeOD-d_4)……128
Şekil 4.48 *C. cankiriense* Gövde-Yaprak (CCGY) kısmından izole edilen bileşikler…129
Şekil 4.49 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) kimyasal yapısı……...131
Şekil 4.50 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) MS spektrumu……131
Şekil 4.51 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) MS-MS parçalanma ürünleri……..131
Şekil 4.52 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)…….....134
Şekil 4.53 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)……134
Şekil 4.54 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)……135
Şekil 4.55 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)……...135
Şekil 4.56 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)……..136
Şekil 4.57 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)……...136
Şekil 4.58 CPÇ-9 (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) bileşiğinin kimyasal yapısı ……..……..137
Şekil 4.59 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)……140
Şekil 4.60 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{1}H NMR spektrumu (D_2O ilavesi ile)……140
Şekil 4.61 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)……...141
Şekil 4.62 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)……...141
Şekil 4.63 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……..142
Şekil 4.64 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) HMBC etkileşimi ……142
Şekil 4.65 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)……...143
Şekil 4.66 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)……...143
Şekil 4.67 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) kimyasal yapısı……144
Şekil 4.68 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……...147
Şekil 4.69 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……...147
Şekil 4.70 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)……148
Şekil 4.71 CPÇ-8 bileşiğine ait heteronükleer korelasyonlu HSQC etkileşimi……..148
Şekil 4.72 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) HSQC NMR spektrumu……..149

Şekil 4.73 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) HMBC etkileşimi……149
Şekil 4.74 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)…….....150
Şekil 4.75 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)…….150
Şekil 4.76 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) COSY NMR spektrumu (devam) **(**DMSO- d_6)……151
Şekil 4.77 *C. paphlagonica* Çiçek (CPÇ) kısmından izole edilen bileşikler……...152
Şekil 4.78 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) MS spektrumu……...154
Şekil 4.79 CPGY-8 bileşiği (Paphlagonica-2) için önerilen MS-MS parçalanma ürünleri ……155
Şekil 4.80 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) yapısı…….156
Şekil 4.81 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)…...159
Şekil 4.82 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)….159
Şekil 4.83 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……160
Şekil 4.84 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……160
Şekil 4.85 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HSQC etkileşimi……...161
Şekil 4.86 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……161
Şekil 4.87 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HMBC etkileşimleri……..162
Şekil 4.88 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6) ……162
Şekil 4.89 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) kimyasal yapısı……...163
Şekil 4.90 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1) ……165
Şekil 4.91 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1) ……165
Şekil 4.92 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{13}C DEPT NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)……..166
Şekil 4.93 CPGY-11 bileşiğinin HSQC etkileşimleri……166
Şekil 4.94 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) HSQC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1) ……167
Şekil 4.95 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) HMBC etkileşimleri……167
Şekil 4.96 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) HMBC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1) ……...168
Şekil 4.97 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) COSY NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1) ……168
Şekil 4.98 CPGY-12 bileşiğinin [8α-*O*-(2',3'-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] yapısı……..169
Şekil 4.99 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{1}H N MR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)…… ……..….172
Şekil 4.100 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)……...172
Şekil 4.101 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{13}C DEPT NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)…….....173
Şekil 4.102 CPGY-12 bileşiğine ait **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]**

HMBC etkileşimleri……...173
Şekil 4.103 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** HMBC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)…….174
Şekil 4.104 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** HSQC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)……..174
Şekil 4.105 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** ^{1}H-^{1}H COSY NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)……...175
Şekil 4.106 *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) kısmından izole edilen bileşikler ……176
Şekil 4.107 *C. cankiriense* gövde-yaprak (CCGY) kısımlarından izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antikanser aktivite grafikleri ……..177
Şekil 4.108 *C. paphlagonica* çiçek (CPÇ) ekstresinden izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafikleri……..178
Şekil 4.109 *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) ekstresinden izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafikleri……179
Şekil 5.1 İzole edilen bazı seskiterpen laktonların……..192
Şekil 5.2 *Psephellus pyrrhoblepharus* bitkisinden izole edilen seskiterpen laktonlar…194
Şekil 5.3 *Centaurea arenaria* bitkisinden izole edilen bazı flavonoidler……198

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Kansere sebep olan etmenler ve oranları……4
Çizelge 2.1 *Centaurea* türlerinden izole edilen flavonoidler……...14
Çizelge 2.2 *Centaurea* türlerinden izole edilen seskiterpen/seskiterpen laktonlar……..29
Çizelge 2.3 Ana halka yapısına göre bazı alkoloidler……40
Çizelge 3.1 Çalışılan bitkilere ait kısa kodlar……..49
Çizelge 3.2 1 ml'lik kuvarz küvet içerisindeki karışımları…….....82
Çizelge 4.1 Çalışma bitkilerine ait kısaltmalar ve verim miktarı……83
Çizelge 4.2 *Centaurea* türlerine ait ekstrelerin total antioksidan aktivite, indirgeme gücü, serbest radikal giderme, süperoksit anyon radikali giderme ve $ABTS^{+\cdot}$ radikali giderme aktiviteleri……87
Çizelge 4.3 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin CA-I ve CA-II izoenzimlerine karşı hidrataz aktivitesi…….....90
Çizelge 4.4 *C. paphlagonica* çiçek kısmının (CPÇ, EO) uçucu yağ bileşenleri…….....93
Çizelge 4.5 *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin HPLC-TOF/MS analiz sonuçları…….95
Çizelge 4.6 *C. paphlagonica* ekstrelerinin HPLC-TOF/MS ile kantitatif analiz sonuçları …….....96
Çizelge 4.7 *C. cankiriense* ve *C. paphlagonica* bitki ekstrelerinin *Sitophilus granarius* böceğine karşı kontak toksisite insektisit aktivite sonuçları……..97
Çizelge 4.8 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6) ……..104
Çizelge 4.9 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6) ……..115
Çizelge 4.10 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR sinyalleri (MeOD-d_4)……...120
Çizelge 4.11 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (MeOD-d_4) ……..125
Çizelge 4.12 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)……133
Çizelge 4.13 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)……139
Çizelge 4.14 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)……...146
Çizelge 4.15 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)…… ……..158
Çizelge 4.16 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri ($CDCI_3$-d_1)……...165
Çizelge 4.17 CPGY-12 bileşiği [8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri ($CDCI_3$-d_1)……..171
Çizelge 4.20 HeLa hücresine karşı aktivite gösteren bileşiklere ait IC_{50} değerleri…...180
Çizelge 5.1 CPGY-8 (Paphlagonica-2) bileşiğinin in siliko hedef molekülleri…….200
Çizelge 5.2 CCGY-9 (Cankiriense-2) bileşiğinin in siliko hedef molekülleri……...201
Çizelge 5.3 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiklerinin in siliko hedef molekülleri……...202

1. GİRİŞ

İnsanoğlu pek çok nesneyi doğada bularak, onu işleyerek ve doğayı kendi yararına kullanarak hayatını idame etmiştir. Binlerce yıl boyunca hiçbir yöntemin bilinmediği yaygın hastalıkların tedavi edilmesinde bitki temelli ürünlerden faydalanılmıştır. İnsanlık sayısız bitkisel kaynaklı ürünü temelini bilimsel hiçbir anlam içermeyen tamamen deneme yanılma yoluyla öğrendikleri pekçok metodu hastalıkların tedavisinde kullanmışlar ve geleneksel aktarım yolu ile kuşaktan kuşağa aktarılarak bu tedavi yöntemlerinin gününmüze kadar geliştirilerek gelmesine katkıda bulunmuşlardır. Bitkilerin tedavi edici özelliği, kendine özgü içerdiği ve etkili olan maddelerden kaynaklanmaktadır. Doğal ürünler, tarih boyunca eski uygarlıklardan çeşitli örnekler ile gelen tıp ve kimya ile yakın ilişkilere sahiptir. Bu ilişki geleneksel ya da bitkisel tıbbın kullanım alanlarını içine almaktadır. Bu zamana gelene kadar mevcut yöntemler ya bazı modern yöntemlerin temelini oluşturmuş ya da bazıları etkisini yitirip unutulmuştur. Hatta bu kullanım şekli doğal ürün kaynağına mistik anlamlar bile katmıştır. Örneğin, antibakteriyel, antioksidan ve kolinerjik gibi çeşitli biyolojik etkilere sahip olduğu bilinen adaçayını bu özelliği mistik olarak onun kötülüğü bıraktırdığı mistik düşüncenin var olmasına neden olmuştur (Moritomo *et al.* 2000). Bu özellikleri bitkilerin bünyesinde sahip oldukları doğal ürünlerden fenolik bileşiklerden ileri gelmektedir. Fenolik bileşiklerin biyosentezi, shikimik asit ve poliasetat yollarından meydana gelir ve esas olarak basit fenolleri, fenolik asitleri, stilbenleri, kumarinleri, flavonoidleri, antosiyaninleri, kateşinleri ve tanenleri içerir. Genellikle bitkinin bulunduğu yerde bitkiye büyüme, rakip, patojenler veya yırtıcılara karşı savunma mekanizmaları gibi kritik roller yüklenerek biyolojik aktiviteden sorumlu olduğu ve biyolojik aktivite özelliği katmaktadır (Morimoto and Komai 2000). Fenolikler veya polifenoller bitkilerde en yaygın olarak bulunan antioksidanlardır. Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, moleküler yapılarıyla ilişkilidir. Sahip olduğu hidroksil gruplu halkalı yapılarından dolayı fenolikler kendi elektronlarını serbest radikallere aktarabilir, ancak moleküler yapıları serbest radikal bileşiği olmalarını önler. Bununla birlikte, elektron transfer potansiyelleri nedeniyle, demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında, artan fenolik bileşik konsantrasyonları fentom reaksiyonları yoluyla reaktif oksijen türleri üretebilir. Fenoliklerin sayısı, çeşitli kanser hastalıklarına karşı koruyucu, önleyici ve

terapatik etkilere sahiptir. *İn vitro* ve *in vivo* kanser çalışmaları fenolik yapıdaki bileşiklerin antikanser ve apoptozu indükleyici özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Yar Khan *et al.* 2012). Polifenoller, yapılarında içerdikleri fenol halkalarının fonksiyon ve sayılarına göre ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elemanlara dayanarak farklı gruplara ayrılmıştır (Pandey and Rizvi 2009). Bazı bilim insanları bitkileri, kendisinin sentezleyip ya da içerdiği fungus ya da mikroorganizmalara sentezletip onun korunmasını ve büyümesini sağlayan biyoaktif bileşiklerden dolayı bir hazine evi olarak görmektedir (Gouda *et al.* 2016). *Taxus brevifolia* (porsuk ağacı) bitkisinin kabuğundan izole edilen taksol ve paklitaksel bileşikleri akciğer, göğüs ve yumurtalık kanserlerinin tedavisi için kullanılmaktadır. *Artemisia annua* bitkisinden izole edilen artemisinin bileşiği sıtmaya karşı kullanılmakta ve karaciğer hastalıklarında kullanılan silimarin bileşiği *Silybum arianum* bitkisinden izole edilmiş ve ilaç olarak yıllardır kullanılan bitki temelli bileşiklere en iyi örnektir. Birçok kemoterapötik ajan doğal kaynaklardan (bitkiler, deniz kaynakları ve mikroorganizmalar) elde edilir (Santosh *et al.* 2017). Doğal bileşikler, tedavi edici (terapötik) olarak etkili antikanser ilaçları için iskeletler sağlamıştır.

Canlıların temel yapı taşı olan hücreler biraraya gelerek dokuları, dokular bir araya gelerek organları oluşturduğu insanlık tarihi kadar eski bir bilimsel sunudur. Hücrelerin belirli diziliş ve düzen içinde bir araya gelmesini belirli görevler üstlenerek oluşmaktadır. Hücreler ayrıca belirli bir hız ve kontrol altında çoğalması gerekmektedir. Bunun olması durumunda hücre sağlıklı hücre tanımını almaktadır. Sağlıklı hücrelerin (kas ve sinir hücreleri hariç) bölünebilme yetenekleri bulunmaktadır. Hücreler sonsuz bir şekilde bölünemezler. Öte yandan yaşlanıp sağlıksız hücre konumuna düşen hücrelerin canlı sisteminde hızla yıkılması gerekmektedir. Hücre içinde ya da dışındaki ölen ya da yaralı olan hücrelerin yıkılması gerekmektedir. Sağlıklı herbir hücre belirli bölünebilme sayısına sahiptir ve planlı ve kontrollü bir şekilde bölünebilmektedir. Bu durumun yanlış işlemesi sonucunda, kontrolsüz şekilde hücre çoğalmaları kanser hücreleri şeklinde ifade edilmektedir. Tarih boyunca kanser insan ve hayvanlarda sık görülen bir problem olmuştur. Kanser hakkında bilinen eski kayıtlar MÖ 3000 yılına kadar uzanmaktadır. Kanser kelimesi Latince yengeç anlamına gelen “canker’’ veya ‘’carcinos’’ kelimelerinden türemiştir. Tümör terimi ilk defa MÖ 3. yüzyılda tümörün

etrafındaki şişmiş damarları bir yengecin bacaklarına benzettiği için Hippokrat tarafından kullanılmış, Yunan Doktor Galen ise şişme anlamına gelen "oncos" terimini kullanmıştır (Fitzmaurice *et al.* 2015, Pavlopoulou *et al.* 2015). Hücrelerin çoğalmasında, kanser hücrelerinin yapısal farklılışmasının yanında işlevsel farklılaşmada söz konusudur. Örneğin; normalde kanserli hücrelere dönüşen hücre yaptığı işlevleri yerine getiremezken, bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevlerde kazanabilmektedir. Kanser hücreleri çoğalarak tümörleri (kitleleri) oluştururlar. Tümörler bulundukları yerlerdeki normal hücre ve dokuları işgal ederek çalışamalarını engellemektedir. Kanser hücrelerinin oluştukları tümörler, hücrelerinden ayrılarak kan ya da lenf dolaşım sistemi ile canlının diğer organ ya da bölgelerine gidebilirler. Tümörlü hücrelerin gittikleri yerlerde koloni şeklinde yayılma olayına metastaz adi verilir. Hücrenin esas yapısının bozulup kanserli hücre olarak biçim alması ve tanınması zaman almaktadır. Bu zaman kanser cinslerine göre değişkenlik göstermektedir. Kanserler doku ve organlara göre isimlendirilirler ve başladıkları organ ve mikroskop altındaki görünüşlerine göre sınıflandırılırlar.

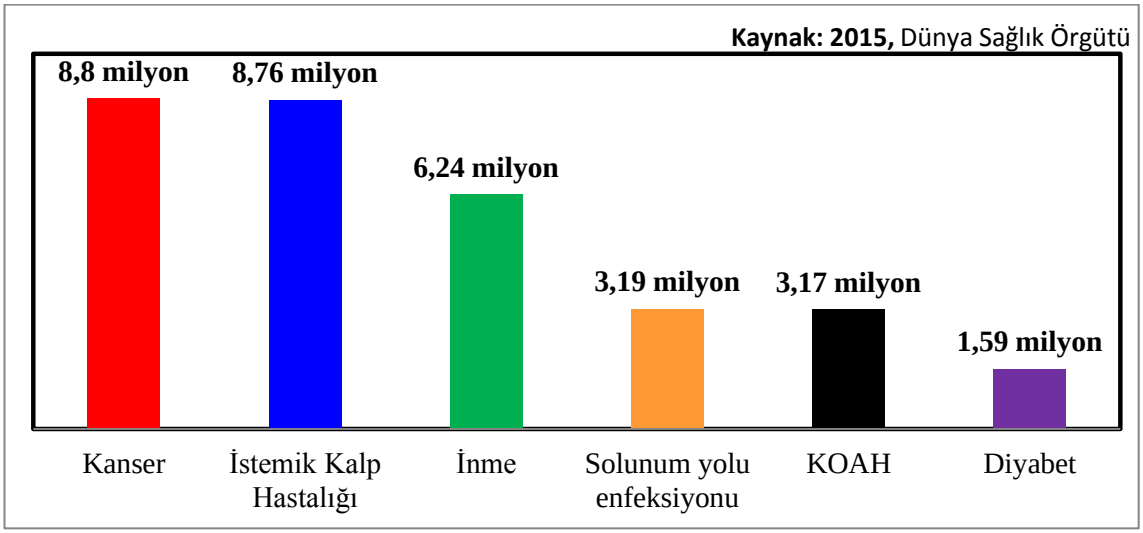
Kanserli dokular (tümörler) üç grup altında incelenebilir; beniyn (iyi huylu), premaliyn (iyi-kötü huylu) ve maliyn (kötü huylu). İyi huylu tümörler: herhangi bir dokuda oluşabilir, bölgesel olarak büyür, kenarları düzenlidir, genelde bir bağ dokusu kapsülü ile etrafındaki dokudan ayrılır, etraflarındaki dokuları istila etmezler, vücudun diğer bölümlerine metastaz yapmazlar fakat tek zararı büyüdüğü bölgede şişkinlikle beraber basınç oluşturmasıdır. İyi-kötü huylu tümörler: iyi huylu bazı tümörlerin kötü huylu tümörlere dönüşmesine denir. Kötü huylu tümörler: hızlı sekilde çoğalırlar, ölüme neden olurlar, kan damarına veya lenfatik dolaşıma geçerek (invazyon) bulunduğu dokuda ikincil bir tümör oluşturması veya vücudun başka bir bölgesinde tümör oluşturması (metastaz) yapmasıdır (Franks *et al.* 1998, Karp 2009, Klug and Cummings 2002). Kanserin nedenleri; kanserin nedeni tahmin edilebilmekte fakat sebebi tam olarak gün yüzüne çıkarılamamaktadır. Kanser hastalığı için iki grup risk faktörü vardır. Birincisi; yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile geçmişine bağlı olarak değişir. İkincisi; çevresel faktörlere bağlı olarak değişir. Kansere sebep olan etmenler Çizelge 1.1'de detaylı bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 1.1 Kansere sebep olan etmenler ve oranları

Kanser sebebi	**Oran %**
Beslenme yanlışlıkları	35
Sigara, alkol kullanımı	33
Enfeksiyonlar	10
Meslek hastalıkları	4
Çevre kirliliği	2
Besin katkı maddeleri	1
İdiyopatik (diğer)	15

Bu risk faktörlerinin hepsi, sağlıksız yaşam şartlarından kaynaklanmakta aynı zamanda insanların yaşadığı sosyal ortamdan veya alınmayan önlemlerden kaynaklanmaktadır. Diğer birçok olmayan hastalıklar gibi, kanserin ivmesinin hızlı bir şekilde artması kentleşmenin, çevre kirliliğinin ve yaşam tarzındaki değişikliklerin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır (Chen *et al.* 2017, Pedersen *et al.* 2017).

Genel olarak dünyadaki ölümler sıralanırsa, 2012 yılına kadar kardiyovasküler hastalıkların ardından ikinci sırayı kanser hastalıkları yer almaktadır. Dünya sağlık örgütünün 2015 yılı verilerine dayanarak dünyadaki ölümlerin nedenleri verilmiştir. Şekil 1.1'de gösterildiği üzere kanser vakalarından kaynaklanan ölümlerin diğer sağlık sorunlarından kaynaklanan ölümlerden daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Dünyada hastalıklara bağlı olarak insan ölümlerinin nedenleri (Anonim. 2015)

Kanser, modern toplumda daha fazla üzerinde uğraşı ve araştırmayı gerekli kıracak önemli bir halk sağlığı, sosyal ve ekonomik sorundur. Bu sorunun çözülmesi için yıllarca tıbbın gelişmesi ile beraber kemoterapi çalışmaları artmış ve kendini modernize etmiştir. Kanser tedavisinde kemoterapi uygulamalarının pekçok ciddi önemli sorunlara sebep olduğu gözden kaçırılmamalıdır. Hücrelerin kemoterapi ilaçlarına direnç kazanması, kemoterapi ilaçlarının kan dolaşımı sırasında tüm vücuda dağılarak kanserli hücrelerin yanında normal hücrelerin de etkilenmesi, toksik etki oluşturması, tümör bölgesine yeterli dozda ulaşamaması, kemik iliğinin baskılanması nedeniyle bağışıklık sisteminin yetersiz kalarak tedavilerin gecikmesine ve başarısız olmasına sebep olmaktadır.

Yıllardır kullanılan ilaçların etkinliğinin azalması ya da kanserli hücrelerin direnç kazanmasının yanında ortaya çıkan yeni kanser vakalarının tedavisi için yeni moleküllere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu negatif etki kanser tadavisinin başlangıcından beri kullanılan bitkilere ve diğer organik maddelere olan ilginin daha da artmasına neden olmuştur. Günümüzde kemoterapi tedavilerinin yanında alternatif uygulamalardan da yararlanılmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda organik temelli bitkiler kullanılarak ya da anorganik madde türlerinin sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini kapsayan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Sentetik ilaçların fazla yan etkiye sahip olmaları, ülke ekonomisine faydası olan ve düşük maliyetli tedavi olanaklarını sağlaması ve çok yönlü aktiviteye sahip olması bitki temelli bileşiklerin ya da drogların klinikte kullanım potansiyellerini artırmaktadır.

Antioksidanlar kemoterapi ilaçları ile beraber kanser hastalarına verildiği zaman kemoterapi ilaçlarının yan etkilerini azaltıp hastanın tedavisinin kesintisiz devamını sağlamakta ve kemoterapinin yan etkilerini tolere edebilmektedir. Kemoterapi esnasında antioksidan kullanımının en büyük sebebi bu özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Antioksidanların kanser tedavisinin yanı sıra kullanımının sadece avantaj değil bazı dezavantajları da mevcuttur. Kanser hastalığı sırasında vücutta reaktif oksijen türleri (ROS) büyük artış gösterir. Kanser hücresi bu artışa karşı direnç mekanizmasına sahiptir. Kemoterapi ilaçlarının kendine has mekanizmaları sayesinde ROS miktarını artırmakta ve bu artış kanser hücresinin direncini kırmaktadır. Kanser ilaçlarının

kanserli hücrenin DNA sını bozmak dışında ROS artışı ile de kanser hücrelerini öldürürler. Bu durumda, kanser hastasına antioksidanlar verildiği zaman kanser ilaçlarının yükselttiği ROS seviyesinde düşme ve kanser hücresinin ilaca direnç kazandığı bilimsel bir sonuçtur. Bunun için hedefe yönelik bileşiklerin kullanılarak kanser olayının çözülmesi en mantıklı düşünce ve çalışma şeklidir.

Kansere neden olan en önemli etmenlerden bir tanesi de; yediğimiz gıdaların, sebze meyvelerin içerisinde yani özüne işlemiş olan sentetik kimyasallardır. Bu kimyasallar hem toprakta hem de kullanılan bitki ve meyvede kalıntı oluşturmaktadır. Zirai mücadelenin en önemli araştırma konusu tarım ya da depo zararlısı olarak kabul edilen insektisitlerdir. İnsektisitler uzun zamandır haşere yönetimi için sentetik kimyasal böcek öldürücülere karşı bir alternatif olarak düşünülmekte, çevreye veya insan sağlığına karşı çok az tehdit oluşturmaktadır. Bazı bitkisel ürünler böcek antifidantları veya kovucular olarak kullanılmak üzere düşünülmüştür. Tarımsal haşere yönetimi konusunda, botanik insektisitler, sanayileşmiş ülkelerde organik gıda üretiminde kullanım için en uygun olanıdır, ancak gelişmekte olan ülkelerde gıdaların üretim ve hasat sonrası korunmasında çok daha büyük bir rol oynayabilir. Ancak bazı doğal sivrisinek kovucular dışında, eklembacaklılar için çok az ticari başarı sağlanmıştır (Isman 2006). Yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı, tarımsal zararlılar ile mücadelede ve kanser tedavisinde doğal ürünlerin geliştirilmesinin önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Kadınlar için en ölümcül kanser hastalıklarından birisi rahim kanseridir. HeLa kanseri halka arasında rahim ağzı kanseri olarak bilinmekte olup rahmin ağız bölgesinin alt kısmında oluşmaktadır. Dünyada meme kanserinden sonra en ölümcül kanser türüdür. Bu kanser türü ilk defa 1951 yılında ölen Henrietta Lacks isimli kadının öldükten sonra kadından alınan bu hücrelerin ölümsüz olduğu keşfedilmiştir. Bu hücreler daha sonra kültüre edilip çoğaltılmış ve bu kadının adına isminin ilk harfleri kullanılarak bu kanser hücresi HeLa ismini almıştır. HeLa hücresi kültüre edilen en eski insan kanser hücresidir ve o günden bugüne bu seri kullanılmaktadır (Akçalı 2010).

Bu çalışmanın birinci aşamasında, Çankırı ilinin doğal ekosisteminde yetişen endemik iki *Centaurea* (*C. paphlagonica* ve *C. cankiriense*) türünün fitokimyasal içeriği ile antiproliferatif ve antioksidan özelliklerinin belirlendi. Ayrıca bu bitkilerden elde edilen

özütlerin antikanser ve antioksidan özellikleri belirlenerek tıbbi özellikleri ortaya çıkarıldı. Çalışmanın ikinci aşamasında, yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip ekstrelerden biyoaktif bileşiklerin izolasyonu gerçekleştirildi. Bu bitki türlerinden izole edilen bileşiklerin yapıları NMR, MS, IR gibi tekniklerle aydınlatıldı. Ayrıca, biyoaktiviteden sorumlu olduğu düşünülen bileşiklerin HeLa kanser hücrelerine karşı antiproliferatif potansiyalleri ortaya konuldu.

2. KURAMSAL TEMEL ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Çalışılan Bitkilere Ait Genel Özellikler

2.1.1 Asteraceae (Papatyagiller) familyası botanik özellikleri

Asteraceae, diğer ismi Compositae olan ve papatyagiller olarak bilinen bu bitki familyası bitkiler alemindeki en büyük familyaları arasındadır. Bu familyaya ait bitki türleri geniş bir yayılış göstererek antartika dışındaki bütün kıtalarda çok farklı habitat tiplerine uyum sağlamışlardır (Reaka-Kudla *et al.* 1996). Familya tek yıllık, iki yıllık, çok yıllık otsu yada çalımsı bitkiler, ağaçlar veya salgı cepleri olan tırmanıcı bitkiler ile küresel ölçekte 1600 cins ve 23600 den daha fazla tür ile temsil edilmektedir (Anderberg *et al.* 2007, Stevens 2001). Türkiyede yaklaşık 1350 adet bulunmaktadır ve yaklaşık %38 endemizm özelliği ile bu türlerin 447'si endemik olup toplam 134 cinsi vardır (Davis 1988, Doğan 2007, Özhatay and Kültür 2006). Dünyada ve bulunduğumuz coğrafyada çok geniş yayılış gösteren Asteraceae familyasına ait pek çok bitki türünün farmakolojik özelliklere sahip olduğu bilimsel olarak kaydedilmiştir. Bu özelliklerini içerdikleri flavonoidler, kumarinler, diterpenler, poliasetilenler, oksijenli seskiterpenler ve kemo-taksonomik özelliklerinden dolayı bu familyanın en önemli sekonder bileşik grubu olarak kabul edilen seskiterpen laktonlardan sağlamaktadırlar (Staneva *et al.* 2008, Zidorn 2008).

Bu familyada bulunan bazı bitkilerin dokularında lateks bulunmaktadır. Yaprakları birbirini sırayla izleyen veya karşılıklı yahut tabanda yer almakta ve stipulasızdır. Yaprak kenarları dişli, loblu veya derin olarak çeşitli şekillerde parçalıdır. Çiçekler bir tabla üzerinde sapsızdır ve kapitulumu oluşturacak şekilde kümelenerek çok sayıdadır. Kapitulumun altında çok sayıda sri dizilim gösteren brakte (pulsu koruyucu organ) dairesi yer almaktadır. Çanak yapraklar pullu, kıllı veya çıplaktır. Çiçekler iki eşeylidir epigindir. Çiçeklerin ya hepsi hermafrodit ve protandır ya da dişi, erkek olarak mevcut veya eşeysizdir. Ovaryumun ucunda bulunan kaliks papus şeklinde bir tüy demeti ile veya yaklaşık olaraksürekli bir korona (taç) şeklinde bulunmaktadır. Bazı durumlarda

papus yoktur. Korollada petaller birleşiktir. Taç yapraklar tabanda birleşmiş olup; tüpsü, ipliksi, çansı, dilsi yapıda veya iki dudaklıdır ve genellikle 3 veya 5 dişlidir. Stamenler (çiçek erkek organı) 5 adet epipetalli, sap kısımları serbest anter kısımları birbirine birleşik ya da ender olarak serbesttir (Akyüz 2016, Aytac *et al.* 2016, Duman *et al.* 2017, Gao *et al.* 2010). Asteraceae meyvesi için eskiden aken (kapçık) olarak adlandırılmış (Häffner 2000) bunun yanında bazı literatürde sipsela terimi kullanılmıştır (Aytaç and Kaptaner 2012, Bona 2014). Meyve iki karpelli, kuru kapalı, tek lokuslu ve tek tohumludur. Meyvede ovaryum iki karpelli ve alt durumludur.

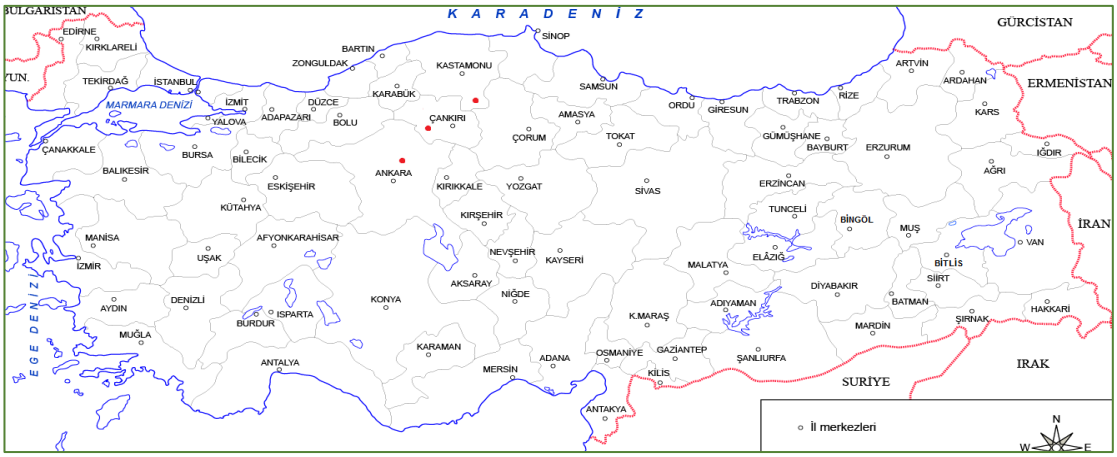
2.1.2 *Centaurea* L. cinsi genel özellikleri

Hipokrat ileri sürdüğü fikre göre, *Centaurea* ismi çok eski zamanlarda yaşadığına inanılan ve mitolojik bir yaratık olan *Centaur*'dan ileri gelmektedir (Gledhill *et al.* 1985). Bu dönemde Centaur, insan başlı ata benzer bir canlı olarak tanımlanmış ve çok muhtemeldirki bu ismin bitkiye atıf edilmeside bitkinin çiçek yapısının bu yaratık ile ilişkilendirilmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sebepten dolayı Linnaeus tarafından bitkiye cins ismi olarak *Centaurea* adı verilmiştir. *Centaurea* L cinsi dünyada yeni kayıtlar ile beraber 600 den daha fazla tür ile temsil edilmektedir (Eskin 2011). Ülkemizde 194 türü bulunmakta ve 118 endemik türe sahip olması ile %54'lük bir endemizm oranına sahiptir (Atasagun *et al.* 2013, Uysal *et al.* 2013). Tek, iki veya çok yıllık olarak otsu veya ender olarak dikenli dalları ile çalı şeklindeki bu bitkiler halk arasında Türkçe adlarıyla peygamber çiçeği, timur dikeni, yıldız dikenler, zerdali dikeni, sarıbaş, gökbaş ve çoban kaldıran olarak anılır (Arif *et al.* 2004, Baytop 1999, Wagenitz 1975). Kendine has reklere sahip olan bitki türü yoğun mavi, kırmızı, sarı ve beyaz tonlarına doğru açık renkte değişen renklerde çeşitliliğe sahiptir. Genellikle disk çiçekleri morfolojide farklı olan ve steril olan ışın çiçeklerinden daha koyu veya daha açıktır. Merkezde bulunan çiçekçikler tüpsü ve hermafrodit, kenarda yer alan çiçekçikler ise genel olarak daha büyük, gösterişli ve huni şeklinde olmasına rağmen verimsizdir. Meyveler aken tipi meyveler olup genellikle yüzeyi tüysüz ve olgunlaştığı zaman yassılaşmış ve tepesi yuvarlak ya da düz bir şekle sahiptir. Aken üzerinde, dış kısımdakiler sert tüylü, iç kısımdakiler kısa ve pulsu dizilişli olmak üzere iki ya da çok sıralı papus bulunmaktadır. Papus kalıcı veya nadiren düşücüdür, bazen yoktur.

Bitkilerin gövde ve yaprak yüzeyleri genelikle sık veya kısa tüylü ya da pürtüklü olmakla beraber nadiren çıplaktır. Yapraklar gövde üzerinde almaçlı (alternat) olarak dizilir ve bazen sadece tabanda rozet formunda bulunmaktadır. Gövde ve rozet yaprakları basit tip şekilden derin parçalı (pinnatipartit) şekil doğru değişen tiplerdedir. Heterogam kapitulum, iki farklı tip çiçekçik taşıyan radyan formda veya çiçekçiklerin tamamı benzer şekilde olup disk formundadır. İnvolukrum genel olarak oval, küremsi, dikdörtgenimsi (oblong) veya yukarı doğru daralan gibi farklı şekillerdedir. Reseptakulumun çevresini saran involukrum brakteleri çok sıralı kiremit dizilişli ve dik konumlu olup, çoğunlukla hepsinde zarımsı, saman renginde veya derimsi ek yapılar bulunmaktadır. Aynı populasyon içerisinde boyut ve şekillerdeki farklılıklardan dolayı taksonomik olarak tanımlama ve sınıflandırma zordur. Bunun için modern kimyasal ve sitolojik teknikler kullanılarak teşhisler yapılmalıdır (Kargün 2011, Wagenitz 1986). Bazı *Centaurea* türleri ekosistemlere kolayca uyum sağlama özelliklerinden dolayı bazı bölgelerde istilacı yabani otlar haline gelebilir.

2.1.3 *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz

*C. paphlagonic*a Türkiye'de Orta Karadeniz bölgesi ve orta anadoluda yayılış gösteren endemik bir bitki türüdür. Bitki 1500-1700 m yükseklikteki taşlı yamaçlar, subalpin yamaçlar ve çayırlıklarda yetişmektedir. Bitki morfolojisi itibari ile 15-60 cm uzunluğa kadar uzaya bilen, kalın köşeli gövdesi, odunsu köklere sahip, dallanmalar fazla, yaprakları elsi ve parçalı olan çok yıllık bir bitki türüdür (Hamzaoğlu and Budak 2009). Bitkinin çiçek ve meyve verme dönemi sıcaklık-yağış oranlarına göre Temmuz ve Ağustos ayları olarak belirlenmiştir (Şekil 2.1, Şekil 2.2).



Şekil 2.1 *C. paphlagonica* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası (●)



Şekil 2.2 *C. paphlagonica* bitkisinin genel görünümü (Resimler yazar tarafından çekilmiştir)

2.1.4 *Centaurea cankiriense* A. Duran & H. Duman

C. cankiriense bitkisi Orta ve Kuzey Anadolu'nun geçiş bölgesinde yetişen endemik bir türdür. Bir İran-Turan elementidir. Bitki 1400-1600 m yükseklikteki taşlı yamaçlar, yol kenarları veya düz yayla arazilerinde yetişmektedir. Bu bitki Çankırı iline özgü b-ir endemik türdür. Bitkinin çiçek ve meyve verme dönemi sıcaklık-yağış oranları ile doğrudan bağlantılı olarak Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarını içerdiği belirlenmiştir (Duran and Duman 2002). *C. cankiriense* 5 km^2'lik bir alandan daha küçük bir alanda yayılış gösteren bu tür tehlike altındadır (Şekil 2.3, Şekil 2.4).



Şekil 2.3 *C. cankiriense* bitkisinin Türkiye'deki yayılış haritası (●)



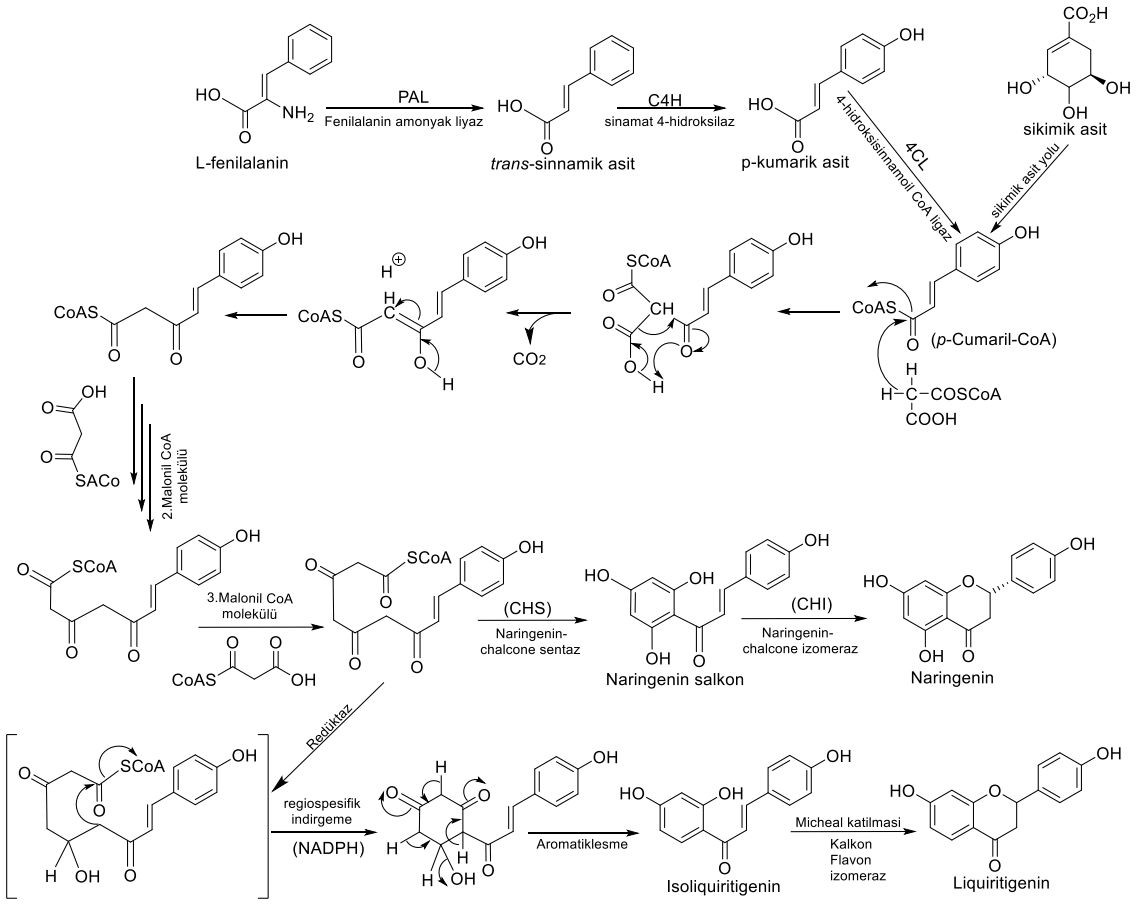
Şekil 2.4 *C. cankiriense* bitkisinin genel görünümü (Resimler yazar tarafından çekilmiştir)

2.2 *Centaurea* L. Türlerinin Genel Kimyasal İçerikleri

Literatür verilerine göre, fitokimyasal çalışmalar sonucunda *Centaurea* taksonlarının çok zengin sekonder metabolit içerdiği belirtilmiştir. Bu zenginlik taksonların halk arasında kullanımını artırmakla birlikte bilimsel çalışmalarında bu türler üzerindeki potansiyelini daha çekici kılmaktadır. Bu taksonlar sekonder bileşen tipi olarak terpenik bileşikler, flavonoidler, ligninlar, megastigman glikozitler, poliasetilenler, fenilpropanoid glikozler, indol alkaloitler, teroidal glikozitler ve basit yapılı pekçok bileşik grubuna sahip olduğu belirtilmiştir (Baykan-Erel *et al.* 2010, Hodaj *et al.* 2017, Sarker *et al.* 2001, Shoeb *et al.* 2007, Shoeb *et al.* 2005, Shoeb *et al.* 2004, Youssef 1998).

2.2.1 Flavonoidler

Genellikle sarı renge sahip olmalarından dolayı latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türemiş ve flavonoid ismini almıştır. 15 C atomuna sahip 2-fenil benzopiran (difenil propan) yapısına (C_6-C_3-C_6) sahiptirler (Huvaere and Skibsted 2015, Kahraman *et al.* 2002). Flavonoidlerin A ve B halkaları iki farklı yoldan sentezlenmektedir. B halkası şikimik asitten çıkılan sentez yolu ile oluşmaktadır. A halkası fenilalenin bileşiğinden çıkılarak biyosentezi olan poliketid yoluyla oluşmaktadır (Dewick 1995, Knaggs 2001).



Şekil 2.5 Flavonoidlerin biyosentez yolakları (Austin and Noel 2003, Luhata and Luhata 2017)

Flavonoid türevleri arasında flavon, flavonol, izoflavon, bisflavanon ve bu flavon gruplarına bazı pozisyonlardan bağlı olan glikozit türevleri ve glikozitlerin de kendi

içerisindeki türevlerinin olduğu bileşikler bulunmaktadır (Belkacem *et al.* 2014, Mirzahosseini *et al.* 2019, Rengasamy *et al.* 2019). Flavonoidler *Centaurea* türleri arasında en çok izole edilen sekonder bileşik grubu arasındadır. *Centaurea* türleri arasında aglikon yapısı ve glikozit bağlı moleküllerin var olduğu pekçok kaynakta belirtilmiştir.

Çizelge 2.1 *Centaurea* türlerinden izole edilen flavonoidler

Bitkinin ismi	**İzole edilen bileşikler**	**Referanslar**
C. furfurace	Apigenin, hispidulin, hispidulin 7-O-metil glukuronit, cirsimaritin 3,5,7,4'-trihidroksi-3-metoksi flavon, apigenin-7-O glukozit, apigenin-7-O metil glukronid, hispidulin-7-O-glukozit, patelutin-7-O-glukozit,	(Akkal *et al.* 2003, Akkal *et al.* 1999)
C. microcarpa	Nepetin, astragalin, sentauredin 7-O-β-glukopiranozil	(Baatouche *et al.* 2019)
C. virgata	Apigenin, hispidulin, salvigenin, eupatorin, 3'-metileupatorin, izokamferid	(S Tuzun *et al.* 2017)
C. kilaea Boiss.	Apigenin, cirsimaritin, eupatorin, pektolinarigenin, salvigenin, 3'-O-metileupatorin, jaceosidin,	(Sen *et al.* 2017)
C. horrida Badaro	Apigenin, hispidulin, kuersetin, fisetin, rutin, kuersetin-3-O-β- galaktosit, visenin-2, şaftozit, neoşaftozit, horridin, krizoeriol 7-O-rutinozit, viteksin, kamferol 3-O-β-D glikopiranozit, izoviteksin, kamferol 3-O-α-L ramnopiranozit kuersetin 3-O-α-L ramnopiranozit, apigenin 3-O-β-D-glikopiranozit, apigenin 8-C-α arabino piranozit, apigenin 6-C-α-L-arabinopiranozit skutellarein 7-O-β-D-glukopiranozit, apigenin 7-O-β-D-glikopiranozit	(Boukhary *et al.* 2017, Flamini *et al.* 2002)
C. calolepis Boiss	Apigenin-6,8-di-C-β-Dglukozit, izoviteksin viteksin, izorientin, rutin, orientin, sikaftosit luteolin-7-O-glukosit, luteolin-6,8-di-C-β-D-glikozit	(Erel *et al.* 2011)
C. soskae Hayek	Apigenin, izokamferid, hispidulin, eupatorin, santoflavon, salvigenin	(Tešević *et al.* 2014)
C. schischkinii	Astragalin, afzeli, apigenin	(Shoeb *et al.* 2005)
C. montana	Montanoside	(Shoeb *et al.* 2006)
C. africana	Algerianin1, 4'-metil gossipetin2, 3'-hidroksi flindulatin, kirisoriol, jaseidin, kornikulatusin, sentaurein	(Seghiri *et al.* 2009)
C. urvillei DC. subs*p. urvillei*	Naringenin-7-O-β-D-glikopiranozit, eriodiktiyol-7-O-β-glikopiranozit, apigenin 7-*O*-β-D glikopiranozit, hispidulin-7-O-β-glikopiranozit, ,hispidulin-7-O-β-D metilglikopiranozit, 6-hidroksi kemferol-7-O-β-D-glikopiranozit, apigenin-7-O-β-D-metilglikopiranozit, hispidulin-7-O-β metil glikopiranozit	(Gülcemal *et al.* 2010)

Çizelge 2.1 *Centaurea* türlerinden izole edilen flavonoidler (devam)

C. bracteata	Sentabraktein, brakteozit, jasein, luteolin, aksillarin, aksillarin 7-glikozit, nepetin, patuletin-7-sülfat, hispidulin, aksillarin 7-O-β-D-glikopiranozit, jaseidin, 6-hidroksiluteolin-6,4'-dimetil eter, 6-hidroksiluteolin-6,4'dimetil-eter-7-O-β glikopiranozit, nepetin-7-O-β glikopiranozit, nepetin-7-sülfat, Apigenin 7-glukronit, sentaureidin, izokemferit, kersetin 3,3'-disülfat, jaseosiolin, 6-hidroksi kamferol-3,6 dimetil eter, sentaradiksin,	(Flamini *et al.* 2001b, Flamini *et al.* 2001a)
C. ruthenica	Patuletin, kersetagetin, aksillarin, jaseosidin 6-metoksi kamferol, patuletin 3,7- di-O glikozit, kersetagetin 7-O glikozit, patuletin 7-O-glikozit, aksillarin 7-O-galaktozit, kersetin-3-O-glikozit, aksillarin-7-O glikozit, jaseosidin-7-O-glikozit, 6-metoksi kemferol 7-O-glikozit	(Mishio *et al.* 2006)
C. jacea L.	Eupatorin, hispidulin, 6-metoksi kamferol, sirsiliol, izokamferid, sentauridin, aksillarin	(Forgo *et al.* 2012)
C. scoparia	3',4'-dihidroksi-(3",4"-dihidro-3"-hidroksi-4"-asetoksi)-2",2"-dimetil pirano-(5",6":7,8)-flavon-3-O-β-glikopiranozit, sinarozit, 3,3',4'-trihidroksi-(3",4"-dihidro-3",4"-dihidroksi)-2",2"-dimetilpirano-(5",6":7,8)-flavon, apigetrin, luteolin, atalantoflavon, 5,7 dihidroksi-3',4',5'-trimetoksi flavon, apigenin, 5-hidroksi-3',4'-8-trimetoksi-2",2"-dimetilpirano (5",6",6,7), sirsimaritin, hispidulin, 3',4',5,8-tetrametoksi-2",2"-dimetilpirano (5",6",6,7) flavon, sentaureidin, salvigenin, oroksilin A,	(Ahmed and Kamel 2014)
C. kurdica	Kuersitrin, izokuersetin, naringenin-7-O-glikopiranozit	(Dereli *et al.* 2020)
C. nerimaniae	Sirsimaritin, hispidulin, apigenin, izokamferid, apigenin 7-O-glikozit	(Melikoglu *et al.* 2018)
C. pumilio	Rutin, kuersetin, mirisetin, kamferol, mirisetin 3-O-α-L-ramnopiranozit, kuersetin 3-O-α-L-ramnopiranozit, kamferol 3-O-β-glikopiranozit	(Mostafa *et al.* 019)
C. drabifolia subsp. *dentosa*	Apigenin, orientin, viteksin, kuersetin-3-O-glikozit, patuletin-*O*-hekzosit, luteolin-7-O-rutinosit, luteolin-7-O-glikozit, izoviteksin, kuersetin, hispidulin, luteolin	(Zengin *et al.* 2019a)
C. kotschi var. *persica*	Apigenin, orientin, viteksin, kuersetin-3-O-glikozit, luteolin-7-O-rutinosit, luteolin, luteolin-7-O-glikozit, izoviteksin, kuersetin, hispidulin,	
C. urvielli subsp. *hayekiana*	Apigenin, orientin, kuersetin-3-O-glikozit, luteolin-7-O-rutinosit, hispidulin, viteksin, luteolin-7-O-glikozit, izoviteksin, kuersetin,	
C. scabiosa	Taksifolin, kirisin 7-O-glikozit, baikalin, eriodiktol	(Kasterova *et al.* 2019)
C. sibirica	Taksifolin, izokuersitrin	

Çizelge 2.1 *Centaurea* türlerinden izole edilen flavonoidler (devam)

C. arenaria subsp. *arenaria*	Epatilin, izokamferid, eupatorin, apigenin, 3'-metil-epatorin	(Csapi *et al.* 2010)
C. diluta subsp. *algeriensis*	Epatilin, jaseosidin	(Zater *et al.* 2016)
C. ragusina L.	Krisin, hispidulin, oroksilin A	(Grienke *et al.* 2018)
C. cyanus	Apigetrin, apiin, kateşin, epikateşin, rutin epigallokateşin gallat, izokuersitrin, naringin hesperidin, luteolin, kuersetin, apigenin, krisin, naringenin, pinobanksin, kamferol, siyanidin pinosembrin, izoramnetin, galangin, 3-O-(6-O-suksinil glikozit)-5-O-glikozit, apigenin 7-O-glikuronid-4′-O-(6-O-malonilglikozit), pelargonidin 3-[6"-suksinil glikozit]-5-glikozit, apigenin 4-O-glikozit, kosmosiin, metilviteksin kaempferol-glikozit, naringenin-7-O-gluko-ramnozit, kuersetin-3 glikoramnozit, apigenin-7-glikozit, kuersetin-7-glikozit, kuersetin-3-glikozit, apigenin-8-C-glikozit, aringenine	(Escher *et al.* 2018, Pirvu *et al.* 2008, Takeda *et al.* 1988)
C. ensiformis	Visenin-2, şaftozit, neoşaftozit, kirisoriol 7-O-rutinosit	(Baykan-Erel *et al.* 2010)
C. melitensis	Hispidulin, nepetin, kuersetin	(Ayad *et al.* 2012)
C. spruneri	Eriodiktol	(Ciric *et al.* 2011)
C. depressa	Apigenin, luteolin, skutellarin, 6-hidroksikamferol-7-O-β-D-glukuropiranozit	(Demir *et al.* 2009)
C. cadmea	Eupatorin, 5-hidroksi-3’,4’,6,7-tetrametoksiflavone, sukutellarin	(Astari *et al.* 2013)
C. grisebachii subsp. grisebachii	5-hidroksi 6,7,3',4'-tetrametoksi flavon, kirsilineol, eupatorin, jaseosidin,	(Djeddi *et al.* 2008)
C. behen L.	Luteolin	(Esmaeili *et al.* 2012)
C. isaurica	Centaureidin, jasein, kamferol-3-glikozit, kuersetin 3-glikozit	(Flamini *et al.* 2004)
C. nicaeensis	Apigenin 4′-(6″-metilglukorunid), kirsilineol, jaceosidin melitensin, apigenin, apigenin 7-(6″-metilglukuronid)	(Hammoud *et al.* 2012)
C. omphalotricha	Oroksilin A, krisin, 5,7,2'-trihidroksiflavon, tenaksin II	(Mouffok *et al.* 2012)
C. polyclada	Salvigenin, eupatorin, 3'-metoksi eupatorin	(Demir *et al.* 2017)
C. daghestanica	Apigenin, sinarozit, eriodiktiyol, hesperidin, jasein, luteolin, taksifolin	(Korga *et al.* 2017)
C. borysthenica	Apigenin, centaurein,apigenin-7-O-glikozit, jasein	
C. davidovii	Apigenin, luteolin, skutellarin 6,7,4' trimetil eter, Kamferol 3-metil eter, 6-hidroksiluteolin 6-metil eter, 6-hidroksi luteolin-6,3'-dimetil eter, skutellarin 6,4' dimetil eter,	(Nikolova and Bancheva 2013)
C. parilica	Apigenin, luteolin, skutellarin 6,4' dimetil eter, 6-hidroksi luteolin 6-metil eter, kamferol 3-metil eter, 6-hidroksiluteolin-6,3'-dimetil eter	

Çizelge 2.1 *Centaurea* türlerinden izole edilen flavonoidler (devam)

C. stenolepis	6-hidroksiluteolin 6-metil eter, Kamferol 3-metil eter, 6-hidroksikamferol 3,6-dimetil eter, Kuersetagetin 3,6,4'-trimetil eter	
C.austroanatolica. C. kizildaghensis	Apigenin, apigenin, 7,4'-dimetil ether, kuersetin, genkwanin	(Uddin *et al.* 2017)
C. nerimanieae	Sirsimaritin, hispidulin, izokamferid, apigenin, apigenin 7-O-glikozit	(Melikoglu *et al.* 2018)
C. orphanidea C. omphalotricha	Apigenin, cirsimaritin, luteolin, 3-metoksikamferol	(Gousiadou and Skaltsa 2003, Kolli *et al.* 2012)
C. hierapolitana	Hispidulin, jaceocidin	(Karamenderes *et al.* 2007a)
C. pungens	Hispidulin 7-O-β-glukuronopiranosit, apigenin-7-O-β-glikuronopiranosit, apigenin-7-O-(6-metoksi)-β-glukuronopiranosit, 6-metoksi,7-metil-luteolin, hispidulin	(Labed *et al.* 2019)
C.bruguierana subsp.*belangerana*	Sirsimaritin, sirsilinelol, eupatilin, Lupeol, retusin, apigenin	(Hadjiakhoondi *et al.* 2019, Mirzahosseini *et al.* 2019)
C. albonitens	Apigenin 4'-O-ramnozit	(Hamedeyazdan *et al.* 2017)
C.resupinata subsp. *dufourii*	Nikotiflorin, apigetrin, kirisoriol, apigenin, kirisin	(Bouzghaia *et al.* 2020)
C. alexanderina	Visenin, izoviteksin, rutin, hesperidin, fisetin, apigenin 7-O-D-galaktoronik asid metil ester, apigenin 7-O-β-D-glikozit, astragalin, viteksin, sentaurein, kamferol, apigenin, kuersetin, naringenin, jaceosidin	(Kubacey *et al.* 2012)

İster tür isterse varyate bakımından çok geniş bir dağılıma sahip *Centaurea* bitki türleri pekçok flavon türevli bileşiği bulundurmaktadır. Bu bileşiklerin pekçok biyolojik aktivitesi bulunmaktadır.

Forgo ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada, *C. jacea* L. bitkisinin kloroform ekstresinin bio-aktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırmalı çalışmasında apigenin, cirsiliol, hispidulin, eupatorin, izokamferid, aksilarin, centaureidin ve 6-metoksikamferol 3-metil eter bileşiklerini izole etmişler. Bileşiklerin HeLa, MCF-7 ve A431 kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesini denemişlerdir. Flavon türevlerinin orta derecede aktiviteye sahip ve hücre seçiciliği aktivitesi olmakla beraber centaureidin bileşiğinin tüm kanser hücrelerinin büyümesini engelleyici etkiye sahip olduğu IC_{50} değerleri ile belirlenmiştir. IC_{50} değerlerin pozitif kontrol olarak kullanılan

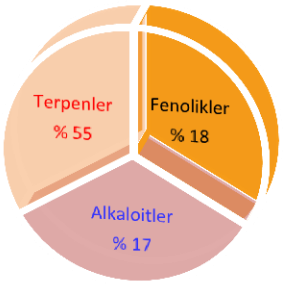
bileşiklerden daha düşük konsantrasyonlarda elde edildiği rapor edilmiştir (Forgo *et al.* 2012). Shoeb ve çalışma grubu, *C. montana* bitkisinden yeni bir flavonoid glikozit türevi olan montanoside bileşiğinin CaCo2 kolon kanser hücresine karşı doza bağlı olarak önemli sitotoksit aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir (Shoeb *et al.* 2006). Seghiri ve arkadaşları 2009 yılında Tunus ve Cezayir'e endemik olan *C. africana* var. *africana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından bir tanesi açil gruplu sekerli flavonoid (algerianin **1**), diğeri aglikon yapısına sahip flavon (4-metil gossipetin **2)** bileşikleri yanında, beş adet bilinen flavonoidin HL-60 insan kemik iliği lösemi kanser hücresine karşı sitotoksik etkilerini değerlendirmişlerdir. Algerianin **1** bileşiğinin HL-60 hücresine karşı 26,1 mM'lık IC_{50} değeri ile yüksek bir antitümör etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir (Seghiri *et al.* 2009). Sayed ve arkadaşları 2014 yılındaki çalışmalarında, *C. scoparia* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde ettikleri etanol ekstresinden iki tane yeni flavon **Bileşik 1** (3',4'-dihidroksi-(3",4"-dihidro-3"-hidroksi-4"-asetoksi)-2",2"-dimetilpirano-(5",6":7,8)-flavon-3-*O*-*β*-D-glikopiranozit), **Bileşik 2** (3',3',4'-trihidroksi-(3",4"-dihidro-3",4"-dihidroksi)-2",2"-dimetilpirano-(5",6":7,8) flavon ve sekiz tane bilinen [sinarosit, apigetrin, sentauredin, oroksilin A, 5,7-dihidroksi-3',4',5'-trimetoksiflavon, atalantoflavon, 5-hidroksi-3',4',8-trimetosi-2",2"-dimetilpirano (5",6":6,7)-flavon ve 3',4',5,8-tetrametoksi-2",2"-dimetilpirano (5",6":6,7)-flavon] flavon bileşiklerini izole etmişlerdir. Bu bileşiklerin HeLa, HepG2 ve MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi değerlendirildi. **Bileşik 2**'nin HeLa hücrelerine karşı 0.079 μM'lık IC_{50} değeri ile harika bir sitotoksik ajan olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Ahmed and Kamel 2014). *C. fenzlii* bitkisinin diklorometan ve etil asetat ekstrelerinin (DCM-EA) karışımı MCF-7 hücresine karşı büyüme engelliyici aktivitesi Yırtıcı ve arkadaşları tarafından değerlendirilmiştir. Sitotoksik etkiyi gösteren IC_{50} değeri MTT ve ATP deneyleri ile belirlenmiştir. Apoptotik etki, çift boyama ve akış sitometri yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. DCM-EA ile tedavi edilen hücrelerdeki ölüm oranı yaklaşık % 90 olarak belirlenmiştir ve % 9.2 canlı hücreler, % 22.8 nekrotik hücreler, % 62.3 geç apoptotik hücreler ve % 5.8 erken apoptotik hücreler olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Sitotoksik etkiler gösteren DCM-EA ekstresinin ana bileşeni hispidulin bileşiği olduğu belirlendi (Yırtıcı *et al.* 2017). *C. bruguierana* subsp. *belangerana* bitkisinin % 80 etanol ile meserasyona bırakan Mirzahosseini ve arkadaşları (2019) bu çalışmalarında etanol ekstresini önce suda çözmüşlerdir. Daha

sonra sırasıyla kloroform, etil asetat ve metanol ile ektraksiyon yapıp elde ettikleri kısımların çözücülerini evapore etmişlerdir. Elde ettikleri ekstraktların K-562, AGS, MCF-7 ve SW742 hücre hatlarına karşı sitotoksisitesini belirlemişlerdir. Kloroform ekstresinin aktivitesinin en düşük LC_{50} değeri ile K-562 hücresine karşı sitotoksik aktivivteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Biyolojik aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmaları ile kloroform ektresinin kromatografik metotlar ile C18 ve sephadex LH-20 dolgu maddeleri kullanarak fraksiyonlandırmışlardır. Bu fraksiyonların tekrar ayrıştırılması ile sirsimaritin, sirsilinelol ve eupatilin bileşiklerini izole etmişlerdir. Bu bileşiklerin normal hücrelere karşı yok denecek kadar az toksik etki gösterdiği belirlemişlerdir. Kanser hücrelerine karşı izole edilen bileşiklerin sitotoksik etkisinin olduğu fakat doz çalışmaları ile daha iyi sonuçların elde edilebileceği sonucuna ulaşmışlardır (Mirzahosseini *et al.* 2019). Grienke ve ark, 2018 yılında *C. ragusina* L. bitkisinin yapraklarından etanol çözücüsü ile bitki özütü elde ettiler. Bu bilim insanları çalışma materyalinden krisin, hispidulin ve oroksilin A flavon bileşiklerini izole edip yapılarını spektroskopik yöntemler ile belirlemişlerdir. Bu bileşiklerin bazı tümörlü hücre hatları (V79, SCVII, B16F10, FsaR, Caco-2, HeLa, MCF-7) ve normal hücre hatlarına karşı etkileri incelendi. İzole edilen flavonoidlerin (krisin, hispidulin ve oroksilin A) incelenen hücre hatlarının çoğuna karşı sitotoksik etkilerin olmadığını DNA ile sadece zayıf etkileşimler yapmasından dolayı aktif olmadığı düşünülmektedir. Fakat flavonoidlerin HeLa hücrelerine karşı biraz daha güçlü sitotoksik aktivite göstermesi, DNA dışındaki bazı biyolojik hedeflerle etkileşim içerisinde olduğu sonucuna varılmıştır. Flavonoid iskeleti üzerinde hidroksi grubu fazla olan hispudilin bileşiği belirgin sitotoksik aktiviteyi sergilediği ortaya konulmuştur (Grienke *et al.* 2018).

2.2.2 Terpenler

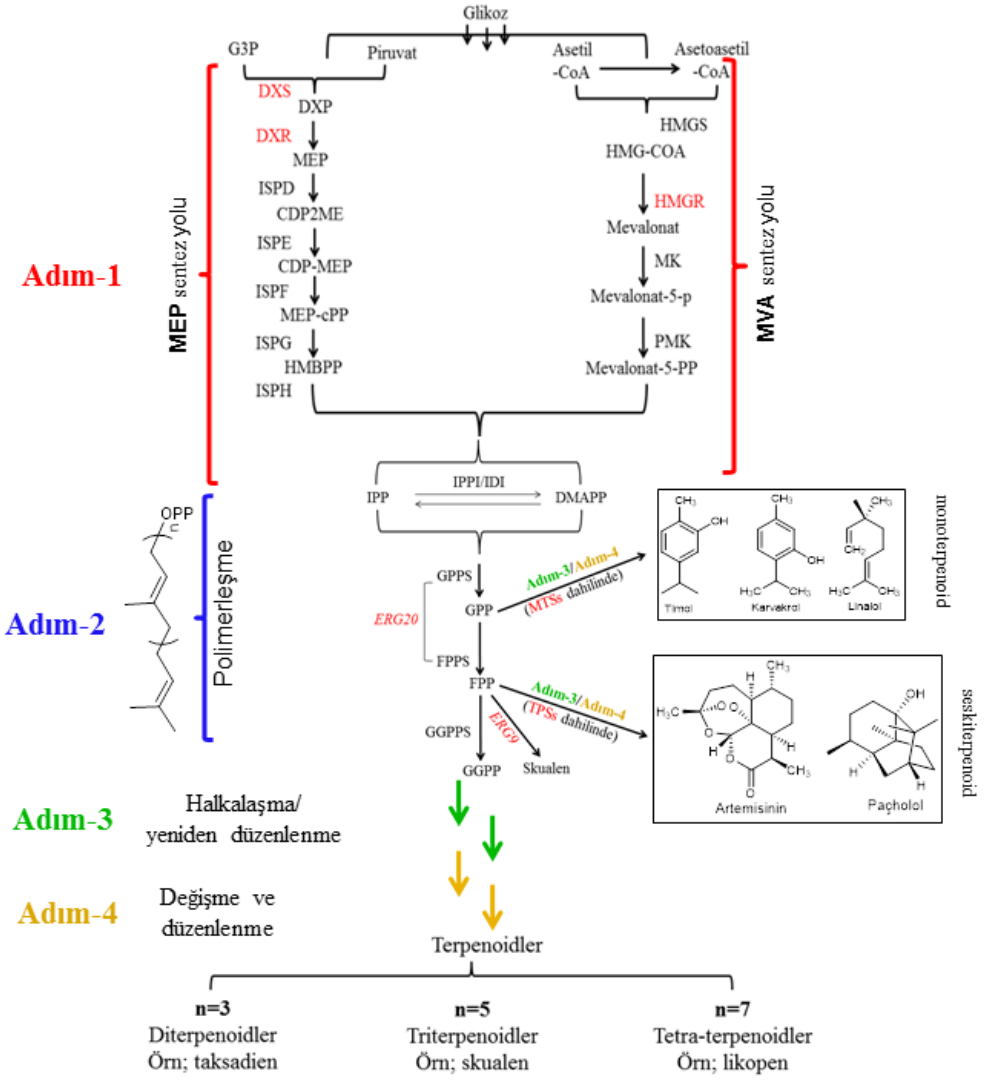
"Terpen" terimi ilk başlarda, esansiyal yağlarda bulunan ve kapalı formülü $C_{10}H_{16}$ olan ve pekçok izomer için kullanılan bir terim olmuştur. İzoprenoidler ismi ile de bilinen terpenler ya da terpenoidler, bitkilerde, mikroorganizmalar, böcekler ve çeşitli deniz organizmalarında doğal olarak oluşan en geniş ve çeşitli doğal ürün grubunu temsil etmektedir. Doğal ürünlerin yaklaşık % 55'i terpenlerden oluşmaktadır ve yaklaşık

80.000'den fazla terpenoidin yapısal olarak karakterize edildiği tahmin edilmektedir (Pemberton *et al.* 2017).



Şekil 2.6 Doğadaki bitkilerde bulunan sekonder bileşiklerin dağılımı

Terpenoidler beş karbonlu izopren birimlerinden türetilirler ve birleşen izopren moleküllerinin sayısına göre, hemiterpenler (C5), monoterpenler (C10), seskiterpenler (C15), diterpenler (C20), sesterpenler (C25), triterpenler (C30), tetraterpenler (C40) ve kauçuk gibi politerpenler olarak sınıflandırılırlar (Dewick 2002). Terpenoidlerin bitkilerdeki biyo-sentezi: sitosolik mevalonik asit (MVA) yolağı ve plastid yerleştirilmiş desoksoksüloz fosfat (DXP) yolu (MEP yolu) diye adlandırılan iki farklı yoldan sentezlenmektedir. Her iki biyosentetik yol da aktifleştirilmiş izopren birimleri dimetilalil difosfat (DMAPP) ve izopentenil difosfat (IPP) verir ve bunlar baş-kuyruk veya kuyruk-kuyruk olarak birleşirler ve daha sonra siklizasyona ve diğer değişikliklere uğrayabilir. Farklı hücresel bölmelerde beş karbon öncüsü izopentenil difosfat (IPP) ve alelik izomer dimetilalil difosfat sitozolde, mevalonik asit (MVA) yolu, üç asetil-CoA molekülünden IPP'ye neden olurken, plastidlerde IPP, piruvat ve gliseraldehid-3-fosfattan metil-eritritol fosfat (MEP) yolu ile elde edilir. Hemiterpenler, monoterpenler, diterpenler ve tetraterpenler DXP yolundan elde edilirken, triterpenler, steroidler ve bazı seskiterpenler MVA yolundan elde edilir.

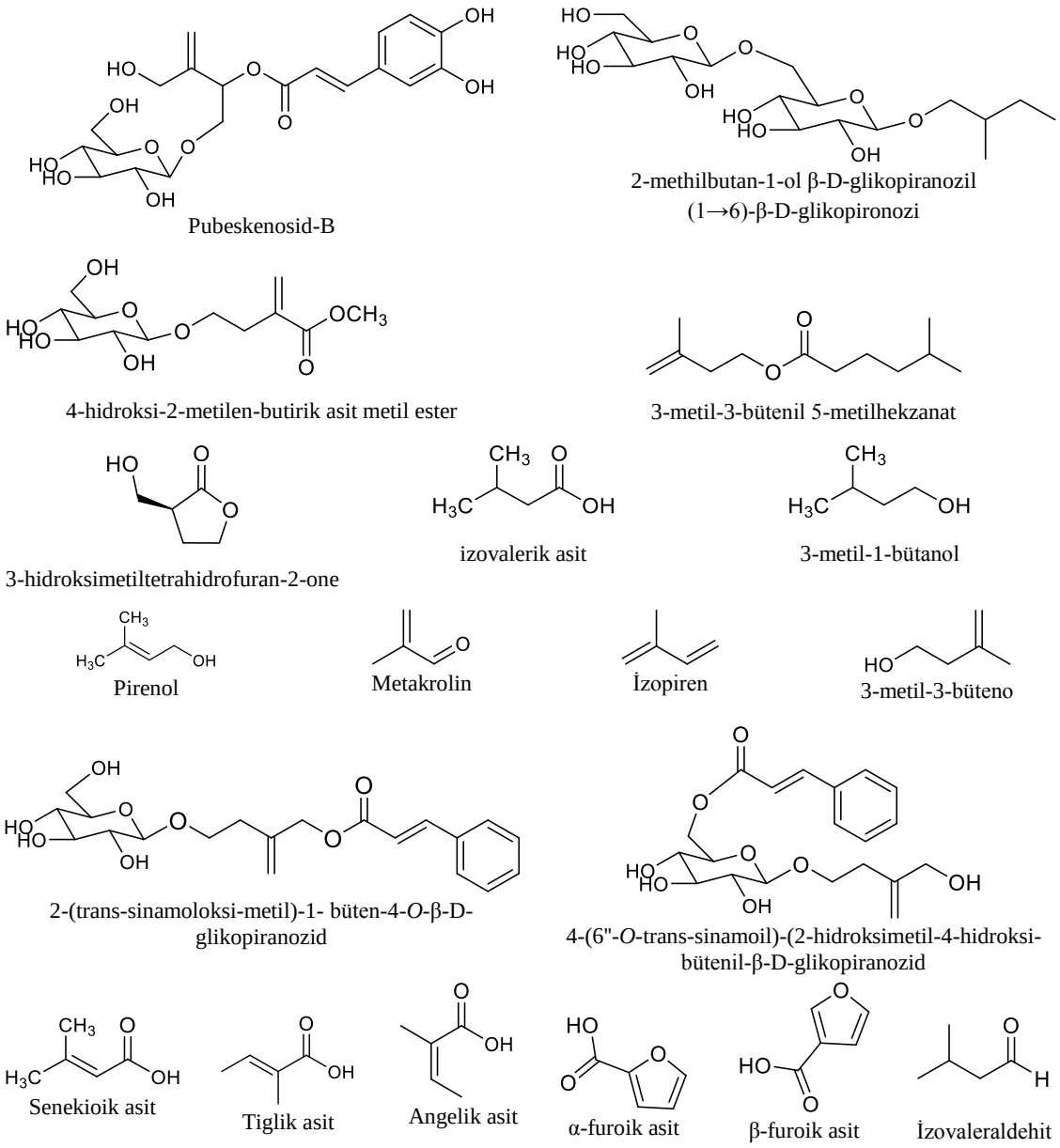


Şekil 2.7 Terpenoidlerin biyosentez yolakları (Bergman *et al.* 2019, Ma *et al.* 2012, Wang *et al.* 2019)

Terpenoid türevlerinden mono ve seskiterpenler çoğunlukla uçucu haldedirler. Diterpenler ve daha fazla izopren birimi ile sentezlenen terpenler uçucu değillerdir. Terpenler; herhangi bir hetero atom bulundurmamaları durumunda bu ismi alırken, bünyesinde hetero atom bulunduran ve buna bağlı olarak fonksiyonel gruplara sahip olan alkol, keton, aldehit ve karboksilik asit gibi bileşikler terpenoid ismini almaktadırlar.

2.2.2.1 Hemiterpenler

Hemiterpenler DMAPP'den (dimetilalil pirofosfat) sentezlenen, bitkilerde en bol bulunan ve uçucu bir bileşik olan izoprenlerdir. İzopren bileşiği yosunlar, eğrelti otları, açık tohumlu çok yıllık ağaç türleri, kapalı tohumlular sınıfından olan bitki türleri ve böcekler tarafından yaygın bir şekilde üretilmektedir ve özellikle nemli tropik bölgelerde yetişen ağaç türleri arasında atmosfere yayılımı sağlanmaktadır.

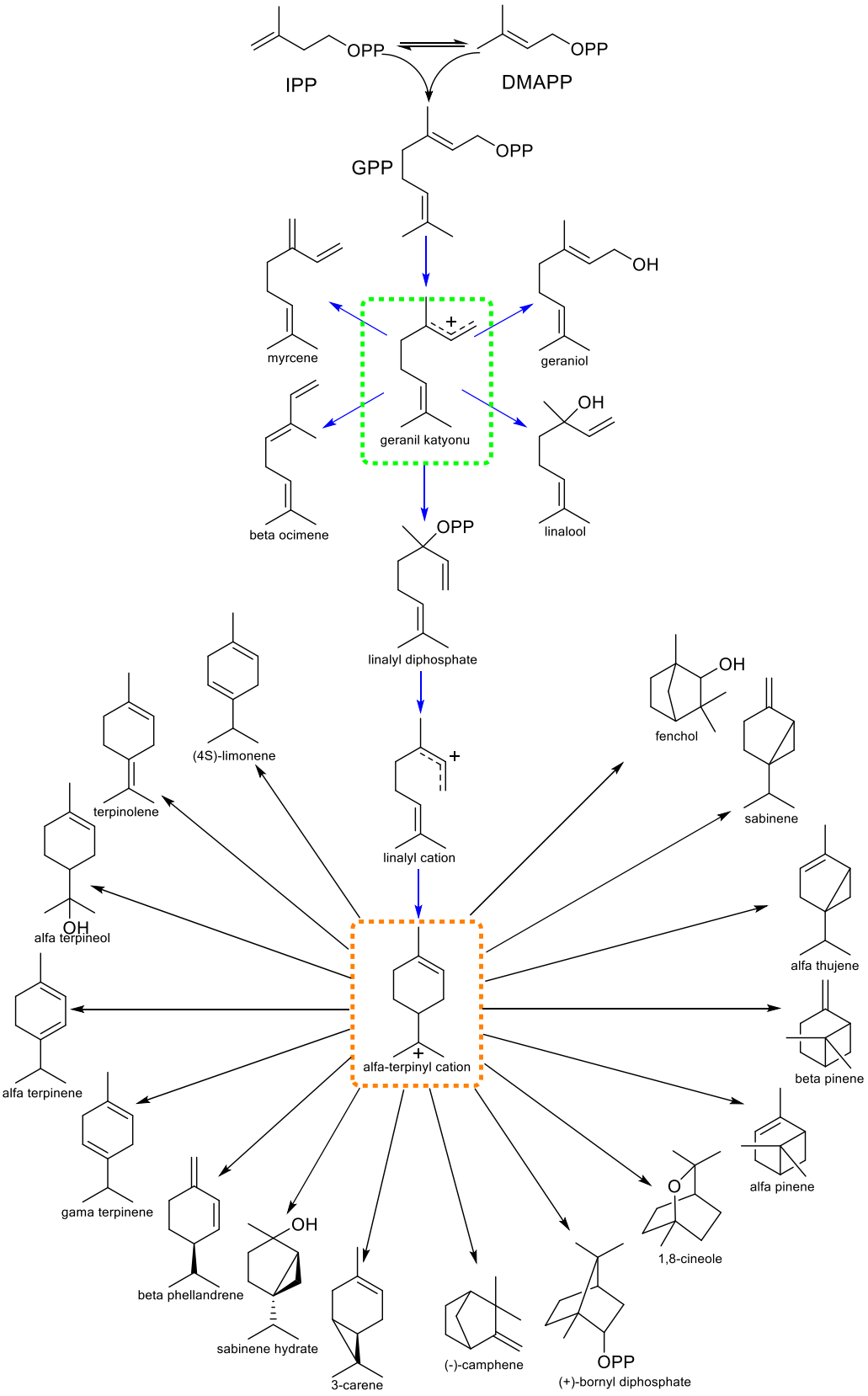


Şekil 2.8 Bazı bitki türlerinden izole edilen hemiterpenoidler

Atmosfere yayılan izopren bileşiği kısa sürede olsa bitkilerin yapraklarını koruyarak hayatta kalmalarını sağlar. Bununla birlikte bitkinin ozon ve reaktif oksijen türlerine karşı toleransını arttırır (Sharkey *et al.* 2008). Hemiterpenler sinyal molekülleri gibi çok önemli bir belirteç görevide taşıyabilirler. Örneğin, adaçayı bitkisinin yaprakları herhangi bir zarara maruz kaldığında heksenal, monoterpenler ve metiljasmonatlar gibi diğer uçucu bileşikler sentezler ve bunun yanında yüksek miktarda uçucu hemiterpen metakrolein bileşiğini etrafa yayarlar. Bu olay bu bitkinin çevresinde yaşayan diğer bitkilerinde bu saldırı olasılığına karşı hızlı savunma mekanizması üretmesini sağlamaktadır (Baldwin *et al.* 2006). Hemiterpenler bazı böcekler tarafından (un biti vb.) feromen olarak salgılanmaktadır (El-Sayed 2011).

2.2.2.2 Monoterpenler

Monoterpenler, temelini izopren biriminin oluşturduğu ve dekan yapısındaki bileşik grubunun değişik düzenlenmesi ile ortaya çıkan terpen ailesinin bir üyesidir. Monoterpenler, bitkilere kendine has kokularını veren uçucu yağların ve savunma reçinelerinin bileşenleri olarak görev alan terpenik bileşikler sınıfındandır. Pekçok monoterpen bileşikleri çok yıllık (narenciye, kiraz, nane gibi) ağaç ve tek yıllık/çok yıllık otsu/odunsu bitkilerin uçucu yağlarında bulunan ve besleyici özellikleri olmayan bileşiklerdir. Monoterpenler yapısına göre düz zincirli ve halkalı olmak üzere iki şekilde gruplandırılabilir. Bazı düz zincirli monoterpenler arasında mirisen, geraniol ve linalool bulunur. Halkalı yapılar arasında tuyon, karan, timol, karvakrol, mentol, kafur, pinen ve limonen gibi birçok bileşik bulunmaktadır. Bunun yanında bazı monoterpenler molekül içi düzenlenme ya da izopren birimlerinin farklı türlerde bağlanması ile de farklı türden oluşumları içermektedir. Monoterpenlerin oluşumu farklı terpen yapılarının katalizlenmesi ile geranil difosfattan sentezlenmektedir. Şekil 2.9'da monoterpenlerin (monoterpenoidlerin) biyosentez oluşumları bazı terpen/terpenoid örnekleri verilerek gösterilmiştir.



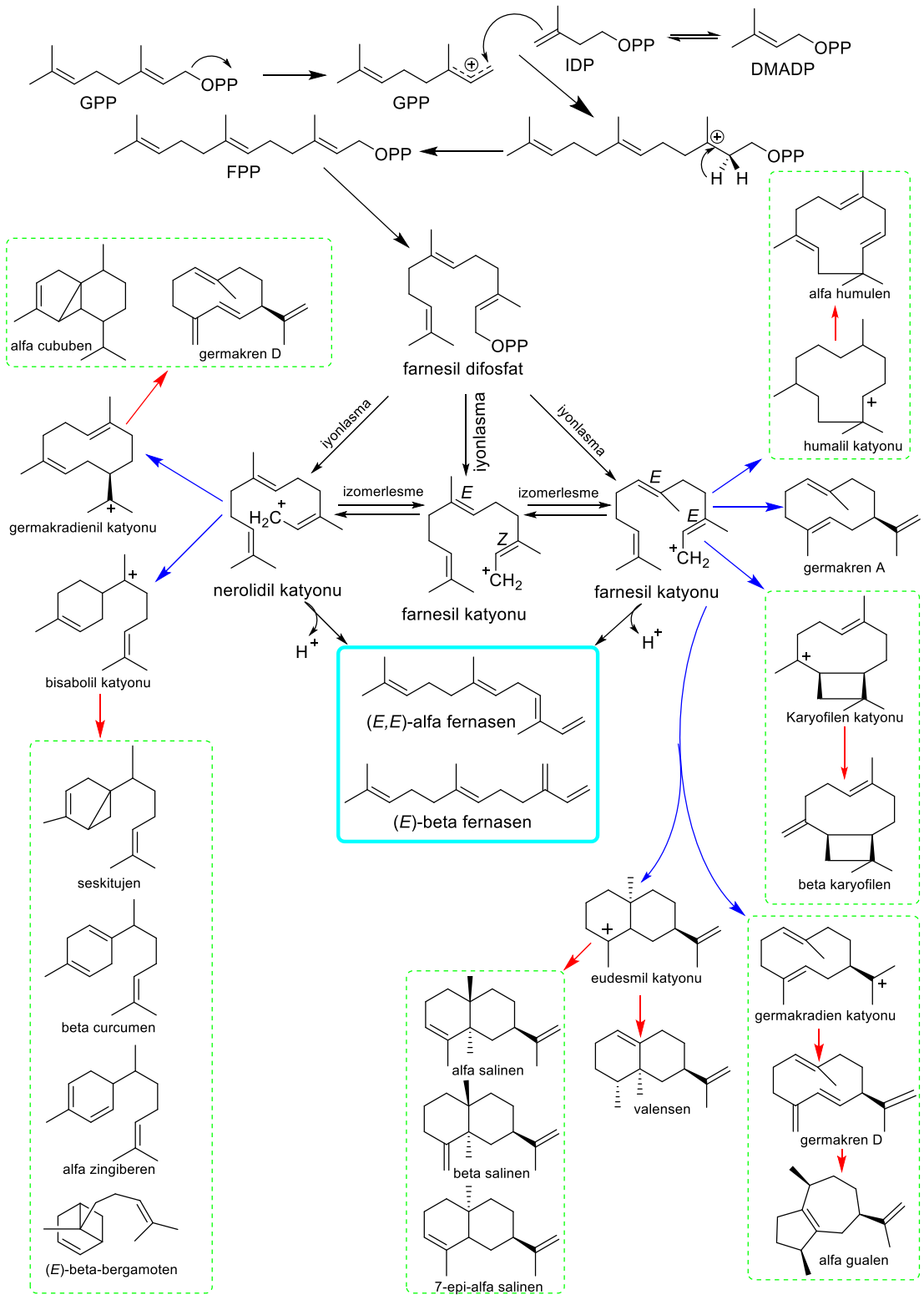
Şekil 2.9 Monoterpenlerin (monoterpenoid) biyosentezi ve bazı monoterpenler (Ignea *et al.* 2019, Ramak *et al.* 2014, Zebec *et al.* 2016)

Monoterpenlerin bitkiler için çok önemli özellikleri bilimsel olarak kanıtlanmakla beraber rolünün ne olduğu konusunda tam bir kesinlik yoktur. Monoterpenler, bitkilerin birbiri ve diğer canlılar ile etkileşimi sonucunda; bitkinin çimlenmesine ve gelişimine inhibe edici özelliklerinin olduğu belirlenmiştir (Fischer 1986). Genel olarak monoterpenler bazı tür böcekleri kendisine çekerek bitkinin tozlaşmasını sağlamakta ve bazı böcekleri uzaklaştırarak koruma sağlamaktadır.

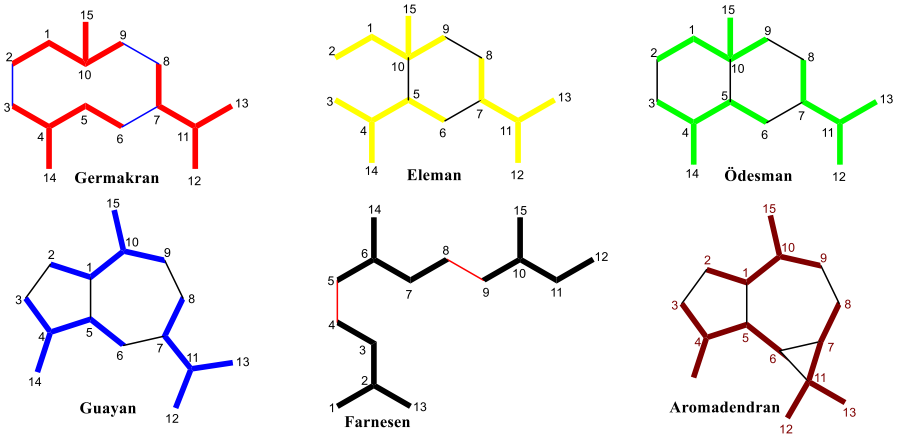
Monoterpenler çok fazla biyolojik aktiviteye sahip olabilmektedir. Bazı monoterpenler antitümör aktivitesine sahiptir, sadece kanserin oluşumunu veya ilerlemesini önlemekle kalmaz, aynı zamanda mevcut kötü huylu tümörleri azaltıp yok olmasını sağlamaktadırlar. Monoterpenlerin tümör hücrelerine karşı etki mekanizması, apoptozun indüklenmesi ve anahtar düzenleyici proteinlerin protein prenilasyonuna müdahalede bulunmaktadır. Bu terpen/terpenoid terimine çok geniş bir anlam kazandırmaktadır. Bununla beraber kimya, ilaç ve tıp alanında araştırma geliştirme potansiyeline sahiptir.

2.2.2.3 Seskiterpen ve seskiterpen laktonlar

Seskiterpenler yapısında 15 karbon bulunan ve üç izopren biriminin birleşmesiyle türetilen alifatik, bisiklik ve trisiklik yapıdaki terpenik bileşiklerin alt sınıfını oluşturmaktadır. Monoterpenler gibi, seskiterpelerin çoğu, türetildikleri bitkinin uçucu yağının bileşenlerini oluşturmaktadır. Seskiterpenler geranil difosfat grubunun izopentil difosfat grubuyla kondenzasyon reaksiyonu sonucunda oluşan farnesil difosfat grubu üzerinden sentezlenmektedir. Farnesil difosfat grubundan, farnesil karbokatyonu oluşmakta ve oluşan karbokatyonların molekül içi düzenlenmeleri oluşmaktadır. Molekül içi düzenlenmeler beraberinde halkalaşmayı ve halkalı yapıları oluşturmaktadır. Molekül içi düzenlenmelerin farklılığı ve halkalardaki farklılıklar seskiterpen bileşiklerinin farklı yapılar oluşturmasını sağlamaktadır (Dewick 2001).

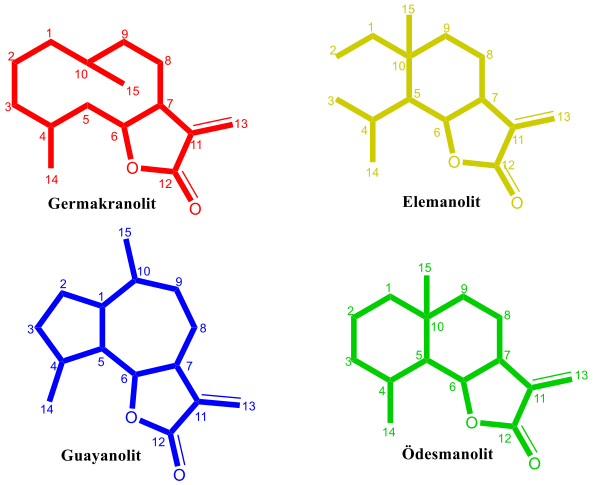


Şekil 2.10 Seskiterpenlerin biyosentezi ve bazı seskiterpenler (Kschowak *et al.* 2018, Li *et al.* 2020, Sallaud *et al.* 2009, Smit *et al.* 2019, Vattekkatte *et al.* 2018)

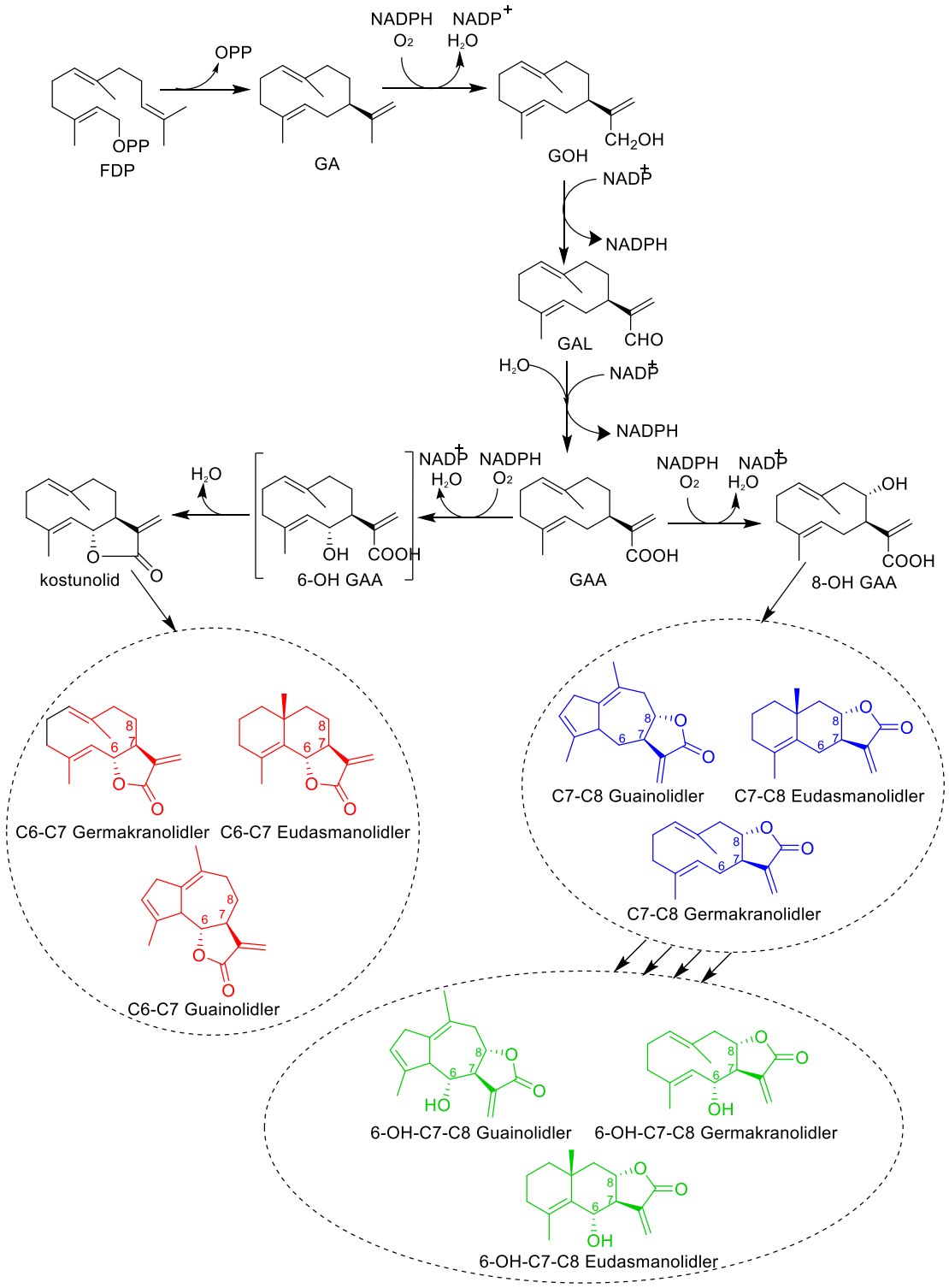


Şekil 2.11 Seskiterpen bileşiklerine ait bazı ana iskeletler

Seskiterpenler yapılarında bazı fonksiyonel gruplarda bulundurabilirler. Ayrıca bu bileşikler yapılarında 5 üyeli (gama lakton) veya 6 üyeli (sigma lakton) lakton halkası bulundururlar. Bu bileşikler seskiterpen laktonları oluşturmaktadır. Yapısındaki lakton halkalarından dolayı bileşiğin isminin sonuna "-olide (Türkçe; olit)" eki getirilmektedir. Laktonlar özelliklede γ-laktonlar biyo-sentez oluşumları itibari ile 6,7 veya 7,8 konumlarından 12-13 konumlarından bağlanabilirler. Ayrıca seskiterpen laktonlar 11 ya da 13 konumunda uç alken olan bir metilen grubu vardır; bu tür laktonlar α-metilen-γ-lakton olarak isimlendirilmektedirler. Seskiterpen laktonlar germakranolit, elemanolit, ödesmanolit ve guayanolit tipi dört ana seskiterpen yapısına sahiptirler ve bu yapılarda monosiklik, bisiklik ve trisiklik yapılar olarak gruplandırılmaktadır.



Şekil 2.12 Bazı seskiterpen lakton grupları



Şekil 2.13 Seskiterpen laktonların biyosentezi ve bazı seskiterpen laktonlar (De Kraker *et al.* 2002, Ramirez *et al.* 2013)

Bilimsel çalışmalar göstermektedir ki; *Centaurea* türlerinde germakran, eleman, ödesman ve guayan tipi dört ana seskiterpen yapısına sahip olduğu kanıtlanmıştır. *Centaurea* türlerinden izole edilmiş olan seskiterpenlerin C-6 konumunda α-yönelimli, oksijen molekülüne sahip ya hidroksil grubu ya da C-6, C-12 konumlarından bağlı γ-lakton halkası şeklindedir. Bazı moleküllerde ise laktonizasyon C-8 konumundan gerçekleşmekte α-yönelimli olup ve ester grupları C-8, C-12 konumlarından bağlı γ-lakton yapıları oluşmaktadır. Pekçok yapıda bulunan ve karakteristik bir özellik taşıyan yapı C-11, C-12 konumunda lakton ünitesine konjuge metilen grubu (uç alken) bulunmaktadır. *Centaurea* türlerindeki seskiterpen lakton bileşiklerinin diğer bir karakteristik özelliği C-10 konumundan bağlı olan ve uzanan metil grubunun (C-14) bulunmasıdır.

Bu serinin önemli bir üyesi, terpenoid biyosentezinde anahtar bir ara madde görevi gören pirofosfatlı farnesoldür. Farnesol, kanser kemopreventif aktivitesi göstermiştir (Crowell and Gould 2004).

Çizelge 2.2 *Centaurea* türlerinden izole edilen seskiterpen/seskiterpen laktonlar

Bitkinin ismi	**İzole edilen bileşikler**	**Referanslar**
C. nicaeensis	Melitensin	(Hammoud *et al.* 2012)
C. aninetensis	Salograviolit A	(El-Najjar *et al.*2008)
C. deflexa	(3a,3aR,4S,6aR,9aS,9bR)-4-hidroksi-3-metil-6-metilen oktahidroazulen [4,5 b]furan-2,8(3H,9bH)-dione	(Chicca *et al.* 2011)
C. ptosimopappa	4β,15-dihidro-3-dehidrosolstitialin A	(Çelik *et al.* 2006)
C. musimomum	Cynaratriol	(Lopez-Rodriguez *et al.* 2009)
C. helenioides	Grosshemin; grosheimin	(Yayli *et al.* 2006)
C. hololeuca	Hololusin, cebellin J; desacillinoklorin C; klorojanerin 15-deacetilraposerin, repin, sinaropikrin, janerin, cebellin G, babilin B, solstitiolid, klorohissipifolin C, klorohissopifolin A, 15-deskloro-15-hidroksiklorojanerin (hidroksijanerin),	(Rosselli *et al.* 2006)
C. babylonica	Cebellin J, desacillinoklorin C, babilin B, babilin A 15-deacetilraposerin, klorohissopifolin C,	(Bruno *et al.* 2005)
C. solstitialis L. ssp. *solstitialis*	Centaurepensin =klorohissopifolin A, klorojanerin ve 13-asetil solstitialin A,	(Özçelik *et al.* 2009) (Yesilada *et al.* 2004)
C. depressa	13-asetil solstitialin A, solstitialin A,	(Akkol *et al.* 2009)
C. ptosimopappa	Zaluzanin C	(Çelik *et al.* 2006)
C. acaulis	β-siklokostunolid, santamarin	(Bentamène *et al.*2005)

Çizelge 2.2 *Centaurea* türlerinden izole edilen seskiterpen/seskiterpen laktonlar(devam)

C. grisebachi subsp.*grisebachii*	8α-hidroksi-4-epi-soncukarpolid, malackitanolid, 4-epi-malakitanolid, 4'-acetilmalakitanolid, 4'-acetil-4-epi-malakitanolid,	(Djeddi *et al.* 2008)
C. phyllocephala	Malackitanolid	(Lazari *et al.* 2008)
C. pullata	8α-hidroksi-11β,13-dihidro-onopordaldehit, 8α-hydroxy-11β,13-4-episoncukarpolid, 8α-O-(4'-hidroksi-2'-metilenbutanoyloksi)- 11β,13 dihidrosoncukarpolid, 8α-O-(4'-hidroksi-2'-metilenbutanoyloksi)- 11β,13- dihidro-4-epi soncukarpolid	(Djeddi *et al.* 2008)
C. tweediei *C. diffusa*	Onopordopicrin	(Bach *et al.* 2011)
C. calolepis	Cnicin	(Erel *et al.* 2011)
C. scabiosa	Grosshemin	(Krasnov *et al.* 2006)
C. cadmea	Ivalin	(Karamenderes *et al.* 2007b)
C. athoa	Atoin, 14-O-asetilatoin, metil 14-O-asetilatoin-12-oat, 4'-hidroksipekterolid-14-O-asetat	(Demir *et al.* 2016)
C. ragusina	Solstitalin A 3,13-diasetat, epoksirepdiolid, ragusinin sinaropikrin, deasikliknaropikrin, hemistepsin A	(Radan *et al.* 2017) (Grienke *et al.* 2018)
C.omphalotricha	4'-asetil sinaropikrin, 4'-asetil cebellin F, 15-asetil dehidromelitensin, linichlorin B, 3-aasetil sinaropikrin, sinaropikrin 8-(4-hidroksimetakrilat)-dehidromelitensin, 15-asetil melitensin, desasilsinaropikrin, 8-hidroksi-11,13-dihidrozaluzanin C.	(Kolli *et al.* 2012)
C. sulphurea	Sulhurein	(Lakhal *et al.* 2010)
C. aegyptiaca	Seneciptin A, seneciptin B, sinaicin, klorohissopifolin E, sebellin J, liniklorin A	(Sary *et al.* 2016)
C. behen	Sinaropikrin, aguerin B, 4β,15-dehidro-3-dehidrosolstitialin A	(Shakeri *et al.* 2018)
C. rhizantha	Rihizantolid A, rihizantolid B, sinarinin A, kandavanolid, salograviolie A, deacylcynaropicrin 8-O-[3′-hidroksi-2′-metilpropionat]	(Shakeri *et al.* 2019)
C. microcarpa	Hidroksi-11β,13-dihidro onopordaldehit	(Baatouche *et al.* 2019)
C. pungens	11β,13-dihidrosalonitenolid 15-O-β-glukopiranosid, Sentaureolid A, Sentaureolid B	(Labed *et al.* 2019)

El-Najjar ve arkadaşları, *C. aninetensis* bitkisinin toprak üstü kısmınından elde edilen metanol ekstresinin izolasyonu ile bir tane seskiterpen lakton (Salograviolit A) bileşiğini saflaştırmışlardır. Normal insan bağırsak hücreleri için toksik olmayan konsantrasyonda salograviolit A bileşiğinin HCT-116 ve HT-29 hücre hatlarının gelişimini durduğu ortaya konulmuştur. Metanol ektresinin antikanser aktivitesi *in vivo* deney hayvanları üzerinde karsinojen 1,2-dimetilhidrazin ile oluşturulan tümörlü hücrelerin sayısını azalttığı ve tümör hücresinin var olduğu alanı küçülttüğü ispatlanmıştır (El-Najjar *et al.* 2008). Özçelik ve arkadaşları 2009 yılında *C. solstitialis* L. ssp. *solstitialis* bitikisinden 3 adet seskiterpen lakton (Centaurepensin:

klorohissopifolin A, klorojanerin ve 13-asetil solstitialin A) bileşiği izole etmişlerdir. Standartlara karşı izole edilen bileşiklerin antimikrobiyal ve antiviral aktivitesini değerlendirmişlerdir. Antiviral aktivite için Vero hücrelerini kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktivite değerlendirmesi için *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Candida albicans* ve *C. parapsilosis* bakterilerini izole etmişlerdir ve mikro dilusyon yöntemi ile laktonların antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Lakton bileşikleri arasında 13-asetil solstitialin A bileşiğinin *E. faecalis*'e karşı çok önemli antimikrobiyal aktivite göstermiş olup çok yüksek antiviral aktivitede gösterdiği rapor edilmiştir (Özçelik *et al.* 2009). Baykan ve arkadaşları *C. calolepis* bitkisinden izole ettikleri sinisin seskiterpen lakton bileşiğinin anti-inflamatory ve sitotoksit aktivitesi belirlemişlerdir. Sinisin LLC-PK_{11}, SK-MEL ve BT-549 hücre hatlarına karşı sırasıyla 23.3, 14.0 ve 18.3 mM konsantrasyonda IC_{50} değere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiğin bu hücrelere karşı toksit etkisinden dolayı değerli bir bileşik olduğu belirlenmiştir. Ayrıca iltihap önleyici aktivitesininde toksisitesinden kaynaklı kayda değer olduğu rapor edilmiştir (Erel *et al.* 2011). Taştan ve ekibi 2019 yılında yayınlamış oldukları bir makalede, Türkiye'ye endemik *Psephellus pyrrhoblephara* bitkisinin kloroform ekstresinden altı tane bilinen guaianolid tipi seskiterpen türevli bileşiklerin (klorojanerin,19-deooksiklorojanerin, 15-hidroksijanerin, aguerin B, sinaropikrin, eleganin) izolasyonunu yapmışlardır. Seski terpen bileşiklerinin jinekolojik kanser hücreleri (SiHa, HeLa ve MDA-MB-231 cells) üzerindeki antiproliferatif aktivitesi MTT deneyi ile incelendi. Klorojanerin, 19-deooksiklorojanerin, aguerin B, sinaropikrin ve eleganin bileşikleri kayda değer bir şekilde yüksek antiproliferatif aktivite göstermektedir. Özellikle yapısında klor içeren bileşiklerin 2.21 ve 2.88 mM IC_{50} değerlerine sahip inhibisyon konsantrasyonları ile MDA-MB-231 hücrelerine karşı çok yüksek antiproliferatif aktivite sahip olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Tastan *et al.* 2019). Lee ve arkadaşları *Youngia japonica* bitkisinden daha önce izole edilen grosshemin bileşiği ve bu türden guaiane tipi seskiterpen/seskiterpen lakton türevli pekçok bileşiğin insan tümör hücreleri (A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 ve HCT15) üzerine etkilerini incelemişlerdir. Grosshemin bileşiğinin diğer bileşiklerden bariz bir şekilde çok yüksek değerde bu hücrelerin büyümesini engelleyici aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir (Lee *et al.* 2015). Radan ve arkadaşları *C. ragusina* bitkisinin yaprak ve çiçek kısımlarını ayırarak bu

kısımları su ile ektrakte etmiştir. Su ile elde edilen ekstrelerin insan mesane (T24) ve insan beyin tümörü (A1235) kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (Radan *et al.* 2017). *C. omphalotricha* bitkisinin toprak üstü kısmından Kolli ve çalışma grubu çalışmıştır. Fitokimyasal çalışma sonucunda 3 tane yeni seskiterpen lakton türevi; 4'-asetil sinaropikrin, 4'-asetil cebellin F, 15-asetil dehidromelitensin izole etmişlerdir. Ayrıca bilinen 7 tane seskiterpen lakton türevinide izole etmişlerdir; liniklorin B, 3-asetil sinaropikrin, sinaropikrin 8-(4-hidroksimetakrilat)-dehidromelitensin, 15-asetil melitensin, desasilsinaropikrin, 8-hidroksi-11,13-dihidrozaluzanin C. İzole edilen seskiterpen laktonların insan tümör hücre hatlarının (HL-60 ve U937) canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmıştır. İnsan lösemi hücrelerine karşı en sitotoksik bileşikler sırasıyla IC_{50}= 2.0 ± 0.9 ve 5.1 ± 0.4 μmol L^{-1}'lik IC_{50} değerlerine sahip 3-asetil sinaropikrin ve 4'-asetil sinaropikrin bileşikler olarak literatüre kaydedilmiştir (Kolli *et al.* 2012). Sary ve grubu 2016 yılındaki çalışmalarında *C. aegyptiaca* bitkisinden altı tane seskiterpen lakton türevi izole etmiştir. Bu bileşiklerin sitotoksisitesi (IC_{50}, μM), normal fibroblast hücrelerinden (BHK) ziyade HEPG2, HEP2 kanser hücre hatlarına karşı belirlendi. Seneciptin A, sırasıyla 7.2 ± 0.04 ve 7.5 ± 0.02 IC_{50} değerleri ile HEPG2 ve HEP2'ye karşı yüksek sitotoksik aktivite gösterirken, Seneciptin B, her iki hücre hattına karşı sadece sınırlı bir toksisite göstermiştir (Sary *et al.* 2016). Beltagy 2015 yılında yayınladığı makalesinde, *C. scoparia* bitkisinin etanol ve seskiterpen lakton ekstresini (petrol eteri/eter-metanol-1:1:1 oranında çözücü ile hazırlanan) bazı hücre hatlarına (HCT 116, Hela, Hep-G2 ve MCF-7) karşı SBR deneyi ile sitotoksik etkilerini incelemiştir. Sitotoksisite pozitif kontrol olarak Doksorubisin kullanıldı. Bitki ekstreleri seçilen hücre hatlarına karşı artan dozda uygulama yapılarak etkileri değerlendirildi. Seskiterpen lakton ekstresi, etilalkol ekstresinden daha düşük IC_{50} değerleri göstermiştir. En yüksek sitotoksik aktivite, IC_{50}= 8.03 ± 0.48μg/mL ile MCF7 hücre hattına karşı seskiterpen lakton ekstresinin sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, etanol ekstraktı IC_{50}= 14.3 ± 1.34 ± μg/mL değeri ile çoğunlukla HC5 116 hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteye sahiptir (Beltagy 2015). Shakeri ve arkadaşları *C. behen* bitkisinden 3 adet seskiterpen lakton (Sinaropikrin, aguerin B, 4β,15-dehidro-3- dehidrosolstitialin A) bileşiklerini izole etmişlerdir. İzole edilen seskiterpen laktonlar bileşiklerinin doksorubisin standardına (IC_{50}=1.17 μg/mL) karşı 1.15 ve 1.62 μg/mL IC_{50} değerleri ile A2780 hücrelerine karşı

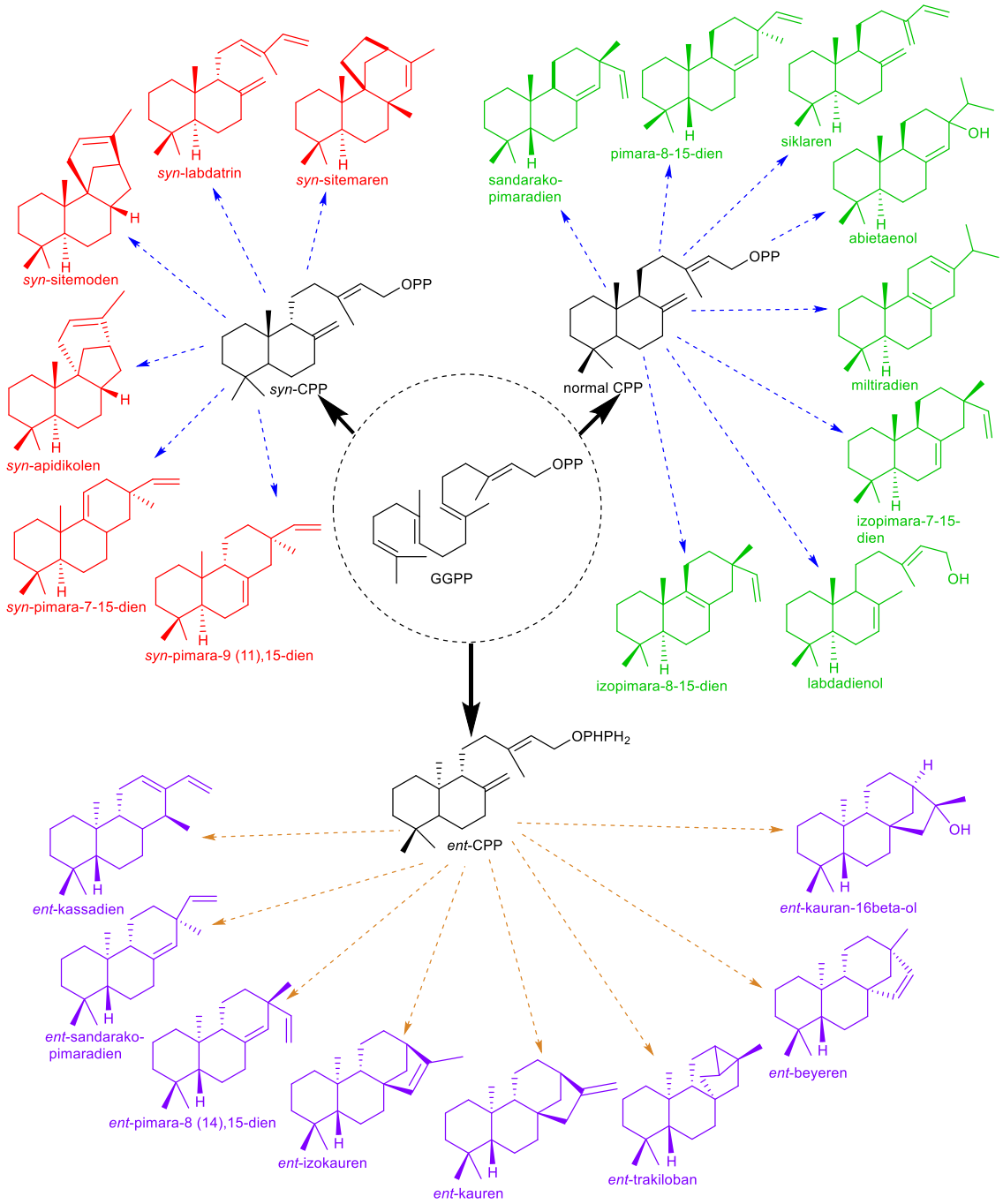
güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, anti-anjiyojenik çalışma, sinoropikrin ve aguerin B'ün HUVEC'lerin proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki belirgin inhibitör etkisinin olduğunu göstermiştir. Ek olarak, sinoropycrin ve aguerin B bileşiklerinin, CAM deneyinde önemli anjiyo-inhibitör etkileri göstermiştir. Bu bulgular, kanser tedavisi için yeni kemoterapötik ajanlar olabileceğine önemli ışık tutmaktadır (Shakeri *et al.* 2018). Shakeri ve ekibi bir diğer çalışmalarında 2019, *C. rhizantha* bitkisinin toprak üstü kısımlarından iki yeni (Rihizantolid A, Rihizantolid B) ve dört tane bilinen (kandavanolid, salograviolie A, deacylcynaropicrin 8-*O*-[3′-hidroksi-2′-metilpropionat], Sinarinin A) seskiterpen lakton izole etmişlerdir. İzole edilen bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerini Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerine karşı belirlenmiştir. Sadece, deacylcynaropicrin bileşiği 500 µg/mL konsantrasyonda MIC/MBC deneyinde *S. aureu*s'a karşı orta derecede antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bütün bileşiklerin, beş tane kanser hücresine (MCF-7, A2780, Jurkat, A-549, PC3) karşı sitotoksik aktiviteleri ve NIH/3T3 normal hücreye karşı toksisitesi değerlendirilmiştir. Bunlar arasında bileşik 8-*O*-[3′-hidroksi-2′-metilpropionat] 5.02-16.76 µg/mL IC_{50} değerleri ile çok yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Shakeri *et al.* 2019). Labed ve ekibi 2019 yılında yapmış olduğu araştırmada, *C. pungens* bitkisinin toprak üstü kısımlarından iki tane yeni aminoasit türevli seskiterpen lakton konjugatı (Sentaurolid A, Sentaurolid B) ve bir tane bilinen seskiterpen lakton [11β,13-dihidrosalonitenolid 15-*O*-β-glukopiranosid] izole etmişlerdir. *C. pungens*'den izole edilen bileşiklerin gram-pozitif bakteriler (*B. cereus, S. aureus* ve *L. innocu*a) ve gram-negatif bakteriler (*P. aeruginosa ve P. fragi*) bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Bileşikler arasında Sentaurolid A bileşiği tüm bekterilere karşı yüksek antibakteriyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Labed *et al.* 2019). Grienke ve ark, 2018 yılında *C. ragusina* L. bitkisinin etanol özütünden deasiklinaropikrin, hemistepsin A ve ragusinin seskiterpen lakton bileşiklerini izole etmişlerdir. Seskiterpen lakton türevi bileşiklerin bazı tümörlü hücre hatları (V79, SCVII, B16F10, FsaR, Caco-2, HeLa, MCF-7) ve normal hücre hatlarına karşı etkileri incelendi. Seskiterpen laktonlar ragusinin bileşiği özellikle SCVII, Caco-2 ve HeLa hücre çizgileri üzerinde en güçlü sitotoksik aktiviteyi gösterirken, normal V79 fibroblastları üzerinde hiçbir sitotoksik etki göstermemiştir. Antibakteriyel aktivite değerlendirmesi için ise benzer şekilde, sitotoksik aktivite ile sübstitüentlerin α-metilen-

γ-lakton grubu çevresindeki merkezi halka üzerindeki tipi ve özellikleri arasında bir korelasyon gözlendi. Seskiterpenler için daha az lipofilik substitüente sahip olanlar bileşiğe hidrofobik bir özellik katmaktadır. Bu hidrofobik özellik seski terpenlerin büyük olasılıkla hücre zarından daha iyi nüfuz etmesini sağlamakta ve sonuç olarak daha iyi antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteyi mümkün kıldığı sonucunu ortaya koymuşlardır (Grienke *et al.* 2018).

2.2.2.4 Diterpenler

Diterpenler dört izopren biriminin birleşmesi ile oluşmuş 20 karbon atomuna sahip terpen grubundandır. Terpenlerin okside olmuş hallerine terpenoidler denilmektedir. Diterpenler 2E, 6E, 10E geranil pirofosfattan biyo-sentez yolakları ile doğal olarak oluşmuş ve dağada en fazla bulunan terpenoid türüdür. Diterpenler asiklik, monosiklik ve bisiklik olarak üç farklı gruba ayrılmaktadır. Diterpenler mevalonik ve non-mevalonik asit yolakları ile sentezlenebilmektedir (Dubey *et al.* 2003). Bitkiler özellikle deniz yosunları dışında mantarlar ve böcek dünyasındaki böcekler tarafından bünyelerinde bulunmaktadır.

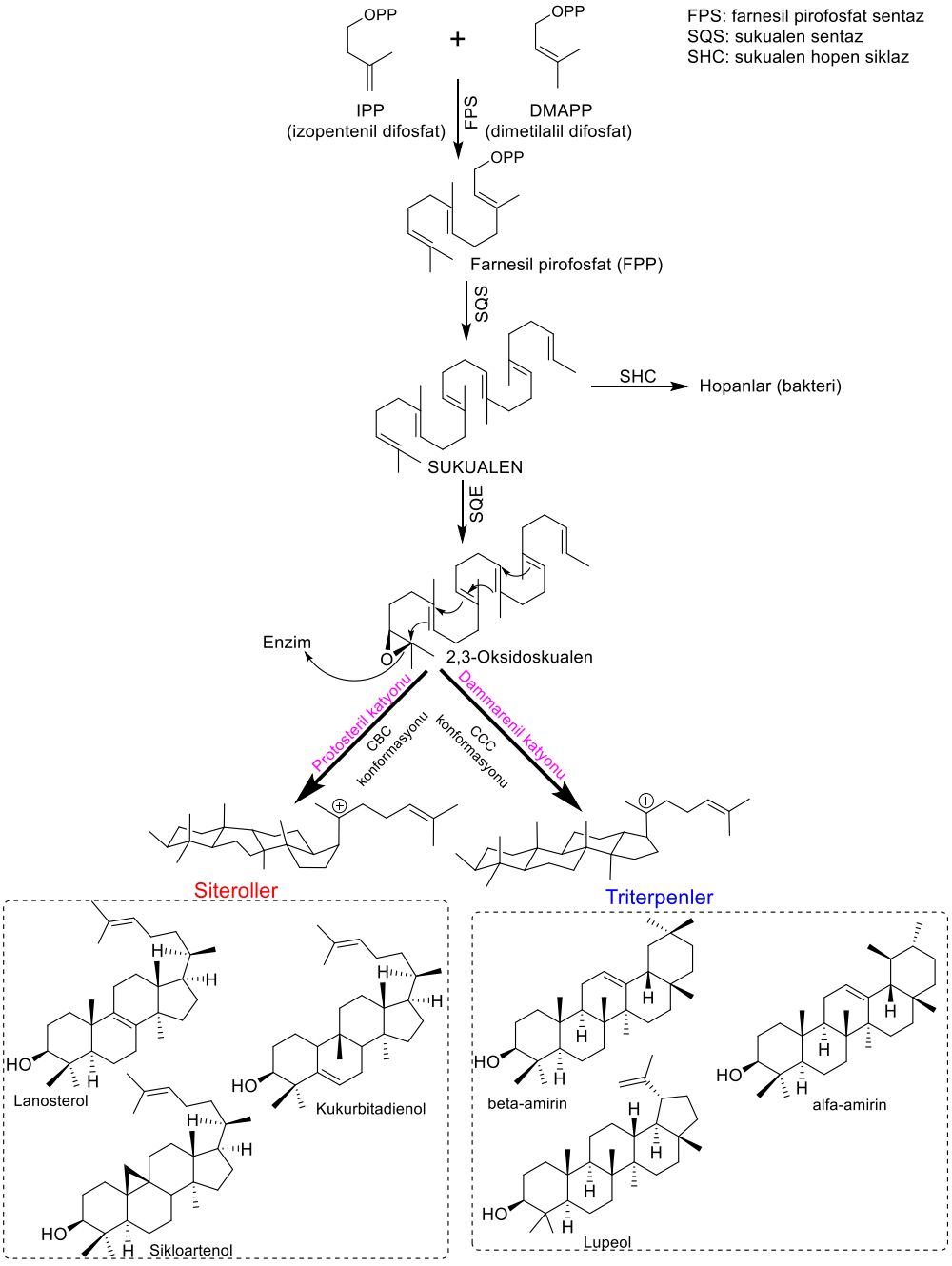
Doğal orjinli bileşik sınıfı içerisinde, diterpenler, en geniş biyolojik aktivitesi olan bileşiklerdir. Diterpenlerde biyolojik aktivitenin halkalı diterpenlerde daha fazla olduğu vurgulanmaktadır. Diterpenler retinol, retinal, taksol, fitol gibi biyolojik özelliği fazla bileşikler için temeldir. Genel olarak yiyeceklerde ve kozmetikte katkı maddesi olarak kullanılır. Bilimsel araştırmalar sonucunda; diterpenlerin anti-karsinojenik, anti-inflamatuar, antioksidan, antimikrobik, anti-kanser, yara iyileştirici, antihipertansif, analjezik ve nörofarmakolojik aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir (Chang *et al.* 2007, Costa *et al.* 2012, Costa *et al.* 2014, Nothias-Scaglia *et al.* 2014). Pekçok bitki için acı özelliklerinden dolayı avunma özellikleri katmaktadır. Ayrıca, antibakteriyal ve antitüberküloz özellikleride çok fazladır (Encarnación-Dimayuga *et al.* 2006, Fraga *et al.* 2005, Wellsow *et al.* 2006).



Şekil 2.14 Diterpenlerin biyo-sentezi ve bazı diterpenler (Andersen-Ranberg *et al.* 2016, Smanski *et al.* 2012, Vattekkatte and Boland 2020)

2.2.2.5 Triterpenler

Triterpenler/triterpenoidler altı izopren biriminin birleşmesiyle oluşan bileşik grubundandır. Bu grubun en basit üyesi skualen bileşiğidir. Bu bileşik, iki tane 15 karbon atomuna sahip farnesil fosfatın baş-baş ya da kuyruk-kuyruk kondenzasyonu ile sentezlenmektedir ve polisiklik triterpenlerin öncülüğünü oluşturmaktadır.



Şekil 2.15 Triterpenlerin bio-sentezi ve bazı triterpenler (Ghosh 2016, Han *et al.* 2006, Zheng *et al.* 2015).

Çoğu bitkilerin uçucu yağlarında bulunan mono ve seskiterpen bileşiklerinin aksine, triterpen/terpenoid grubu bileşiklerinin az bir kısmının doğadaki yayılışı çok fazladır. Örneğin; α-amirin, β-amirin, ursolik asit ve oleanolik asit bitkilerin yaprakları ve meyveleri üzerindeki mumsu tabakada, reçine ve balzamlarda ağırlıklı olarak bulunmaktadır. Biyolojik özelliklerine bakıldığı zaman en önemli triterpenoid yapıları oleanan, ursan, lupan ve euphan karbon iskeletleridir (Dzubak *et al.* 2006). Triterpenler; steroidler, steroller, saponinler ve kardiyak glikozitler gibi bileşikleri bünyesinde bulundurmaktadır. Steroidler, bitkiler dışında hayvanlar için hormon, ko-enzim ve provitamin olarak işlev göstermektedir.

Antienflamatuar, hepatoprotektif, analjezik, antimikrobiyal, antimikotik, virostatik, immünomodülatör ve tonik etkiler gibi pekçok biyolojik özelliklere sahiplerdir. Bitkilerde mumsu tabakada bulunan triterpenoidlerin bitkiyi mikrobiyal saldırı ve böcek saldırılarına karşı koruyucu özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Farmasötik uygulamalar için birçok triterpenoidin kullanımı, hemolitik ve sitostatik özellikler nedeniyle sınırlıdır. Bu sınırlandırmaları ortadan kaldırmak ve triterpenlerin kullanım alanlarını artırmak için bu bileşiklerin kimyasal ya da biyoteknolojik tekniklerle modifikasyonu mümkündür. Bu bileşiklerin pekçok kiral merkezi olduğundan sentezi sırasında çok fazla izomeri oluşmaktadır. Bu da verimi ve izolasyonu zorlaştırmaktadır. Bunun yerine regio ve anantioselektif modifikasyonları oluşturacak dönüştürücülere ihtiyaç vardır buda mikroorganizmalarda varolduğu bilimsel olarak belirlenmiştir (Muffler *et al.* 2011).

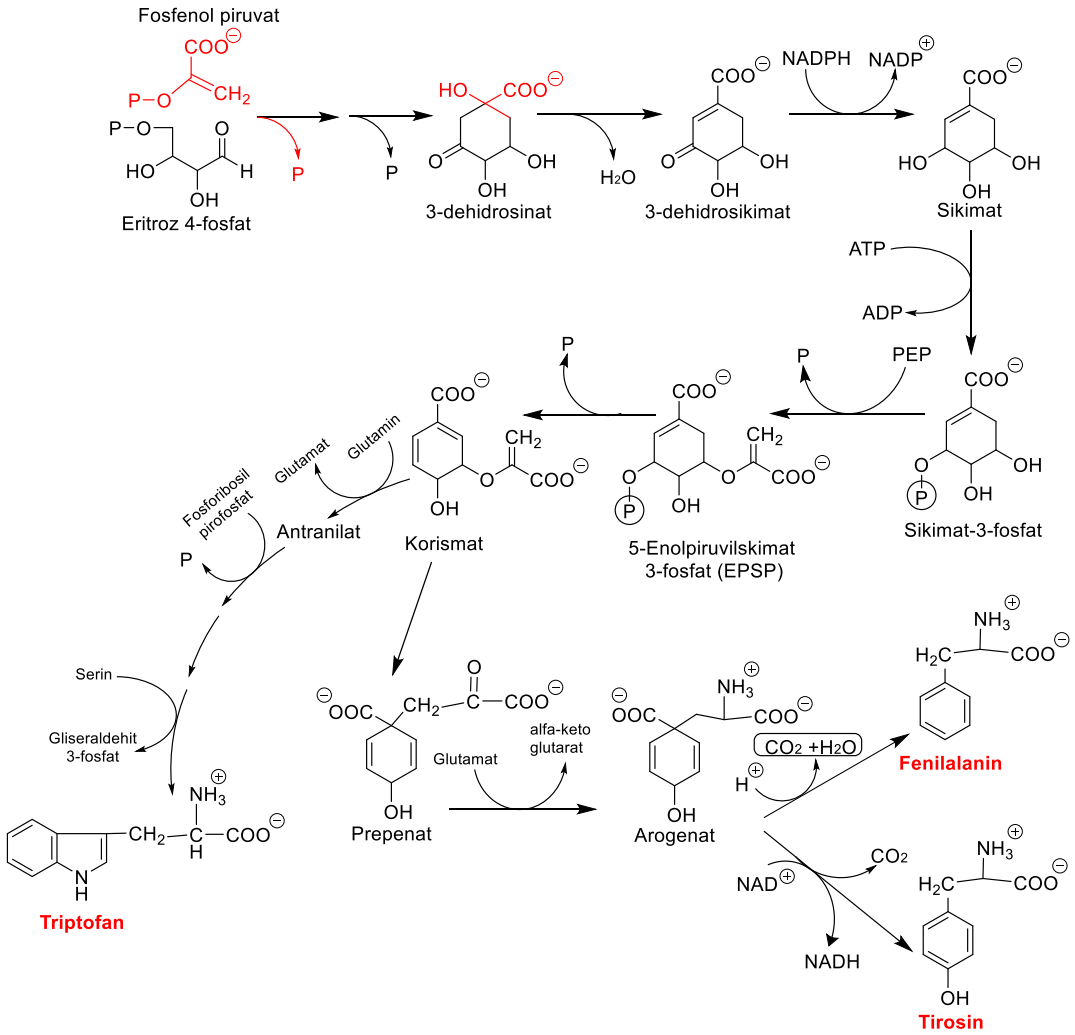
Dünyada, *Centaurea* türlerinin triterpen bileşiklerini ihtiva ettiği yönünde pek çok literatür çalışması bulunmaktadır. *C. omphalotricha* ve *C. resupinata* subsp. *dufourii* bitkisinden lupeol, taraksasterol, daucosterol ve *β*-sitosterol (Bouzghaia *et al.* 2020, Mouffok *et al.* 2012), *C. sadleriana* bitkisinden campesterol (Csupor *et al.* 2013), *C. cadmea* bitkisinin toprak üstü kısımlarından *β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glikopiranozid (Astari *et al.* 2013) gibi bitki türleri triterpen türevli bileşik yönünden oldukça zengindir.

Türkiye'de yetişen *Centaurea* türleri üzerine yapılan çalışmalarda: *C. ptosimopappoides* bitkisinden bir tane hopan türevi 17*β*,21*β*-epoksi-16α-etoksihopan-3*β*-ol ve bir tane bakkaran türevi 3*β*-asetoksi-17,24-diokso bakkaran (Serin 1997), *C. cuneifolia* bitkisinden bir tane triterpen; *α*-amirin ve bir tane sterol; *β*-sitosterol (Aslan and Öksüz 1999), *C. kilaea* bitkisinden taraxasterol ve oleanolik asit (Sen *et al.* 2017), *C. solstitialis*'den lupeol, *α*-amirin, *β*-amirin, *α*-amirin asetat, *β*-amirin asetet ve taraxasterol asetat (Sotes *et al.* 2015) gibi triterpenler/triterpenoidler bileşikleri izole edilmiştir.

2.2.3 Alkaloidler

Alkaloidler yapısında genellikle en çok azot bulunduran, sekonder metabolitlerin en geniş grubu olarak bilinen, arginin, tirosin, triptofan, lizin ve fenilalanin gibi en basit amino asitlerden oluşan heterosiklik bileşiklerdir (Gokgoz and Akbulut 2015). Alkaloid terimi ilk olarak 1819 yılında Meissner tarafından kullanılmış ve ilk alkaloid izolasyonu 1830 yılında yapılmıştır. Alkaloidlerin kullanımına dair ilk bulgular M.Ö. 3000 yıllarına kadar geri gitmektedir. Bu dönemde Sümerler tarafından güçlü narkotik etkilere sahip haşhaş (*Papaver somniferum*) bitkisi yetiştirilmiş ve taş tabletler üzerine resmedilerek kullanımına dair ilk kanıtları oluşturmaktadır. Ayrıca bu dönemde bitkinin "mutluluğun çiçeği" olarak ifade edildiği bilgisine kayıtlarda ulaşılmaktadır (Ramawat *et al.* 2009). Dünyada yaklaşık 25.000 alkaloit türevinin olduğu rapor edilmiştir. Bu bileşik grubu, çeşitli yapılara ve önemli farmakolojik aktivitelere sahip bol miktarda bulunan doğal küçük moleküllerdir ve insanlık tarafından terapötik ajanlar olarak kullanılmıştır (Bhadra and Kumar 2011). Bu bileşiklerin kendine has özellikleri bulunmaktadır: renksizdirler, kokusuzdurlar, acıdır ve kristal haldedirler. Alkaloidlerin yapılarında bulunan azot atomunun proton almasının yanında ve proton veren amin gruplarında hidrojen atomu/atomlarının bulunmasından dolayı alkaloidleri mükemmel biyoaktif moleküller yapmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı reseptörler ve enzimlerle birlikte hidrojen bağlarının oluşmasını sağlamaktadırlar (Kittakoop *et al.* 2014). Oksijen içermeyen alkaloidler uçucu özelliğe sahiptir ve sıvı durumdadırlar. Alkaloidlerin çoğu bitkilerde sentezlenip tanımlanması yapılmasına rağmen, alkaloidler alglerden, böceklerden, deniz ve kara hayvanlarından, mikroorganizmalar ve mantarlardan da

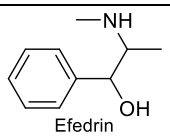
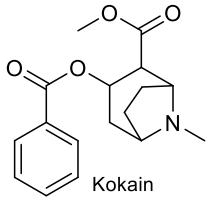
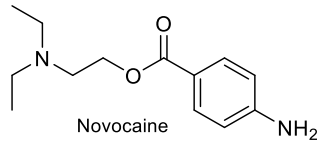
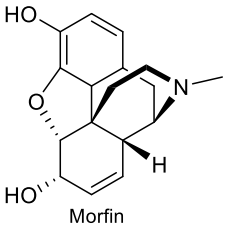
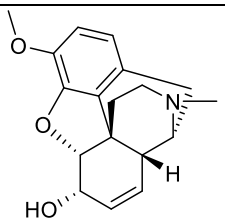
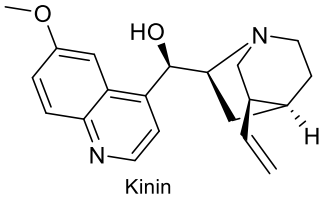
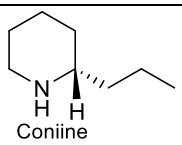
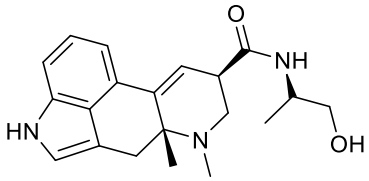
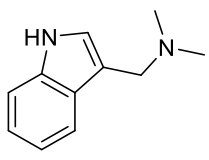
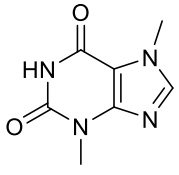
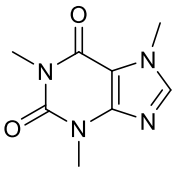
bulunduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Şekil 2.16'da alkaloidlerin temel biyosentezi gösterilmiştir.



Şekil 2.16 Alkaloidlerin temel olarak türedikleri biyosentez basamakları (Diaz *et al.* 2015, Funayama and Cordell 2014)

Alkaloidler halka yapılarına göre farklı alt gruplara ayrılır. Örn; izokinolin tipli alkaloidler dikkate değer terapatik özellikleri olan ya da potansiyeli olan alkaloitlerdendir (Wink 2015). Alkaloidler, yapısal benzerlikler ve biyosentezleri için kullanılan amino asitler temelli alkaloid aileleri olarak sınıflandırılabilirler. Ayrıca bazı alkaloidlerin sentezi terpenoidler, poliketidler ve peptitler gibi diğer sekonder metabolitlerin yapı taşı olarak kullanılması ile üretilmektedir. Ana halka yapısına göre bazı alkoloidler Çizelge 2.3'te verilmişir.

Çizelge 2.3 Ana halka yapısına göre bazı alkoloidler

Feniletilamin alkaloidleri	 Efedrin
Piridin-pirolidin alkaloidleri	 Nikotin
Pirolidin-piperidin (Tropan) alkaloidleri	 Kokain  Novocaine
İzokinolin alkaloidleri	 Morfin  Kodein
Kinolin alkaloidleri	 Kinin
Piridin ve piperidin alkaloidleri	 Coniine
İndol alkaloidleri	 Ergometrin  Gramine
Purin alkaloidleri	 Teobromin  Kafein

Shoeb ve arkadaşları *C. montana* bitkisinin çekirdeklerinden 8 adet indole türevli alkaloid izole etmişlerdir ve bu bileşiklerden dimerik yapıdaki yeni bir alkaloid (montamine) bileşiğini belirlenmiştir. Yeni alkoloid bileşiğinin (montamine) Caco-2 kolon kanser hücresine karşı (IC_{50}=43.9 mM) çok önemli sitotoksit aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir (Shoeb *et al.* 2006). Ayrıca izole edilen moschamine bileşiğininde yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu bilimsel kanıt olarak sunulmuştur.

Shoeb ve arkadaşları başka bir çalışmada *C. schischkiniin* bitkisinin çekirdeklerinden schischkiniin isminde yeni bir indol alkoloid izole etmişlerdir. Yeni ve izole edilen diğer bileşiklerin Caco-2 kolon kanser hücresine karşı sitotoksisitesi ve toksisitesi belirlenmiştir. 76 μM'lık IC_{50} değeri ile orta seviyede bir sitotoksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Shoeb *et al.* 2005).

Hodaj ve arkadaşları *C. vlachorum* bitkisinin çekirdeklerinden iki indol alkaloid (serotonin ve moschamine) izole etmişlerdir. Bu bileşiklerin antioksidan ($DPPH^{\bullet}$ ve AAPH'li linoleik asit inhibisyonu) ve son olarak, bu bileşiklerin soya fasulyesi lipooksijenaza karşı inhibüsyon etkisi substrat olarak linoleik asit kullanılarak değerlendirilmiştir. Seratonin bileşiğinin antioksidan etkisi diğer bileşiğe ve standart olarak kullanılan troloks bileşiğine oranla çok yüksektir. Diğer yandan moschamine bileşiği soybean lipoksigenaz'ı %80 oranında inhibe ederek çok yüksek inhibüsyon etkisinin var olduğunu belirlemişlerdir. Bu etkinin bileşikteki metoksi grubunun halkaya ve moleküle inhibüsyon özellik kazandırdığını belirlemişlerdir (Hodaj *et al.* 2017).

2.3 *Centaurea* L. Türlerinin Farmakolojik Özellikleri

Centaurea türlerinin halk tıbbında sadece bu türün yada diğer bitki türleri ile oluşturulan drogların antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog, koleretik, dijestif, stomaşik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyel, antipiretik, kolagog, amaçlarla kullanıldığı

bilinmektedir (Barrero *et al.* 1997, Farrag *et al.* 1993, Gürkan *et al.* 1998, Kaij-a-Kamb *et al.* 1992, Orallo *et al.* 1998).

2.3.1 *Centaurea* L. türlerinin halk arasındaki tıbbi özellikleri

Centaurea türleri, pekçok canlı tarafından kullanılması insana ışık tutmuş ve halk arasında geleneksel kullanımı yıllarca denenerek insan hayatına faydalar sağlamıştır. Bu türlerden, *C. cyanus* anadoluda kurutulmuş çiçekleri % 5'lik konsantrasyonda kullanımı ishal kesici, iştah açıcı, kuvvet verici ve nefes daralmasını engellemesinden dolayı göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop 1999). *C. behen* bitkisinin çiçekleri mide sorunlarını giderici ve adet getirici olarak, *C. jacea* ve *C. calcitrapa* bitkilerinden hazırlanan % 6'lık ekstrelerin ateş düşürücü, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak, *C.iberica* bitkisi mide ağrıları, böcek ve yılan ısırmalarına karşı, *C. uniflora* zehirlenmelere karşı, *C. chilensis* bitkisinin sulu ekstresi ateş düşürücü ve romatizma tedavilerinde, *C. aspera, C. seridis* var. *maritima, C. melitensis* bitki ekstrelerinin kan şekerini düzenleyici etkileri, *C. pallescens* idrar sökücü, sıtma hastalığına karşı koruyucu ve anti sıpazmotik olarak halk arasında kullanılmaktadır. Türkiye'de *C. pulchella, C. drabifolia ve C. solstitialis* bitkileri halk hekimliğinde çıban oluşumunu engelleyici, hemoroid, peptik ülser, soğuk algınlığını ve uçuk mikrobunun neden olduğu enfeksiyonlarını tedavi etmede kullanıldığı bildirilmektedir (Fujita *et al.* 1995, Honda *et al.* 1996, Sezik *et al.* 2001). Türkiye'de yetişen bazı *Centaurea* türleri; *C. cyanus* L., *C. depressa* bieb. ve *C. iberica* gibi tıbbi özelliği olan bitkiler astım tedavisinde geleneksel olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Melikoğlu *et al.* 2015). *C. kotschyi* var. *decumbens* bitkisinin metanol ve su çözücülerinde elde edilen ekstrelerin HSV-1 uçuk virüsüne karşı antiviral etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Dombekci and Duman 2019, Uzunçar 2016). *C. calcitrapa* ve *C. cyanus* bitkilerinin göz iltihabını giderici, jinekolojik rahatsızlıkların giderilmesi ve yara gibi dermatotolojik problemlerin ortadan kaldırılması gibi etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Janackovic *et al.* 2008). *C. horrica* bitkisinden elde edilen sulu ekstrelerin yorgun gözlerin ve konjuktivit olan gözler için yıkama solüsyonu olarak kullanılmaktadır (Boukhary *et al.* 2017). *C. antiochia* var. *praealta* bitkisini nörolojik hastalıkların başlangıcı ile birlikte gelişim sürecinde ve alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Ozsoy *et al.* 2015).

2.3.2 *Centaurea* L. türlerinin biyoaktivite çalışmaları

Zater ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, *C. diluta* subsp. *algeriensis* bitkisinde toprak üstü kısımlarını metanol-su solvent karışımı ile ekstrakte etmişlerdir, Ekstrenin A549, MCF7 ve U373 kanser hücrelerine karşı sitotoksit aktivitesi MTT deneyine göre yapıldı. Akvitenin yüksek olmasından dolayı ekstreden kromatografik metotla etken bileşikler izole edilmiştir. Vanilin, paridol, arktigenin, eupatilin, jaceosidin bileşiklerini izole etmişlerdir. İzole edilen bileşiklerin A549, MCF7, U373, Hs683, PC3 ve B16-F10 hücrelerine karşı sitoktoksik aktiviteleri denenmiştir. Arktigenin (IC_{50}: 28mM Hs683, 33 mM B16-F10), eupatilin (IC_{50}: 33 mM B16-F10, 47 mM PC3) ve jaceosidin (IC_{50}: 32 mM PC3, 40 mM B16-F10) maddelerinin kısmen sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Jaceosidin bileşiği ılımlı bir antimikrobiyal aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir (Zater *et al.* 2016).

Ostad ve arkadaşları 2016 yılındaki çalışma kapsamında *C. bruguierana* subsp. *belangeriana* (DC.) Bornm. bitkisinden elde edilen kloroform ve etilasetat ekstrelerinin bazı kanser hücrelerine karşı HT-29, Caco-2 ve T47D sitotoksit etkilerinin ve normal hücreler karşı NIH-3T3 toksisite etkisi değerlendirmiştir. İki ekstreninde Caco-2 ve T47D kanser hücresine karşı yüksek sitotoksik etkide bulunurken (IC_{50}<100 µg/ml) çok önemli bir durum olarak Normal NIH-3T3 hücresine karşı çok yüksek IC_{50} değeri ile toksisitesinin düşük olduğunu belirlemişlerdir (Ostad *et al.* 2016).

C. aegyptiaca L. bitkisinin metanol ekstrelerinin bazı hücre hatlarına karşı HepG2, MCF7, HCT-116 ve HeLa hücre hatlarına karşı antiviral ve sitotoksik aktivitesi Bakr ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Bakr ve grubu HepG2, MCF7, HCT-116 ve HeLa hücrelerine karşı metanol ekstresinin yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu ektsrenin Hepatit A virüsüne (HAV) karşı düşük antiviral aktiviteye sahip olduğu görülmüşken, uçuk virüsü tip 1'e (HSV 1) karşı hiçbir antiviral etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Bakr *et al.* 2016). Melikoğlu ve arkadaşları, bu çalışma ilk kez *C. nerimaniae* bitkisinin antioksidan, antibakteriyel, antienflamatuar ve anti-

kolinesteraz aktiviteleri biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu bitki türünden elde edilen ekstrenin inflamasyon, mikrobiyal ve AD hastalıkları da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların etkili tedavisi için potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Melikoglu *et al.* 2018). Bahmani ve ark. 2018 yılındaki çalışmalarında, tek başına *C. albonites* bitkisinden hazırlanan ve Vincristine (VCR) bileşiği ile hazırlanan metanol ekstresinin karışımlarını kullanarak NALM-6, REH, NB4 ve KMM-1 hücre hatlarına karşı potansiyel sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, *C. albonitens* ekstraktının (CAE), G0/G1 fazı ile apoptoz ile sitotoksisiteyi indüklediğini belirlemişlerdir. İlginç bir şekilde, normal hücreler CAE tedavisinden sonra belirgin sitotoksisite göstermemiştir. Ayrıca düşük dozda VCR ile hazırlanan CAE'nin hücre dizilerinin (NALM-6 ve REH) anti-kanser etkilerini artırdığını bulmuşlardır. Diğer çalışmalar hücre döngüsü durmaksızın VCR ve CAE'nin apoptozu indükleyerek sinerjistik etki gösterdiğini ve sonucunda antikanser aktivitelerinin olduğunu doğrulamaktadır. Bu çalışmada, ilk kez *C. albonitens*'in metanolik ekstraktının potansiyel bir antikanser ajanı yada VCR'nin kemoterapötik hassasiyetinin bir artırıcı olarak kabul edilmesi gerektiğinin bilimsel olarak kanıtı yapılmıştır (Bahmani *et al.* 2018).

Hamedeyazdan ve ekibi bilimsel bir makalesinde (2017), *C. albonitens* bitkisinin toprak üstü kısımlarını metanol ile mesare etmişlerdir. Metanol ekstraktın antioksidan kapasitesi $DPPH^{\bullet}$ serbest radikalinin giderilmesi tekniği ile belirlemişlerdir. İlaveten ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid içerikleri Folin-Ciocalteu ve kolorimetrik alüminyum klorür yöntemleri ile tespit edilmiştir. $DPPH^{\bullet}$ radikali giderme aktivitesi ekstrenin IC_{50} değeri 389.9 μg/mL olarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktının toplam fenolik ve flavonoid içeriği, her biri ayrı ayrı kurutulmuş 100 g bitki materyalinde 2.87 g gallik asite eşdeğer ve 0.28 g quercetine eşdeğer olarak sonuçları bulunmuştur (Hamedeyazdan *et al.* 2017). Bouzghaia ve ekibi (2020) *C. resupinata* subsp. *dufourii* bitkisinin toprak üstü kısımlarını etil asetat ve *n*-bütanol çözücüleri ile ektrakte etmişlerdir. Ekstrelerin antioksidan ve antibakteriyal aktivitelerini belirlemişlerdir. Etilasetat ekstrelerinden toplam dokuz tane bileşik izole etmişlerdir. Fakat bileşiklerin aktiviteleri çalışılmamıştır. Etilasetat ekstresinin *in vitro* antioksidan aktivitesi DPPH radikal giderme yöntemi kullanılarak (IC_{50}=36.263 ± 0.005 μg/mL) belirlendi ve yüksek

bir antioksidan potansiyele sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. İlaveten her iki ekstreninde mikro organizmalara karşı potansiyel bir antibakteriyal özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Bouzghaia *et al.* 2020). Kubacey ve ark 2012 yılındaki makalelelerinde, *C. alexanderina* bitkisinin yapraklarının % 80 MeOH ekstraktının biyolojik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Metanol ekstresinin A-495 akciğer kanseri hücre hattına karşı yüksek antikanser aktivitesinin olduğunu ilk defa rapor etmişlerdir. Dört farklı yöntemle metanol özütünün önemli analjezik aktivite gösterdiği belirlendi. Ayrıca metanol özütü önemli anti-enflamatuar aktivitenin yanı sıra önemli hipoglisemik ve antidiyabetik aktivite gösterdiği görüldü. Ekstraktın antimikrobiyal etkisi değerlendirildi ve göğüs enfeksiyonu için *Pseudomonas aeruginosa* patojenine karşı aktivitesinin olabileceği bilimsel olarak belirlendi (Kubacey *et al.* 2012). Özsoy ve ark 2015 yılındaki çalışmalarında Türkiye'ye endemik olan *C. antiochia* var. *praealta* bitkisinin toprak üstü kısımlarını önce petrol eteri sonra soxlet aparatını kullanarak sırasıyla kloroform ve metanol çözücülerinden ekstreler elde etmişlerdir. Özsoy ve ekibi elde ettikleri ekstrelerin, antioksidan, antienflamatuvar, asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Sonuçlar, ekstraktın DPPH ve ABTS katyon radikallerini inhibe ettiğini ve FRAP analizinde Fe^{3+} dan Fe^{2+} yı indirgediğini göstermektedir. Ekstraktların AChE ve hem siklooksijenaz COX-1 hem de COX-2'yi inhibe ederek antienflamatuar etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ekstraktlar aynı zamanda gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin yanı sıra maya bakterilerinin büyümesini inhibe etmiştir ve bu yüzden antibakteriyal etkisi sunulmuştur. Bu sonuçlara göre, bu bitki türü halk arasında antimikrobiyal, antienflamatuar ve yara iyileştirici ajan olarak kullanılabilirliğine bir referans olmaktadır (Ozsoy *et al.* 2015).

Acet 2020 yılındaki çalışmasında *C. triumfetti* bitkisinin toprak üstü kısmını kullanarak bitkinin fenolik bileşen içeriğini ve ekstrenin ya da ekstrelerin antioksidan (ABTS, DPPH), antimikrobiyal (disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri) ve enzim aktivitesi (α-glukosidaz ve α-amilaz) gibi enzimleri inhibisyonunu yaparak diyabetin engellenmesi gibi özelliklerini ortaya çıkarmayı düşünmüştür. Bitkinin sap kısmından elde edilen etilasetet ekstresinin toplam antioksidan etkisinin çok yüksek olduğu ve bu etkinin fenolik flavonoid miktarının fazla olmasından kaynaklandığı saptanmıştır.

Ekstraktların fenolik içerikleri HPLC cihazı kullanılarak belirlendi. Bitkinin sap kısmı kullanılarak elde edilen etil asetat ekstraktlarının biyolojik aktivitesinin, diğer ekstraktlardan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca antimikrobiyal ve enzim inhibisyon aktivitesinin çok yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır. HPLC analizi sonucunda bitkinin ana bileşeni olarak klorojenik asidi belirlemişlerdir (Acet 2020). Kalkhorani ve arkadaşları (2019) tarafından, *C. bruguierana* subsp. *belangeriana* bitkisinin toprak üstü kısımları kullanılarak % 80'lik etanol ekstresi elde edildi. Bu ekstreler su ile çözülerek sırasıyla kloroform, etilasetat ve metanol ekstraksiyonları elde edildi. Tüm ekstraktların Anti-*helicobacter pylori* aktivitesi MIC agar difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Biyolojik aktivite yönlendirme sonucunda üç tane bilinen flavon izolasyonu, aktivitesi yüksek olan kloroform ekstresinden elde edildi (Kalkhorani *et al.* 2020).

Centaurea türleri üzerinde yapılmış olan literatür çalışmaları kapsamlı bir şekilde analiz edildiğinde bu türün çok önemli fitokimyasal özellikler ve biyolojik etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca bu iki endemik *Centaurea paphlagonica* ve *Centaurea cankisiense* endemik iki bitki türü üzerine izolasyon ve özellikle antiproliferatif aktivite çalışmalarının mevcut olmadığı görülmüştür. Bu çalışma ile bu türlere ait antiproliferatif, antioksidan, insektisit ve enzim aktivite potansiyalleri ortaya konulmuş ve antiproliferatif aktiviteden sorumlu moleküller belirlenerek litartüre ve bundan sonraki çalışmalara ışık tutmasından dolayı tez çalışması önemli bir nitelik taşımaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmanın konusu olan bitki materyallerinin toplanıp, hazırlanması, ekstraksiyonu, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma ve yapı tayini Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Laboratuarı'nda yapıldı. Antioksidan aktivite testleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, antikanserojen aktivite testleri ise Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi.

3.1 Bitkisel Materyal

Tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyaller Çankırı ili sınırlarındaki lokasyonlardan ve koordinatlardan toplandı. *Centaurea paphlagonica* bitki türü 13-20 Temmuz 2015 tarihleri arasında Çankırı ili sınırları içindeki Kalfat (Orta ilçesi) Atkaracalar yolu 5-8 km arası, yol kenarı yamaçları, kaya araları, çayır alanlarında 1496 m yükseklikte, 40°44'382"N-33°06'099"E koordinatlarından toplanmıştır. *Centaurea cankiriense* bitki türü 13-20 Temmuz 2015 tarihleri arasında Çankırı ili sınırları içindeki Kalfat (Orta ilçesi)–Atkaracalar yolu 5-7 km arası, çayır alanları, tarla içlerinde 1499 m yükseklikte, 40°45'098"N-33°06'099"E koordinatlarından toplanmıştır. Bitki türlerinin teşhisi Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Uzman Tuğrul KÖRÜKLÜ tarafından yapılmıştır. *Centaurea cankiriense* bitkisi Ankara Üniversitesi herbaryumuna 60502 herbaryum numarası, *Centaurea paphlagonica* bitkisi Ankara Üniversitesi herbaryumuna 60501 herbaryum numarası ile kayıtlıdır. Bitki matareyalleri farklı kısımlara ayrılarak (çiçek, gövde-yaprak ve kök) doğrudan güneş ışığından uzak, rutubetsiz ve nem içermeyen serin yerlerde kurutuldu. Kurutulan bitkilerin farklı kısımları laboratuvar parçalayıcısı kullanılarak toz haline getirildi ve cam kavanozlarda kullanılma zamanına kadar saklandı.

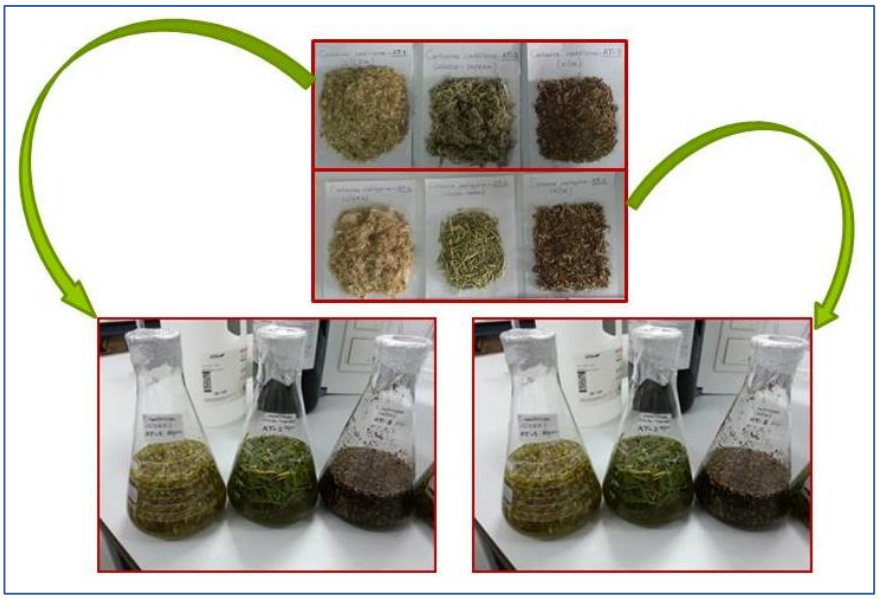
3.2 Özütleme (Ekstraksiyon)

3.2.1 Bitki ekstraktlarının elde edilmesi

Bitki materyallerinden çalışma özütlerinin (ekstraktların) eldesi için katı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Ekstraksiyon için bitki örneği öğütülerek toz haline getirildi. Öğütülmüş olan örnek katısının yüzey alanı artacağı için çözücünün daha fazla nüfuz edeceği bir alan söz konusu olacak ve ekstraksiyon verimini doğrudan artıracaktır. Öğütülen her bir bitki kısmı ayrı ayrı darası alınan cam kaplar içerisine tartılıp konuldu ve üzerine metanol/kloroform (1:1, 10 L) çözücüsü ile maserasyona bırakıldı. Ekstraksiyon sırasında ortam sıcaklığının 25-30 °C sıcaklığı geçmeyecek şekilde ektraksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sırasındaki sıcaklığın yüksek olması çözünen maddenin çözücüye daha fazla geçişini sağlayacaktır. Fakat uygulanan yüksek sıcaklık özellikle sıcaklığa hassas olan (antioksidan, antikanser vb. özellikli) bileşiklerin yapısında bozunarak etkilerinin ya azalmasına yada ters etkilere sahip olmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle bu bileşiklerin oda sıcaklığında ektraksiyon çok önemlidir.

Bitki içerisindeki pekçok bileşiğin yapısında bulunan sübstitüentlere göre farklı polaritesi bulunmaktadır. Apolar özellikli maddelerin çözünürlüğü polar çözücülerde çok azdır. Tam zıt olarak polar özellikli bileşiklerin apolar çözücülerde çözünmesi çok zordur. Her iki bileşik grubuna sahip maddelerin elde edilebilmesi için metanol/kloroform (1:1) çözücüsü ile çalışma materyali ekstrakte edildi.

Ön deneme antioksidan ve antikanser çalışmaları için 20 gram bitki materyalleri alındı ve 100 mL metanol/kloroform (1:1) çözücüsü ile ekstraksiyona bırakıldı ve üç defa tekrar edildi. Elde edilen ekstraktlar birleştirildi ve biyolojik aktivite çalışmaları için buzdolabında muhafaza edildi.



Şekil 3.1 Biyolojik aktivite için parçalanmış bitkilerin ekstraksiyon işlemi

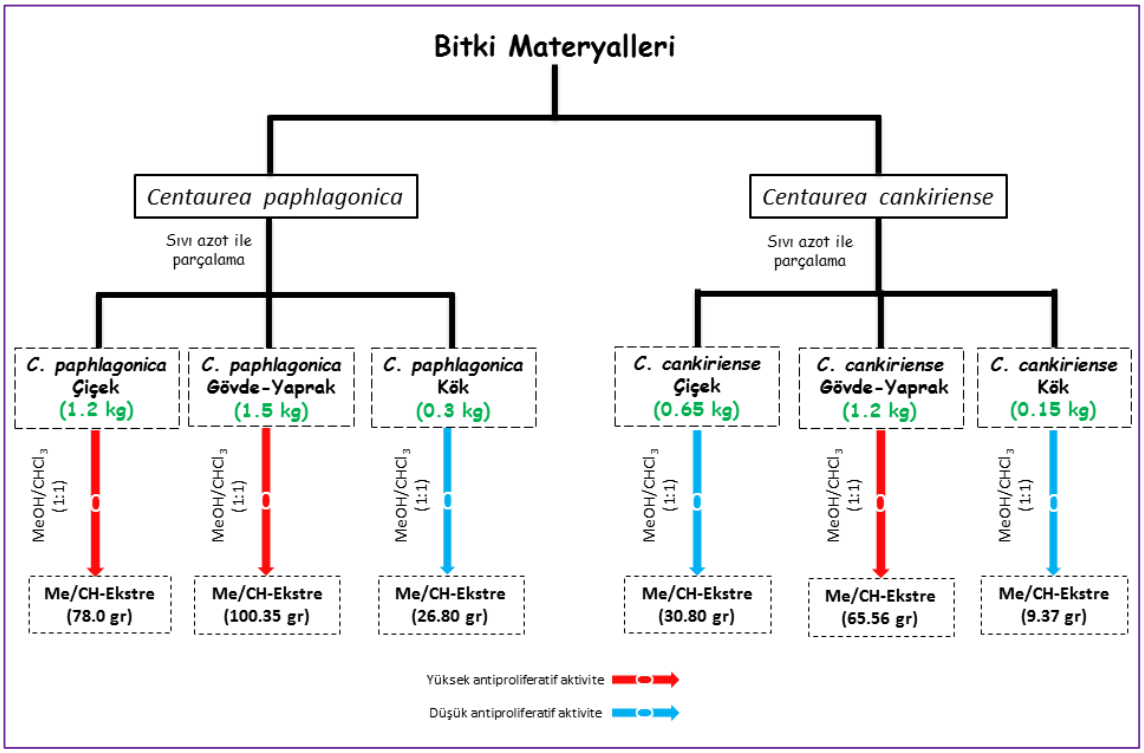
Daha büyük miktarda ekstraksiyon işlemi işin daha önceden kısımlarına ayrılan bitki materyalleri kurutuldu ve sıvı azot yardımı ile temiz bir tenekede öğütüldü. Sıvı azottan sonra ya da yetersiz kaldığı yerde büyük boy buz kırma makinası ile parçalama işlemi yapıldı. Bitki materyalinin üzerine hücre zarının parçalanıp fenolik maddelerin organik çözücüye geçmesi için kloroform (1/1 oranında) karışımı yapılan metanol çözücüsü (metanol/kloroform) eklenerek ve oda sıcaklığında belirli zaman periyotlarında bekletildi (Abay *et al.* 2012).

Çizelge 3.1 Çalışılan bitkilere ait kısa kodlar

Ekstre kodu	**Bitki**	**Bitkinin kısmı**
CCÇ	*Centaurea cankiriense*	Çiçek
CCGY	*Centaurea cankiriense*	Gövde-Yaprak
CCK	*Centaurea cankiriense*	Kök
CPÇ	*Centaurea paphlagonica*	Çiçek
CPGY	*Centaurea paphlagonica*	Gövde-Yaprak
CPK	*Centaurea paphlagonica*	Kök

Öğütülen kısımlar ayrı ayrı 10 L'lik kavanozlara konuldu ve üzerine alabildiği kadar önceden hazırlanan metanol/kloroform çözücüsü konuldu. Sıvı ekstreler her dört günlük

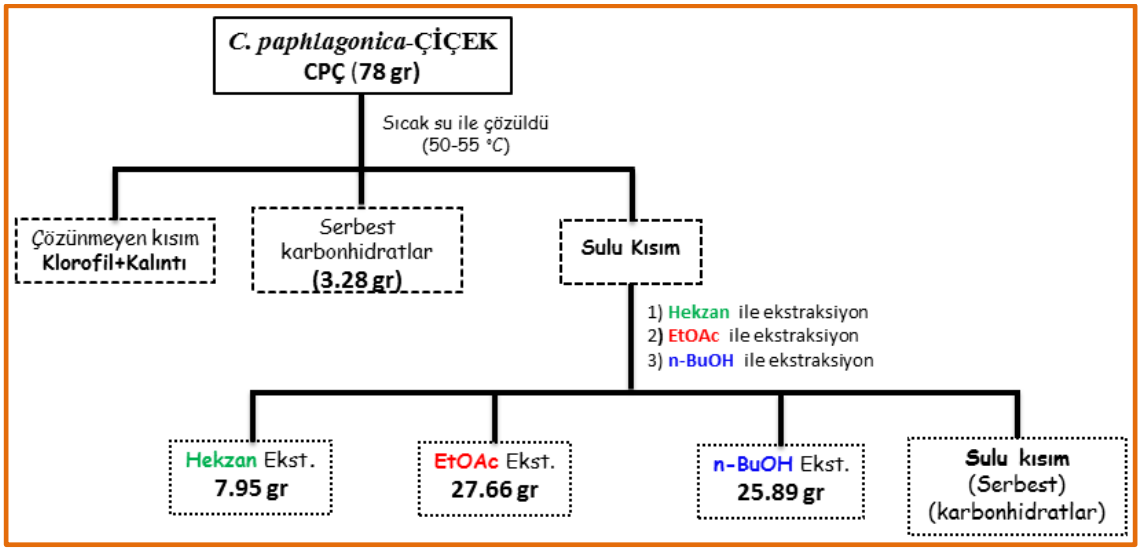
süre sonunda adi süzgeç kağıdında süzme işlemi yapıldı. İlk ekstraksiyon sonucu süzülen bitki posası tekrar aynı çözücü sisteminde dört-beş defa daha ekstrakte edildi. Elde edilen bütün ekstraktlar kendi aralarında birleştirildi ve çözücüsü çok yüksek olmayan sıcaklıkta (20-35ºC) uzaklaştırılarak +4 °C'de saklandı. Şekil 3.2'de bitki materyallerinden elde edilen ekstreler ve elde etme yöntemleri detaylı verilmiştir.



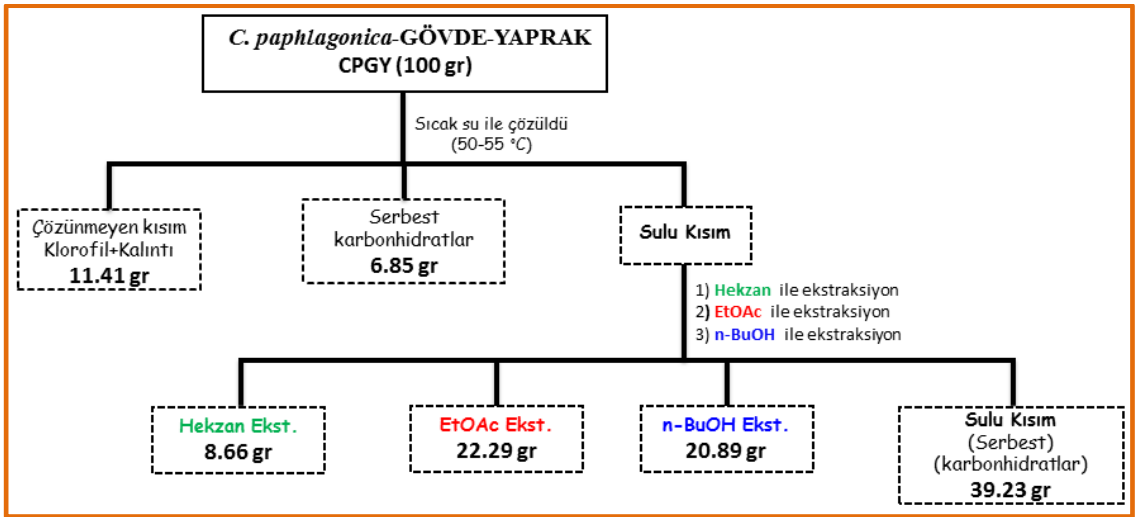
Şekil 3.2 Bitki materyallerinden ham ekstrelerin elde edilme şeması

Tez çalışması, antiproliferatif aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmasını metodolojik olarak ilke edinip bu yöntem ile ilerlediğinden; HeLa hücresine karşı en etkili ve en fazla bulunan ekstrelerin durumu göz önünde bulundurularak izolasyon işlemleri yürütüldü. Bu yüzden xCELLigence antiproliferatif aktivite sonucunda **CCGY** (*C. cankiriense*-Gövde:Yaprak), **CPÇ** (*C. paphlagonica*-Çiçek) ve **CPGY** (*C. paphlagonica*-Gövde:Yaprak) ekstrelerinin izolasyonu gerçekleştirildi. Ham ekstrelerin NMR ve İTK analizi sonucunda çok fazla klorofil ve şeker maddeleri ihtiva ettikleri belirlendi. Ham ekstreler kendi içinde su ile çözülürse su içerisine istenmeyen maddelerin geçeceği ve süzme işlemi sırasında klorofilin süzgeç kağıdında kalabileceği küçük bir miktar ile ön deneme yapılarak teyit edildi. Bu nedenle büyük miktarda ham

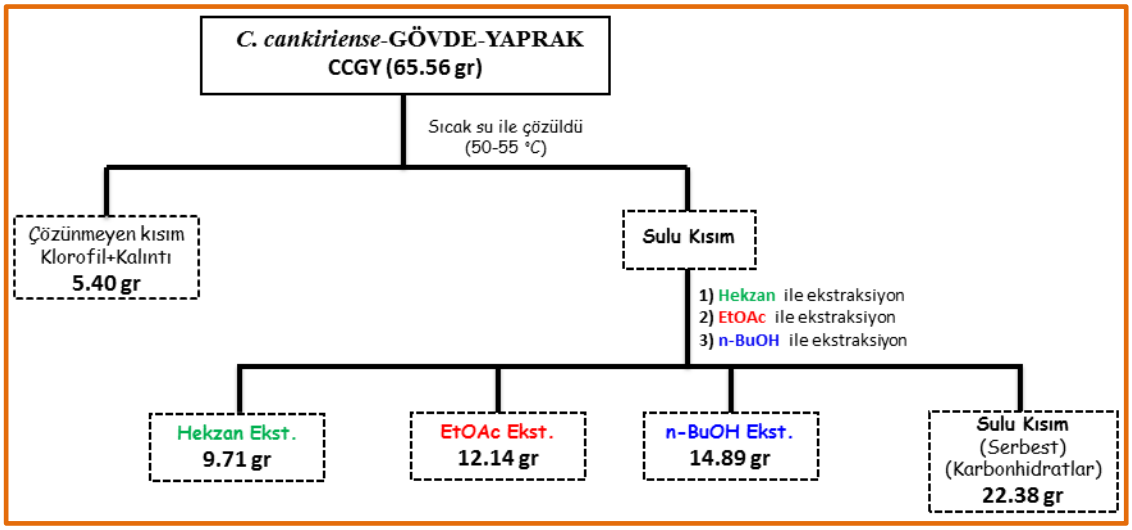
ekstre için sıvı-sıvı ekstraksiyonunun yapılmasına karar verildi. Bitki ekstrelerine ait sıvı-sıvı ekstraksiyon ile fraksiyonlandırma yöntemi CPÇ için Şekil 2, CPGY için Şekil 3 ve CCGY için Şekil 3.3'te detaylı şekilde verilmiştir.



Şekil 3.3 CPÇ ekstrelerinin elde edilme şeması



Şekil 3.4 CPGY ekstrelerinin elde edilme şeması



Şekil 3.5 CCGY ekstrelerinin elde edilme şeması

Elde edilen herbir ekstraktın ve fraksiyonun içeriği, NMR ve İTK kontrolü sağlanarak karşılaştırması yapılmıştır.

3.3 İzolasyon Çalışması

Antiproliferatif aktivite yönlendirmeli izolasyon çalışmasına göre HeLa hücresine etkili ekstreler **CCGY** (*C. cankiriense*-Gövde:Yaprak), **CPÇ** (*C. paphlagonica*-Çiçek) ve **CPGY** (*C. paphlagonica*-Gövde:Yaprak) olarak belirlendi ve buradan elde edilen ekstre yada ekstrelerin izolasyonu gerçekleştirildi.

3.3.1 *C. paphlagonica* çiçek (CPÇ) ekstresi üzerine izolasyon çalışması

Kromatografik ayrım için, CPÇ bitkisinin 26 gram EtOAc ekstresi 5-6 mL metanol ile çözüldü. Diğer yandan normal faz dolgu maddesi olarak kullanılan silikajel 60 (0.063-0.20 mm, 70-230 mesh ASTM) bir gece boyunca etüvde 100 °C sıcaklıkta içerisindeki su ve bu sıcaklıkta uçucu hale gelebilicek maddelerin uzaklaştırılması için şartlandırıldı. Daha sonra metanol ile çözülen ekstre 50 g silikajele emdirildi ve çözücü tamamen kuru olana kadar karıştırıldı. Diğer taraftan 10 cm çapında 75 cm uzunluğunda su ile soğutmalı vakum sistemi olan cam kolona 500 g silikajel 60 hekzan ile bulamaç haline

getirilerek vakum kolonuna yüklemesi yapıldı. Şartlanmış vakum kolonuna silikajel ile elue edilip kurutulan ekstre kuru şekilde yüklendi. Kolondan sırasıyla %100 hekzan (1. Fr), (1:1) hekzan:kloroform (2-4. Fr), (1:4) hekzan:kloroform (5. Fr), %100 kloroform (6-15. Fr), (3:7) aseton:kloroform (16-17. Fr), (1:1) aseton:kloroform (18-23. Fr), %100 Aseton (24-25. Fr), %100 metanol (26. Fr). Vakum kromatografisi sonucunda 30 fraksiyon toplandı. Herbir fraksiyonun İTK profilleri incelendi ve daha hassas saflaştırma işlemlerine devam edildi. Toplam yedi fraksiyon elde edildi (VK-1, VK-2, VK-3, VK-4, VK-5, VK-6 ve VK-7).

VK-1 ve VK-2 kodlu fraksiyonların yağ asidi ve klorofil içerdikleri NMR analizleri ve İTK sonuçları ile belirlendi, bu nedenle iki fraksiyon izolasyon dışı bırakıldı.

VK-3 fraksiyonu (3.52 g) silikajel kolona tatbik edildi ve CH_2Cl_2:EtOAc (100:0) sistemi ile başlayan çözücü sistemi artan polarite ile birlikte CH_2Cl_2:EtOAc (0:100) çözücü sistemi ile kolon fraksiyonlandırması sonlandırıldı. Alt fraksiyonlardan; Fr 15 sephadex LH 20 kolona tatbik edilmiştir ve EtOAc çözücüsü ile fraksiyonlandırma yapılarak **CPÇ-1** bileşiği saf olarak elde edilmiştir. Fr 24-29 celite 545 dolgu maddesinin olduğu kolona sıvı olarak yükleme işlemi yapılmıştır ve DCM:Hek:MeOH (8:2:2) izokratik sistem ile kolon fraksiyonlandırması yapıldı. Bu işlem sonucunda **CPÇ-2** bileşiği saflaştırıldı. Alt fraksiyonlardan sonuncusu Fr 18-22 ekstresi EtOAc:MeOH (100:0-0:100) çözücü sistemleri kullanılarak silikajel kolon tatbik edildi ve fraksiyonlandırıldı. Bunun sonucunda **CPÇ-3** bileşiği saflaştırıldı.

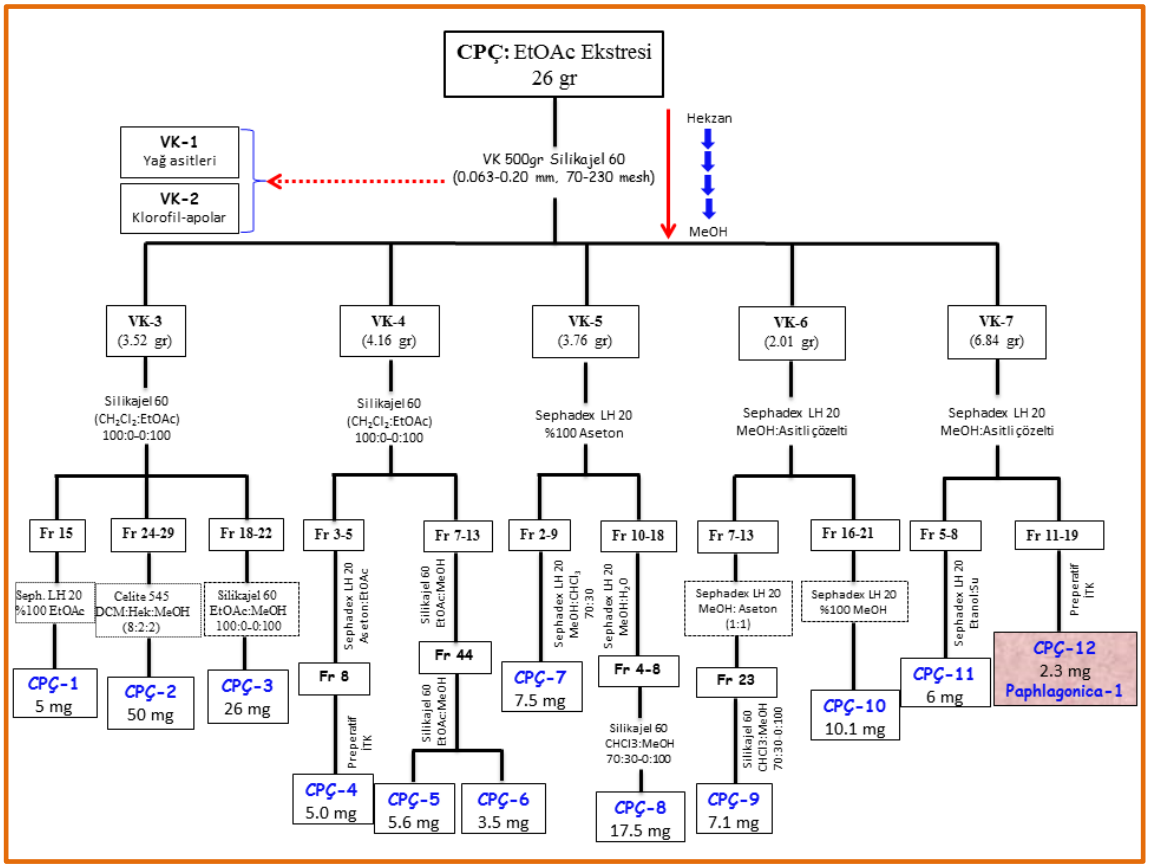
VK-4 fraksiyonu (4.16 g) silikajel 60 maddesi üzerinden CH_2Cl_2:EtOAc (100:0-0:100) çözücü sisteminin karışımları kullanılarak fraksiyonlar toplandı. Bu fraksiyonlardan; Fr 3-5 tekrar ayrımı gerçekleştirilmesine karar verildi. Sephadex LH 20 ile buradan toplanan Fr 8 toplandı ve çok az bir kirlilik olduğu belirlendi. Aynı fraksiyon preparatif cam plaka üzerinden yüklemesi yapılarak kirliliğin olmadığı spot kazınarak alındı. Bu fraksiyon **CPÇ-4** olarak kodlandı ve saflaştırılması yapılmış oldu. Diğer bir alt fraksiyon Fr 7-13'un EtOAc:MeOH izokritik çözücü sistemi ile silikajel kolonda ayrımı için tatbik edildi. Buradan toplanan Fr 44 kodlu fraksiyondaki safsızlıkların giderilmesi

için yine aynı çözücü sistemi ile silikajel kolon izolasyonu gerçekleştirilerek **CPÇ-5** ve **CPÇ-6** kodu ile iki tane bileşiğin saf olarak ayrılmış olduğu İTK kontrolü ile belirlendi.

VK-5 fraksiyonu (3.76 g) sephadex LH 20 kolona aseton ile çözülerek %100 aseton ile kolon devam edildi ve alt fraksiyonlar toplandı. Fr 2-9 alt fraksiyonu yine sephadex LH 20 kolonuna MeOH:$CHCl_3$ (70:30) izokratik sistemi ile yükleme ve fraksiyonlandırma yapıldı. Bu fraksiyondan **CPÇ-7** bileşiği saflaştırıldı. Fr 10-18 alt fraksiyonu sephadex LH 20 kolonu üzerinden MeOH:H_2O sistemi fraksiyonlar toplandı ve yine bir alt fraksiyon toplandı. Alt fraksiyon Fr 4-8'in kirlilik içerdiği görüldü ve silikajel 60 üzerinden MeOH:$CHCl_3$ (30:70-0:100) çözücüsü ile kolon sonlandırıldı ve sonuçta **CPÇ-8** bileşiği saflaştırıldı.

2.01 g VK-6 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonuna yüklendi ve hareketli faz olarak MeOH:Asitli çözelti sistemi ile kolon işlemi başlatıldı ve alt fraksiyonlar toplandı. Fr 7-13 alt fraksiyonu MeOH:Aseton (1:1) ile kolon kromatografisi başlatıldı. Buradan Fr 23 alt fraksiyonu elde edildi ve safsızlığı gidermek için silikajel kolonunda MeOH:$CHCl_3$ (30:70-100:0) artan polaritede çözücü sistemleri kullanılarak fraksiyonlandırma yapıldı ve **CPÇ-9** bileşiği izole edildi. Alt fraksiyonlardan bir diğeri Fr 16-21, sephadex LH 20 kolonunda % 100 metanol ile saflaştırılması yapıldı ve **CPÇ-10** bileşiği saf elde edildi.

6.84 g VK-7 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonuna MeOH:Asitli çözelti sistemi ile yüklendi ve fraksiyonlandırma işlemi yapıldı. Alt fraksiyon Fr 5-8, sephadex LH 20 üzerinden EtOH:su (1:1) karışımında şartlanmış kolona tatbik edilerek aynı sistem üzerinden ayrımı gerçekleştirildi ve **CPÇ-11** bileşiği saflaştırıldı. Diğer bir alt fraksiyon Fr 11-19 preperatif cam tabakaya yüklendi ve MeOH:su:AA çözücüsü ile yürütülme işlemi yapılarak tek spot elde edildi ve **CPÇ-12** bileşiği saf olarak izole edildi.



Şekil 3.6 CPÇ (EtOAc ekstresi) izolasyon şeması

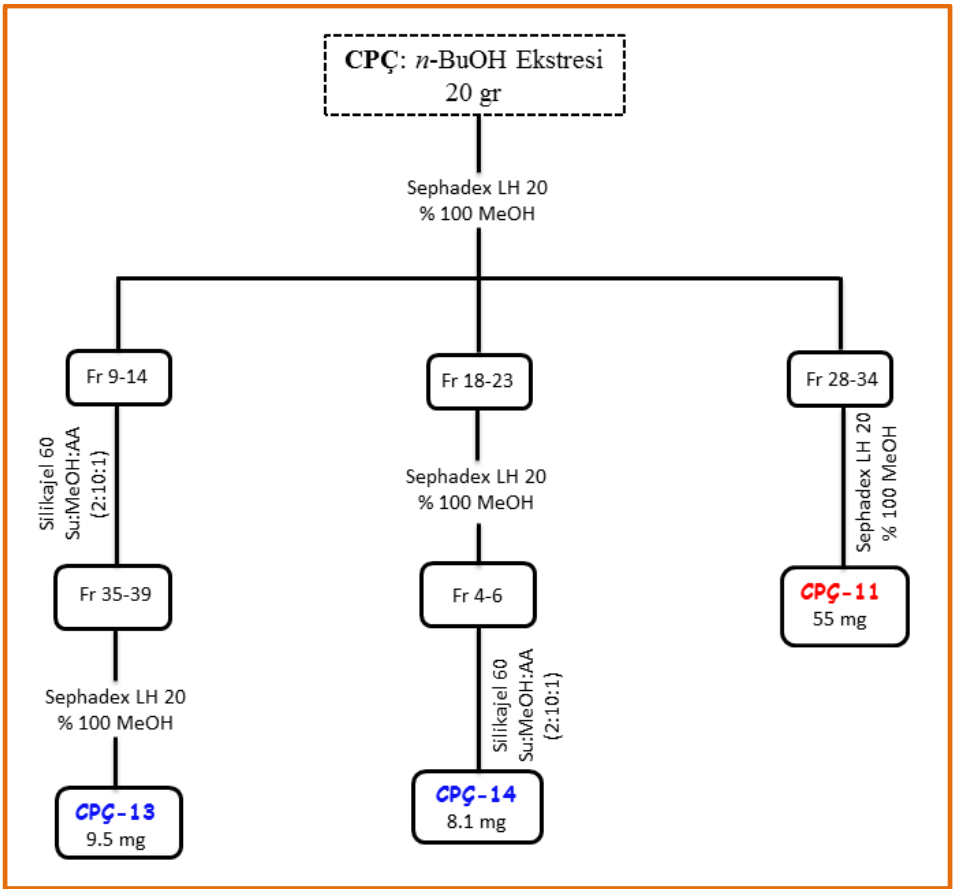
CPÇ bitkisinin *n*-BuOH ekstresi (20 g) 5-6 mL metanol ile çözüldü. Çözülen kısım yaklaşık 70 gramlık metanol ile elue edilen sephadex LH 20 dolgu maddesine yüklendi. Hareketli faz olarak sadece metanol çözücüsü kullanıldı. Fraksiyonlar 4 ml hacimde olacak şekilde toplama işlemi yapıldı ve fraksiyonların İTK kontrolleri yapılarak birleştirildi. Temel olarak üç farklı fraksiyonda birleştirme işlemleri yapıldı.

Fr 9-14 silikajel 60 dolgu maddesi üzerinden fraksiyonlandırıldı ve ana spot ve diğer spotlar üzerinden izolasyona sephadex LH 20 ile devam edildi. Sonuç olarak sarı renkli **CPÇ-13** (9.5 mg) bileşiği saflaştırıldı.

Fr 18-23 metanol ile çözündü ve sephadex LH-20 kolona uygulandı. Metanol çözücüsü ile kolon fraksiyonlandırıldı. Fr 4-6 yeter miktarda silikajel kolona (önceden silikajel ile

elue edilmiş) kuru şekilde yükleme yapıldı ve MeOH:su:AA (2:10:1) izokratik sistem kullanılarak kolondan **CPÇ-14** (8.1 mg) bileşiği saf olarak elde edildi.

Fr 28-34 metanol ile çözündü ve sephadex LH-20 kolona tatbik edildi ve mobil faz metanol üzerinden fraksiyonlandırma yapıldı. Toplam 40 fraksiyon toplandı. Serik sülfat belirteci kullanılarak yapılan İTK kontrolü sonunda tek spotlu koyu mor renkli **CPÇ-11** (55 mg) bileşiğinin saf olarak elde edildiği teyit edildi.



Şekil 3.7 CPÇ (*n*-BuOH ekstresi) izolasyon şeması

3.3.2 *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) ekstresi üzerine izolasyon çalışması

Bitkinin çalışılan kısmına (CPGY) ait 20 gr EtOAc ekstresi 5-6 mL metanol ile çözüldü. Sabit faz olarak 24 saat önceden metanol ile şişmeye bırakılan sephadex LH 20 kolon dolgu maddesi 80 cm uzunluğa ve 3 cm çapındaki açık kolon sistemine yüklendi.

Metanol ile çözülen ekstre kolona tatbik edildi ve kolon aynı çözüzcü ile üç fraksiyon toplandı. Fr-1 ve Fr-3'ün İTK ve NMR incelemesi sonucunda kayda değer madde olmadıkları bu yüzden izolasyonun Fr-2'den devam edilmesine karar verildi. 10 gram Fr-2 fraksiyonu DMSO-su karışımı ile çözülüp önceden programı oluşturulmuş olan preparatif HPLC cihazına ters faz (C-18) kolon kullanılarak enjeksiyonu yapıldı. Hareketli faz olarak asetonitril:su:FA (25:75:1) izokritik çözelti sistemi ile kolon fraksiyonlandırması yapıldı. Toplam 17 fraksiyon toplandı. Pre-1, Pre-2, Pre-3, Pre-4, Pre-6, Pre-7, Pre-10, Pre-16 ve Pre-17 fraksiyonları tekrar saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu.

Pre-1 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonuna yüklendi ve % 100 metanol ile fraksiyonlandırma yapıldı. Bu fraksiyondan **CPGY-1** (**CCGY-2** ile aynı) bileşiği saf olarak izole edildi.

Pre-2 fraksiyonu metanol ile şartlanmış sephadex LH 20 kolonuna yüklendi ve aynı çözücü ile kolon üzerinden fraksiyonlandırma işlemi yapıldı. Fraksiyonlama işleminden Fr 4-8 alt fraksiyonu elde edildi ve aynı fraksiyon silikajel 60 kolonu üzerinden EtOAc:MeOH izokratik sistemi kullanılarak **CPGY-2** bileşiği saflaştırılmış olarak elde edildi.

Pre-3 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonuna yüklendi. Çözücü olarak metanol kullanıldı ve fraksiyonlar toplandı. Alt fraksiyonlardan Fr 2-5'nin tekrar aynı kolon sistemi ve çözücü kullanılarak **CPGY-3 (CCGY-3)** bileşiği saflaştırıldı.

Pre-4 fraksiyonu metanol ile çözülerek aynı sistem ile hazırlanan sephadex LH 20 kolonuna yüklendi. Buradan iki tane farklı alt fraksiyon elde edildi. Bunlardan Fr 7-9 fraksiyonu silikajel 60 kolonuna yüklendi. Hareketli faz olarak EtOAc:MeOH:hekzan (4:3:1.5) izokratik sistem kullanıldı ve **CPGY-4** bileşiği saf olarak toplandı. Bunun yanında alt fraksiyonlardan Fr 1-6 kolonda temizlendi ve kristallendirilerek **CPGY-3 (CCGY-3)** aynı bileşik izolasyonu gerçekleştirildi.

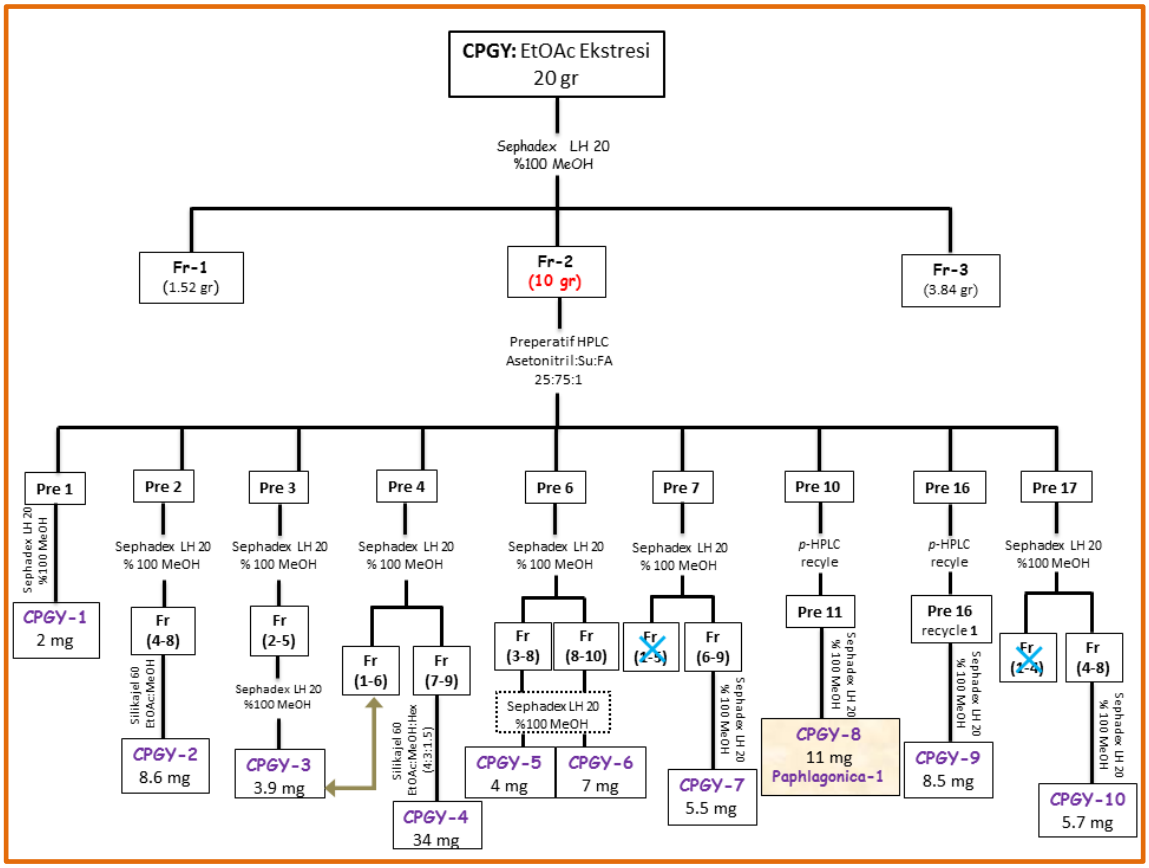
Pre-6 fraksiyonu metanol ile çözüldü. Metanol ile hazırlanan sephadex LH 20 kolonuna madde yüklendi. Aynı çözücü ile sistem devam ettirilerek fraksiyonlandırma yapıldı. Buradan elde edilen Fr 3-8 kodlu alt fraksiyonu için saflaştırılma işlemi gerçekleştirildi. Buradan da bu fraksiyon sephadex LH 20 kolonunda tekrar saflaştırması gerçekleşti ve **CPGY-5** kodlu bileşiği saflaştırılmış oldu. Diğer alt fraksiyon Fr 8-10 yine sephadex LH 20 kolonunda **CPGY-6** kodu ile bileşik saf olarak izole edildi.

Pre-7 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonunda metanol ile yükleme yapıldı. Aynı zamanda fraksiyonların toplanmasıda bu çözücü ile yapıldı. Buradan elde edilen alt fraksiyon Fr 6-9 yine aynı kolon üzerinden az bir kirliliğin belirlenmesi ile tekrar izolasyonu yapıldı. Sonuçta **CPGY-7** bileşiği saf olarak elde edildi.

Preperatif HPLC çalışmasında kantitatif olarak fazla olan pikin toplanması ile Pre-10 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyon analiz sırasında kolondan o dakikada gelen maddenin tekrar kolon içerisinde döngüsü sağlanarak çözücü kullanmadan mevcut çözücü ile kolondan defalarca dolaştırılıp diğer maddelerin ayrılması özelliğine sahip (recycle) sistem ile alt fraksiyon Pre 11 elde edildi. Bu fraksiyon sephadex LH 20 kolonunda ufak tefek safsızlıkları giderildi ve **CPGY-8** bileşiği saf elde edildi.

Pre 16 fraksiyonu önceki fraksiyon gibi *p*-HPLC cihazı ile asetonitril:su:FA (30:70:1) çözücü sistemi kullanılarak analizi gerçekleştirildi. Saf bileşik üç defa recyle sistemine tabii tutularak Pre 16 recycle 1 kodu ile toplandı. Aynı kodlu numune sephadex LH 20 kolonunda metanol ile temizlendi ve **CPGY-9** (**CCGY-7** ile aynı) saf izole edildi.

Pre 17 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonunda metanol ile fraksiyonlandırıldı. Alt fraksiyon Fr 4-8 tekrar sephadex LH 20 kolonunda aynı çözücü ile temizleme işlemi yapıldı. Sonuç olarak **CPGY-10** kodlu bileşiğin saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.



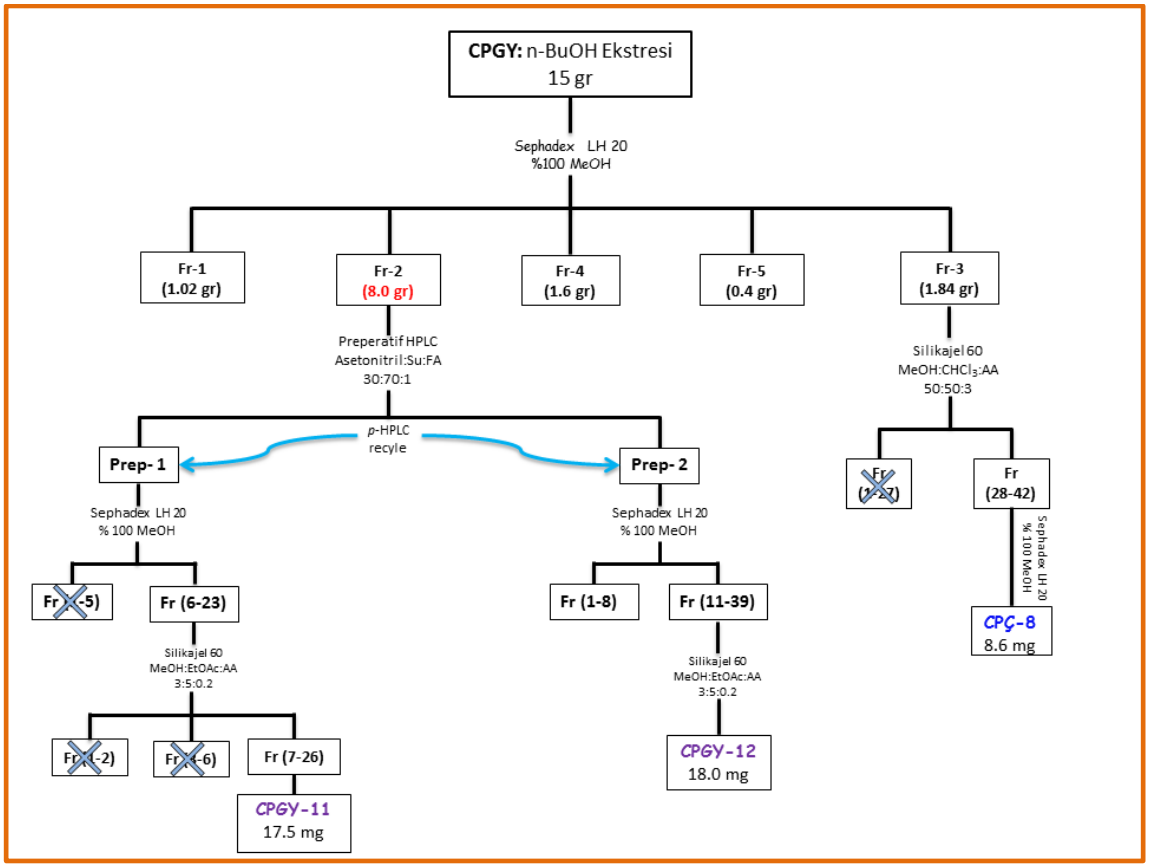
Şekil 3.8 CPGY (EtOAc ekstresi) izolasyon şeması

CPGY bitkisinin n-BuOH ekstresi (15 gr) 7-8 ml metanol ile çözüldü. Çözülen kısım yaklaşık 70 gramlık metanol ile elue edilmiş sephadex LH 20 dolgu maddesine sıvı olarak yüklendi. Hareketli faz metanol çözücüsüydü. Buradan beş fraksiyon elde edildi. Fraksiyonların İTK profilleri incelendiğinde Fr-2 ve Fr-3 farksiyonlarında spotlar görüldü. Diğer fraksiyonlara ait izolasyon işlemleri yapılamayacak kadar spot yoktu.

Fr-2 fraksiyonu preperatif HPLC cihazında asetonitril:su:FA (30:70:1) izokratik sistem ile ayrılması yapıldı. İki pik ayrı ayrı cihaz içinde ayrım sırasında p-HPLC sistemine bağlı recycle sisteminde ayrıştırılması gerçekleştirildi. İki fraksiyon (Prep-1 ve Prep-2) elde edildi. Prep-1 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonunda metanol ile fraksiyonları toplandı. Buradan Fr 6-23 alt fraksiyonu elde edildi. Bu fraksiyonda silikajel 60 kolonunda MeOH:EtOAc:AA (3:5:0.2) sisteminde yine bir fraksiyonlandırma yapıldı. Fr 7-26 alt fraksiyonu elde edildi. Bu fraksiyonun kristallendirilmesi ile **CPGY-11**

bileşiği saf elde edildi. Prep-2 fraksiyonu sephadex LH 20 kolonunda metanol ile fraksiyonlandırıldı. Bunun sonucunda ilk olarak Fr 1-8 alt fraksiyonu elde edildi. Fakat buradan herhangi bir bileşik izolasyonu yapılamadı fakat diğer bir alt fraksiyon Fr 11-39 fraksiyonu silikajel kolonu üzerinden MeOH:EtOAc:AA (3:5:0.2) sistemi ile tekrar saflaştırması yapıldı. Sonuç olarak **CPGY-12** bileşiği saf olarak izole edildi.

Fr-3 fraksiyonu silikajel 60 kolon dolgu maddesi ile doldurulmuş kolona katı olarak yüklenerek MeOH:$CHCl_3$:AA çözücü karışımında iki fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlardan Fr 28-42 kodlu alt fraksiyon tekrar izolasyona tabii tutuldu (sephadex LH 20-%100 MeOH). Saflaştırılan bileşiğin **CPÇ-8** kodu ile daha önce saflaştırılan 1,3-dikafeoilkuinik asit (dicaffeoylquinic acid) olduğu belirlendi.



Şekil 3.9 CPGY (*n*-BuOH ekstresi) izolasyon şeması

3.3.3 *C. cankiriense* gövde-yaprak (CCGY) ekstresi üzerine izolasyon çalışması

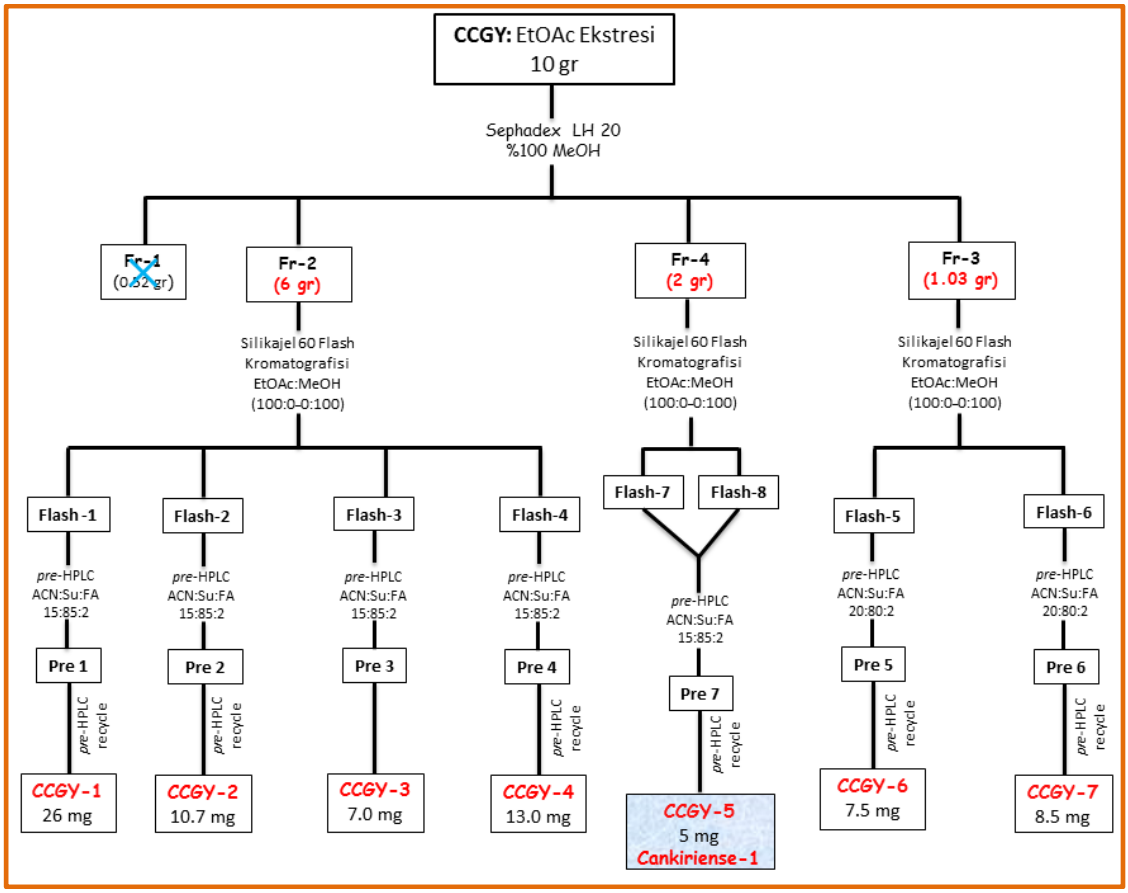
10 g **CCGY** bitkisinin EtOAc ekstresi 5-6 mL metanol ile çözüldü. Diğer taraftan bir gün önceden hareketli faz ile şartlanması yapılan sephadex LH 20 kolonu üzerine çözülen ekstre tatbik edildi. Kolon sunucunda 65 fraksiyon toplandı. Bu fraksiyonlar kendi içinde İTK kontrolü yapılarak birleştirildi. Toplam dört fraksiyon elde edildi. İzolasyonun Fr-2, Fr-3 ve Fr-4 fraksiyonları üzerinden yapılmasına karar verildi. İzolasyon yöntemlerinin detaylandırılmış şekilde sunumu Şekil 3.10'da verilmiştir.

Fr-2 kodlu fraksiyon silikajel 60 kolonu üzerinden EtOAc:MeOH (100:0-0:100) artan polaritede çözücü gradient sistemleri uygulanarak flash kromatografisinde yaklaşık 78 fraksiyon toplandı ve herbir tüpün içeriği İTK ile görüntülendi ve dört fraksiyon tabanında birleştirildi. Flash kromatografisinden alınan fraksiyonlar preperatif HPLC cihazında ters faz kolon kullanılarak preparatif ayrımı gerçekleştirildi. Flash-1 fraksiyonu *p*-HPLC cihazına son hacim 2 mL olacak şekilde DMSO:Su (1:3 oranında) karışımında çözüldü ve 0.45 µ'luk gözenek büyüklüğüne sahip filtrelerde süzülerek enjeksiyonu gerçekleştirildi. Mobil faz olarak asetonitril:su:FA (15:85:2) izokratik çözücü sistemi kullanıldı. Cihazda recycle sistemi kullanılmasına rağmen saflaştırılamadı ve elde edilen Pre 1 alt fraksiyonu tekrar farklı programda asetonitril (% 5) ile birlikte recycle analiz yöntemi ile tekrar enjeksiyonu yapıldı. Saflaştırıldıktan sonra **CCGY-1** (CPÇ-3 ile aynı) bileşiği saf olarak ayrıldı. Flash-2 fraksiyonu *p*-HPLC cihazına aynı çözücü sistemi ve aynı konsantrasyonda yüklemesi yapıldı. Buradan Pre 2 fraksiyonu recycling tekniği ile cihaz içerisinde tekrar safsızlıklardan uzaklaştırıldı ve **CCGY-2** (CPGY-1 ile aynı) bileşiği saf olarak elde edildi. Flash-3 fraksiyonu *p*-HPLC cihazına benzer sistem ve şartlarda enjeksiyonu yapıldı. Elde edilen Pre 3 alt fraksiyonu 3 defa recycling tekniği uygulanarak safsızlıkları giderildi. Çözücüsü uçurulan fraksiyon **CCGY-3** (CPGY-3 ile aynı) kodu ile saflaştırıldı. Flash-3 fraksiyonu diğer fraksiyonlarda yapılan işlem basamakları gibi aynı şekilde izolasyonu yapıldı ve **CCGY-4** bileşiği saf olarak elde edildi.

Fr-3 kodlu fraksiyonuda Fr-2 gibi aynı şekilde fraksiyonlandırıldı. Alt fraksiyonlar Flash-5 ve Flash-6 elde edildi. İki alt fraksiyon ayrı ayrı asetonitril:su:FA (20:80:2)

sistemi ile *p*-HPLC cihazına yüklendi ve bunlarında alt fraksiyonları elde edildi. Bu fraksiyonlardaki safsızlıklar recyclig metodu ile giderilerek Flash-5 fraksiyonundan **CCGY-6** (CPÇ-2 ile aynı) bileşiği ve Flash-6 fraksiyonundan **CCGY-7** (CPGY-9 ile aynı) bileşiği saf olarak izole edildi.

Fr-4 kodlu fraksiyonda bir önceki fraksiyondaki aynı ayırma yöntemi kullanılarak, Flash-7 ve Flash-8 alt fraksiyonları elde edildi. Safsızlıklar giderildikten sonra bu fraksiyonların benzer oldukları İTK ile belirlendi ve birleştirildi. Bu fraksiyonda *p*-HPLC cihazına enjekte edildi ve mobil faz olarak asetonitril:su:FA (15:85:2) izokratik sistem kullanıldı. Elde edilen Pre 7 alt fraksiyonu tekrar recycling metodu ile kromatografik ayrıştırılması gerçekleştirildi. Sonuç olarak **CCGY-5** kodlu bileşik saf olarak izole edildi.

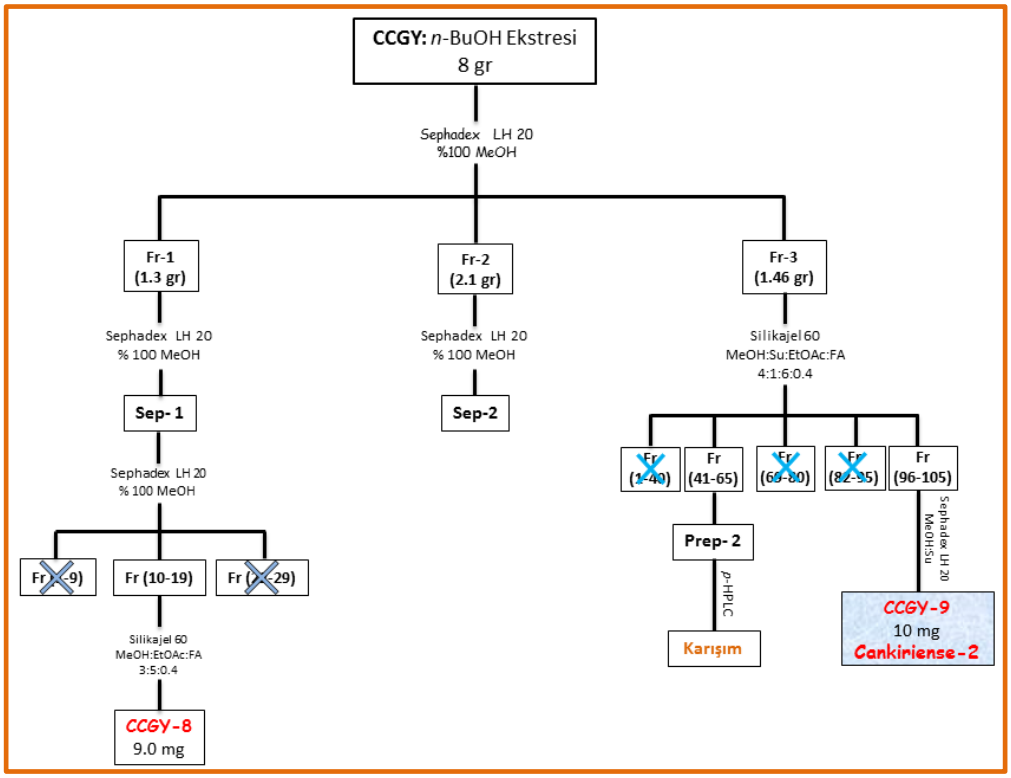


Şekil 3.10 CCGY (EtOAc ekstresi) izolasyon şeması

8 g CCGY bitkisine ait *n*-BuOH ekstresi 4 mL metanol ile çözüldü. Daha önceden metanol ile şartlandırılan sephadex LH 20 kolonuna yüklendi. Çözücü olarak metanol ile işlem başlangıcı yapıldı kolon bitene kadar aynı çözücü kullanıldı. Toplam 18 adet fraksiyon toplandı. Fraksiyonlara ait İTK görüntülemeleri yapılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Sonuçta üç fraksiyona kadar indirildi (Fr-1, Fr-2 ve Fr-3). Bunlar arasında Fr-2 çalışma sırasında kaybedildi. Çalışmaya diğer iki fraksiyon üzerinden devam edildi. Çalışma metodu Şekil 3.11'de detaylı verilmiştir.

Fraksiyon-1 tekrardan sephadex LH 20 (MeOH kullanılarak) kolonunda fraksiyonlandırıldı. Bu fraksiyondan Sep-1 alt fraksiyonu elde edildi. Bu fraksiyonda sephadex LH 20 kolonunda tekrar izolasyonu metanol ile gerçekleştirildi 29 alt fraksiyon toplandı. Alt fraksiyonlardan Fr 10-29 aralığı silikajel 60 kolonunda MeOH:EtOAc:FA (3:5:0.4) çözücüsü ile tekrar kolon kurularak **CCGY-8** bileşiği saf olarak izole edildi.

Fraksiyon-3 silikajel kolonunda MeOH:Su:EtOAc:FA (4:1:6:0.4) mobil fazı ile iki tane alt fraksiyon toplandı (Fr 41-65 ve Fr 96-105). Fr 41-65 fraksiyonu *p*-HPLC ile ayrımı tam gerçekleşmedi ve çalışma bu fraksiyon üzerinden devam ediyor. Alt fraksiyon Fr 96-105 fraksiyonu Sephadex LH 20 kolonunda MeOH:Su karışımı üzerinden fraksiyonlandırıldı ve **CCGY-9** bileşiği saf olarak izole edildi.



Şekil 3.11 CCGY (*n*-BuOH ekstresi) izolasyon şeması

3.4 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* Bitkilerinden Uçucu Yağ Eldesi

C. paphlagonica ve *C. cankiriense* bitkilerinin uçucu yağlarını çıkarmak amacıyla bitki materyallerinin toprak üstü kısımları kullanıldı. Toprak üstü kısımlar çiçek ve gövde-yaprak olarak iki kısıma ayrıldı. Su buharı destilasyon tekniği kullanılarak Şekil 3.12'de görülen Neo-clavenger aparatı yardımı ile yaklaşık olarak 500 gram bitki numunesi ayrı ayrı tartılıp herbirisi için yaklaşık 500 mL destile su ile kaynatıldı. 3 saatlık kaynatma sonucunda sadece *C. paphlagonica* bitkisinin çiçek (CPÇ) kısmından uçucu yağ eldesi gerçekleşti. *C. cankiriense* çiçek ve gövde-yaprak kısımları doğada az bulunduğu için fazla materyal sağlanamadı ve uçucu yağı elde edilemedi. Elde edilen uçucu yağın kimyasal analizi ve bileşenlerin bağıl oranları Agilent marka GC-MS cihazında yapılarak belirlendi.



Şekil 3.12 Uçucu yağ (Neo clavenger) aparatı

3.5 Ekstraktların Kimyasal Bileşen Analizleri

3.4.2 GC-MS analizi

GC-MS analizleri Agilent Technologies 7890A GC system marka ve modele sahip, 5975 Triple Axis Detector kütle spektroskopisi ile yapıldı. GC-MS analizleri için HP-5MS Kolon (60 m x 320 m x 0.25 m), elektron iyonlaştırma enerjisi ve 70 eV'lik enerji kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak dakikada 1 mL/dk akış hızı ile He gazı kullanıldı. Splitless modda injeksiyon hacmi 1 L olarak belirlendi. Analiz edilen bileşiklerin gelme zamanı ve parçalanma fragmentleri cihazda yüklü olan Famedb23, Famdbwax, WILLEY ve NIST05 kütüphanelerinde taranarak yapıları belirlendi. GC-MS fırın programı şu şekildedir: toplam sıcaklık 100 dakikadır. Optimizasyon sonucunda başlangıç sıcaklığı 100°C olarak belirlendi ve bu sıcaklıktan program başlatıldı. Bu sıcaklıkta 10 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra dakikada 5°C artışla sıcaklık 200 °C'ye çıkarıldı ve bu sıcaklıkta 20 dakika tutuldu. Yine dakikada 5°C'lik artışla sıcaklık 270 °C'ye yükseltildi bu sıcaklıkta 36 dakika bekletildi.

3.4.3 Uçuş zamanlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-TOF/MS)

Çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür. Ekstraktların fenolik bileşen analizi Agilent Technology marka 1260 Infinity HPLC Sistemine modeline bağlı 6210 TOF (Time of Flight) LC/MS detektörü bağlı ZORBAX

SB-C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 μm) kolunu kullanılarak belirlenmiştir. Hareketli faz olarak çözücü karışımları: (A) ultra saf su (% 0.1'lik formik asit), (B) asetonitril (HPLC saflıkta) kullanılmıştır. Akış hızı 0.6 mL/dak ve kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 μL olarak ayarlandı. Çözücü programı: 0-1 dakika % 10 B; 1-20 dakika % 50 B; 20-23 dakika % 80 B; 23-30 dakika % 10 B olarak belirlendi. Analiz için HPLC-TOF/MS cihazının iyonlaşma modu negatif olarak seçilmiştir ve 325 °C'de bir azot gazı ve 10.0 L/dak gaz akışı, 40 psi nebülizör, 4000 V kılcal gerilim ve son olarak 175 V parçalama voltajı ile çalıştırılmıştır. Örnekler metanol ile çözülerek çözelti konsantrasyonu 250 ppm olacak şekilde hazırlandı. Stok çözeltiler içerisindeki çözünmeyen partiküller 0.22 μm boyutundaki PTFE filtreler kullanılarak viallere süzüldü.

3.5 Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Belirteçler

Serik Sülfat Belirteci: 2.4 g $Ce(SO_4)_2.4H_2O$ kimyasalı 100 mL'lik balon joje tartılarak konuldu üzerine % 10'luk H_2SO_4 ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Hazırlanan belirteç kromatografi plağına püskürtüldü ve 100 °C'de 5-10 dakika spotlar oluşuncaya kadar bu sıcaklıkta bekletildi.

Amonyak (NH_3) Buharları: İnce tabaka kromatografisi için tabaka üzerine tatbik edilen maddeler uygun çözücü karışımı/karışımları içerisinde yürütülmüştür. Daha sonra kromatografi tankının içerisine NH_3 kimyasalı konuldu ve tabaka bu buhara maruz bırakıldı.

% 10 luk H_2SO_4 belirteci: 100 ml'lik balon joje içerisine % 98.0'lik saflıkta sülfürik asitten 10 mL konuldu ve üzerine 90 ml ultra saf etanol çözücüsü eklenerek çözelti hazırlandı (etanol içerisinde % 10'luk H_2SO_4 çözeltisi). Kromatografi tabakasına püskürtülen çözelti 100 °C ısıtılarak spotların ortaya çıkması sağlandı.

3.6 Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Silika jel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck).

Silika jel GF254 (Merck).

Etanol (Merck), n-bütanol (Merck) ve kloroform, hekzan, etil asetat, metanol, metilen klorür gibi çözücüler teknik çözücüler destile edildikten sonra NMR ve GC-MS yöntemleri ile saflıkları kontrol edilerek kullanıldı.

Tripsin EDTA (%25) (Sigma)

Penicilin streptomycin solüsyonu (Sigma)

DPBS (Dulbekko'nun fosfat tampon tuzu) (Sigma)

Fetal Bovine Serum (Heat inactivated) (Sigma)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High glucose (Sigma)

2,2-Difenil 1-pikril hidrazil ($DPPH^{\cdot}$) ,

Sodyum fosfat (NaH_2PO_4), (Sigma)

Sodyum hidroksit (NaOH), (Sigma)

Demir-II-klorür ($FeCl_2.4H_2O$), (Sigma)

Potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$], (Sigma)

Demir-III-klorür ($FeCl_3$), (Sigma)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3), (Sigma)

Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR), (Sigma)

Sodyum nitrit ($NaNO_2$), (Sigma)

Hidroklorik asit (HCl), (Sigma)

Sülfürik asit (H_2SO_4), (Sigma)

α-Tokoferol (Sigma)

Troloks (Sigma)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), (Merck)

Ferrozin, (Merck)

1,10-Phenanthroline, (Merck)

Triklorasetik asit (TCA), (Merck)

Alüminyum klorit ($AlCl_3$), (Merck)

Gallik asit, (Merck)

Kersetin, (Merck)

Kafeik asit, (Merck)
Sodyum nitrat ($NaNO_3$), (Merck)
Sodyum molibdat (Na_2MoO_4), (Merck)
Amonyum molibdat [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$], (Merck)
Bütillenmis Hidroksi Anisol (BHA), (Merck)
Bütillenmis Hidroksi Toluen (BHT) ise Merck.

3.7 Bitki Ekstrelerinin *In vitro* Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları

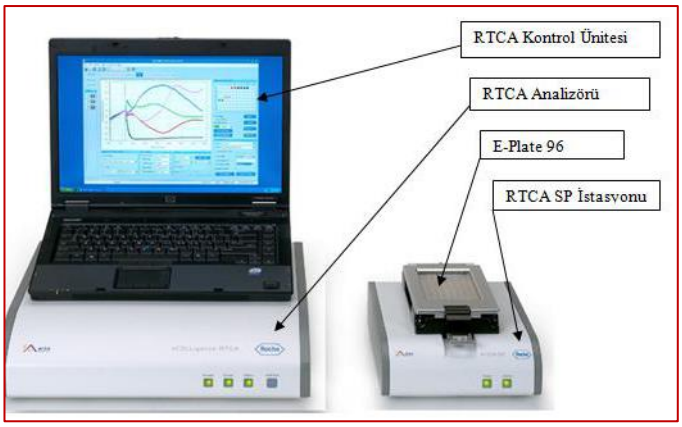
Bitki ekstrelerinin ön deneme antiproliferatif aktiviteye bağlı doz çalışmaları Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Hücre Kültür laboratuarında yapılmıştır. Çalışılan bitkilerden izole edilen bileşiklerin antiproliferatif aktivite testleri Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Şevki ARSLAN ve ekibi tarafından yapılmıştır.

3.7.1 xCELLigence RTCA-SP cihazı

Antikanser çalışmalar için kullanılan xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü) SP (Tek Plak) cihazı, hücre temelli biyolojik amaçlı çalışmalarda kullanılmak üzere tasarlanmıştır ve mikro-elektronik sensör sistemleri ile hücre durumunu işaretleyici, gerçek zamanlı, otomatik izleme özelliklerine sahiptir. Günümüzde biyolojik testlerin çoğunluğu optik saymaya dayanmaktadır, RTCA SP cihazı ise biyolojik test süreçlerinin elektronik olarak saptanması, dolayısıyla molekül ve hücre biyolojisinin mikroelektronikle birleştirilmesi esasına dayanır. Hücrenin ya da molekülün bazı özelliklere sahip olup, olmaması veya sahip olduğu özelliklerdeki değişiklikler elektron ve iyonların sensör yüzeylerindeki geçişlerini etkilemektedir. Sensör yüzeylerinin elektronik özelliklerin ölçülmesi sensörlerin üzerinde bulunan hücrelerin biyolojik durumu hakkında önemli bilgi vermektedir. Hücrelerde meydana gelen biyolojik değişmelere bağlı olarak, RTCA SP cihazı hücrelerle temas halinde olan sensörün elektronik özelliklerindeki değişimi otomatik olarak ölçer. Bu değişimler analogun (okuyucunun) okuyabilmesi ve analiz edilmesi için dijital sinyallere dönüştürülmektedir. Biyolojik deneylerde RTCA SP cihazı klasik cihazlara oranla

başlıca avantajlara sahiptir: İşaretleyici olmadan sonuç saptama, gerçek zamanlı izleme, otomatik ölçüm, kontrolü kolay, daha doğru bilgi içeriği, yüksek doğruluk ve hassasiyet ve geniş çaplı uygulama seçeneğine sahip olmasıdır.

RTCA SP cihazının merkezi 96-kuyucuklu plakların (E-Plate 96) alt kısmına yerleştirilmiş mikroelektronik hücre sensörü dizisidir. Sensör elektrotlarının elektronik direncinin ölçülmesi ile elektrotlar üzerindeki hücrelerde değişikliklerin saptanması ve izlenmesini sağlarlar. Hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi ve moleküllerin birbirini çekme kuvveti (adezyon) elektrot direncini etkiler. Eğer elektrotta hücre varsa, elektrot yüzeyine bağlı olan hücreler izolatör olarak davranıp ortamın direncinin artışına neden olur. Bu yüzden elektrot üzerinde ne kadar hücre varsa elektrottaki direnç değişimi o kadar fazla olacaktır. Hücre durumunun göreceli durumunu belirtmesi açısından hücre indeksi (CI) parametresi türetilmiştir. Ortamda hücre olmadığı zaman sensörün elektronik özelliği etkilenmeyecektir. Elektrotlar üzerinde daha fazla hücre bulunduğunda direnç daha büyük olacaktır. Hücreler olmadığında veya elektrotlar üzerine iyi bağlanmadığı zaman CI değeri yaklaşık olarak sıfırdır. Aynı fizyolojik koşullarda elektrot üzerinde fazla hücre bağlı ise CI değeri daha yüksektir. Bu durumda CI, bir kuyucuk içinde hücre sayısı kantitatif olarak hesaplanabilir. RTCA SP cihazı şu bileşenlerden oluşur (Şekil 3.13).

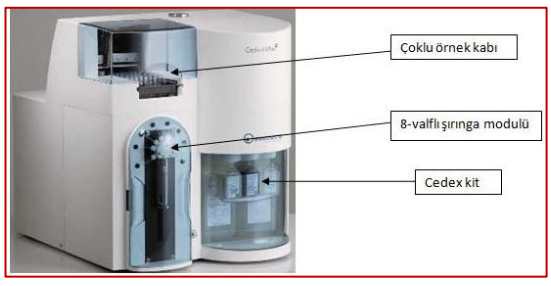


Şekil 3.13 xCELLigence RTCA-SP Cihazı ve Temel Bileşenleri

Hücreler, E-Plate 96'ın kuyucuklarına eklenir, sensör-elektrodun yüzeylerine temas eder ve bağlanır. Sensör yüzeylerinin elektronik özellikleri bir doku kültürü inkübatörünün içine yerleştirilen RTCA SP istasyonu ve RTCA analizörü aracılığıyla izlenir. Hücre canlılığı, morfolojisi ve sitotoksitesi gibi hücrenin biyolojik durumu hakkında eş zamanlı kantitatif bilgiler kontrol ünitesindeki RTCA yazılımının kontrolü ile belirlenmektedir.

3.7.2 Hücre sayım cihazı (Cedex HiRes analizör)

Cedex HiRes analizörü otomatik olarak hücre konsantrasyonunu ve süspansiyonunun elverişliliğini tanımlamaktadır. Analiz, hücre süspansiyonunun trypan blue göç metodu ile boyanması ve analiz edilmesi esasına dayanır. Elde edilen veriler, ekim işleminin değerlendirilmesinin yanında, hücre kültürünün spesifik büyüme oranı ve hücrenin çoğalması gibi hücre kültürünün durumunun ayrıntılı değerlendirilmesine izin verir. Hücrelerin ölü ya da canlı olarak teşhisi ve ayrımı çok tutarlı ve kesin sonuçlar sunan standardize durumlar altında yapılmaktadır. Total hücre, canlı hücre, ortalama alan ve total hücre yüzdesi aynı zamanda belirlenmektedir. Cell diameter histogramı canlı hücrelerin metrekaredeki dağılımını göstermektedir. Belirli hacimde trypan blue hücre süspansiyonu içeren örnek kabına şırınga vasıtasıyla ilave edilmektedir. Kontrollü pompa hareketiyle hücre süspansiyonu ve boya sabit şekilde karıştırılmaktadır ve daha sonra her ölçüm zamanında yine inkübe edilmelidir. İnkübasyon periyodundan sonra şırıngadaki boyalı hücre süspansiyonu, kapiler tüp vasıtasıyla şekil tarayıcısı olan duyarlı akış bölmesine taşınmaktadır. Taralı flow chamber şekli değerlendirme işlemi için küçük şekillere parçalanmaktadır. Trypan blue metodu ile canlı olmayan boyanır ve ölü hücreler analizörde koyu şekilde boyalı görülecektir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 Cedex HiRes Analizörü

3.7.3 HeLa hücresinin hücre kültürü

Tüm işlemler steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Steril kaplarda bulunan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler trypsin-EDTA (10 mL) ile 1-2 dakika inkübe edilmiştir (veya CO_2 inkübatöründe, 37°C). Böylece yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlanmıştır. İnkübatörden çıkarılan kap içerisine besi yeri DMEM- (10 mL) eklenerek ortam nötralize edilecek ve kap çalkalanarak hücre süspansiyonu falkon tüpüne aktarılıp, (600 RPM, 5 dk.) santrifüj edilerek hücrelerin çökeltilmesi sağlandı.

Besiyeri steril olarak boşaltıldıktan sonra, hücre çökeltisi DMEM + besi yeri (1-3 mL) ile bir pipet yardımı ile süspansiyon haline getirildi. Diğer taraftan steril 250 mL'lik kaplara 20 mL DMEM besi yerinden konuldu. Bu kaplara süspansiyon edilen hücrelerden 1 mL konulup ve kaplar kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirildi. Bu işlem (split) 4 günde bir tekrarlandı.

3.7.3.1 Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Hücre pelletinden % 10 DMSO-DMEM karışımı ile hazırlanan hücre süspansiyonu 1 ml (yaklaşık $1x10^6$ hücre/ml) steril 2 ml cryoviallere alınarak, tüpler doğrudan sıv1ı azot içinde veya 1 gün -80 °C de bırakıldıktan sonra sıvı azot içinde muhafaza edildi.

3.7.3.2 Hücrelerin sayılması işlemi

Besi yeri ile süspansiyon edilen karışımdan 20 µL alınarak Cedex HiRes Analyzer örnek kabına konuldu, trypan blue solüsyonu ile ölü hücreler etiketlendi. Kap içerisindeki canlı hücrelerin toplam hacminden kapladıkları alan hesabı, hücre sayım cihazı ile otomatik olarak kaydedildi.

3.7.3.3 DMEM çözeltisinin hazırlanması

1000 ml'lik bir behere deiyonize su (700-800 mL) konuldu, beher içine manyetik balık atılarak manyetik karıştırıcıya alındı, üzerine DMEM (1 L için bir şişe) ilavesi yapıldı. Oluşan karışım üzerine $NaHCO_3$ (2,2 g) ilave edildi ve pH metre ile HCl çözeltisi kullanılarak pH 7,2 ayarlandı. Toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Bu çözelti steril kabine alınıp ve 0,22 mikronluk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzülerek +4 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.7.3.4 DMEM katkılı çözeltisinin hazırlanması

500 ml'lik steril şişede bulunan DMEM çözeltisinden 60 ml alınıp ve bu şişeye 50 ml fetal Bovine Serum (FBS), 10 ml Penstrep ilave edildi. Tüm işlemler steril kabinde, steril malzemeler kullanılarak gerçekleştirildi ve + 4 ºC de saklandı.

3.7.3.5 Tripsin EDTA çözeltisi

Oda sıcaklığında veya 37 ºC'de çözünen Tripsin EDTA çözeltisi steril kabinde 10 ml hacimli steril tüplere alınarak -20 ºC'de muhafaza edildi.

3.7.3.6 Penicilin streptomycin çözeltisi

Oda sıcaklığında veya 37 ºC'de çözünen Penicilin Streptomycin çözeltisi steril kabinde 10 ml hacimli steril tüplere alınarak -20 ºC'de tutuldu**.**

3.7.3.7 DPBS tampon çözeltisinin hazırlanması

1000 ml'lik bir behere deiyonize su (700-800 ml) konulup, beher içine manyetik balık atılarak manyetik karıştırıcıya alındı, üzerine DPBS (1L için bir şişe) ilavesi yapıldı. Herhangi bir ısıtma işlemi yapmaksızın çözünmesi sağlandı. 1 N HCl veya 1N NaOH kullanılarak pH 7,2 ye ayarlandıktan sonra, toplam hacim 1L'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti steril kabine alınır ve 0,22 mikronluk steril filtrelerden vakum altında steril şişelere süzülerek +4 ºC de muhafaza edildi.

3.7.4 Örneklerin hazırlanması

Ham ekstreler için 20 mg örnek tartıldı ve 1 mL steril DMSO çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra 1:3 oranında DPBS ile seyreltildi (5 mg/mL). Oluşan yeni çözeltiler 0.22 mikronluk steril filtreler kullanılarak steril falcon (15 ml) tüplerine süzülecek ve -20 ºC'de muhafaza edildi.

3.7.5 Tümör hücresi (HeLa) proliferasyon deneyi (Kolorimetrik, *in vitro*)

E-plate 96 nın kuyucuklarına 50 µL kültür ortamı koyuldu ve RTCA cihazına yerleştirilerek arka plan (background) okuması yapıldı. Bundan sonra kuyucuklara 50 µL belirli sayıda hücre içeren hücre süspansiyonu eklendi ve plaka RTCA cihazına yerleştirilerek 24 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Bu süre zarfında hücrelerin kuyucuk tabanına yapışarak büyüme sürecine girmeleri sağlandı. Bu süre sonunda kuyucuklara, son hacim 200 µL olacak şekilde farklı derişimlerde etken madde/bitki ekstraktı içeren kültür ortamı çözeltisi eklendi ve plaka RTCA cihazına yerleştirilerek belirlenen süre boyunca hücrelerin yaşam/ölüm durumları gerçek zamanlı olarak kaydedildi. Tüm testler üç tekerrürlü olarak yapıldı.

3.8 Saf bileşiklerin *in vitro* Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları

Ekstrelerde izole edilen bileşiklerin HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivite çalışmaları MTT deneyi ile belirlendi.

3.8.1 Hücre kültürü

HeLa hücre hattı (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu, ATCC) hücre kültürü laboratuarımızda 37 °C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren ortamda inkübe edildi. Hücrelerin gelişimi ve çoğaltılması % 10 fetal sığır serumu (FBS) ve % 1 penisilin içeren Roswell Park Memorial Enstitü (RPMI-1640) besiyeriyle gerçekleştirildi. Her 2-3 günde bir, hücre yoğunluğuna ve deneysel ihtiyaçlara bağlı olarak pasajları gerçekleştirilmiştir. Steril 100 mm'lik kültür petri kabında üretilen hücreler yaklaşık % 80-90 yoğunluğa ulaşıncaya kadar beslendi, ancak bu yoğunluktan sonra Tripsin-EDTA yardımıyla yüzeyinden kaldırıldı ve santrifüjde çöktürme işleminden sonra yine kendi medyumu içerisinde yeni bir petri kabına aktarıldı. Böylece hücrelerin çoğalması sağlandı. Kültürleme işlemi sırasında hücreler fosfat tamponlu tuz (PBS) ile yıkandı. Hücre sayımı ise tripan mavi solüsyonu ile toma lamında gerçekleştirildi.

3.8.2 Sitotoksisite testi

Saf bileşiklerin hücre kültürü üzerinde *in vitro* olarak sitotoksik etkileri MTT testi uygulanarak tespit edilmiştir. MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi sağlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir. 96 kuyucuklu mikroplakanın, her bir kuyucuğuna $1x10^4$ hücre/100µL olacak şekilde ekilen hücreler 37 °C'de % 5 CO_2'li etüvde 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı ve farklı konsantrasyonlarda (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 125 ve 250 µM) test maddeleri uygulandı. 37 °C'de % 5 CO_2'de 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyeri yenilendi (100 µl) ve mikroplakanın her kuyucuğuna 10 µL MTT çözeltisi eklendi. 150 rpm'de 5 dk çalkalandıktan sonra 4 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi. Kuyucuklardaki süpernatant uzaklaştırıldı ve 500 µL DMSO ilave edildi. 150 rpm'de 5 dk çalkalandı. Formazon kristallerinin açığa çıkardığı rengin şiddeti 590 nm'de mikroplaka okuyucuda ölçüldü.

3.8.3 Sonuçların değerlendirilmesi

Test edilen bileşikler ile solvent (DMSO) kontrol grubunun absorbans değeri kıyaslanarak % cinsinden ölen hücre sayısı (Inhibisyon konsantrasyonu, relatif inhibisyon aktivitesi, IC) hesaplandı. Test örneği yerine test maddesinin çözeltisini içeren kuyucukların (DMSO kontrollerin) absorbans değerleri %100 canlılığı gösterir. Bu deneyde kullanılan solventin (DMSO) ortamdaki oranı %1 olarak belirlendi.

3.9 *In vitro* Antioksidan Aktivite Çalışmaları

Bitki ekstrelerine ait antioksidan aktivite çalışmaları Samsun Ondakuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında Prof. Dr. Tevfik ÖZEN ve ekibi tarafından yapılmıştır.

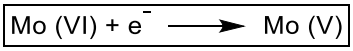
C. paphlagonica ve *C. cankiriense* bitkisinin farklı çözücüler ile hazırlanmış ekstraktlarının antioksidan aktivite (Toplam antioksidan kapasite, indirgeme gücü, serbest radikal ($DPPH^{\bullet}$), $ABTS^{\bullet+}$ radikali ve süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi tayini) testleri spektroskopik olarak tespit edilmiştir.

Antioksidan aktivite teslerinde bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), tersiyer-bütilhidroksikinon (TBHQ), troloks, EDTA, askorbik asit ve α-tokoferol gibi genellikle kullanılan standart bileşikleri aktivite testleri için karşılaştırmak amacı ile kullanılmıştır.

3.9.1 Toplam antioksidan kapasite

Centaurea türlerine ait olan ekstraktların toplam antioksidan kapasitesi, spektrofotometrik fosfomolibdenyum yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem, ortamda bulunan Mo (VI)′ün indirgeyici örnek tarafından Mo (V)′e indirgenmesi sonucu oluşan

yeşil rengin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır (Aguilar Urbano *et al.* 2013, Mohamed *et al.* 2007).



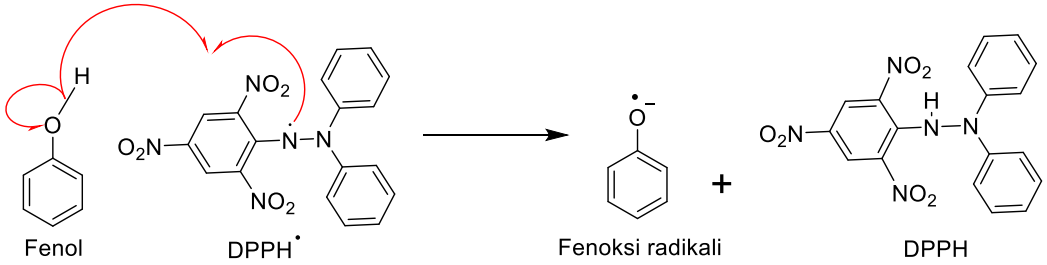
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örnek çözeltilerinden ayrı ayrı (1 mL) kapaklı cam deney tüplerine alındı ve üzerine 2 mL reaktif çözeltisi (0,6 M′lık sülfürik asit, 28 mM′lık sodyum fosfat ve 4 mM′lık amonyum molibdat çözeltisi hazırlandı) eklendi. Deney tüpleri 95 ^{o}C′ de 90 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında soğutuldu ve 695 nm de absorbans değerleri ölçüldü. Toplam antioksidan kapasite sonuçları $A_{0.5}$ µg/mL olarak hesaplandı.

3.9.2 İndirgeme gücü tayini

1 mL farklı konsantrasyonda hazırlanmış ekstreler ve standartlar 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6) ve 2,5 mL %1′lik $K_3Fe(CN)_6$ ile karıştırıldı. Karışım 50 ^{o}C′ deki su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 2,5 mL %10′luk trikloroasetik asit (TCA) eklenerek ve karışım 10 dakika 2200 rpm′de santrifüjlendi. Elde edilen üst fazın 2,5 mL′si ile 2,5 mL H_2O ve % 0,1 lik 0,5 mL $FeCl_3$ karıştırıldı. Ekstre ve standartların 700 nm′de absorbans değerleri ölçülecek ve indirgeme gücü kapasiteleri karşılaştırıldı (Oyaizu 1986). İndirgeme gücü kapasitesinin esası $K_3[Fe(CN)_6]$ bileşiğindeki Fe^{3+} iyonunun numune içerisindeki bileşikler ile reaksiyonu sonucunda $Fe(CN)_6^{4-}$ anyonundaki Fe^{2+} ye indirgenmesi şeklinde oluşmaktadır. Oluşan $Fe(CN)_6^{4-}$ anyonunun var olduğu ortama eklenen $FeCl_3$ bileşiğindeki Fe^{3+} iyonu ile renkli $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ kompleks bileşiğini oluşturur. Oluşan kompleks 700 nm'de absorbansı ölçülmektedir. İndirgeme gücü kapasitesinin etkinliği Fe^{3+} iyonunun Fe^{2+} ye indirgenmesi ve renkli kompleksin 700 nm'deki absorbans değerinin yüksek olmasona bağlıdır. İndirgeme gücü kapasite sonuçları $A_{0.5}$ µg/mL olarak hesaplandı.

3.9.3 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi tayini

Örneklerin serbest radikal giderme aktivitesi DPPH· (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak tayin edildi. Aktivite örneklerin DPPH· nin menekşe/mor rengini giderme kapasiteleri ölçülerek değerlendirildi (Blois 1958). Yöntem, örneklerin bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH· çözeltisinin rengini açması esasına dayanmaktadır.



Şekil 3.15 DPPH· radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 1 mL örnek ve standartların çözeltileri, 1 mL 0,1 mM DPPH· çözeltisi ile vorteks yardımıyla 30 saniye karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra karışımın absorbansı 517 nm'de ölçüldü. Örneklerin radikal giderme aktivitesi aşağıda yazılı olan formül kullanılarak EC_{50} değerleri hesaplandı.

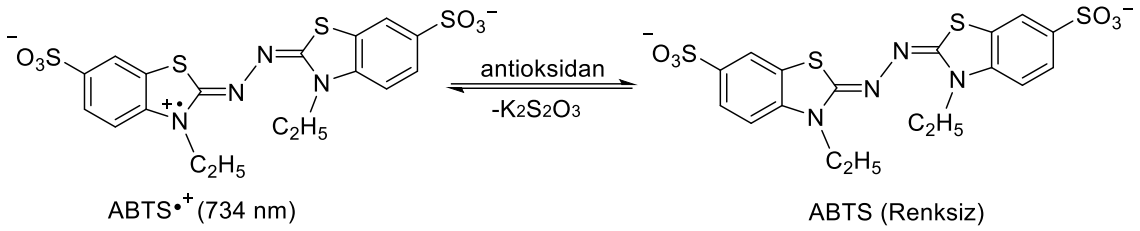
$$\text{DPPH}^{\cdot}\ \text{giderme aktivitesi (\%)} = [(A_o - A_1)/A_o] \times 100$$

A_o: kontrolün absorbansı (0.1 mM DPPH· çözeltisinin absorbansı)

A_1: örnek absorbansı (ekstrakt ve standart madde)

3.9.4 $ABTS^{\cdot+}$ Radikali giderme aktivitesi tayini

Aktivite Re ve arkadaşlarının (1999) belirlediği yönteme göre uygulandı. Bu yönteme göre 7 mM ABTS ve 2,45 mM potasyum persülfat çözeltileri bir gece karanlıkta (veya 12-16 saat) bekletilerek $ABTS^{\cdot+}$ radikali elde edildi.



Şekil 3.16 $ABTS^{\cdot+}$ radikalinin yapısı ve antioksidan ile verdiği reaksiyon

Mavi-yeşil renkli $ABTS^{\cdot+}$ çözeltisi, 734 nm de absorbsiyonu 0,700±0,02 olacak şekilde etil alkolle 1,0:0,50 oranında seyreltildi. 1 ml $ABTS^{\cdot+}$ çözeltisi ile 10 µl örnek çözeltileri deney tüplerinde iyice karıştırıldı. Karşım 1. ve 6. dakika sonunda 734 nm' de absorbans değerleri ölçüldü. Aktivite aşağıdaki formül kullanılarak EC_{50} değerleri hesaplandı (Re *et al.* 1999).

$$\%\ ABTS^{\cdot+}\ \text{giderme aktivitesi} = [(A_6 - A_1) / A_1] \times 100 = (\Delta A / A_1) \times 100$$

A_1: 1. dakikadaki absorbans değeri

A_6: 6. dakikadaki absorbans değeri

ΔA: $A_6 - A_1$

3.9.5 Süperoksit anyonu radikali giderme aktivitesi tayini

Örneklerin süperoksit anyonu giderme aktivitesi Nishimiki Metoduna göre tayin edildi (Nishimiki *et al.* 2002). Süperoksit radikali NBT (nitrotolue tetrazolium) indirgenmesiyle ve NADH (nikotinamid adenin dinükleotid) nin oksidasyonu ile PMS (ferrozin meta sülfat)-NADH sisteminde üretilir.

$$NADH + H^+ + 2O_2 \xrightarrow{PMS} NAD^+ + 2\ O_2^{\cdot-} + 2H^+$$

$$NBT + 2\ O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow NBT\text{-}H_2 + 2\ O_2$$

$$NADH + H^+ + NBT \xrightarrow{PMS} NBT\text{-}H_2 + NAD^+ \quad \text{(net reaksiyon denklemi)}$$

Deneyde, reaksiyon karışımı NBT (nitrotolue tetrazolium) (156 μM, 1.0 mL), NADH (nikotinamid adenin dinükleotid) (468 μM, 1.0 mL) ve 1 mL farklı konsantrasyondaki ekstrakt ve sentetik antioksidant maddelerin çözeltileri iyice karıştırıldı. Reaksiyon karışımına PMS (ferrozin meta sülfat) (100 μM, 0.4 mL) ilave edilmesiyle reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon karışımı 5 dakika ortam sıcaklığında bekletildi ve 560 nm de absorbans değerleri ölçüldü. Örneklerin serbest radikal giderme aktivitesi aşağıda yazılı olan formül kullanıldı ve EC_{50} değerleri hesdaplandı.

$$\text{Süperoksit giderme aktivitesi (\%)} = 100 - [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A_o: kontrolün absorbansı

A_1: örnek absorbansı (örnek ve standart madde)

3.10 İnsektisit Aktivite Çalışmaları

İnsektisit aktivite test çalışmaları**,** Çankırı Karatekin Üniversitesi Yapraklı Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü Laboratuvarında Dr. Öğr. Üyesi Ömer Cem KARAKOÇ tarafından yetiştirilen depo zararlıı olan ergin *Sitophilus granarius* kültürleri üzerine iki yöntem (Kontak toksisite etki çalışmaları ve Tek doz fumigant etki çalışmaları) ile belirlenmiştir.

3.10.1 Kontak toksisite etki çalışmaları

İnsektisidal aktiviteyi belirleme yöntemlerinden bir tanesi kontak (değme) aktivite testi ile belirlenmiştir. Yöntem, Karakoç ve arkadaşlarının (2016) ve Pimentel ve ekibinin (2008) yılındaki belirtmiş oldukları uygulama metodunda ufak modifikasyonlar gerçekleştirilerek yapılmıştır. Depolanmış ürün zararlısı böceklerle yürütülen insektisidal aktivite çalışmaları için ham ekstreler ve uçucu yağın aseton ile hazırlanan % 10'luk ana stok çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan %10'luk çözelti, denemede kullanılan böceklerin thoraksının dorsaline Hamilton şırınga ile 1 μL/böcek

hacminde enjeksiyonı ile uygulaması yapılmıştır (Karakoç and Gökçe 2012, Pimentel *et al.* 2008).



Şekil 3.17 İnsektisit aktivite çalışmasına ait görüntü

Kontrolde her böcek türü için 1 µL/böcek dozunda aseton kullanılmıştır. Denemeler beş tekerrürlü olarak kurularak ve her tekerrür için 10 adet böcek kullanmıştır. Uygulama yapılan böcekler içerisinde 5 gr buğday/kırık buğday bulunan 60 mm çapındaki petri kaplarına aktarılıp ve 27±2°C'de %50±10 nisbi nemde çalışan inkübatöre konulmuştur. Muamelelerde ve kontrollerde meydana gelen ölümler 24, 48 ve 72 saat arayla kayıt altına alınmıştır.

3.10.2 Tek doz fumigant etki çalışmaları

Bu çalışma için, içerisinde 10 ergin böcek olacak şekilde daha önceden steril edilmiş olan cam tüpler kullanıldı. Whatman filtre kağıdından kesilen 20 mm çapında diskler toplu iğne vasıtasıyla cam tüplerin kapaklarına sabitlendi. Ham bitki ekstrelerinin ve uçucu yağın aseton ile % 10'luk uçucu yağ/aseton (v/v) karışımı olacak şekilde seyreltildikten sonra GilsonTM pipet yardımıyla alınarak uçucu yağ için 150 µl/l doz olacak şekilde filtre kağıtlarına emdirildi. DDVP kimyasal standart olarak uçucu yağın etkilerinin karşılaştırılması amacıyla önerilen dozda kullanıldı. Kontrolde 150 µl/L dozunda sadece aseton kullanıldı. Asetonun fumigant etkisi olduğundan emdirme işlemi tamamlandıktan sonra filtre kağıtlarındaki asetonun uçması için, steril 90 mm'lik petri kaplarına transfer edilmiş kağıtlar çeker ocak altına yerleştirilerek 15 dk oda sıcaklığında tutuldu (Tunç *et al.* 1997). Bu sürenin sonunda kapaklar cam tüplerin üzerine kapatılarak tüm tüpler 10, 20 ve 30 °C'deki inkübatörlere yerleştirildi.

Denemeler üç defa tekrar edildi. Böcekler belirtilen sıcaklıklarda 24 saat boyunca inkube edildi. Bu süre sonunda ilk ölüm sayımları yapıldı, ölü böcekler uzaklaştırılarak sağlıklı böcekler içerisinde uçucu yağ içermeyen yeni 65 ml'lik cam tüplere aktarılarak yukarıda belirtilen koşullarda tutuldu. Ölüm oranları 24 saat ara ile 7 gün süreyle kayıt altına alındı.

3.11. Enzim Aktivitesi Çalışmaları

3.11.1 Hidrataz aktivitesi

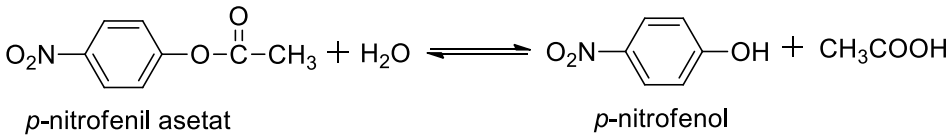
Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir. Bu yönteme göre CO_2'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır (Lengweiler *et al.* 1997, Rickli *et al.* 1964, Wilbur and Anderson 1948). Bu yönteme göre karbonik anhidraz (CA) aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO_2 hidratasyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Bu yönteme göre, kör tüpene 1 mL tris tamponu (pH:8,3), 0,1 mL %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 mL saf su ve 2,5 mL CO_2 çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 mL oldu. Daha sonra kronometre yardımıyla CO_2 çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t_o). Numune tüpüne ise sudan 0,010 mL azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO_2 çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t_c). Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO_2 hidratasyon süresi (t_o) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c'ye bölünmesi ile belirlendi.

$$\text{EÜ} = \frac{t_O - t_C}{t_C}$$

3.11.2 Esteraz aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitisine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorbsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir (Tashian *et al.* 1964). Reaksiyon mekanizması Şekil 3.18'de verildiği gibidir.



Şekil 3.18 *p*-nitrofenilasetatın, *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir. Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Aktivite tayini, 1 mL'lik kuvartz küvetler kullanıldı ve küvet içerisine Çizelge 3.2'deki gibi stok çözeltilerden karıştırılarak yapıldı.

Çizelge 3.2 1 ml'lik kuvarz küvet içerisindeki karışımları

Kullanılan stok çözeltiler	Kontrol küveti (Kör µL)	Numune küveti (µL)
Tris-SO_4 (0.05 M, pH:7.4)	470	470
p-nitrofenil asetat	330	330
Saf su	200	170
Enzim çözeltisi	-	30
Toplam Hacim	**1000**	**1000**

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25 ^{o}C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın

3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Enzim aktivite çalışması 0-25 µg/mL konsantrasyon aralığında beş farklı konsantrasyonda hazırlanarak numune küvetine eklenmiştir.

4. BULGULAR

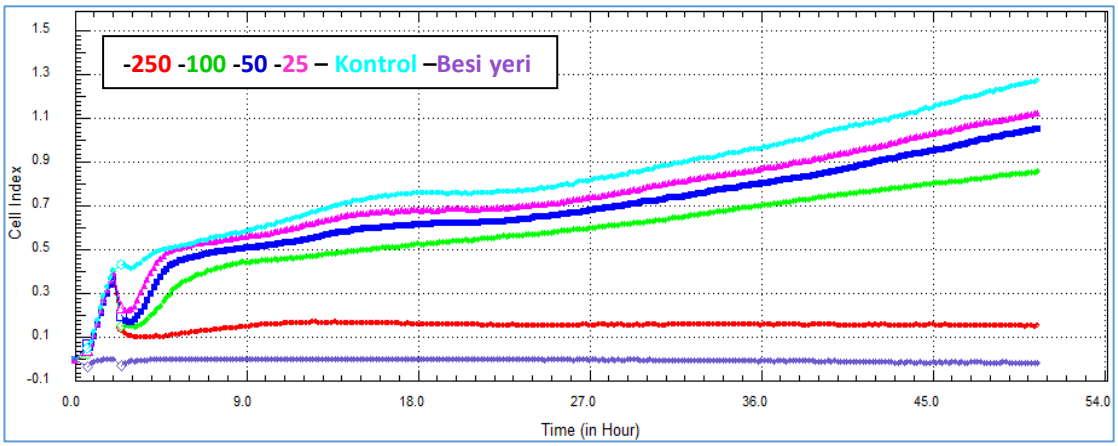
4.1 *Centaurea* Türlerinde Antikanser Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Tez çalışmasında *Centaurea paphlagonica* ve *Centaurea cankiriense* bitkilerinin antikanser aktivitesi olan kısımlar üzerinden izolasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu sebepden dolayı ön deneme antiprolifreatif etkinin belirlenmesi için bitkiler kök, gövde-yaprak ve çiçek kısımlarına ayrılmıştır. Ayrılan herbir bitki branşı MeOH:$CHCl_3$ (1:1) çözücü sistemi ile ekstraksiyona bırakılmış ve ekstreler elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan bitkilere ait kısaltmalar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

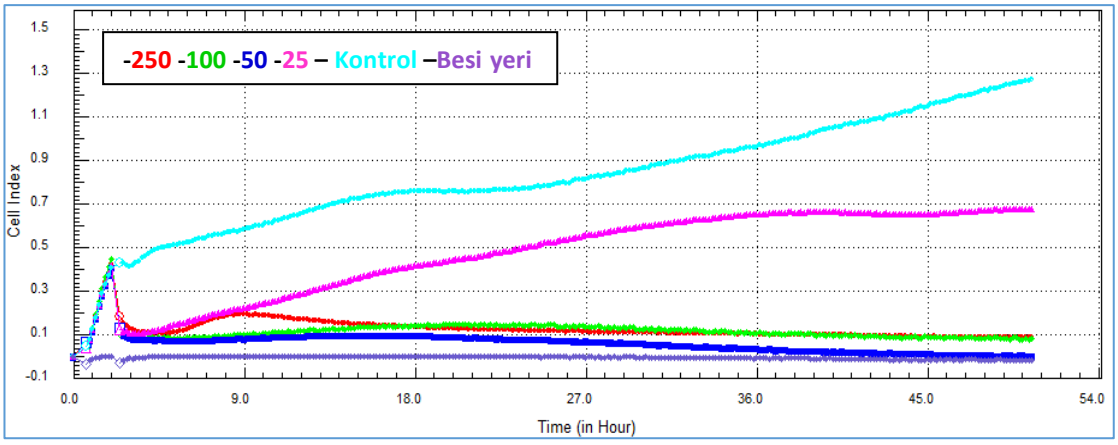
Çizelge 4.1 Çalışma bitkilerine ait kısaltmalar ve verim miktarı

Ekstre kodu	**Ekstre** (20 gr bitki / 100 ml çözücü)	
	Miktar (g)	**Verim (%)**
CCÇ (*Centaurea cankiriense*- Çiçek)	2.738 g	13.69
CCGY (*Centaurea cankiriense*- Gövde-Yaprak)	3.533 g	17.66
CCK (*Centaurea cankiriense*- Kök)	0.929 g	4.64
CPÇ (*Centaurea paphlagonica*- Çiçek)	3.594 g	17.97
CPGY (*Centaurea paphlagonica*- Gövde-Yaprak)	2.873 g	14.36
CPK (*Centaurea paphlagonica*- Kök)	0.590 g	2.95

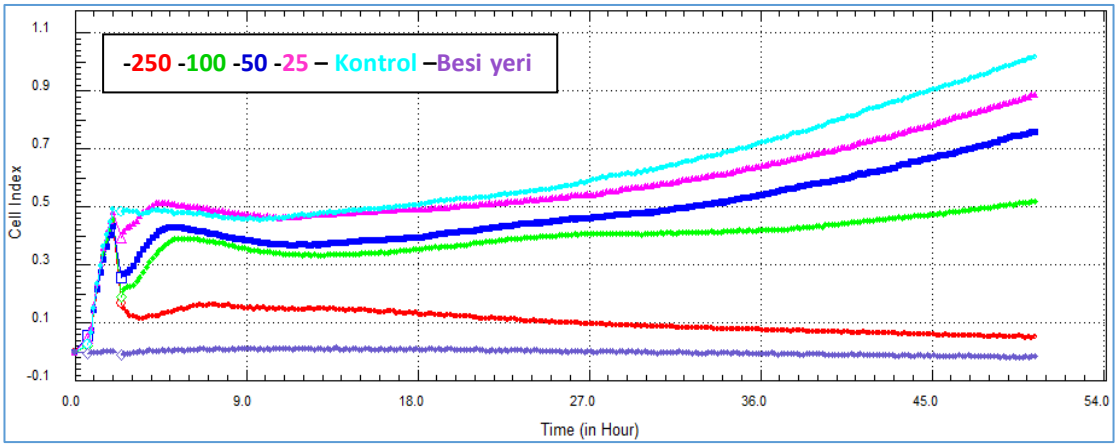
Hazırlanan ekstrelerin antiproliferatif etkileri HeLa (insan rahim kanseri) hücrelerine karşı belirlenmiştir. *Centaurea* bitki türlerine ait ekstrelerin antiproliferatif aktivite sonuçları şekil 11, 12, 13, 14, 15, 16'da verilmiştir. Antiproliferatif aktivite grafiğinde X ekseni zamanı ve Y ekseni hücre indeksini (Cell Index-CI) göstermektedir. Grafikteki renkli çizgiler ise, açık mavi renk; madde dışındaki herşeyin olduğu (hücre ve besi yeri) kontrol grubunu, Mor renk; hücrelerin büyüdüğü besi yerini ifade etmektedir. Kırmızı: 250 µg/mL, Yeşil: 100 µg/mL, Mavi: 50 µg/mL ve Pembe: 25 µg/mL derişimlerini belirtmektedir. Hücre indeksinin yüksek olması hücre büyümesinin doğal olarak hücre sayısının artışını ifade etmektedir.



Şekil 4.1 CCÇ ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği

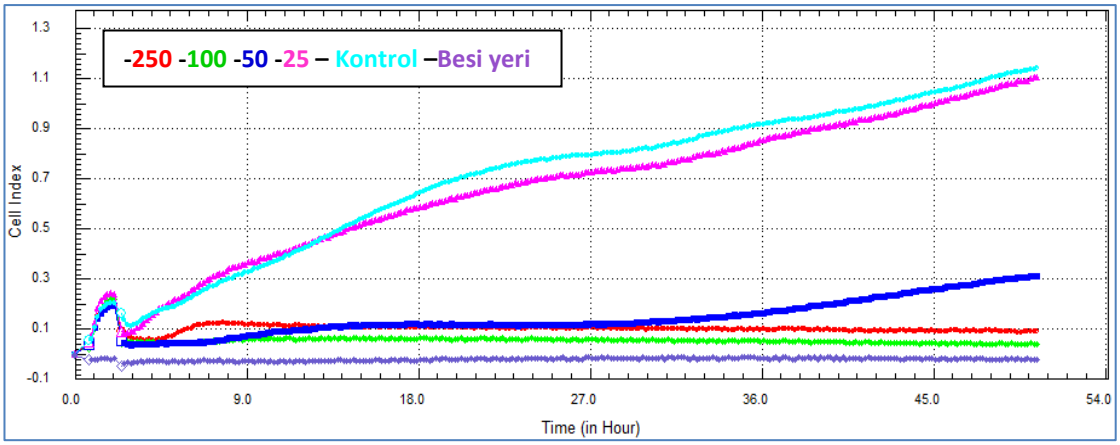


Şekil 4.2 CCGY ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği

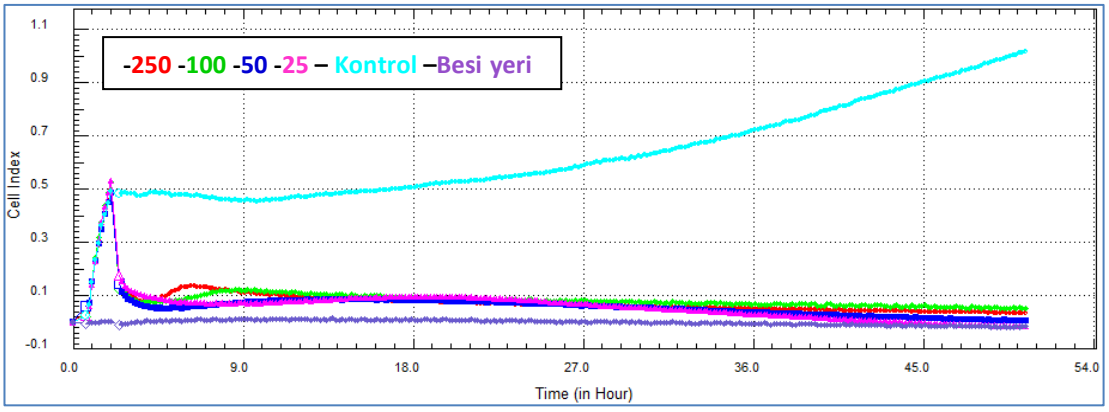


Şekil 4.3 CCK ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği

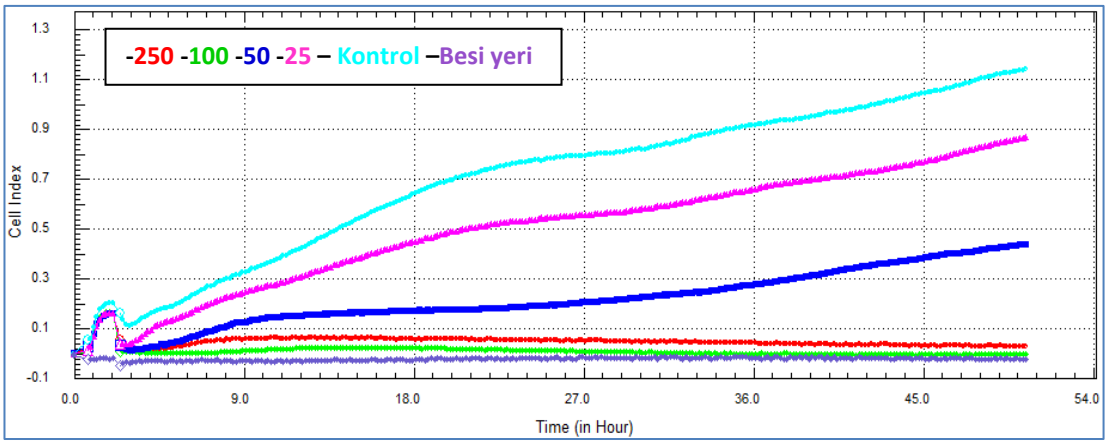
In vitro antiproliferatif aktivite çalışmaları sonucunda, yukarıdaki grafikler (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3) *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin HeLa hücresine karşı etkilerinin nasıl değiştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar dahilinde CCGY ekstresinin çalışma konsantrasyonlarından (250, 100, 50, 25 µg/mL) 25 µg/mL haricindeki diğer konsantrasyonların hepsinde yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu sonucu elde edilmiştir. CCÇ ve CCK kodlu ekstrelerin 250 µg/mL konsantrasyonda yüksek aktiviteye sahip iken, diğer konsantrasyonlarda herhangi bir etki görülmeyerek kontrol grubu ile paralel bir artışın olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4 CPÇ ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği



Şekil 4.5 CPGY ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği



Şekil 4.6 CPK ekstresinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafiği

Yukarıdaki grafiklerin (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6) HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları değerlendirildiğinde *C. paphlagonica* bitkisinden elde edilen ekstrelerin sonuçları görülmektedir. Sonuçlar incelendiği zaman CPGY ekstresinin çalışma konsantrasyonlarının (250, 100, 50, 25 µg/mL) hepsinde çok yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu sonucu elde edilmiştir. CPÇ ekstresinin 250 ve 100 µg/mL konsantrasyonda yüksek antiproliferatif aktivite değerine sahip olduğu ama 25 µg/mL konsantrasyonda etki görülmemiştir. Hatta 30. saatten itibaren CI değerinin yükselmeye başladığı doğal olarak hücrelerin büyümesinin artmaya başladığı görülmüştür. CPK ekstresinin 250 ve 100 µg/mL konsantrasyonda yüksek aktiviteye sahip olduğu fakat 50 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarda her hangi bir aktivitenin olmadığı belirlenmiştir.

4.2 *Centaurea* Türlerinde Antioksidan Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

Centaurea türlerinden elde edilen ekstrelerin ve uçucu yağın antioksidan aktivite çalışmalarına ait bulgular Çizelge 4.2'de detaylı şekilde verilmiştir.

Çizelge 4.2 *Centaurea* türlerine ait ekstrelerin total antioksidan aktivite, indirgeme gücü, serbest radikal giderme, süperoksit anyon radikali giderme ve $ABTS^{+\cdot}$ radikali giderme aktiviteleri

ÖRNEK	Toplam antioksidan	İndirgeme gücü	Süperoksit giderme	$DPPH^{\cdot}$ giderme	$ABTS^{\cdot+}$ giderme
	$A_{0.5}$ (µg/ml)		**EC_{50} (µg/ml)**		
CCÇ (M/K)	301.02±0.51	346.95±0.66	65.88±0.70	21.77±0.75	355.99±0.70
CCGY (He_1)	267.33±1.18	381.31±0.25	-	20.05±0.39	101.77±3.08
CCGY (M/K)	289.35±5.80	304.54±0.76	40.45±0.95	26.68±0.10	137.20±2.09
CCGY (n-Bu)	216.85±0.02	286.70±0.98	68.16±0.30	16.31±3.08	294.00±0.43
CCGY (EA)	186.10±0.38	456.78±0.17	98.51±0.37	15.14±0.15	195.67±0.41
CCK (M/K)	244.61±0.35	463.41±0.45	81.70±0.73	44.57±0.05	241.12±2.10
CPÇ (He_1)	248.37±5.41	384.10±1.07	77.72±2.09	33.53±0.71	131.91±5.07
CPÇ (He_2)	201.75±1.02	221.11±2.41	26.60±2.45	31.49±0.54	232.84±6.77
CPÇ (He_3)	128.99±0.94	252.01±0.75	41.66±3.08	27.54±2.11	141.41±4.12
CPÇ (M/K)	166.92±2.78	239.92±0.82	75.71±2.55	25.20±1.07	129.79±5.01
CPÇa (M/K)	130.07±6.21	275.00±3.41	70.72±0.53	28.85±1.44	240.78±3.41
CPÇ (n-Bu)	135.75±2.11	339.39±1.94	26.79±1.07	24.80±0.84	142.01±1.88
CPÇ (EA)	171.62±6.04	243.14±3.21	25.72±0.91	37.88±1.10	102.29±3.02
CPÇ (EO)	142.92±3.91	359.30±2.07	26.87±3.11	36.38±2.05	223.79±4.91
CPGY (He_1)	313.28±2.09	339.94±0.52	-	35.72±0.67	108.98±0.93
CPGY (M/K)	139.75±5.44	434.85±2.05	44.14±3.20	33.43±2.10	133.54±7.15
CPGY (n-Bu)	343.55±0.40	349.51±0.49	61.87±3.20	33.09±0.59	124.45±2.78
CPGY (EA)	197.65±0.31	396.62±0.94	51.78±0.22	20.13±2.01	259.90±4.09
CPK (M/K)	140.17±3.07	204.64±3.05	70.71±5.07	52.47±0.76	239.35±6.27
BHA	83.95±2.17	63.61±0.04	66.14±0.10	59.89±3.22	63.39±1.64
α-tocopherol	118.11±0.90	50.21±0.08	25.26±1.71	17.93±1.92	77.38±2.06

CPÇa (M/K): (*C. paphlagonica*-çiçek kısmının hekzan ile ekstraksiyonundan kalan posanın metanol/kloroform ile ekstraksiyonu)
EC_{50} değeri (% 50 $DPPH^{\cdot}$ radikali gidermek için gerekli olan antioksidan miktarı)
EC_{50} değeri (% 50 $ABTS^{\cdot+}$ radikali gidermek için gerekli olan antioksidan miktarı)
EC_{50} değeri (% 50 Süperoksit radikali gidermek için gerekli olan antioksidan miktarı)
He_2: (Hekzan ekstresinin 25 °C'de esterleştirilmiş ekstre)
He_3: (Hekzan ekstresinin 65 °C'de esterleştirilmiş ekstre)
M/K: (Metanol/Kloroform (1:1) ekstresi)
EA:(Etil asetat ekstresi)
n-Bu: (*n*-Butanol ekstresi)
EO: (Uçucu yağ)
He_1: (Hekzan ekstresi)

4.2.1 Toplam antioksidan kapasite tayini bulguları

Ekstrelerin ve uçucu yağın toplam antioksidan kapasite aktivitesi, askorbik asidin eşdeğer sayısı olarak ifade edilmektedir. Buna göre, deney sonucunda çıkan $A_{0.5}$ (µg/ml) değerinin düşük olması yüksek aktivite anlamına gelmektedir. Sonuçlara bakıldığı zaman CPÇ (He_3) 128.99±0.94, CPÇa(M/K) 130.07±6.21 ve CPÇ (n-Bu) 135.75±2.11 µg/mL konsantrasyonda $A_{0.5}$ değerine sahip ekstreler BHA ve α-tokoferol standart bileşiklerine en yakın yani en yüksek aktivite değerine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

4.2.2 İndirgeme gücü aktivitesi bulguları

Antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinden biri olan indirgeme gücü aktivitesinin temeli test çözeltisinin sarımsı renginin ortamda bulunan antioksidan ajanların indirgeme kapasitelerinden dolayı yeşilimsi renge dönüşmesi esasına dayanır. *C. paphlagonica* bitkisinden elde edilen ekstrelerin ve uçucu yağın indirgeme gücü aktiviteleri incelenmiştir. Bu deneyde aktiviteden söz edilebilmesi için elde edilen sayısal değerin yüksek olması gerekmektedir. Ekstrelerin ve uçucu yağın indirgeme gücü aktivite sonuçları Çizelge 4.2'de detaylı verilmiştir. Çizelge 4.2'ye göre $A_{0.5}$ değeri standartlara en yakın olan CPK (M/K) ekstresi 204.64±3.05 değeri ile ekstreler içerisinde en yüksek aktiviteye ve CCK (M/K) ekstresi 463.41±0.45 değeri ile en düşük aktiviteye sahip olduğu deneysel olarak belirlenmiştir.

4.2.3 Süperoksit anyon radikali giderme aktivitesi bulguları

Antioksidan aktivite testlerinden bir diğeri süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinde belirleme yöntemlerinden biri olan süperoksit anyon radikali giderme aktivitesinde süperoksit anyon radikali tarafından indirgenen NBT'nin ve oluşan mavi rengin ortamdaki antioksidanlar tarafından engellenmesi esasına dayanır. *C. paphlagonica* bitkisinden elde edilen ekstrelerin ve uçucu yağların süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri incelenmiştir. Ekstreler ve uçucu yağın süperoksit anyon

radikali giderme aktivite sonuçları Çizelge 4.2'de EC_{50} değeri olarak detaylı şekilde verilmiştir. EC_{50} değerinin düşük olması anyon radikali giderme aktivitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. CPÇ (EA) ekstresi 25.72±0.91 değeri ile BHA standardından çok yüksek ve α-tocopherol ile aynı değerde yüksek aktivite göstermektedir. Bunun akabinde CPÇ (He_2) > CPÇ (n-Bu) > CPÇ (EO) etkinlik sırası bu şekilde olmakla beraber bu ekstrelerde BHA standardından çok fazla etki göstermekte ve neredeyse α-tokoferol standardı ile eş değer aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

4.2.4 DDPH$^{\cdot}$ radikali giderme aktivitesi bulguları

DPPH$^{\cdot}$ radikal giderme aktivitesi için *C. paphlagonica* ekstreleri ve uçucu yağından stok çözeltiler (1 mg/mL) hazırlandı. Stoklardan tüplere 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında numune hazırlandı. Üzerine DPPH$^{\cdot}$ çözeltisi eklendi. Son oluşan DPPH'lı çözeltiler karanlık ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 517 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Azalan absorbans ortamda bulunan DPPH$^{\cdot}$ radikalinin reaksiyona girerek serbest radikalin azalmasını ifade etmektedir. Ekstrelerin DPPH$^{\cdot}$ radikali giderme aktivitesi sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Çizelge 4.2'ye göre düşük EC_{50} değeri yüksek antioksidan aktivite anlamına geldiğinden; CCGY (EA) ekstresi 15.14±0.15 değeri ile ve CCGY (*n*-Bu) ekstresi 16.31±3.08 değeri ile standartlardan bile çok yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Diğer yandan DPPH$^{\cdot}$ aktivitesi değerlendirilen tüm ekstrelerin BHA standardından yüksek aktiviteye ve bazı ekstrelerin α-tokoferol standardına yakın değerlerde aktiviteye sahip olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır.

4.2.5 ABTS$^{\cdot+}$ radikali giderme aktivitesi bulguları

ABTS$^{\cdot+}$ giderme aktivitesi pekçok fiziksel duruma sahip ekstre yada saf bileşik hatta içecek formundaki ürünler için sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun için öncellikle ABTS'den ABTS$^{\cdot+}$ radikalinin oluşması gerekmektedir. Radikalin oluşması için gerekli çözeltiler hazırlandıktan sonra 734 nm'deki absorbans değeri ölçülerek belirlenmiştir.

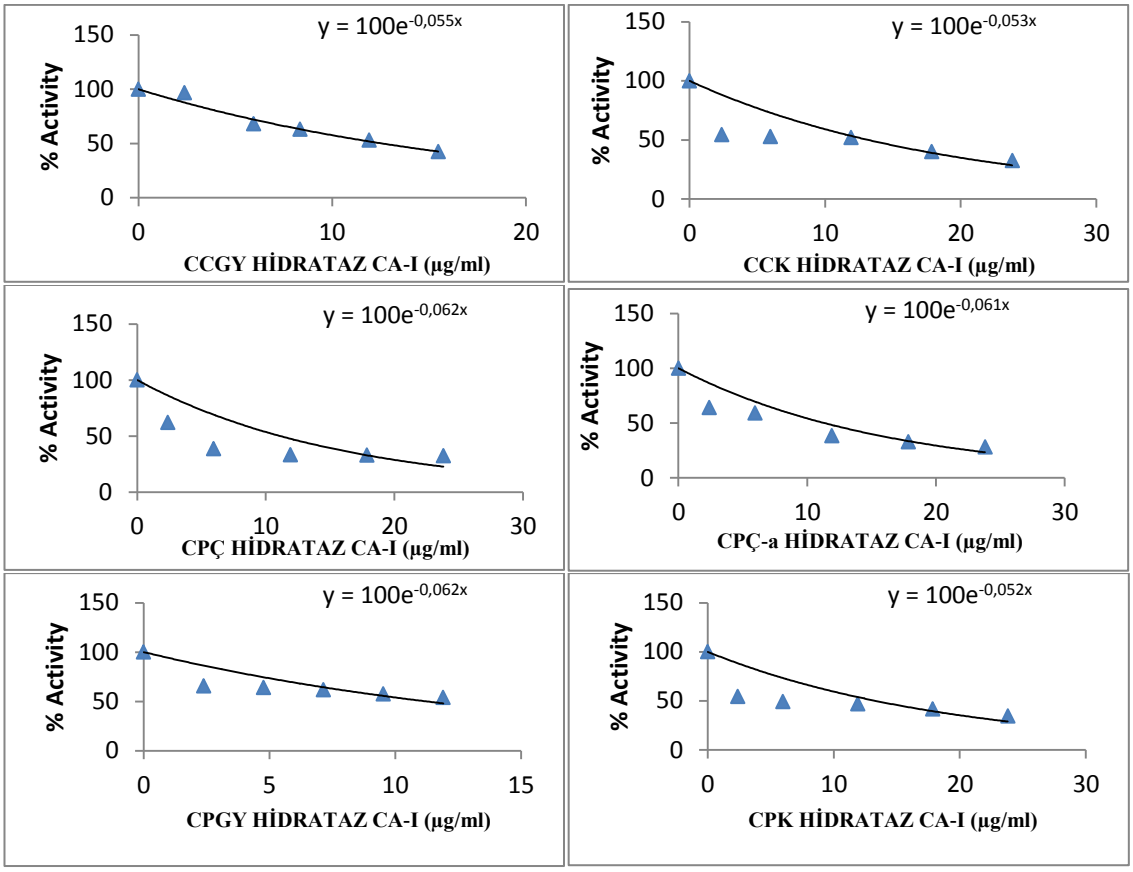
Sonuçlar EC_{50} değeri olarak verilmiştir. Ekstreler ve uçucu yağın $ABTS^{\cdot+}$ radikali giderme aktivitesi sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Ativite değerlendirmesi için düşük EC_{50} değeri yüksek $ABTS^{\cdot+}$ radikali giderme aktivitesi anlamına gelmektedir. Çizelge 4.2'ye göre; CCGY (He_1) ekstresi (101.77±3.08), CPÇ (EA) ekstresi (102.29±3.02) ve CPGY (He_1) ekstresi (108.98±0.93) değerleri ile standartlardan sonra en yüksek aktiviteye sahip ekstrelerdir.

4.3 *Centaurea* Türlerinde Enzim Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

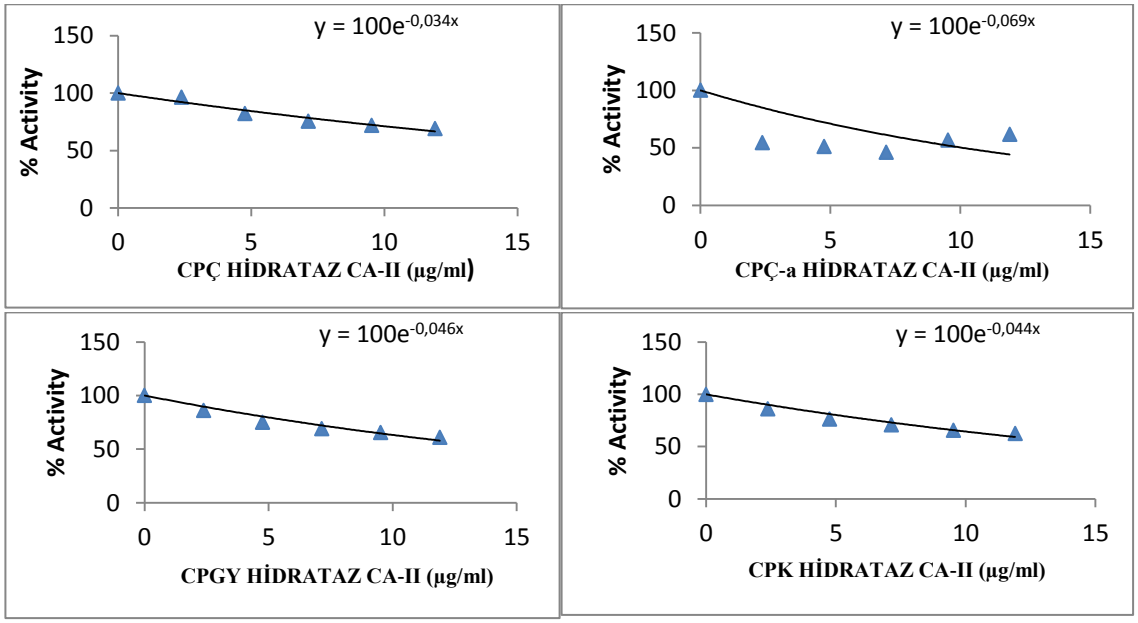
Daha önce insan eritrositlerinden saflaştırılmış olan CA-I ve CA-II izoenzimleri için *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitkilerinden elde edilen ekstrelerin etkileri araştırıldı. Enzim aktivite ölçümleri hidrataz aktivitesi tayin yöntemi ile belirlendi. Enzim aktivitesi gösteren ekstrelerin konsantrasyona bağlı inhibisyon değerlerini gösteren grafikler çizildi. Bu grafikler üzerinden her ekstre için %50 enzim inhibisyonuna sebep olan maddelerin konsantrasyonları hesaplandı (EC_{50} değeri). Herbir ekstreye ait EC_{50} değeri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Buna göre CCÇ ekstresi CA-I ve CA-II izoenzimlerine karşı hiçbir hidrataz aktivite etkisine sahip olmadığı hatta CCGY ve CCK ekstrelerinin CA-I izoenzimine karşı çok iyi EC_{50} değeri ile hidrataz aktivitesi var iken CA-II izoenzimine karşı hidrataz aktivitesi yoktur. Diğer bütün ekstreler için ve özellikle CPÇa (M/K) ekstresinin CA-II enzimine karşı hidrataz aktivite değeri gayet yüksek bir değer olarak okunmuştur. Ekstrelerin değişik konsantrasyonlardaki inhibisyon etkilerini gösteren grafikler Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin CA-I ve CA-II izoenzimlerine karşı hidrataz aktivitesi

Örnek Kodu	**EC_{50}**	
	CA-I Hidrataz (µg)	**CA-II Hidrataz (µg)**
CCÇ	İnhibisyon belirlenemedi	İnhibisyon belirlenemedi
CCGY	12,58	İnhibisyon belirlenemedi
CCK	13,88	İnhibisyon belirlenemedi
CPÇ	12,17	18,79
CPGY	10,84	14,21
CPK	13,99	14,78
CPÇa (M/K)	12,42	9,89



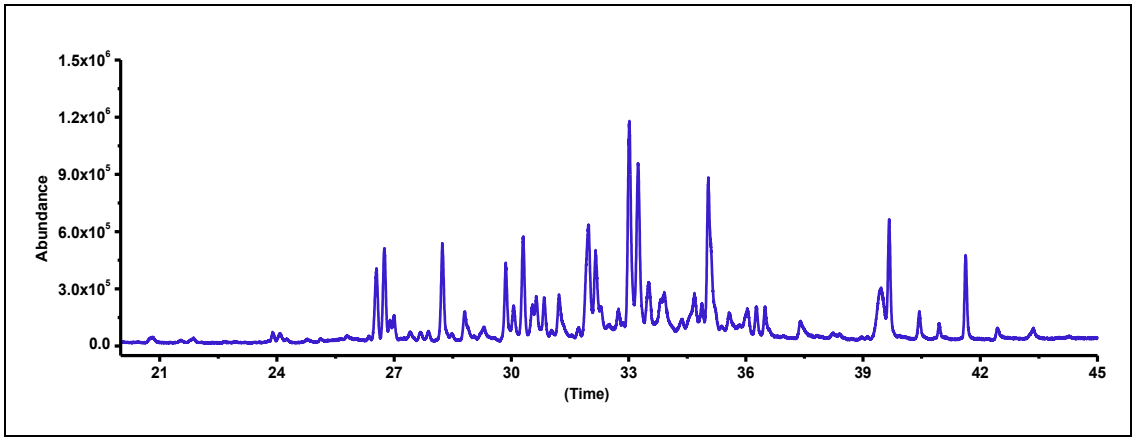
Şekil 4.7 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin CA-I izoenzimine karşı hidrataz aktivitesi grafikleri



Şekil 4.8 *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin CA-II izoenzimine karşı hidrataz aktivitesi grafikleri

4.4 *C. paphlagonica* (CPÇ) Bitkisinin Uçucu Yağ Bileşenleri

C. paphlagonica bitkisinin çiçek kısmı (CPÇ) 3 saat yaklaşık 125-150 °C sıcaklıkta su ile kaynatılarak elde edilen uçucu yağ analizi GC-MS cihazı ile belirlenmiştir. Bu bitki türünden yaklaşık % 0.015 oranında verim ile uçucu yağ elde edildi. *C. paphlagonica* bitkisinin uçucu yağında tanımlanan uçucu bileşikler Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Toplamda 38 uçucu yağ bileşenin varlığı tespit edilmiştir. Ana bileşen olarak 33.02 dakikada alıkonma zamanına sahip spathulenol ve 35.04 dakikada alıkonma zamanına sahip γ-elemene bileşikleri belirlenmiştir. İki ana bileşenin bağıl yüzde oranı spathulenol için 10.02 iken, γ-elemene için 9.84 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.9'da *C. paphlagonica* bitkisinin çiçek kısmından elde edilen uçucu yağ bileşenine ait kromatogram verilmiştir.

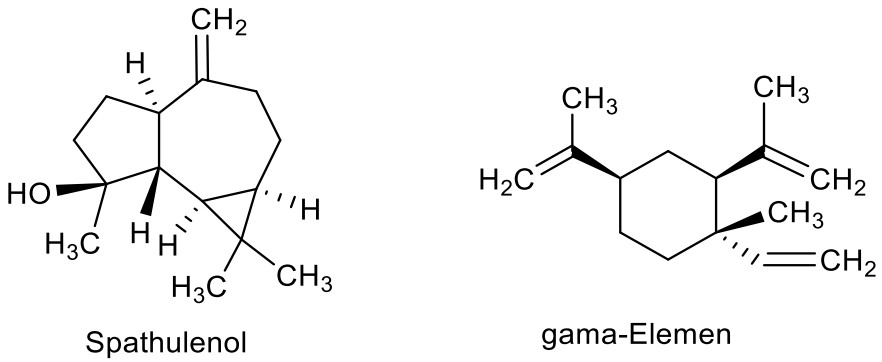


Şekil 4.9 CPÇ bitkisinin uçucu yağ bileşenlerine ait GC-MS kromatogramı

Çizelge 4.4 *C. paphlagonica* çiçek kısmının (CPÇ, EO) uçucu yağ bileşenleri

No	RT	RI	Bileşen ismi	% Alan
1	23.88	1267	Dihidroedulan II	0.28
2	24.09	1273	Timol	0.28
3	26.55	1347	Siklosativen	3.27
4	26.75	1354	α-Kopaen	3.97
5	26.89	1358	β-Damaskenon	0.77
6	26.99	1361	Tetradekan	0.97
7	27.40	1373	Sativen	0.39
8	27.66	1381	Siperen	0.26
9	27.88	1388	2-(2-karboksietil)-6,6-dimetil-3-okzosiklohekz-1-enekarboksilik	0.37
10	28.23	1398	β-Karyofilen	3.96
11	28.81	1417	*trans*-Geranilaseton	1.57
12	29.29	1433	Leden	0.76
13	29.85	1451	β-bisabolol	3.27
14	30.06	1458	β-lonon	1.51
15	30.30	1466	Eremopilen	4.33
16	30.54	1473	α-yılangen	1.16
17	30.64	1476	β-Bisabolen	1.45
18	30.84	1482	Dodekanoik asit, metil ester	1.29
19	31.22	1494	β-Kadinen	2.40
20	31.97	1520	Dodekanoik asit	7.03
21	32.15	1526	Karyofilen oksit	4.05
22	32.74	1547	Aromadendren oksit-(2)	0.56
23	33.02	1556	**Spatulenol**	**10.02**
24	33.24	1563	İzoaromadendren epoksit	8.35
25	33.51	1573	Aristolen epoksit	2.37
26	33.91	1586	Aromaadendren oksit-(1)	3.51
27	34.68	1612	β-Guanin	2.93
28	34.87	1619	Akorenon	1.27
29	35.04	1625	**γ-Elemen**	**9.84**
30	35.57	1645	Leden oksit	1.08
31	36.04	1661	*trans*-Longipinokarveol	2.08
32	36.27	1669	2-*cis*-9-Oktadeseniloksiethanol	1.16
33	37.39	1709	Miristik asit	0.90
34	39.46		Androstan-17-one, 3-etil-3-hidroksi-, (5α)-	4.95
35	39.67		Hekzahidrofarnesil aseton	5.11
36	40.44		1,2-Benzendikarboksilik asit, butil oktil ester	1.27
37	40.95		2,6,10-Trimetiltetradekan	0.55
38	43.36		2-Hekzadekanol	0.70

GC-MS analizi sonucunda CPÇ bitkisinin uçucu yağlarında ana bileşen olan bulunan bileşiklerin yapıları Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10 CPÇ bitkisinin uçucu yağ içerisindeki ana bileşenler

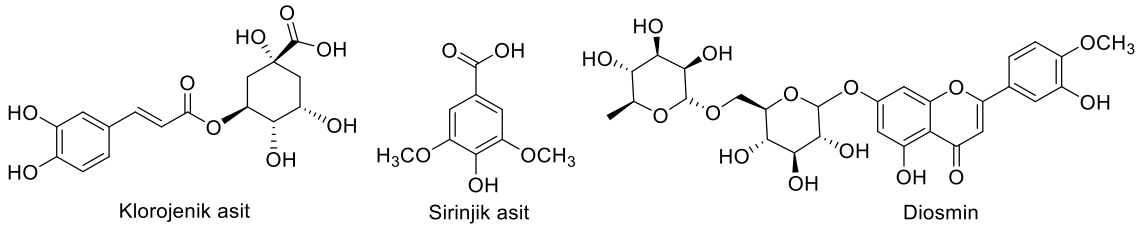
4.5 *Centaurea* Türlerinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları

Centaurea türlerine ait ekstrelerin içerdiği fenolik bileşen analizi HPLC-TOF/MS cihazı ile yapılmıştır. Daha önceden temin edilen 43 fenolik bileşiğin karışımı ile stok çözelti oluşturuldu ve stok çözeltilerden değişik konsantrasyonda (artan konsantrasyonda) çözeltiler hazırlanıp bu çözeltiler ile kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Analizi yapılan ekstreler negatif mod'da cihaza verilmiştir. Alıkonma zamanı ve iyon kütlesinin karşılaştırılması ile ekstre içerisindeki bileşiklerin kantitatif ve kalitatif analizi yapılmıştır. Çizelge 4.5'te *C. cankiriense* bitki ekstreleri (CCÇ, CCGY ve CCK), Çizelge 4.6'da *C. paphlagonica* bitki ekstreleri (CPÇ (MeOH/$CHCI_3$, EtOAc ve n-butanol), CPGY ve CPK) içerdiği fenolik bileşen analizi kantitatif olarak gösterilmiştir. Çizelge 4.5 incelendiği zaman, *C. cankiriense* ekstrelerinden toplam 19 bileşik analizi yapılmıştır. CCÇ ekstresinde klorojenik asit bileşiği (74.93 mg/kg) bulunurken, CCGY ekstresinde sirinjik asit (49.74 mg/kg) ve diosmin (55.09 mg/kg) bileşikleri ve CCK ekstresinde diosmin (14.68 mg/kg) bileşikleri ana bileşen olarak bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 *C. cankiriense* bitki ekstrelerinin HPLC-TOF/MS analiz sonuçları

Numara	Bileşik ismi	Alıkonma zamanı	mg fenolik/kg bitki		
			CCÇ	CCGY	CCK
1	Fumarik asit	3.19	9.53	nd	nd
2	Gentisik asit	4.50	13.93	13.43	3.18
3	Klorojenik asit	5.47	74.93	43.95	5.81
4	Kateşin	5.79	nd	15.03	nd
5	4-hidroksibenzoik asit	6.96	1.85	1.96	0.80
6	Protokateşik asit	7.09	nd	nd	nd
7	Kafeik asit	7.65	nd	nd	nd
8	Vanilik asit	7.87	28.90	nd	3.00
9	Sirinjik asit	8.08	nd	49.74	nd
10	Rutin	9.24	nd	nd	nd
11	Skutellarin	9.73	nd	nd	nd
12	Kuersetin-3-β-D-glikozit	9.77	4.46	nd	nd
13	Naringin	10.50	0.39	0.11	nd
14	Diosmin	10.62	42.43	55.09	14.68
15	Hesperidin	10.76	nd	nd	nd
16	Apigetrin	10.87	nd	nd	nd
17	Neohesperidin	11.08	nd	nd	nd
18	Morin	13.01	14.68	18.49	nd
19	Sinamik asit	15.16	19.29	14.35	3.58
Toplam fenolik ve organik asitler			**210.39**	**212.15**	**31.05**

nd: belirlenemedi



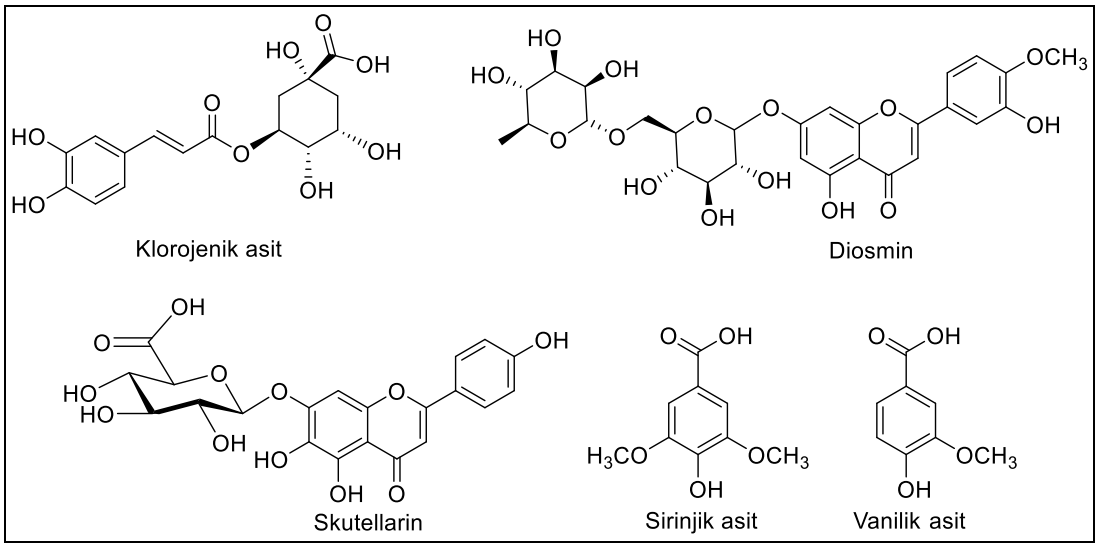
Şekil 4.11 HPLC-TOF/MS analizine göre *C. cankiriense* ekstrelerindeki ana bileşenler

Çizelge 4.6 incelendiğinde, *C. paphlagonica* ekstrelerinden toplam 21 fenolik bileşiğin var olduğu belirlenmiştir. CPÇ (EA) ekstresinde klorojenik asit (109.81 mg/kg) bileşiği, CPÇ (n-Bu) ekstresinde klorojenik asit (95.12 mg/kg) bileşiği, CPÇ ekstresinde klorojenik asit (179.71 mg/kg) bileşiği, CPGY esktresinde skutellarin (409.4 mg/kg) ve

diosmin (115.19 mg/kg) bileşikleri ve CPK ekstresinde ise diosmin (9.94 mg/kg) bileşikleri ana bileşen olarak bulundukları analiz sonucunda ortaya çıkarılmıştır.

Çizelge 4.6 *C. paphlagonica* ekstrelerinin HPLC-TOF/MS ile kantitatif analiz sonuçları

No	Bileşik adı	Alıkonma zamanı	mg fenolik/kg bitki				
			CPÇ (EA)	CPÇ (*n*-Bu)	CPÇ	CPGY	CPK
1	Fumarik asit	3.19	10.43	49.09	23.86	5.59	2.76
2	Gentisik asit	4.50	28.57	5.38	26.36	10.42	2.37
3	Klorojenik asit	5.47	109.81	95.12	179.71	36.18	2.73
4	4-hidroksi benzoik asit	6.96	32.16	1.26	7.42	4.21	0.15
5	Kafeik asit	7.65	13.56	nd	nd	nd	nd
6	Vanilik asit	7.87	59.11	5.18	67.44	9.68	2.57
7	Sirinjik asit	8.08	2.72	nd	34.48	63.16	5.11
8	Rutin	9.24	2.77	4.65	5.21	nd	nd
9	Polidatin	9.64	0.13	nd	nd	nd	nd
10	Skutellarin	9.73	5.27	nd	3.79	409.4	nd
11	Kuersetin-3-β-D-glikozit	9.76	20.80	nd	18.38	nd	nd
12	Sinapik asit	10.50	14.98	nd	nd	nd	nd
13	Naringin	10.51	0.66	nd	2.30	0.08	0.04
14	Diosmin	10.62	6.26	20.42	60.50	115.19	9.94
15	Hesperidin	10.76	nd	nd	2.86	0.41	nd
16	Apigetrin	10.87	nd	nd	nd	6.66	nd
17	Neohesperidin	11.08	nd	nd	1.81	0.24	nd
18	Protokateşuk asit	12.77	2.43	10.04	27.86	nd	4.59
19	Morin	13.01	2.98	6.75	nd	15.04	nd
20	Salisilik asit	13.12	2.73	nd	nd	nd	nd
21	Sinamik asit	15.16	nd	nd	14.12	nd	nd
Total fenolik ve organik asitler			**315.4**	**197.9**	**476.1**	**676.3**	**30.2**



Şekil 4.12 HPLC-TOF/MS analizine göre *C. paphlagonica* ekstrelerindeki ana bileşenler

4.6 *Centaurea* Türlerine Ait Ekstrelerin İnsektisit Aktivite Sonuçları

Çalışma materyalleri *C. cankiriense* ve *C. paphlagonica* bitkilerinin farklı kısımlarından elde edilen ekstrelerin depo zararlısı *Sitophilus granarius* böcek türü üzerine 24, 48 ve 72 saat süre sonunda kontak toksisite etkileri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.7 *C. cankiriense* ve *C. paphlagonica* bitki ekstrelerinin *Sitophilus granarius* böceğine karşı kontak toksisite insektisit aktivite sonuçları

Ekstre Kodu	Tekrar-1		Tekrar-2		Tekrar-3		Tekrar-4		Tekrar-5		Toplam
	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö	C	Ö-C
CCÇ	1	9	0	10	0	10	0	10	0	10	1-49
CCGY	1	9	0	10	1	9	0	10	0	10	2-48
CCK	0	10	1	9	1	9	0	10	0	10	2-48
CPÇ	2	10	2	10	0	10	1	9	0	10	5-45
CPGY	0	10	0	10	1	9	0	10	2	8	3-47
CPK	0	10	1	9	1	9	0	10	0	10	2-48
CPÇ (Hek)	1	9	0	10	2	8	2	8	1	9	6-44
CPÇ (EA)	8	2	10	0	10	0	9	1	8	2	45-5
CPÇ (UY)	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	50-0

UY: Uçucu yağ, EA: Etil asetat, Hek: hekzan

Çizelge 4.7'de belirtildiği gibi beş tekrarı yapılan insektisit aktivite sonucuna göre; bitkilerin metanol/kloroform (1:1) çözücü sistemi ile elde edilen **CCÇ, CCGY, CCK, CPÇ, CPGY, CPK** kodlu ekstrelerinin *S.granarius* böcek türüne karşı kontak toksisiste etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Diğer yandan **CPÇ (Hek)** ekstresi az miktarda, **CPÇ (EA)** ekstresinin çok yüksek oranda böcek türüne karşı aktivitesinin var olduğu ve **CPÇ (UY)** uçucu yağ ekstresinin bu süre sonunda tüm böcekleri öldürdüğü belirlenmiştir. Deneyler 5 tekerrürlü olmakla birlikte her tekerrürde 10 böcek kullanılmıştır.



Şekil 4.13 İnsektisit aktivite çalışma resmi

Sitophilus granarius böcek türü üzerine tek doz fumigant aktivite çalışması sonucunda; CPÇ (EO) uçucu yağının etkileri 24, 48 ve 72 saat süre sonunda belirlenmiş olup bu süre sonunda ancak 1 tane böceğin öldüğü belirlenmiştir. Bu sonuca göre bu uçucu yağın bu böcek türüne karşı bu konsantrasyonda fumigant aktivitesinin olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.14 Fumigant aktivite çalışma resmi

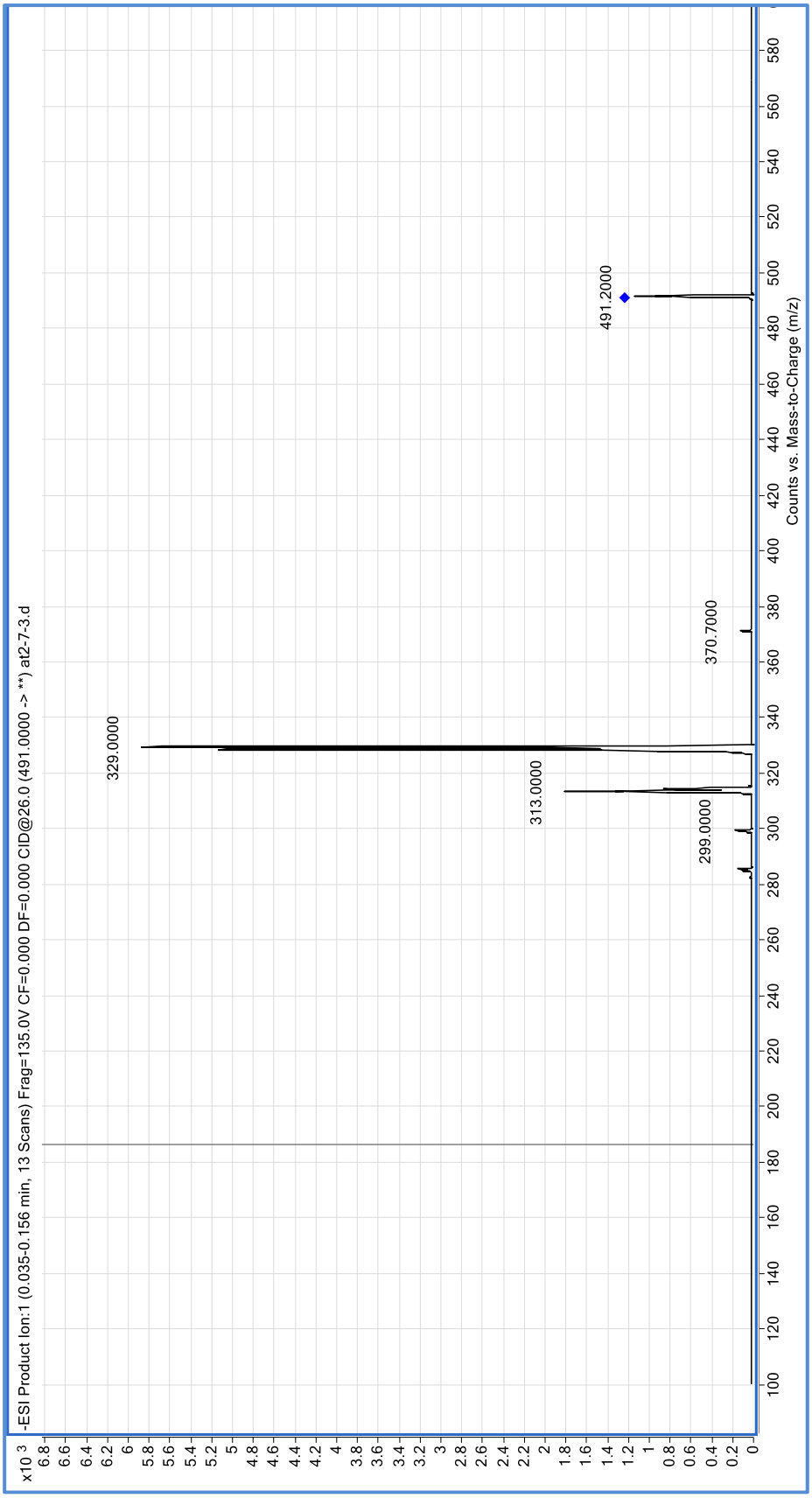
4.7 *C. cankiriense* Gövde-Yaprak (CCGY) Kısmından İzole Edilen Bileşikler

Antiproliferatif aktiviteye sahip *C. cankiriense* gövde-yaprak bitki ekstrelerinin aktivite yönlendirmeli izolasyonu ve buna ait detaylı izolasyon şeması Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de verilmiştir. Detaylı NMR analizleri (1D ve 2D NMR teknikleri) sonucunda *C. cankiriense* bitkisinden 2 tane yeni flavon türevli bileşik (**CCGY-5 ve CCGY-9**) ve 7 tane bilinen bileşik olmak üzere toplam 9 tane bileşik saflaştırıldı ve yapısı aydınlatıldı. Bilinen bileşikler arasında iki adet fenolik asit [CCGY-1: 3,4-dihidroksi benzoik asit (Guria *et al.* 2013), CCGY-6: Vanilik asit (Costa *et al.* 2014)], iki adet hidroksisinnamik asit türevi [CCGY-2: Klorojenik asit (Özbilgin 2010), CCGY-4: Kafeik asit (Tošović 2017)] ve dört adet flavon türevi [CCGY-3: Luteolin-8-*C*-β-glikozit-Orientin (Jang *et al*. 2015), CCGY-7: Nepetin-Eupafolin (Zhao *et al.* 2018), CCGY-8: Diosmin (Salem *et al.* 2018)] izole edilmiş ve yapıları literatür verileri ile uyumludur. Saflaştırılan maddelerin bazılarının spektroskopik bilgileri aşağıda tartışıldı.

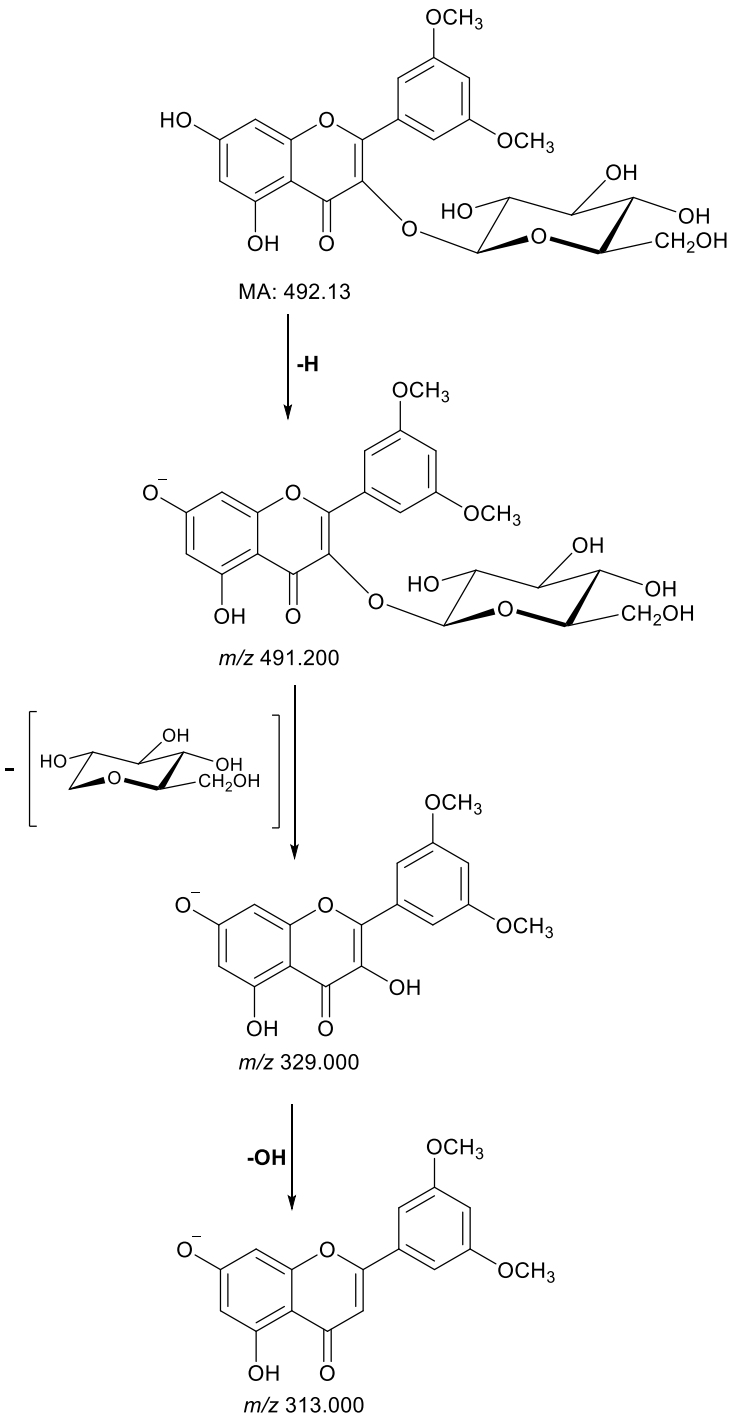
4.7.1 (CCGY-5) Bileşiği (Cankiriense-1)

CCGY-5 bileşiği sarı renkli kristal halinde elde edildi. Bileşiğin kapalı formülü $C_{23}H_{24}O_{12}$ olarak bulunmuştur. Molekül negatif modda iyonlaştırıldı. Teorik olarak m/z $[M\text{-}H]^-$ negatif iyon kütlesi 491.12 iken, analiz sonucunda 491.2000 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.15'te CCGY-5 bileşiğine ait MS spektrumu ve Şekil 4.16'da tahmini MS-MS parçalanma ürünleri verilmiştir.



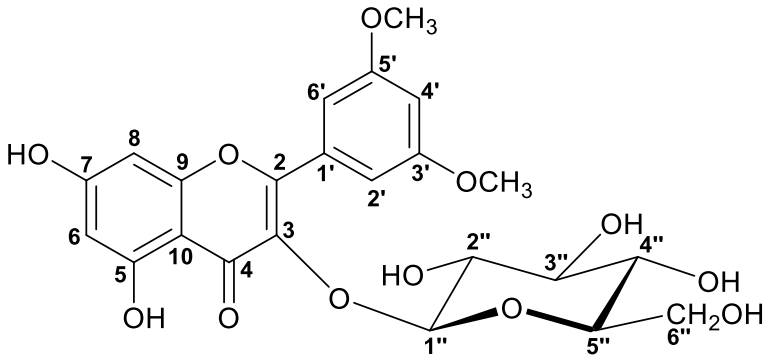
Şekil 4.15 CCGY-5 bileşiğinin (Cankiriense-1) MS spektrumu



Şekil 4.16 CCGY-5 bileşiğinin (Cankiriense-1) MS-MS parçalanma ürünleri

CCGY-5 bileşiğinin (^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR) 1D ve 2D NMR yöntemleri ile alınan spektral verilerin analizi sonucu teknikleri ile yapılan analiz sonucunda bileşiğin sekonder bileşik grubundan flavonol grubuna ait yeni bir bileşik olduğu belirlenmiş ve

kimyasal yapısı Şekil 4.17'de verilmiştir. Bileşiğe ait ^{1}H ve ^{13}C değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.17 CCGY-5 bileşiğinin (Cankiriense-1) yapısı

Bileşiğin ^{1}H-NMR (Şekil 4.18) verilerine göre, aromatik bölgede (δ= 6-8 ppm) rezonans olan 4 adet singlet sinyalin olduğu ve diğer proton sinyallerinin bileşiğe bağlı olan şeker grubuna ait olduğu belirlenmiştir. δ= 7.32 ve δ= 7.05 ppm'de rezonans olan proton sinyallerinin bulunduğu aşağı alan itibari ile bileşiğin B halkasında konumlandıkları belirlenmiştir. Fakat bileşiğin δ= 7.32 ppm'deki protonun integrasyon değeri δ= 7.05 ppm'deki protonun iki katı değere sahip olması bu sinyalin iki H atomuna ait olduğunu işaret etmektedir. Bu durum bileşikte bir simetrinin olduğunu göstermektedir. Bileşiğin δ= 6.56 ppm ve δ= 6.20 ppm'de rezonans olan proton sinyalleri bileşiğin A halkasındaki H-6 ve H-8'e attir. Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumundan iki adet -OH sinyalinin varlığı belirlenmiş olup δ= 12.86 ppm'deki sinyalin karakteristik pik olan molekül için hidrojen bağı yapmış asidik OH grubuna ait olduğu, diğer sinyalin δ= 10.89 ppm'deki -OH grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin δ= 5.12 ppm'de rezonans olan aromatik H-1" sinyali *J*= 7.62 Hz'lik bir ^{3}J etkileşim sabitine sahip olup β-pozisyonundan bağlandığına işaret etmektedir. Bu bileşikteki şekerin glikoz olduğunu göstermektedir.

Bileşiğin Şekil 4.20'deki DEPT spektrumuna göre bir tane metil ($-CH_3$), bir tane metilen ($-CH_2$), dokuz tane metin (-CH) ve dokuz tane kuarterner (-C) karbon sinyali tespit edilmiştir. Bileşiğin Şekil 4.37'deki ^{13}C NMR spektrumuna göre, bileşikte bir tane karbonil grubunun var olduğu belirlenmiştir.

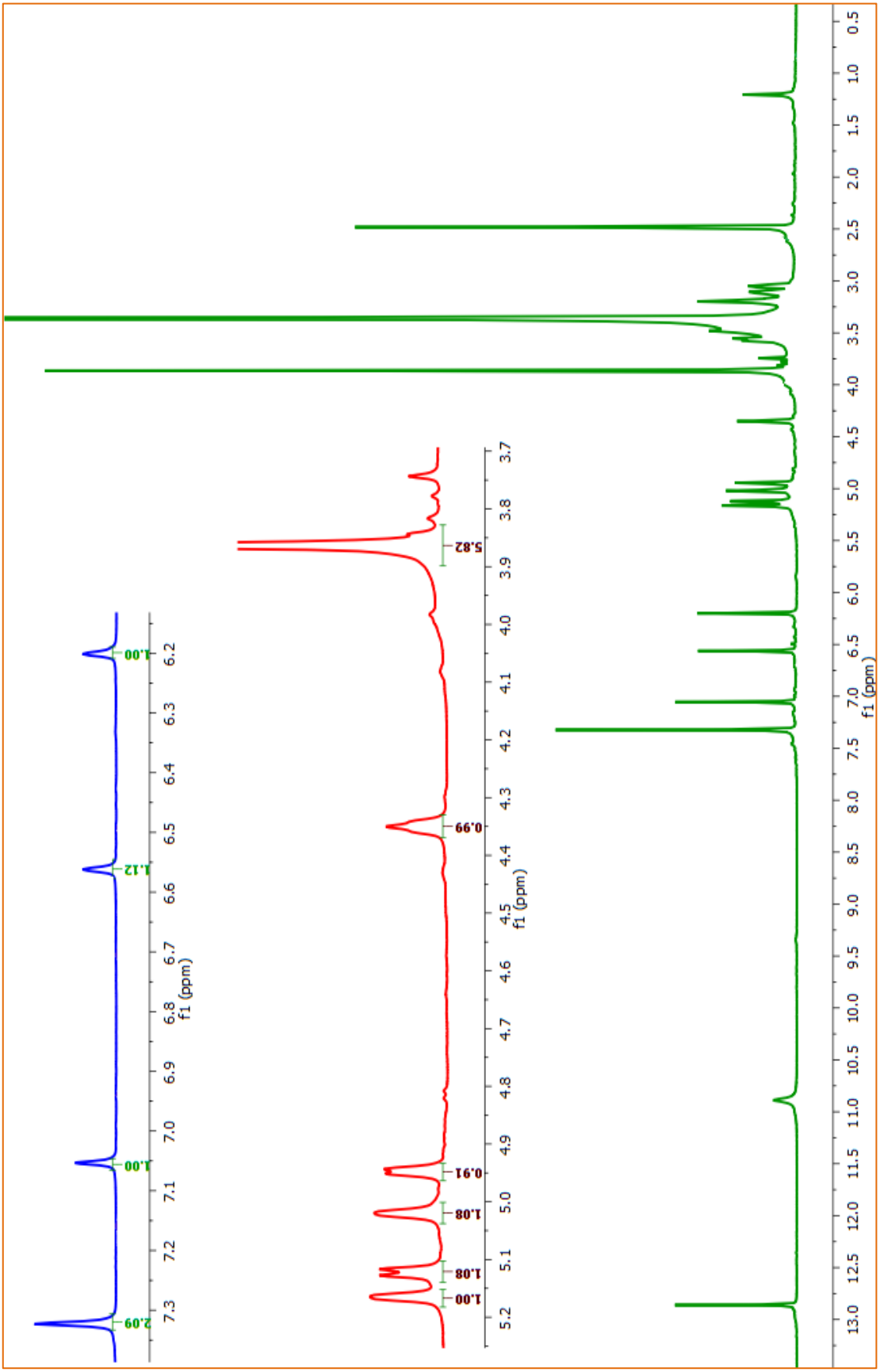
Bileşiğe ait homonükleer COSY spektrumundan (Şekil 4.26) ^{3}J bağ üzerinden etkileşim sadece H-1" protonu H-2" protonu arasında şeker gruplarının olduğu etkileşimlerde görülmektedir. COSY NMR teoriside komşu protonlar etkileşimi olduğundan normalde etkileşim olmaması gerekmektedir. Fakat aromatik B halkasının C-3' pozisyonunda bağlı metoksi protonlarının H-2' protonu ile ^{5}J uzak mesafe etkileşimi görülmüştür.

HSQC spektrumundan (Şekil 4.22) bileşiğin flavonol halkasının *δ*: 6.20 (δ= 99.4) ppm H-6, δ= 6.56 ppm (δ= 94.7) ppm H-8, δ= 7.32 ppm (δ= 105.3) H-2'/H-6' ve δ= 7.05 ppm (δ= 105.3) H-4' konumlarında ^{1}J etkileşimleri yaptığı belirlenmiştir. Ayrıca δ= 5.12 ppm'deki proton sinyalinin δ= 102.3 ppm'deki karbona bağlı olduğu ve dolayısıyla bu protonun, anomerik karbona bağlı anomarik proton olduğu belirlendi. *J*= 7.62 Hz'lik etkileşim sabitine sahip olan anomerik protonun halkaya β-bağı ile bağlı olduğu görüldü.

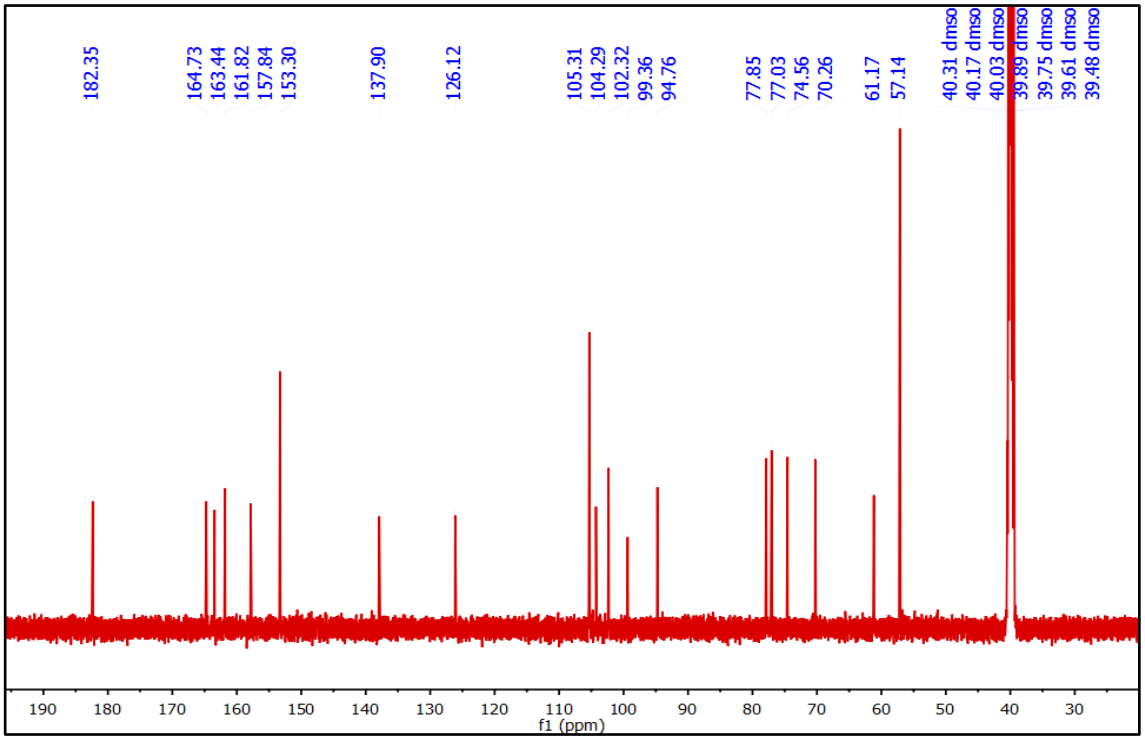
Yeni CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HMBC spektrumu (Şekil 4.24) incelendiğinde C5 konumunda bağlı olan -OH grubunun protonu C5 ile ^{2}J etkileşimi, C6 ile ^{3}J etkileşimi ve C10 ile ^{3}J etkileşimi göstermektedir. Flavon bileşiğinin A halkasında bulunan H-6 protonu sırasıyla C7 ile ^{2}J, C8 ile ^{3}J, C5 ile ^{2}J ve C10 ile ^{3}J uzak mesafe etkileşimleri yaptıkları belirlenmiştir. H-8 protonu sırasıyla C7 ile ^{2}J, C9 ile ^{2}J, C10 ile ^{3}J ve C6 ile ^{3}J uzak mesafe korelasyonları Şekil 4.39'da detaylı olarak verilmiştir. Flavonun B halkasında simetrik olarak konumlanan H-2'/H-6' proton sinyallerinin C3'-C5' ile ^{2}J, C4' ile ^{3}J, C1' ile ^{2}J, C2 ile ^{3}J, C3 ile ^{4}J ve hatta C4 ile çok uzak mesafe ^{5}J korelazasyonları görülmüştür. Flavonun B halkasındaki H-4' konumundaki protonun sırasıyla C3'/C5' ile ^{2}J, C2'/C6' ile ^{3}J ve C1' ile ^{4}J üzerinden **W** etkileşimi göstermiştir. Şeker grubunun δ= 5.12 ppm'de rezonans olan anomerik protonunun bileşiğin C halkasındaki δ= 137.9 ppm'de rezonans olan ve C3 konumundan ^{3}J (üç bağ üzerinden) bağlı olduğu karbona bağlı olduğu (3-O glikozit) belirlenmiştir. Moleküldeki metoksi grubundaki özdeş protonların bileşiğe C3'/C5' konumundan ^{3}J bağ üzerinden bağlı olduğu HMBC etkileşimi ile belirlenmiştir. Bileşiğin HMBC spektrumundaki tüm etkileşimler önerilen yapıyı doğrulamaktadır.

Çizelge 4.8 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)

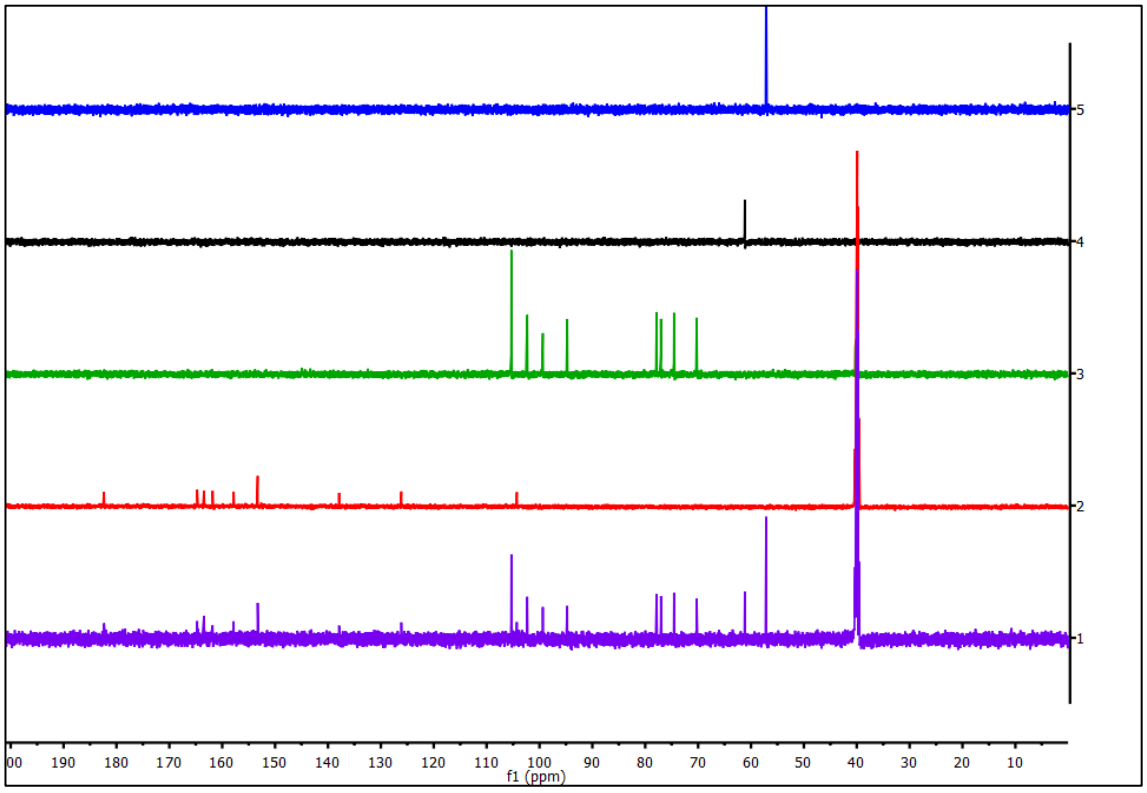
Konum	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) (*J*, Hz)
2	163.4	-
3	137.9	-
4	182.3	-
5	161.8	12.86 (-OH)
6	99.3	6.20 (brs)
7	164.7	10.89 (-OH)
8	94.7	6.56 (brs)
9	157.8	-
10	104.3	-
1'	126.1	-
2'	105.3	7.32
3'	153.3	-
4'	105.3	7.05
5'	153.3	-
6'	105.3	7.32
1''	102.3	5.12 (*d*, *J*= 7.62 Hz, β)
2''	77.03	3.18 (*m*)
3''	74.5	3.19 (*m*)
4''	77.8	3.03 (*m*)
5''	70.3	3.11 (*m*)
6''	61.2	3.57-3.37
-OCH_3	57.1	3.86 (*s*, 6H)



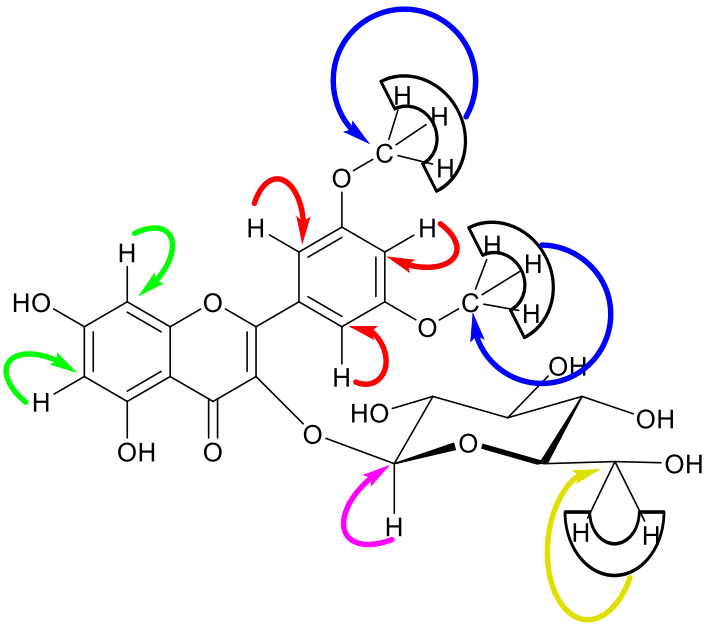
Şekil 4.18 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



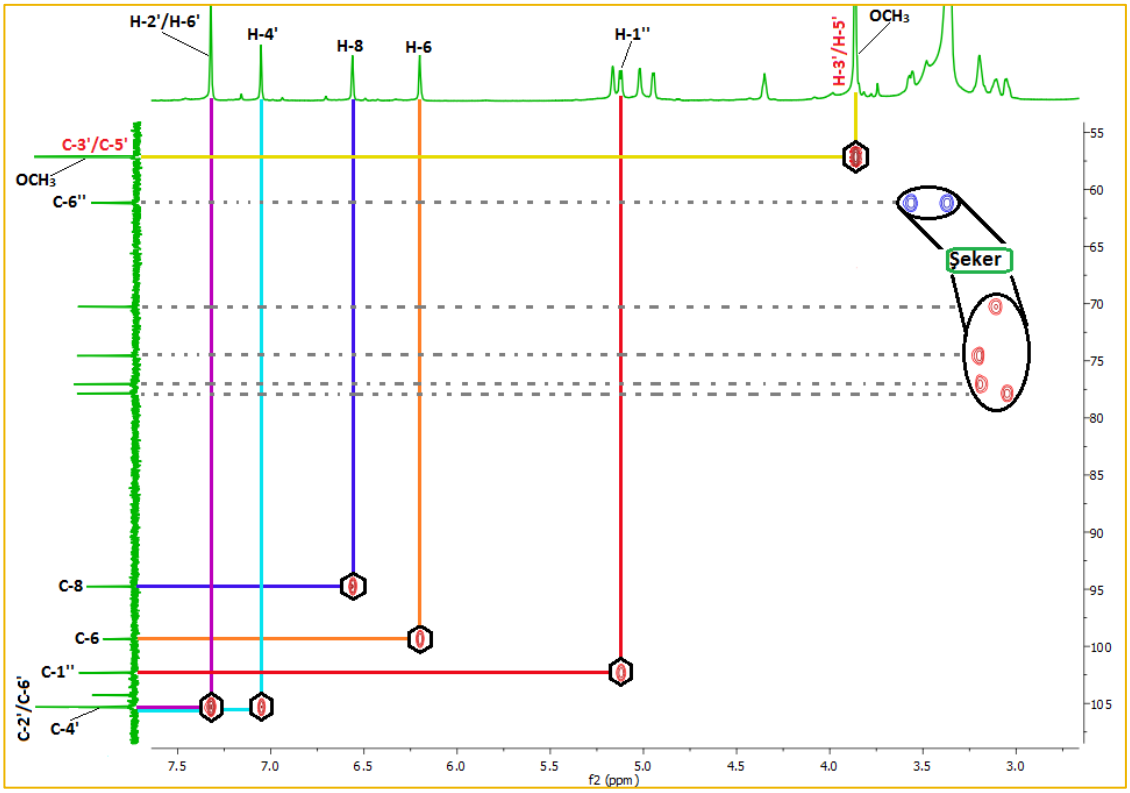
Şekil 4.19 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



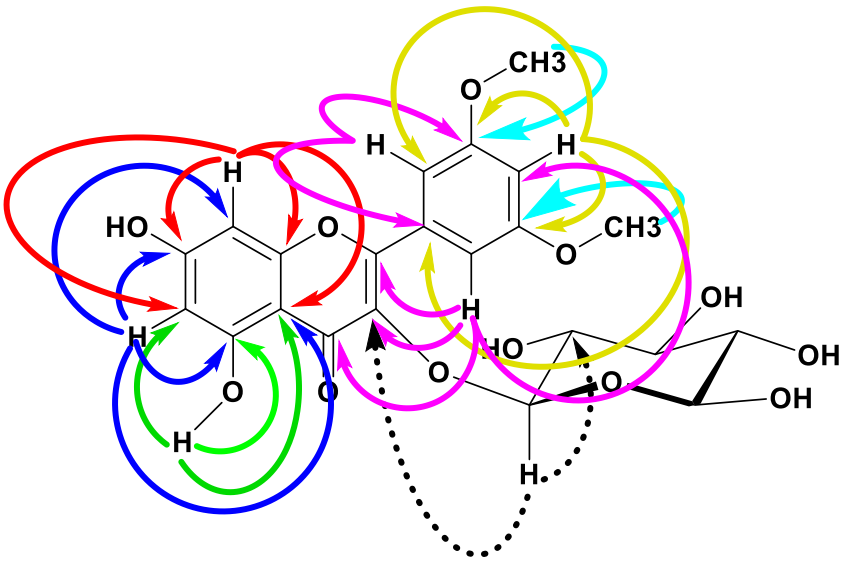
Şekil 4.20 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



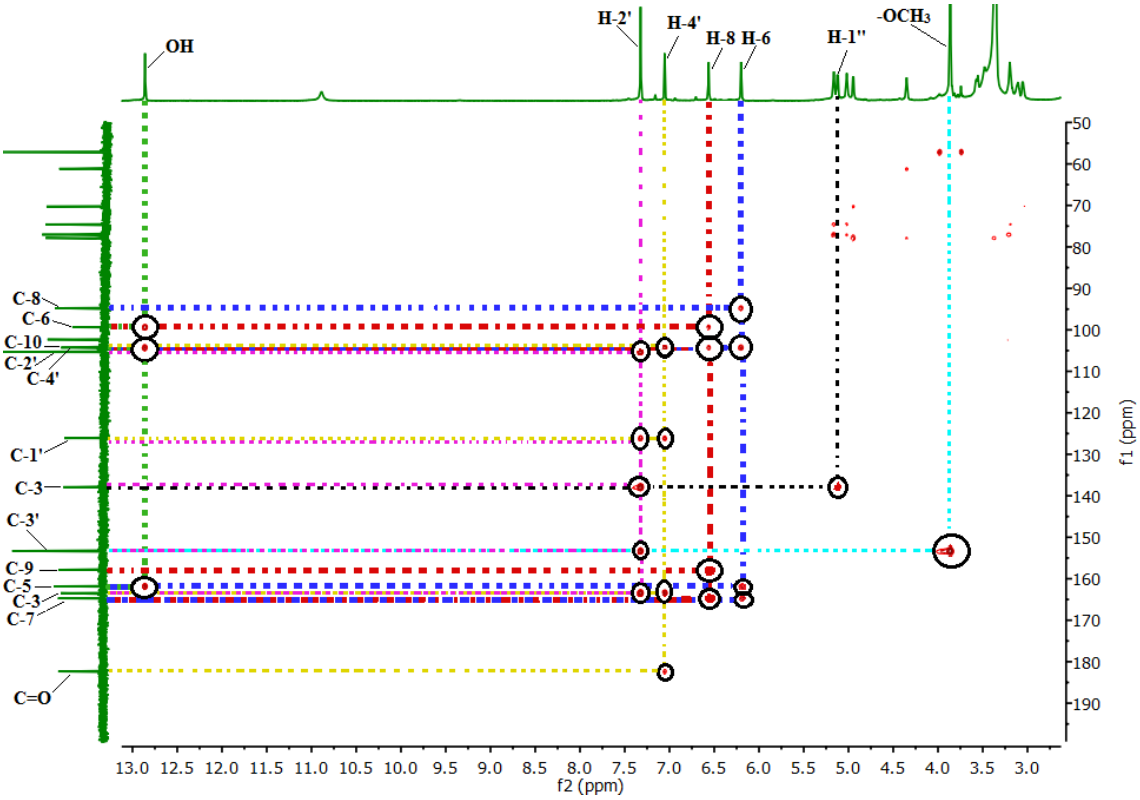
Şekil 4.21 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HSQC etkileşimi



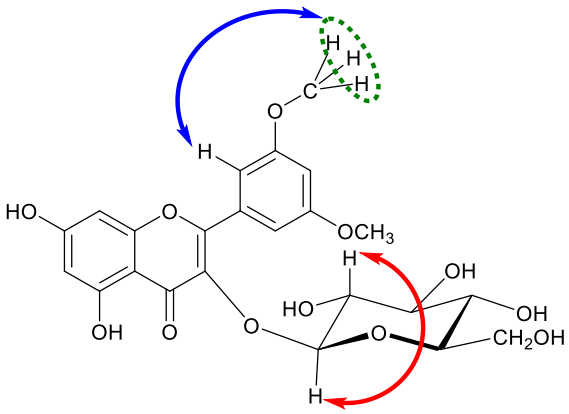
Şekil 4.22 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



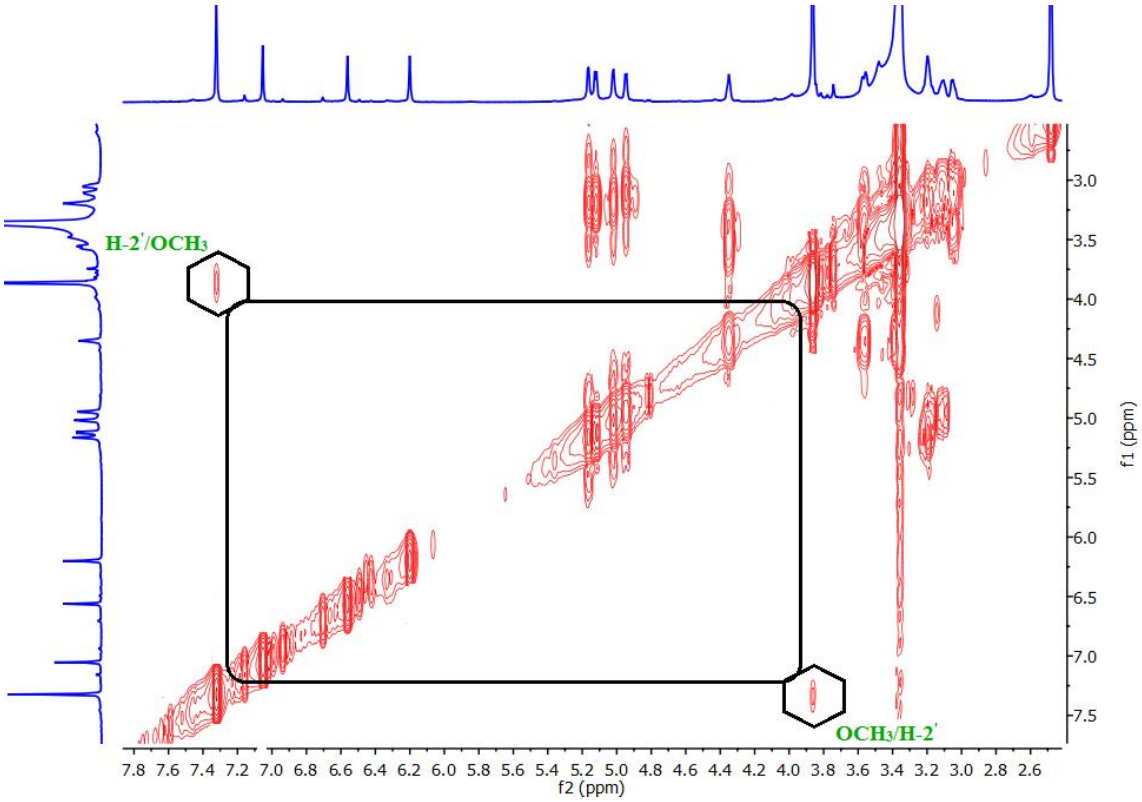
Şekil 4.23 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğine ait HMBC etkileşimi



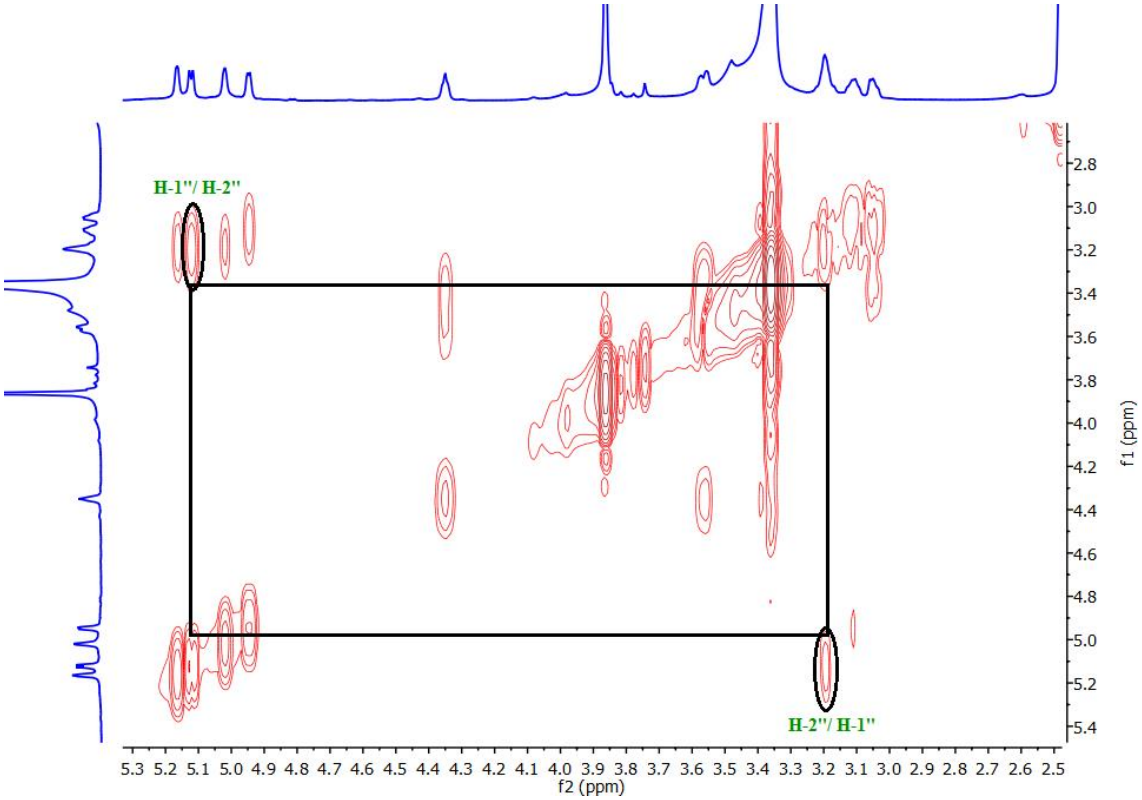
Şekil 4.24 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.25 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğine ait COSY etkileşimi



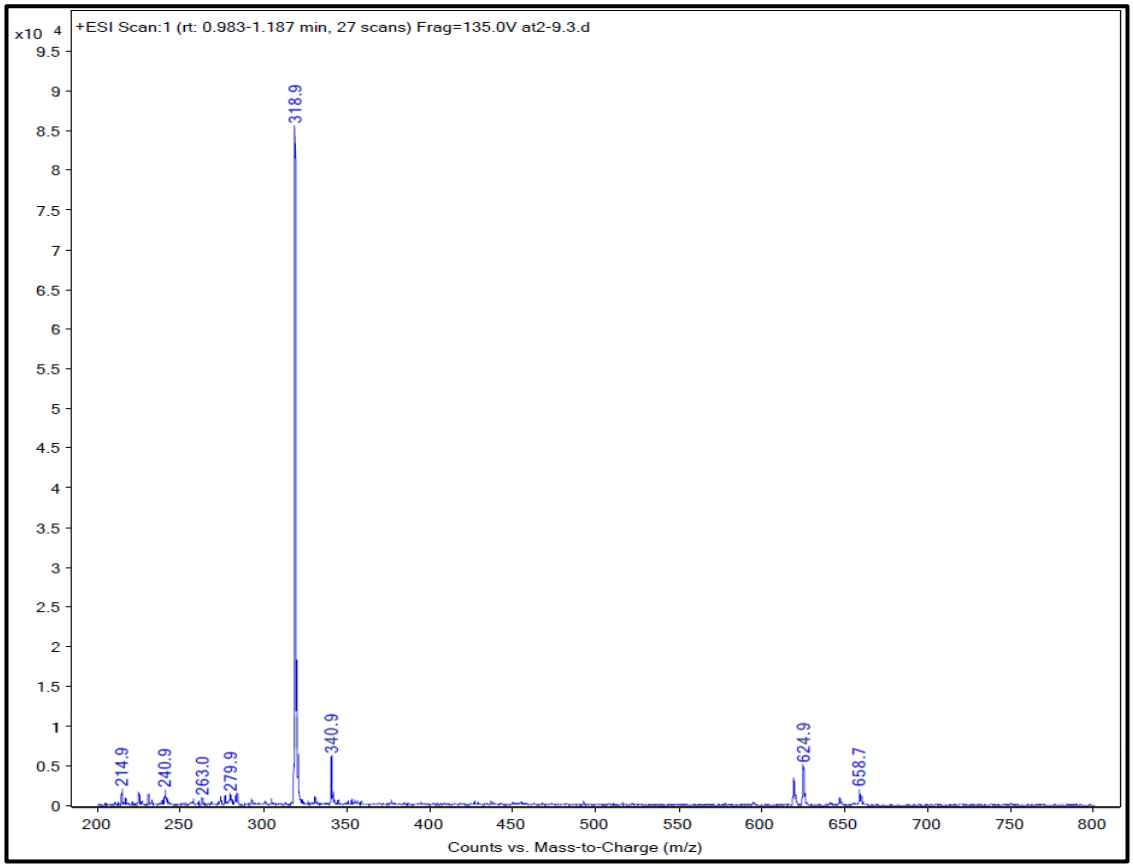
Şekil 4.26 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.27 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (devam) (DMSO-d_6)

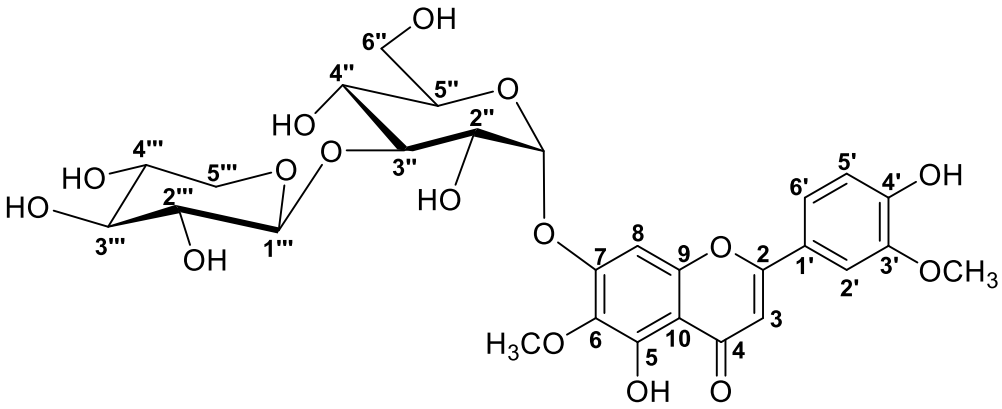
4.7.2 CCGY-9 Bileşiği (Cankiriense-2) (Jaceosidin 7-*O*-β-D glukoz-[1→3]-*O*-β ksiloz)

CCGY-9 bileşiği (Cankiriense-2) şeffaf sarı renkli çökelti halinde elde edildi. Bileşiğin kapalı formülü $C_{28}H_{32}O_{16}$ olarak bulunmuştur. Molekül pozitif modda iyonlaştırıldı. Teorik olarak m/z $[M-H]^+$ pozitif iyon kütlesi 625.1800 iken, analiz sonucunda 624.900 olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.28'de CCGY-9 bileşiğine ait MS spektrumu verilmiştir.



Şekil 4.28 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) MS spektrumu

CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) 1D ve 2D NMR yöntemleri ile alınan spektroskopik verilerin analizi sonucunda bileşiğin glikoz ve ksiloz şekerlerini bünyesinde bulunduran diglikozit yapısında flavon iskeletine sahip bir bileşik olduğu tanımlandı. CCGY-9 bileşiği jaceosidin flavon bileşiğinin yeni bir diglikozit türevi olduğu belirlendi ve Cankiriense-2 olarak adlandırıldı.



Şekil 4.29 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) kimyasal yapısı

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektumundan (Şekil 4.30), aromatik bölgede (δ= 6-8 ppm) rezonans olan 5 adet sinyalin var olduğu ve diğer proton sinyallerinin 3-5 ppm arasında rezonans olduğu ve buda bileşiğe bağlı iki şeker grubuna ait sinyaller olduğu belirlenmiştir. Proton NMR spektrumundan integrasyon değerleri 1 olan ve daha aşağı alanda rezonans olan δ= 7.55 ppm (*s*) ve δ= 7.56 ppm (*d, J*= 8.3 Hz) sinyallerin B halkasına ait H-2' ve H-6' sinyallerine ait olduğu, aynı zamanda etkileşim sabitinden ve daha yukarı alanda rezonans olmasından dolayı δ= 6.92 (*d, J*= 8.3 Hz) ppm'deki pik yine flavon bileşiğinin B halkasındaki H-5' protonuna ait sinyallerin bulunduğuna işarettir ve birbirleri etkileşim sabitlerinin yüksek olması *orto* pozisyonundan konumlandıklarını göstermektedir. Diğer yandan molekülde δ= 6.98 (s) ve δ= 7.03 (s) ppm'de aromatik sinyaller görülmüş olup bu sinyaller sırasıyla H-3 ve H-8 proton sinyallerine ait olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumundan iki adet -OH sinyalinin varlığı belirlenmiş olup δ= 12.92 ppm'deki sinyalin karakteristik pik olan molekül için hidrojen bağı yapmış asidik -OH grubuna ait olduğu, diğer sinyalin δ= 10.12 ppm'deki dinamik -OH grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Bileşiğe bağlı olan ve δ= 5.33 ppm (*d, J*= 6.13 Hz) rezonans olan sinyalin bileşikteki glukoz şekerine ait anomerik protonun (H-1") olduğu ve δ= 4.55 (*d, J*= 6.42 Hz) ppm'de rezonans olan sinyalin yapıdaki ksiloz şekerinin anomerik protonunun (H-1'") olduğu ve sahip olduğu etkileşim sabitlerinden dolayı şeker grubunun anomerik protonları olduğu ve β etkileşimi yaptığı snucuna varılmıştır. Ayrıca spektrumdan δ= 3.87 (s) ve δ= 3.75 (s) ppm'deki iki sinyalin rezonans olduğu ve integrasyon değerlerinin 3 olması bu piklerin iki ayrı metoksi sinyalleri olduğunu gösterdi.

Molekülün DEPT spektrumundan (Şekil 4.32) iki tane metil (-OCH_3), iki tane metilen (-CH_2), ondört tane metin (-CH) ve on tane kuarterner (-C) karbon gruplarının varlığı tespit edilmiştir. Aşağı alanda rezonans olarak δ= 182.6 ppm'de sinyal veren pik karakteristik bir pik olmakla beraber molekülün flavon bileşiği olduğunu ve C-3 konumunda herhangi bir sübstitüentin olmadığını göstermiştir.

Bileşiğin HSQC spektrumundan (Şekil 4.33) sırasıyla; flavon bileşiğine ait ve karakteristik C halkasına ait C-3 (δ= 103.5) konumlu H-3 (δ= 6.98 ppm, *s*) proton sinyali, karakteristik A halkasına ait C-8 (δ= 94.5) konumlu H-8 (7.03 ppm, *s*) proton sinyali, B halkasına ait pikler sırası ile; H-2' (δ= 7.55, *s*)→C-2' (δ= 110.6) ppm, H-5' (δ= 6.92, *d*)→C-5' (δ= 116.2) ppm ve H-6' (δ= 7.56, *d*)→C-2' (δ= 120.8) ppm'de rezonans olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin şeker gruplarına ait anomerik pikler sırası ile; H-1" (δ= 5.33, *d*)→C-1" (δ= 98.3) ppm ve H-1'" (δ= 4.55, *d*)→C-1'" (δ= 104.4) ppm'deki anomerik karbonlara doğrudan bağlılığı tanımlanmıştır. Moleküle ait aynı spektrumdan δ= 3.87 (3H) ppm→ δ= 56.4 ppm metoksi grubu ve δ= 3.75 (3H) ppm→ δ= 60.7 ppm metoksi grubu olmak üzere iki adet metoksi sinyali belirlenmiştir. Bileşiğe ait spektrumdan H-6" (δ= 3.44.3.68) ppm→C-6" (δ= 60.8) ppm ve H-5'" (δ= 3.33-3.61) ppm→C-6'" (65.16) ppm sinyalleri iki adet yapıda şeker grubuna ait diastrotopik protonların karbonlara bağlı olduğu ortaya konulmuştur.

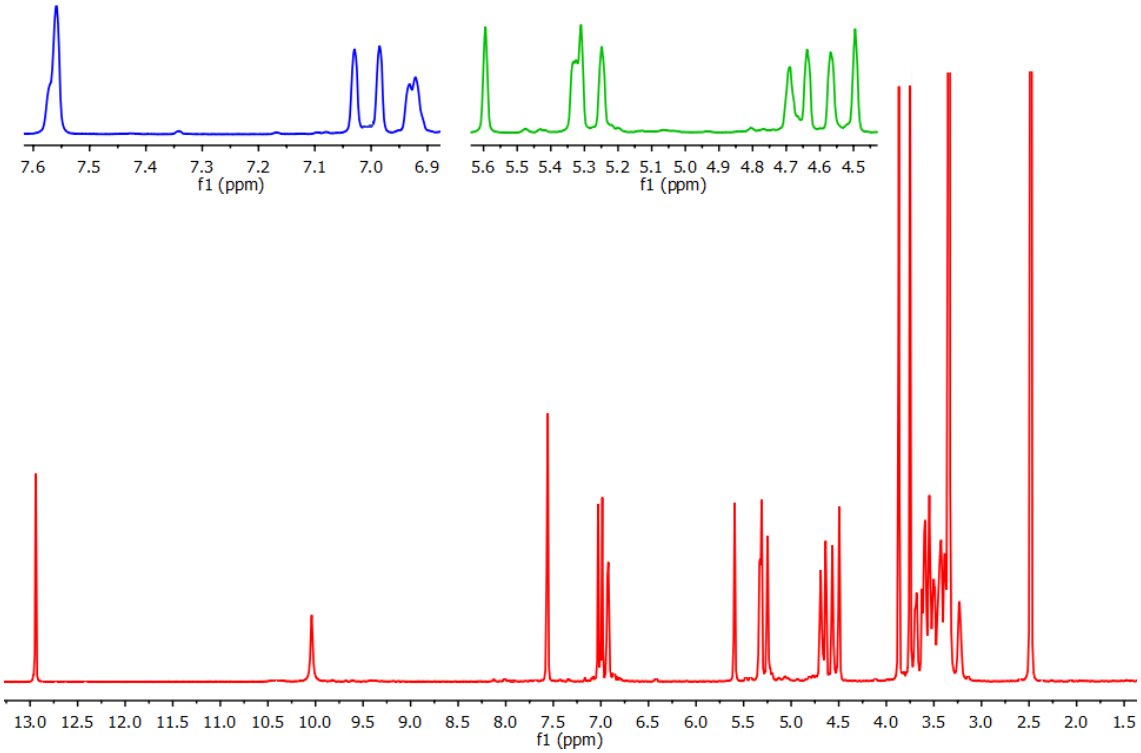
CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) HMBC spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.34), C5 konumunda bağlı olan -OH (δ= 12.9 ppm) protonu C5 (δ= 152.9 ppm) ile ^{2}J etkileşimi, C6 (δ= 132.8) ile ^{3}J etkileşimi ve C10 (δ= 106.1 ppm) ile ^{3}J etkileşimi ve C7 (δ= 156.4 ppm) ile ^{4}J çok azda olsa etkileşim göstermektedir. Flavon bileşiğinin A halkasında bulunan H-8 protonu sırasıyla C7 (δ= 156.5 ppm) ile ^{2}J, C6 (δ= 132.8 ppm) ile ^{3}J, C9 (δ= 152.5 ppm) ile ^{2}J ve C10 (δ= 106.1 ppm) ile ^{3}J uzak mesafe etkileşimleri yaptıkları belirlenmiştir. Flavonun C halkasında C3 (δ= 103.5 ppm) konumundaki H-3 (δ= 6.98, s) protonu sırasıyla; C10 (δ= 106.1 ppm) ile ^{3}J, C1' (δ= 121.8 ppm) ile ^{3}J ve C4 (δ= 182.8 ppm) ile ^{2}J ile uzak mesafe etkileşimleri HMBC spektrumundan elde edilmiştir. Flavon bileşiğinin B halkasında H-2' (δ= 7.55 ppm, s) protonu sırasıyla; C1' (δ= 121.8 ppm) ile ^{2}J, C6' (δ= 120.8 ppm) ile ^{3}J, C2 (δ= 164.6 ppm) ile ^{3}J, C3' (δ= 148.5 ppm) ile büyük ^{2}J etkileşimi ve C4' (δ= 151.3 ppm) ile ^{3}J ile etkileşimlerinin olduğu, H-5' (δ= 6.92 ppm, s)

proton sinyallerinin sırasıyla; C4' (δ= 151.3 ppm) ile ^{2}J, C3' (δ= 148.4 ppm) ile ^{3}J, C6' (δ= 120.8 ppm) ile ^{2}J ve C1' (δ= 121.8 ppm) ile ^{2}J etkileşimlerinin olduğu, H-6' (δ= 7.56 ppm, s) proton sinyallerinin sırasıyla; C1' (δ= 121.8 ppm) ile ^{2}J, C2' (δ= 110.6 ppm) ile ^{3}J, C2 (δ= 164.6 ppm) ile ^{3}J ve C4' (δ= 151.3 ppm) ile ^{3}J etkileşimi yapması ve metoksinin bağlı olduğu δ= 148.5 ppm'deki karbon ile etkileşim göstermemesi metoksinin C-3' pozisyonundan bağlı olduğunu göstermiştir. δ= 3.87 ppm'deki metoksi protonu δ= 148.5 ppm'deki C-3' ile korelazasyonu metoksinin C-3' konumundan bağlı olduğunu ve δ= 3.75 ppm'deki metoksi protonu δ= 132.8 ppm'deki C-6 karbonu ile korelazasyonunun bulunması metoksinin C-6 konumundan bağlı olduğunu göstermiştir. Bileşiğe ait şeker gruplarının konumu, δ= 5.33 ppm'deki anomerik protonun δ= 156.5 ppm'deki C-7 karbonu ile korelasyonun bulunması şekerlerin buradan bağlı olduğunu ve δ= 4.55 ppm'deki anomerik protonun şeker grubunun diastreotopik karbonuna bağlı hidroksi grubundan bağlı olduğunu göstermiştir. İki şeker birbirine H-3" pozisyonundan bağlı olduğu C-3" karbonunun δ= 81.2 ppm'de rezonans olması ile ve HMBC etkileşiminde bu etkileşimim çok net olması önerilen yapı ile uyum içinde olduğunu doğrulamaktadır.

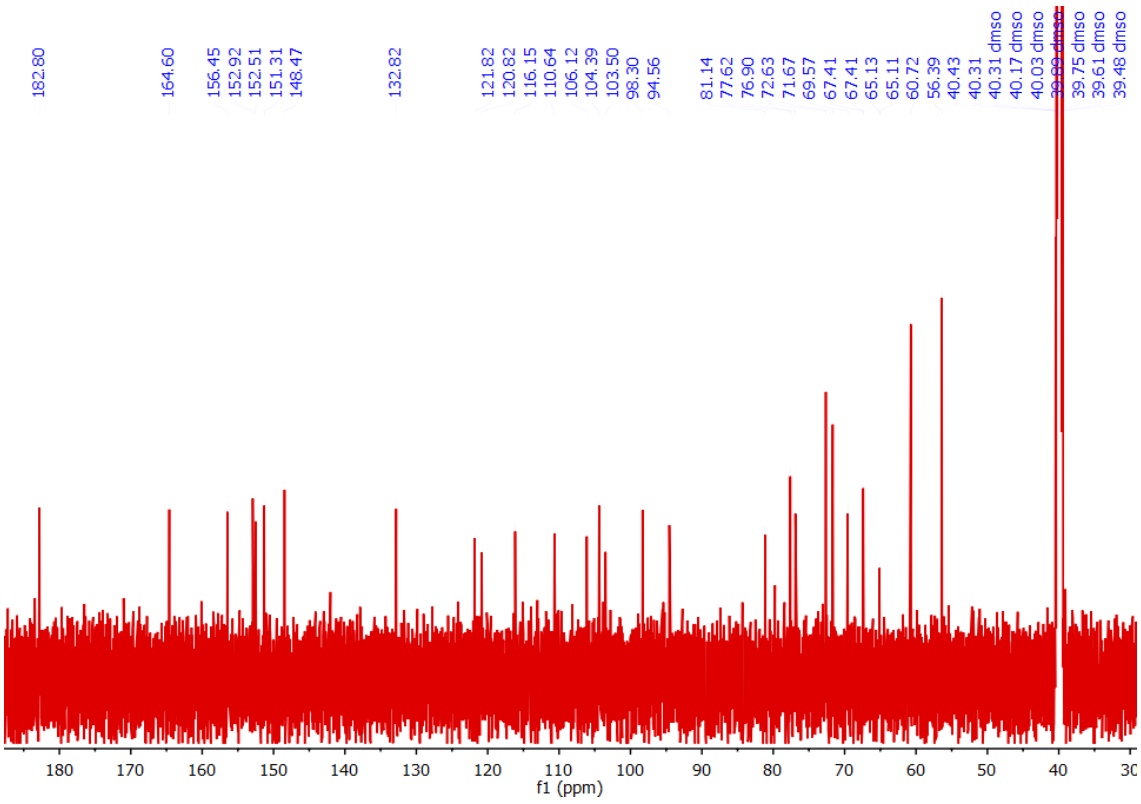
Bileşiğin homonükleer COSY spektrumu incelendiği zaman ^{3}J bağ üzerinden etkileşimlerin δ= 6.92 ppm'deki H-5' protonu ile δ= 7.56 ppm'deki H-6' protonu arasında olduğu, δ= 5.33 ppm'deki anomerik H-1" şeker protonunun δ= 3.57 ppm'deki H-2" protonu ile ve diğer δ= 4.55 ppm'deki anomerik H-1'" şeker protonunun δ= 3.41 ppm'deki H-2'" ile korelasyonları belirlenmiştir. Bileşiğin ^{1}H ve ^{13}C NMR değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)

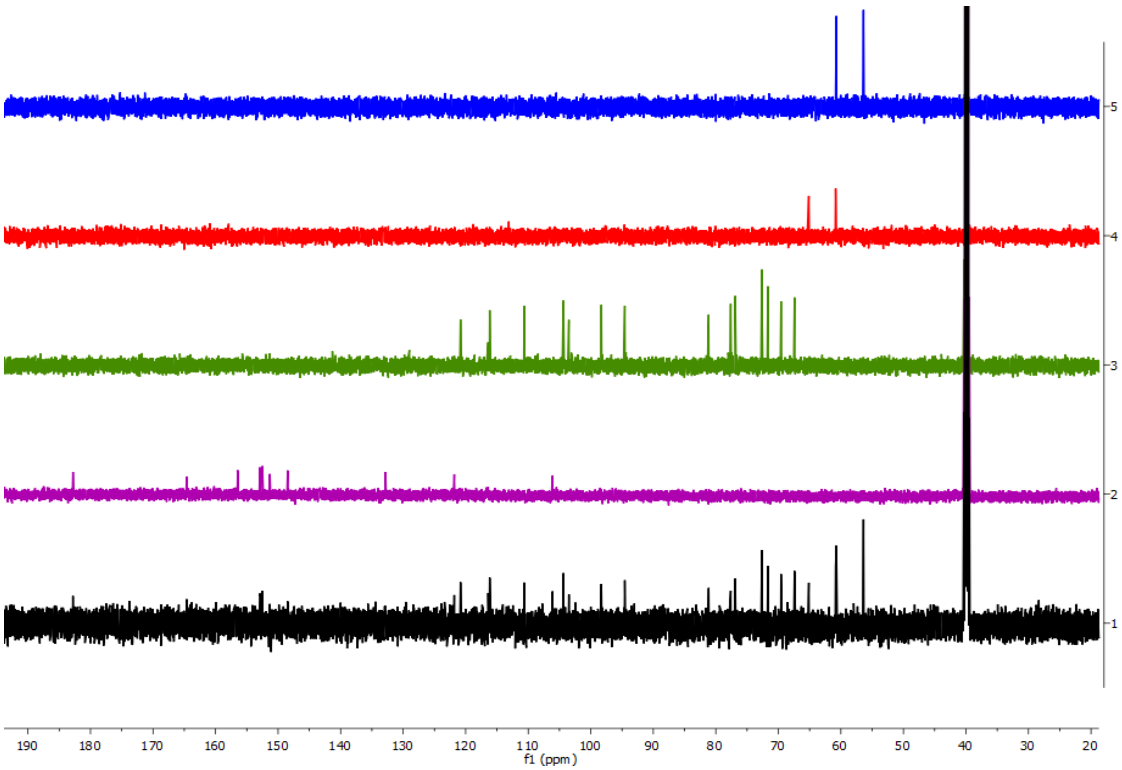
Konum	^{13}C (ppm)	^{1}H(ppm) (*J*, Hz)
2	164.6	-
3	103.5	6.98 (*s*)
4	182.8	-
5	152.9	-
6	132.8	-
7	156.5	-
8	94.5	7.03 (*s*)
9	152.5	-
10	106.1	-
-OCH$_3$	60.7	3.75 (*s*, 3H)
1'	121.8	-
2'	110.6	7.55 (*s*)
3'	148.5	-
4'	151.3	-
5'	116.2	6.92 (*d*, *J*= 8.4 Hz)
6'	120.8	7.56 (*d*, *J*= 8.3 Hz)
-OCH$_3$	56.4	3.87 (*s*, 3H)
1''	98.3	5.33 (*d*, *J*= 6.13 Hz)
2''	67.4	3.57 (*m*)
3''	81.2	3.54
4''	69.6	3.23
5''	77.6	3.50
6''	60.8	3.44-3.68 (*m*)
1'''	104.4	4.55 (*d*, *J*= 6.42 Hz)
2'''	71.8	3.41 (*m*)
3'''	76.9	3.54 (*m*)
4'''	72.8	3.37 (*m*)
5'''	65.1	3.33-3.61 (*m*)



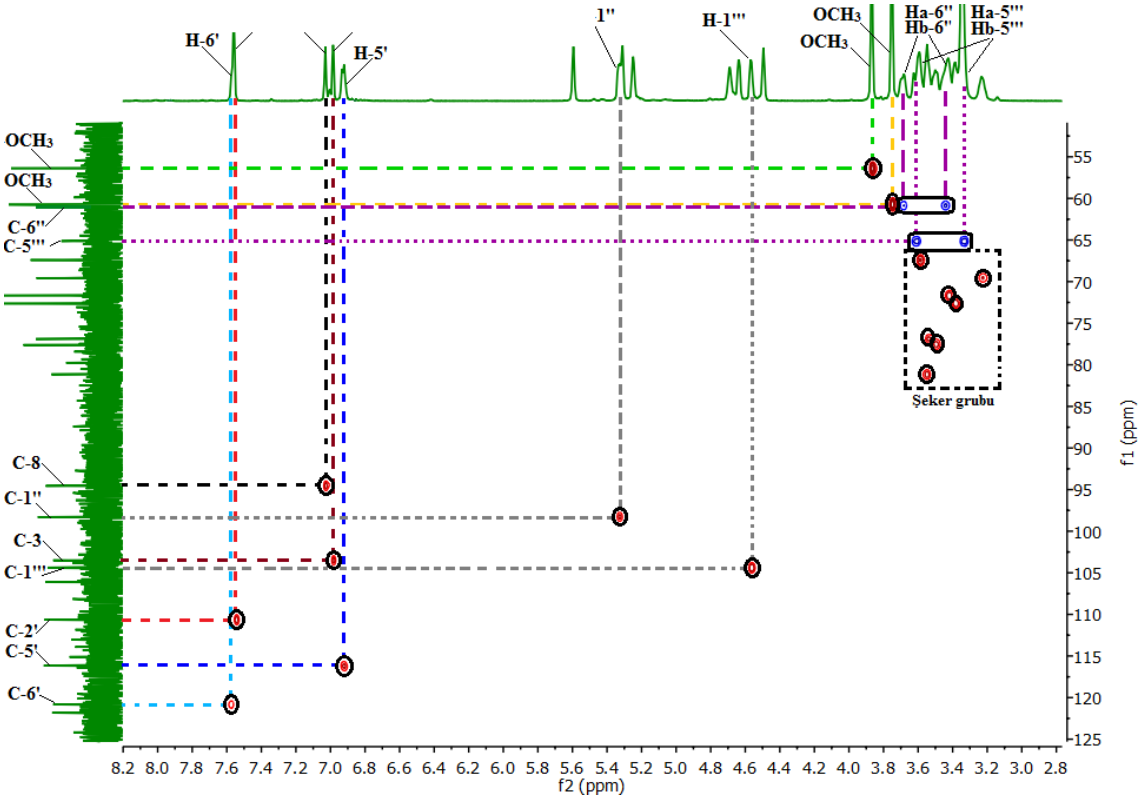
Şekil 4.30 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



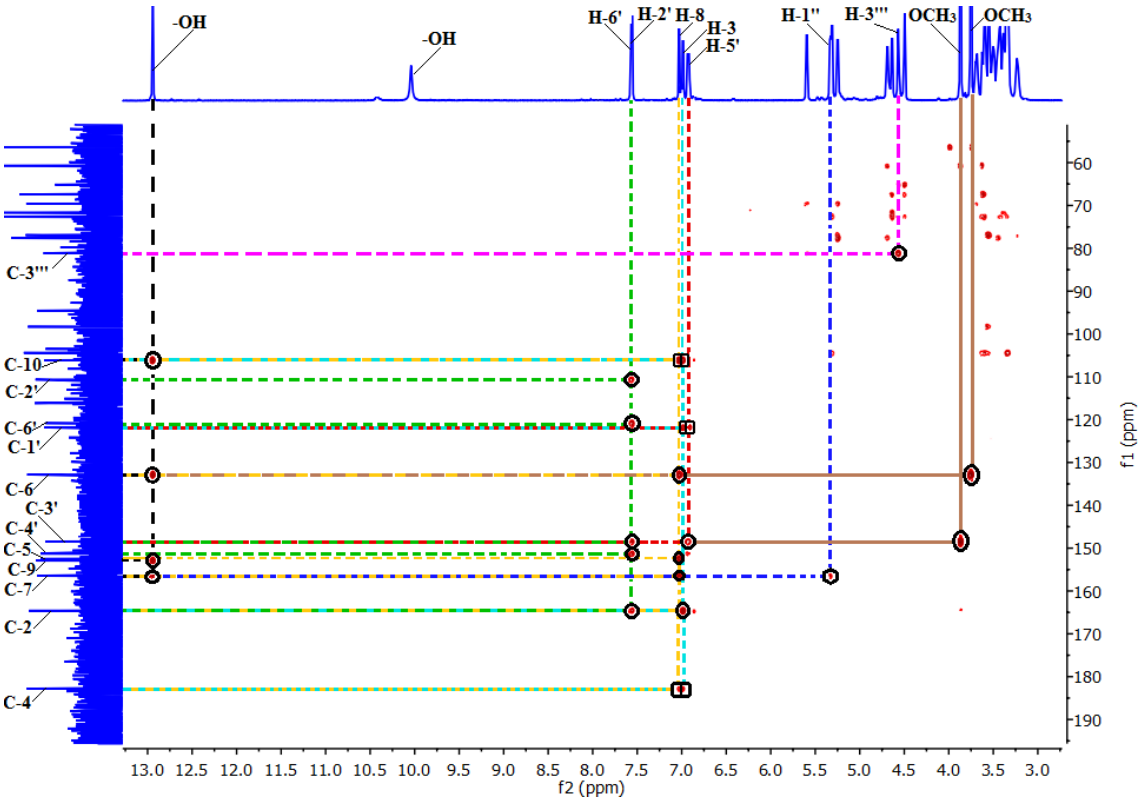
Şekil 4.31 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.32 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.33 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)

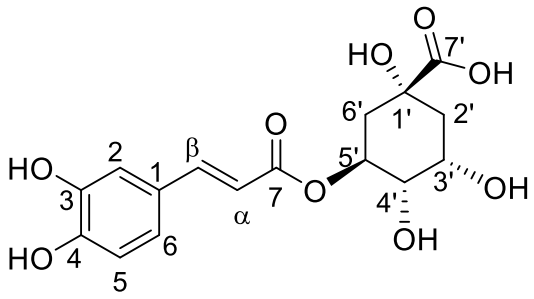


Şekil 4.34 CCGY-9 bileşiğinin (Cankiriense-2) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)

4.7.3 CCGY-2 Bileşiği (Klorojenik asit)

CCGY-2 bileşiği gri-açık kahverengi-beyaz karışımının oluşturduğu renkte amorf katı şeklinde elde edildi. UV λmax (metanol-su) 330, 270 nm aralığında ölçüldü. HPLC-TOF/MS kütle spektrumunda negatif modda görülen m/z $[M-H]^-$ 353.0826 ve $[M-162-H]^-$ kafeoil grubu parçalanma ürününün molekülden ayrılması ile 191.0522 molekül ağırlığına sahip olan moleküler iyon pikleri gözlendi. Bileşiğin kapalı formül $C_{16}H_{17}O_9$ ve 353.0871 molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir.

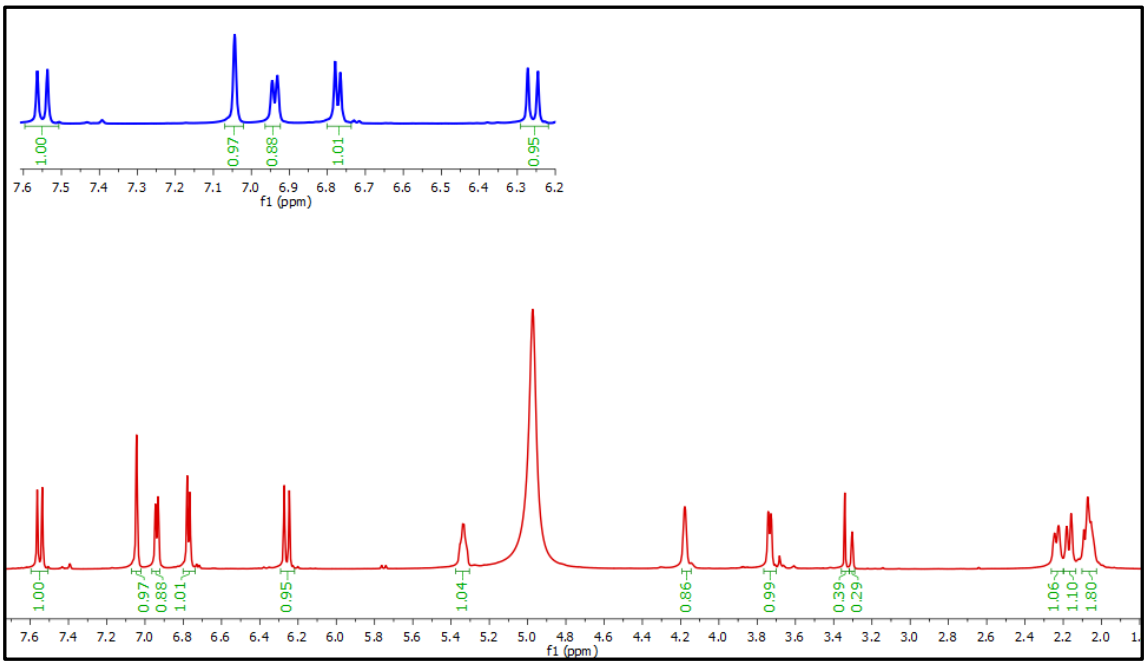
Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumuna göre, en belirgin pikler olan ve karbonil karbonuna α (H-α, δ= 6.25 Hz) ve β (H-β, δ= 7.54 Hz) pozisyonunda bulunan protonlar birbirleri ile *J*= 15.8 Hz'lik bir etkileşme sabitine sahiptirler. Buda birbirlerine *trans* pozisyonda bulunduklarını göstermektedir. Ayrıca H-α ve H-β protonlarının birbirleri ile büyük bir etkileşim gösterdikleri COSY spektrumundaki etkileşimlerden görülmüştür. Bileşiğin H-2 (δ= 7.04 ppm), H-5 (δ= 6.77 ppm, *d*, *J*= 8.2 Hz) ve H-6 (δ= 6.94, *d*, *J*= 8.2 Hz) numaralı protonlar birbiri ile etkileşmektedirler. Bu etkileşimler H-2'nin H-6 ile etkileşmesi *meta* etkileşmesi olmakla beraber H-5'in H-6 ile arasında *J*= 8.2 Hz'lik *orto* etkileşimi olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin DEPT spektrumundan altı adet kuarterner C, sekiz adet CH ve iki adet metilen CH_2 sinyali olmak üzere toplam onaltı karbon sinyali belirlenmiştir. COSY spektrumundan H-5 ve H-6 komşu protonlarının yüksek sinyalde etkileşime sahip oldukları belirlenmiştir. Bu etkileşim türü ile ABX sistemi oluşturulmuş ve benzen halkasında 3 ve 4 numaralı pozisyonların sübstitüentlerin bağlı olduğunu ve dolayısıyla molekülde trans kafeoil grubunun varlığıda teyit edilmiştir. HMBC etkileşiminden C-7 (δ= 167.5) numaralı karbon atomu δ= 5.34 ppm'deki multiplet rezonans olan H-3' protonu ile kolera durumda olduğu ve uzak mesafe etkileşimleri ile bileşiğe kuinik asit grubunun H-5' pozisyonundan bağlı olduğu ortaya konulmuştur. ^{13}C NMR göre, δ= 145.3 ve δ= 148.1 ppm kimyasal kayma değerine sahip sübstitüentler ise karakteristik pikler arasında olup birbirine komşu karbonlara bağlı -OH gruplarının rezonans etkilerinden kaynaklanmaktadır. ^{1}H ve ^{13}C NMR değerleri Çizelge 4.10'da detaylı şekilde verilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



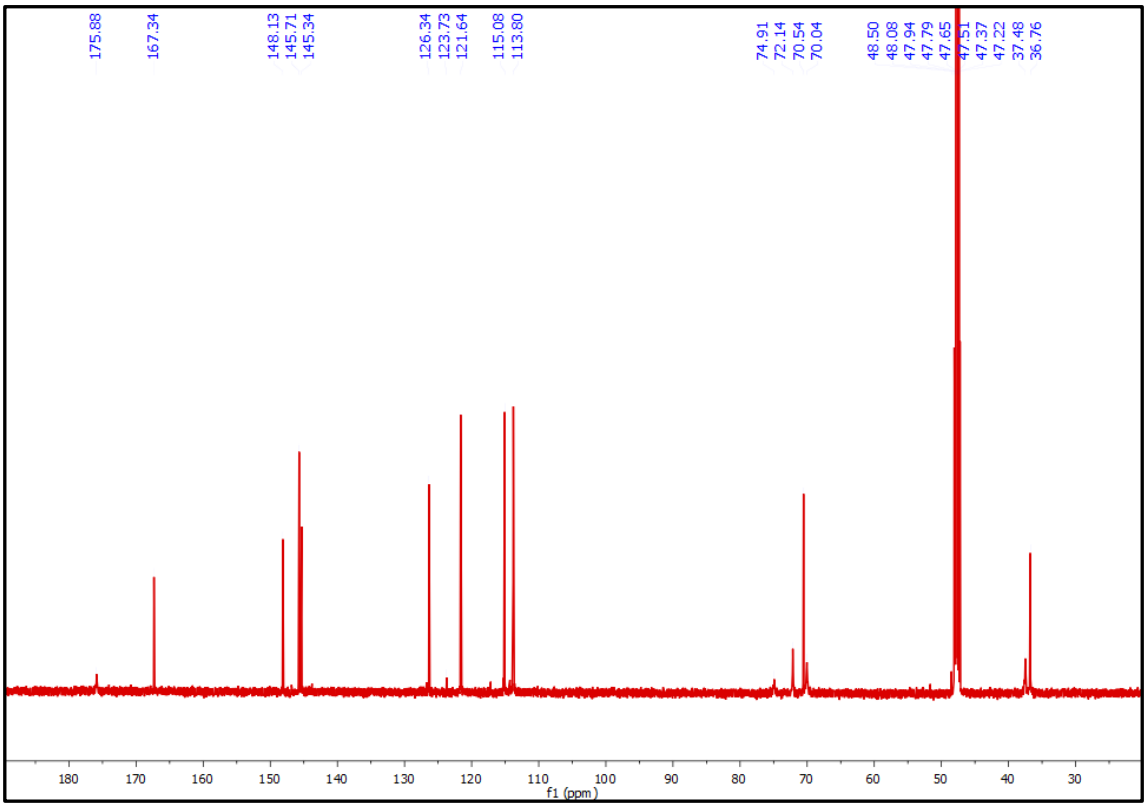
Şekil 4.35 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) yapısı

Çizelge 4.10 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR sinyalleri (MeOD-d_4)

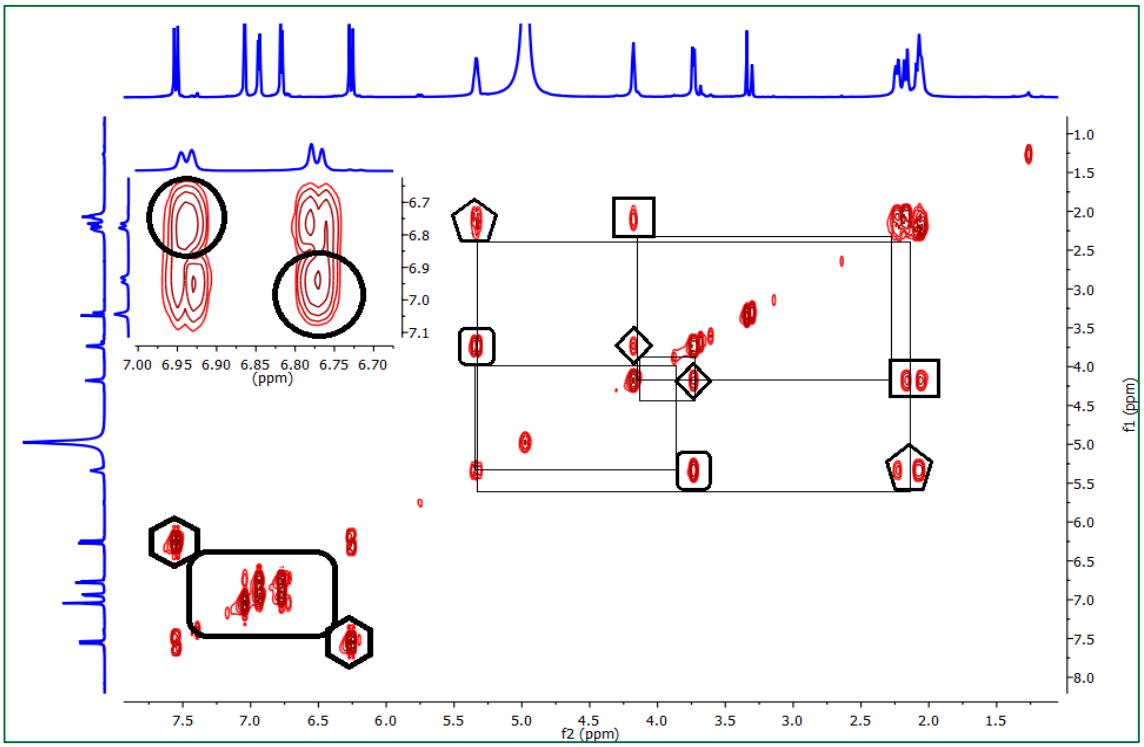
Konum	^{13}C (ppm)	^{1}H(ppm) (*J*, Hz)
1	126.3	-
2	113.8	7.04 (brs)
3	145.3	-
4	148.1	-
5	115.1	6.77 (*d*, 8.2 Hz)
6	121.6	6.94 (*d*, 8.2 Hz)
α	113.8	6.25 (*d*, 15. 8 Hz)
β	145.7	7.54 (*d*, 15.8 Hz)
7	167.3	-
1′	74.86	-
2′	36.7	1.78 (*dd*, J_1=13.0 ve J_2= 7.6 Hz) 2.03-1.98 (*m*)
3′	70.54	5.34 (*m*)
4′	72.08	3.74 (brs)
5′	68.62	4.18 (m)
6′	37.5	2.05-2.00 (*m*) 1.98-1.96 (*m*)
7′	175.9	-



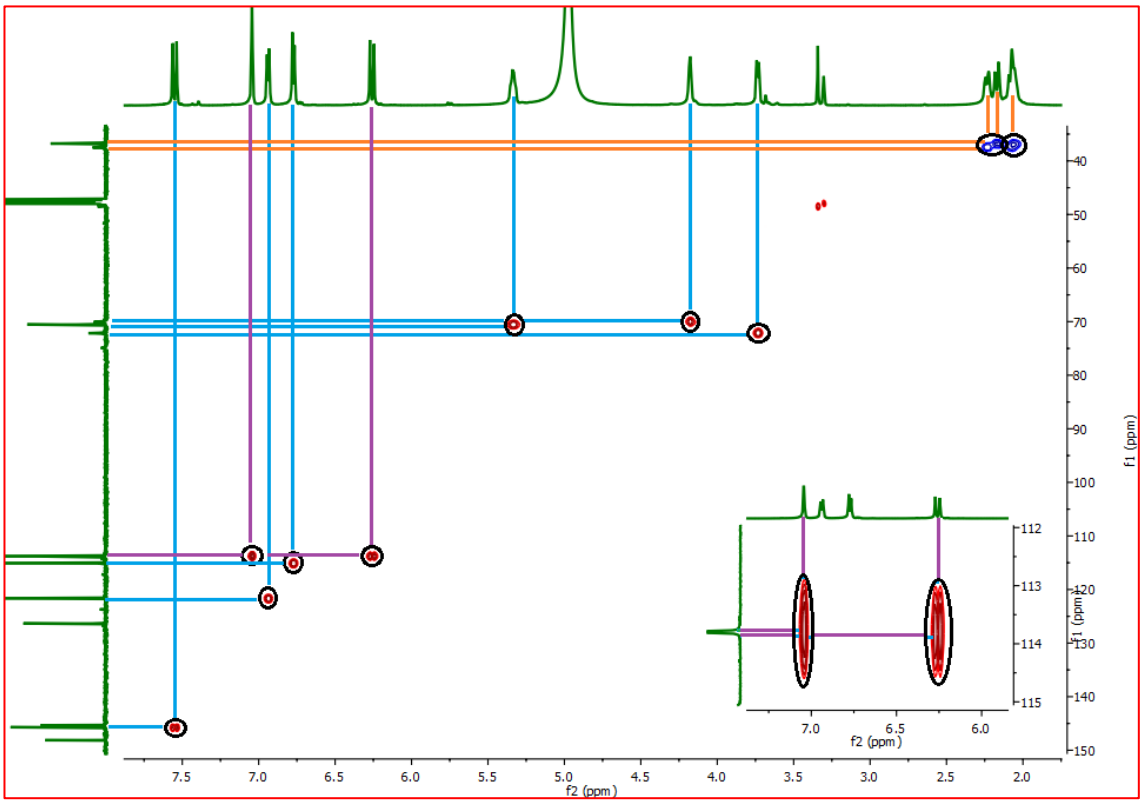
Şekil 4.36 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)



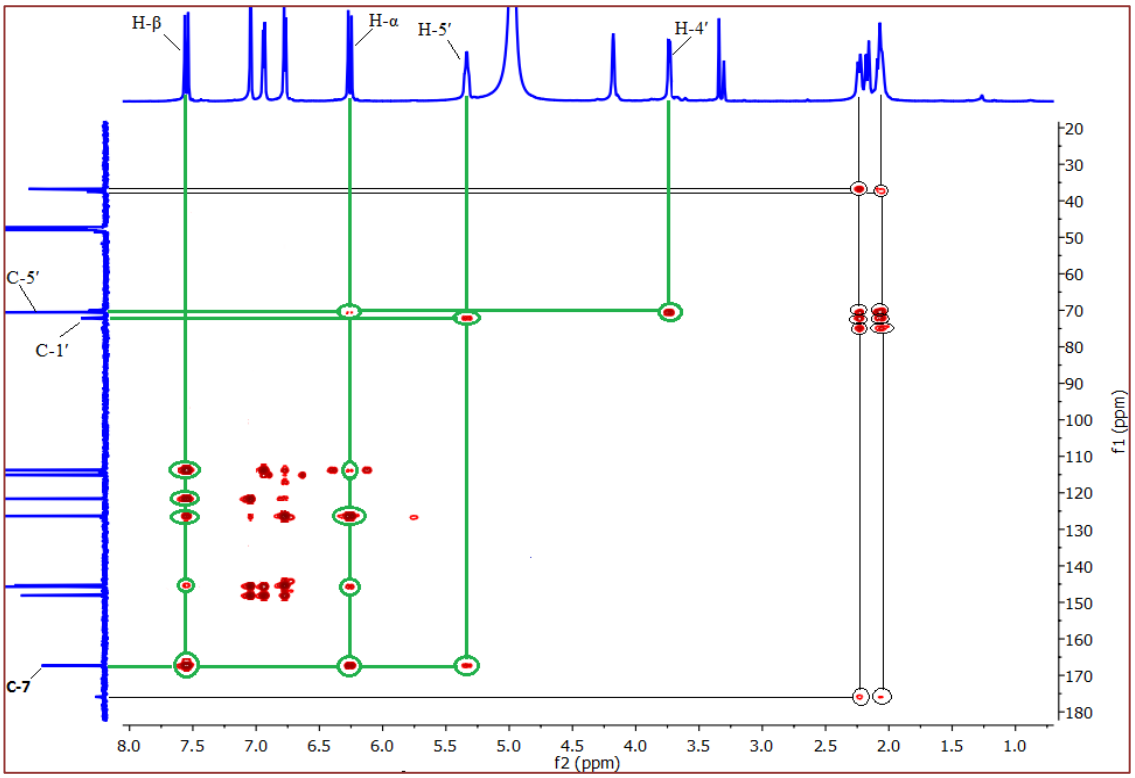
Şekil 4.37 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)



Şekil 4.38 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) COSY NMR spektrumu (MeOD-d_4)



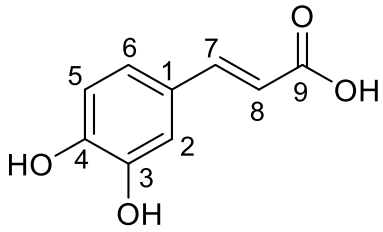
Şekil 4.39 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) HSQC NMR spektrumu (MeOD-d_4)



Şekil 4.40 CCGY-2 bileşiğinin (Klorojenik asit) HMBC NMR spektrumu (MeOD-d_4)

4.7.4. CCGY-4 Bileşiği (Kafeik asit)

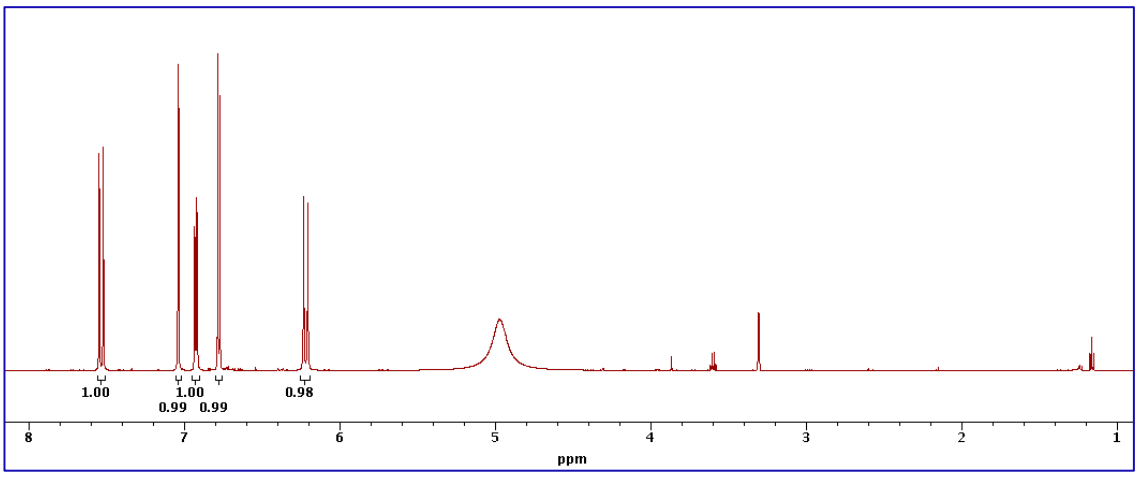
CCGY-4 bileşiğinin ^{1}H, ^{13}C (1D) ve 2D NMR spektrumlarına göre bileşiğin hidroksisinamik asit bileşik grubundan olduğu spektroskopik bulgular sonucu belirlenmiştir. Bileşiğe ait DEPT spektrumu incelendiğinde bileşiğin 5 adet CH metin grubuna ve 4 adet C kuarterner karbona sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.44). Bileşikteki proton NMR spektrumunda (Şekil 4.42) bileşiğin karakteristik piki olan δ= 6.14 ppm'de ve δ= 7.38 ppm'de dublet şeklinde sinyal veren piklerin birbirleri ile korelasyonu ve etkileşim sabitinin *J*= 15.8 Hz'lik olmasından dolayı birbirlerine *trans* konumunda bulundukları tespit edilmiştir. Bileşiğin COSY spektrumundan (Şekil 4.47) *trans* etkileşimi gerçekleştiren protonların H-8 ve H-7 konumunda birbirlerine komşu α ve β protonlarının olduğu belirlenmiştir. Bu etkileşim COSY spektrumunda sinyal gücü yüksek olmasından da anlaşılmaktadır. Bileşiğin HMBC spektrumu (Şekil 4.46) incelendiğinde δ= 169.7 ppm'de rezonas olan karbonil karbonunun α ve β protonları ile korelasyonu yapı ile uyumludur. Burada hem proton hemde karbon atomlarının karbonil karbonuna komşu olmaları rezonans değerlerinin de farklı olduğunu göstermektedir. α ve β doymamış yapıdaki konjugasyonundan dolayı C-7 karbonu üzerindeki azalan elktron yoğunluğundan dolayı daha aşağı alanda rezonans olmaktadır. Bileşiğin asit ve kafeoil grubu, içerdiği H-7 ve H-8 (α ve β protonları) protonlarının δ= 126.4 ppm'de sinyal veren C-1 karbonu ile uzak mesafe etkileşim gösterdiği HMBC spektrumundan da belirlenmiştir (Şekil 4.46). Spektrumdan sırasıyla δ= 6.78, δ= 6.94 ve δ= 7.01 ppm'de rezonans olan pikler aromatik halkaya bağlı H atomlarına aittir. Bu piklerin integrasyon değerleri 1 H'a karşılık gelmektedir. ^{1}H-NMR spektrumundan H-5 ve H-6 protonlarından H-5, δ= 6.78 ppm'de *J*= 8.2 Hz'lik bir dublet sinyali vermiştir. Aromatik halkada bu değerde etkileşim sabitine sahip olan ve COSY spektrumundanda belirlenen etkileşim türü *orto* etkileşimdir. δ= 6.94 ppm'deki H-6 protonu H-5 ile *J*= 8.2 Hz'lik orto etkileşimi ve H-2 ile *J*= 2.01 Hz'lik *meta* etkileşim ile *dd* şeklinde yarılma göstermektedir. Spektrumdan ayrıca C-3 ve C-4 konumunun HSQC spektrumuna göre etkileşim olmaması bu konumun dolu olduğunu ve δ= 145.3 ve δ= 148.0 ppm'deki karakteristik piklerin komşu –OH sübstitüentinin bağlı olduğunu göstermiştir. NMR spektrumları incelendiğinde bileşiğin kafeik asit olduğu literatür verileri karşılaştırılarak teyit edilmiştir.



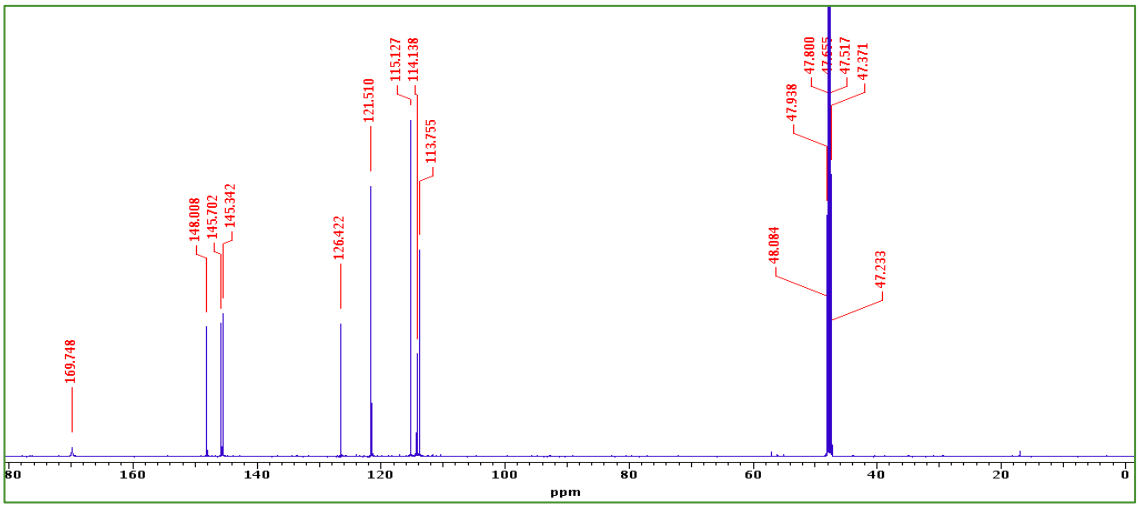
Şekil 4.41 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) yapısı

Çizelge 4.11 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (MeOD-d_4)

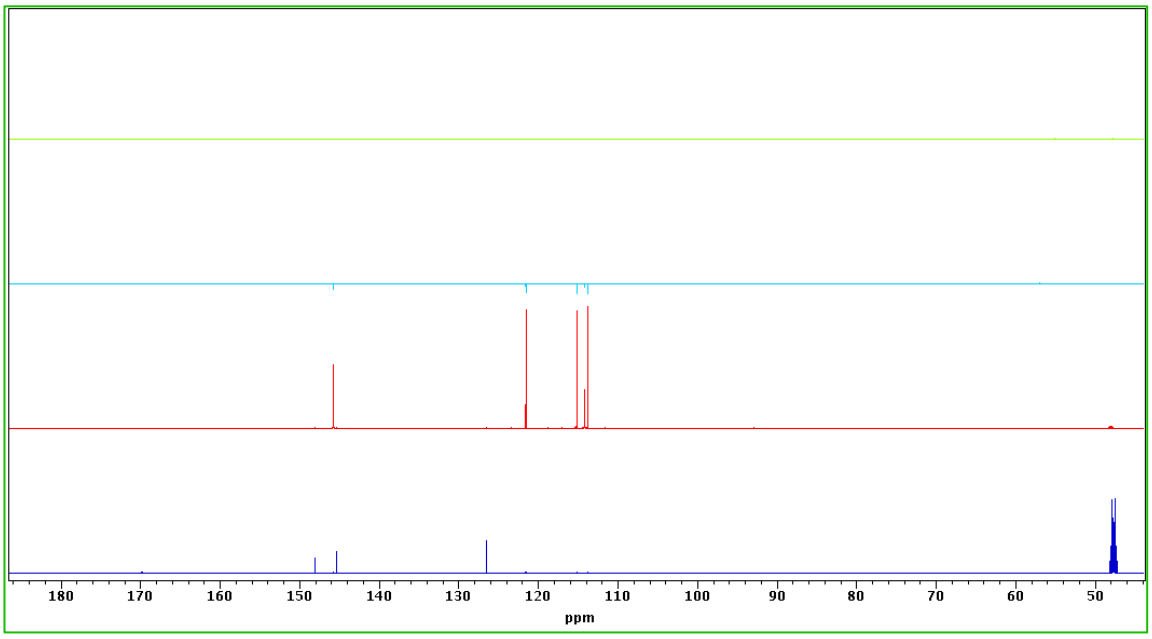
Konum	^{13}C (ppm)	^{1}H(ppm) (*J*, Hz)
1	126.4	-
2	114.1	7.01 (brs)
3	145.3	-
4	148.0	-
5	115.1	6.78 (*dd*, J_1= 8.2 Hz, J_2= 2.01 Hz)
6	121.5	6.94 (*d*, *J*= 8.2 Hz)
7 (β)	145.7	7.38 (*d*, *J*= 15.8 Hz, *trans*)
8 (α)	113.6	6.14 (*d*, *J*= 15. 8 Hz, *trans*)
9	169.7	-



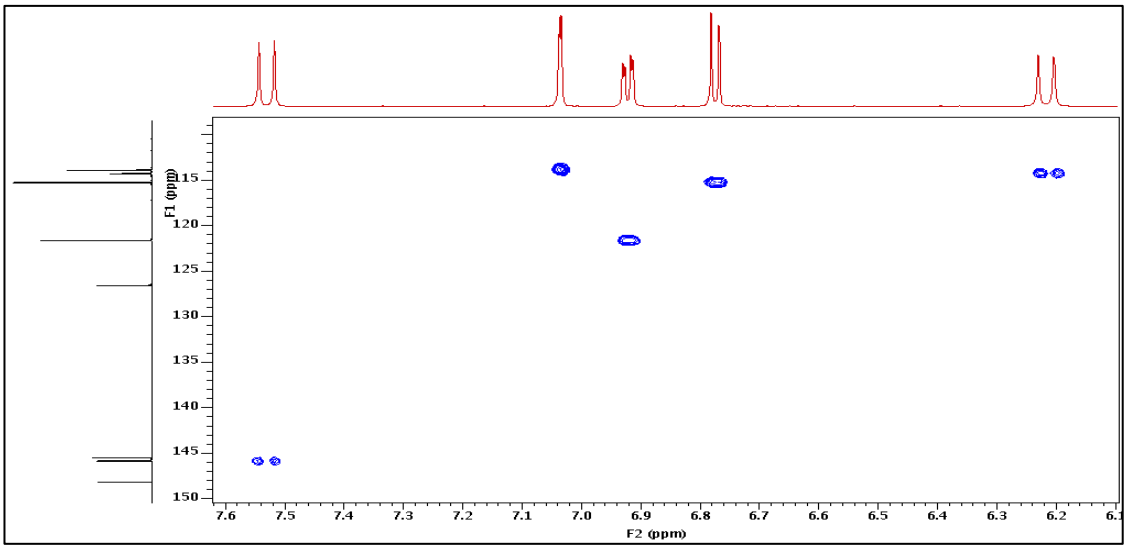
Şekil 4.42 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)



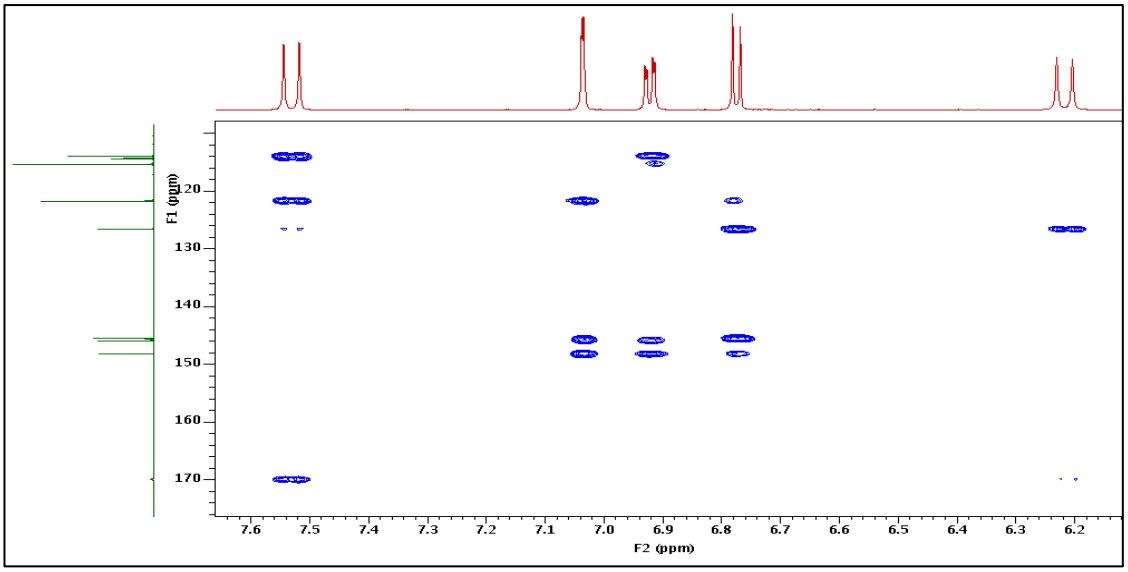
Şekil 4.43 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)



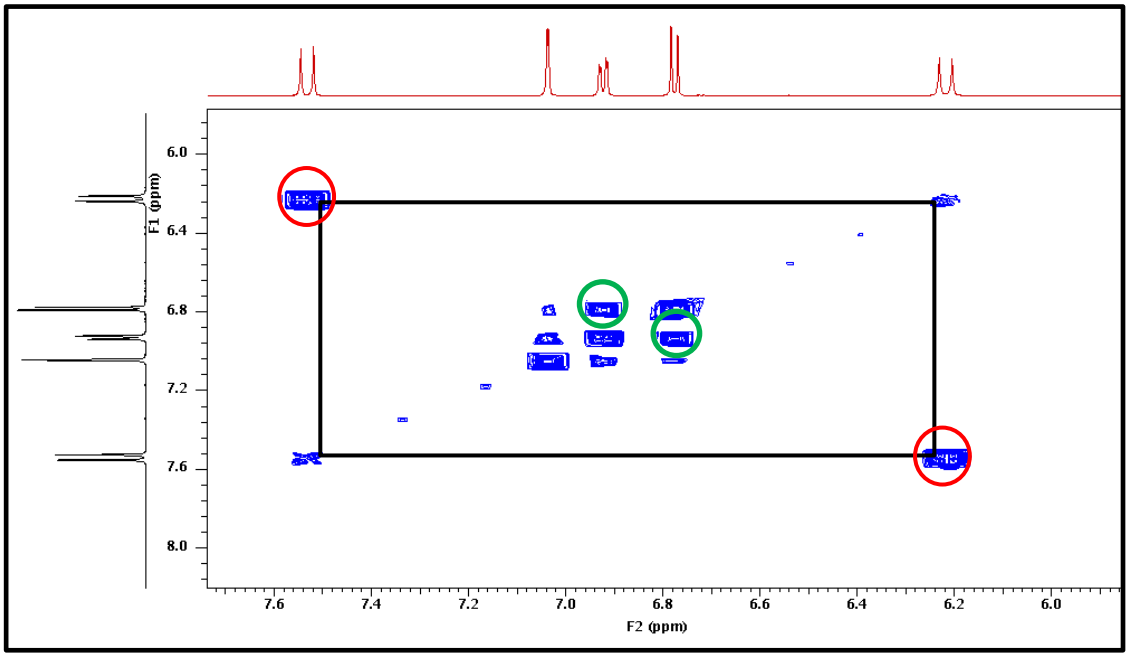
Şekil 4.44 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) DEPT NMR spektrumu (MeOD-d_4)



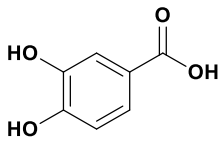
Şekil 4.45 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) HSQC NMR spektrumu (MeOD-d_4)



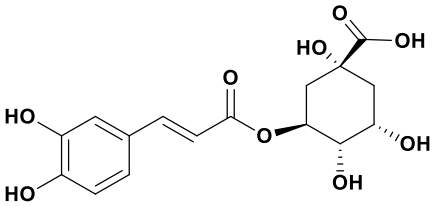
Şekil 4.46 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) HMBC NMR spektrumu (MeOD-d_4)



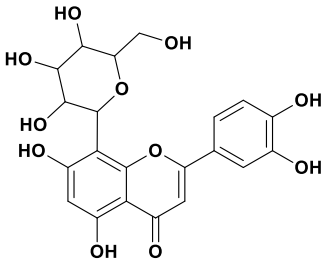
Şekil 4.47 CCGY-4 bileşiğinin (Kafeik asit) COSY NMR spektrumu (MeOD-d_4)



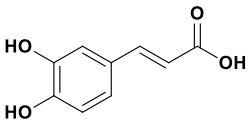
CCGY-1
3,4-dihidroksi benzoik asit



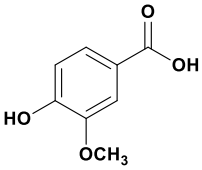
CCGY-2
Klorojenik asit



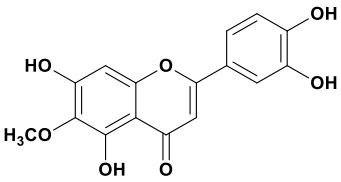
CCGY-3
Orientin



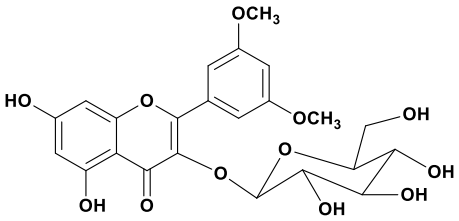
CCGY-4
Kafeik asit



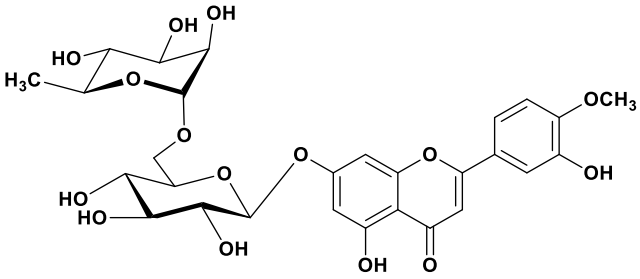
CCGY-6
Vanilik asit



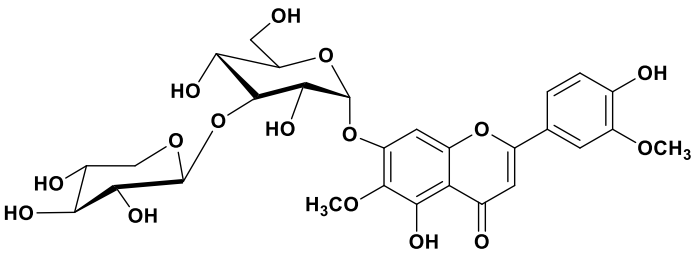
CCGY-7
Nepetin



CCGY-5
Cankiriense-1



CCGY-8
Diosmin



CCGY-9
Cankiriense-2

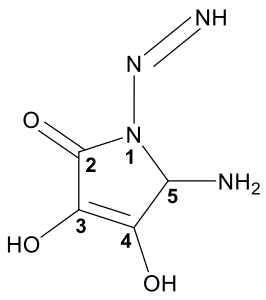
Şekil 4.48 *C. cankiriense* Gövde-Yaprak (CCGY) kısmından izole edilen bileşikler

4.8 *C. paphlagonica* Bitkisinin Çiçek (CPÇ) Kısmından İzole Edilen Bileşikler

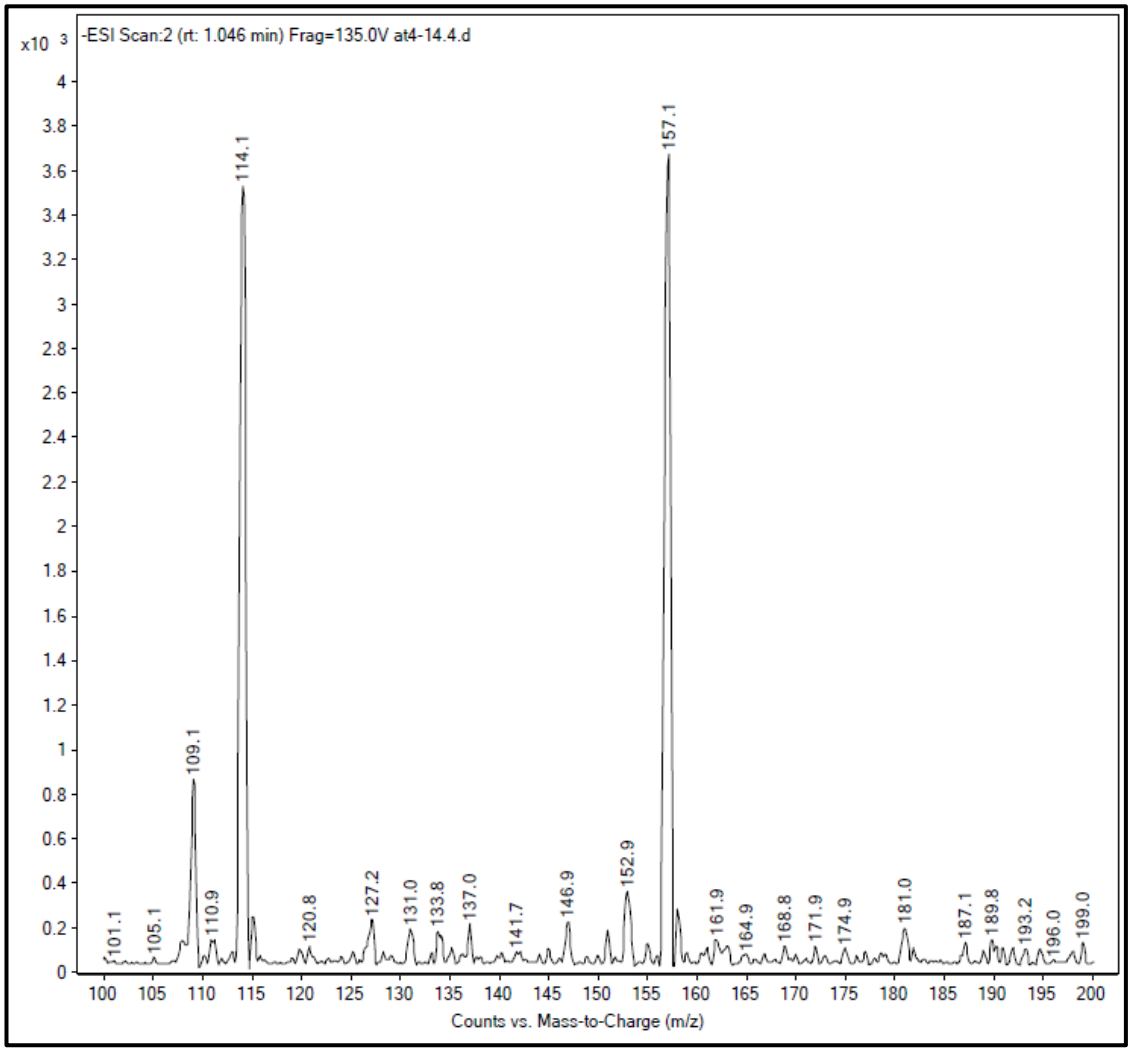
Antiproliferatif aktiviteye sahip *C. paphlagonica* bitkisinin çiçek kısmından elde edilen bitki ekstrelerinin aktivite yönlendirmeli izolasyonu ve buna ait detaylı izolasyon şeması Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de detaylı verilmiştir. *C. paphlagonica* bitkisinden 1 tane yeni azotlu bileşik [**CPÇ-12 (Paphlagonica-1):** 5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on] ve 13 tane bilinen bileşik saflaştırıldı ve yapısı spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. Bilinen bileşikler arasında bir adet fitosterol [CPÇ-11: Daucosterin (Demirtas *et al.* 2017)], altı adet flavon türevi [CPÇ-9: Tamariksetin 7-*O*-β glukozit, CPÇ-10: Kuersimetrin (Legault *et al.* 2011), CPÇ-7: Kuersetin (Liu *et al.* 2010), CPÇ-5: Tamariksetin (Parajuli *et al.* 2018), CPÇ-13: Tamariksetin 7-O-β rutinozit (Harborne and Mabry 2013), ve CPÇ-14: Rutin (Shi *et al.* 2016)], 4 tane hidrosinnamik asit türevi [CPÇ-8: 1,3-dikafeoilkuinik asit (Zheng *et al.* 2018), CPÇ-4: 5-*O*-kafeoil şikimik asit (Ivanova *et al.* 2010), CPÇ-6: klorojenik asit metil ester (Liu *et al.* 2020), CPÇ-2: Vanilik asit (Costa *et al.* 2014)], iki adet fenolik asit türevi [CPÇ-1: Pirokateşol (Huang *et al.* 2014), CPÇ-3: 3,4-dihidroksi benzoik asit (Guria *et al.* 2013)] izole edilmiş ve literatürler ile uyumludur.

4.8.1 CPÇ-12 Bileşiği (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) (Paphlagonica-1)

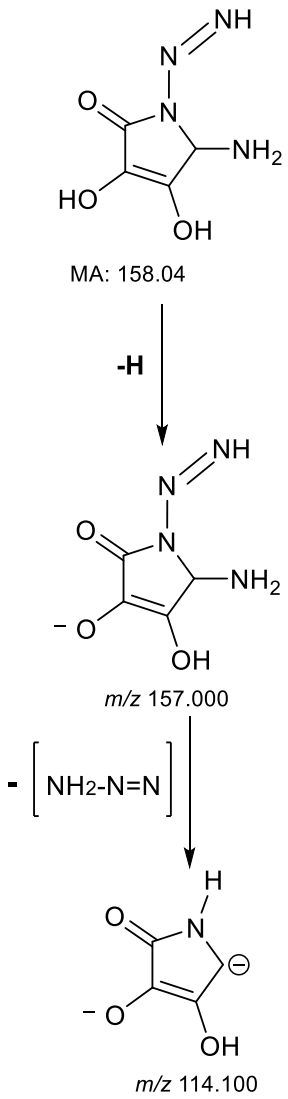
CPÇ-12 bileşiği parlak beyaz-sarı renkli katı kristal şeklinde elde edildi. Bileşiğin NMR spektral verilerinden kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde aydınlatıldı ve literatür için yeni bir bileşik olduğu belirlendi. Molekülün kapalı formülü $C_4H_6N_4O_3$ olarak belirlendi. Molekül LC/MS-MS cihazında negatif modda m/z $[M-H]^-$ 157.000 iyon kütlesine sahip olduğu ve [M-43-H] grubunun molekülden ayrılması ile 114.1000 moleküler iyon piki gözlendi. Şekil 4.50'de CPÇ-12 bileşiğine ait MS spektrumu ve Şekil 4.51'de tahmini MS-MS parçalanma ürünleri verilmiştir.



Şekil 4.49 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) kimyasal yapısı



Şekil 4.50 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) MS spektrumu



Şekil 4.51 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) MS-MS parçalanma ürünleri

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.52) bileşiğe ait 5 tane farklı yerde rezonans olan pik gözlenmiştir. Bu piklerden kimyasal kayma değeri δ= 5.22 ppm olan H-5 protonu dublet vererek rezonans olurken *J*= 7.00 ppm'lik bir etkileşim sabitine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer proton sinyalleri geldikleri bölge itibarı ile hetero atoma bağlı olan proton sinyalleridir.

Bileşiğin ^{13}C-NMR (Şekil 4.53) ve DEPT (Şekil 4.54) spektrumlarından δ= 62.8 ppm'de bir adet metin (CH) karbonunun varlığı ve δ= 173.0 ppm (C=O), δ= 157.8 ppm, δ= 157.2 ppm olan üç adet kuaterner karbonun varlığı belirlenmiş olup yapı ile uyumludur.

Bileşiğin HSQC spektrumu (Şekil 4.55), δ= 5.22 ppm'de rezonans olan protonun δ= 62.8 ppm'deki karbon atomuna tek bağ üzerinden doğrudan bağlı olduğunu göstermiştir. Diğer hidrojen sinyallerinin körele olmaması bu hidrojenlerin N atomuna bağlı olduğuna işaret etmektedir.

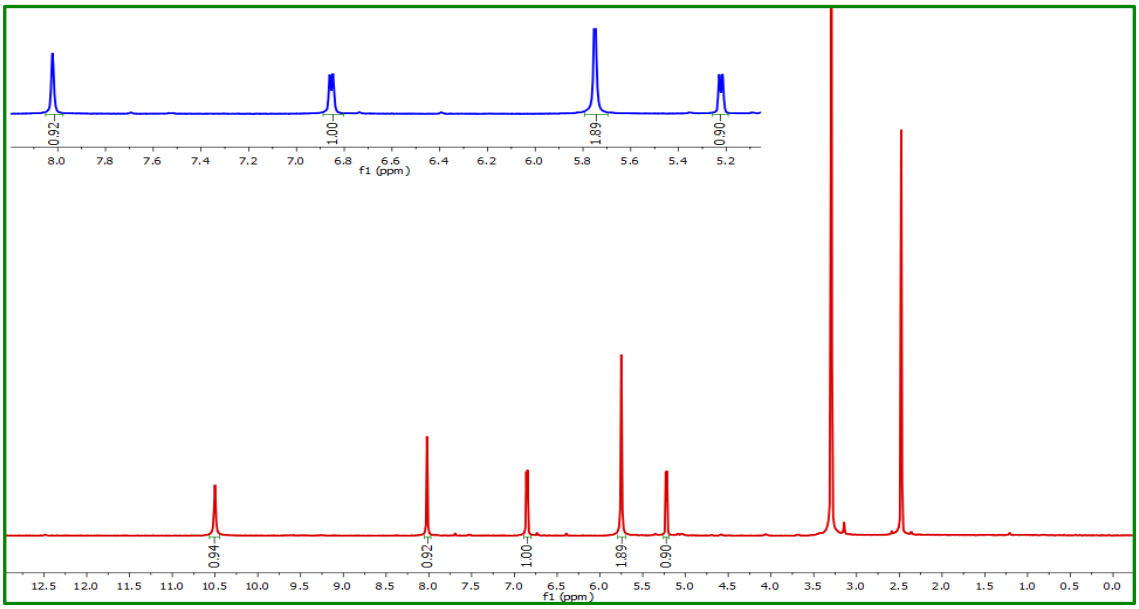
Bileşiğin HMBC spektrumu (Şekil 4.56), δ= 5.22 ppm'de rezonans olan H-5 protonunun δ= 157.8 ppm'deki C4 ile ^{2}J etkileşimi ve δ= 174.0 ppm'deki C2 ile ^{3}J etkileşimi yaptığını göstermiştir. C5 karbonuna bağlı olan ve δ= 5.75 ppm'de rezonans olan amin grubuna (-NH_2) ait özdeş protonların δ= 62.8 ppm'deki C5 ile ^{2}J etkileşimi yaptığı belirlenmiştir. δ= 6.85 ppm'de dublet olarak sinyal veren NH protonu δ= 174.0 ppm'deki karbonil karbonuyla (C2) ^{2}J etkileşimi, δ= 157.8 ppm'deki C4 ile ^{3}J ve etkileşimde olduğu, δ= 62.9 ppm'deki C5 ile ^{2}J etkileşimi gösterdiği spektrumdan belirlenmiştir. δ= 8.02 ppm'deki OH protonunun sırasıyla C5 ile ^{3}J etkileşim, C2 ile ^{3}J etkileşim ve C3 ile ^{2}J etkileşimleri göstermiştir. Tüm bu etkileşimler önerilen yapı ile uyumludur.

Bileşiğin COSY spektrumu ile C3 ve C4 karbonlarına bağlı -OH gruplarında bulunan dinamik protonların birbirleri ile uzak mesafede olsa da etkileştiği belirlenmiştir. Yine uzak mesafe etkileşimi gösteren δ= 8.02 ppm'deki -OH protonu H-5 protonu ile korelasyonu ve δ= 5.22 ppm'deki H-5 protonunun δ= 6.85 ppm'deki -NH protonu (H-1) ile korelasyonu da önerilen yapı ile tam uyumludur.

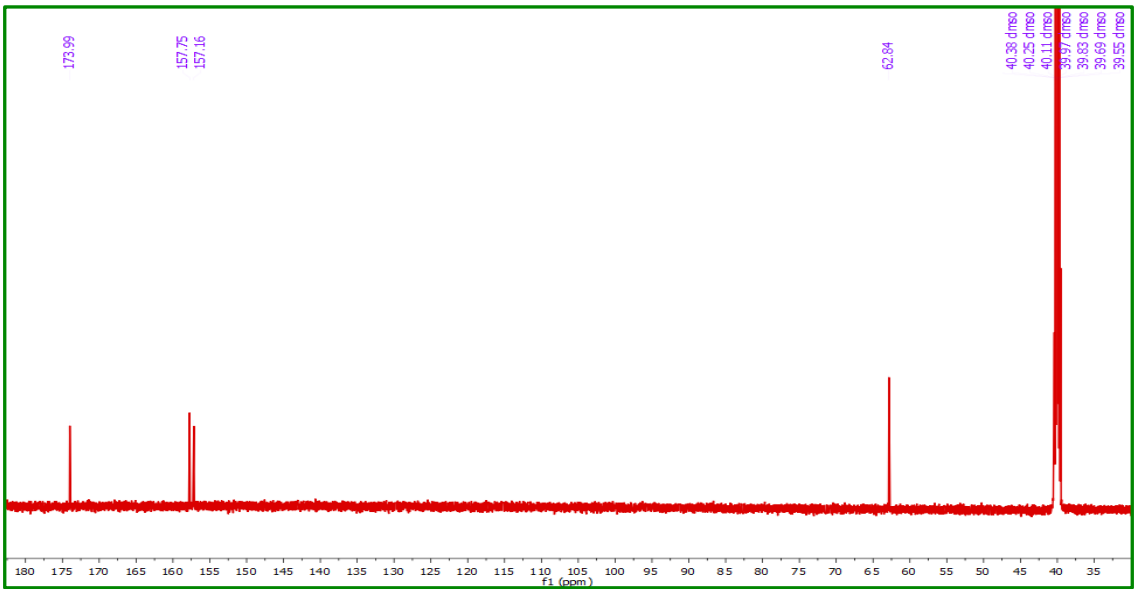
Çizelge 4.12 CPÇ-12 bileşiğinin (Paphlagonica-1) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)

Konum	^{13}C **(ppm)**	^{1}H**(ppm) (*J*, Hz)**
2	174.0	-
3	157.2	10.49 (O<u>H</u>)
4	157.8	8.02 (O<u>H</u>)
5	62.8	5.22 (*d*, *J*= 7.00 Hz)
6	-	5.75 (*s*, N<u>H</u>$_2$)
7	-	6.85 (*s*, N<u>H</u>)

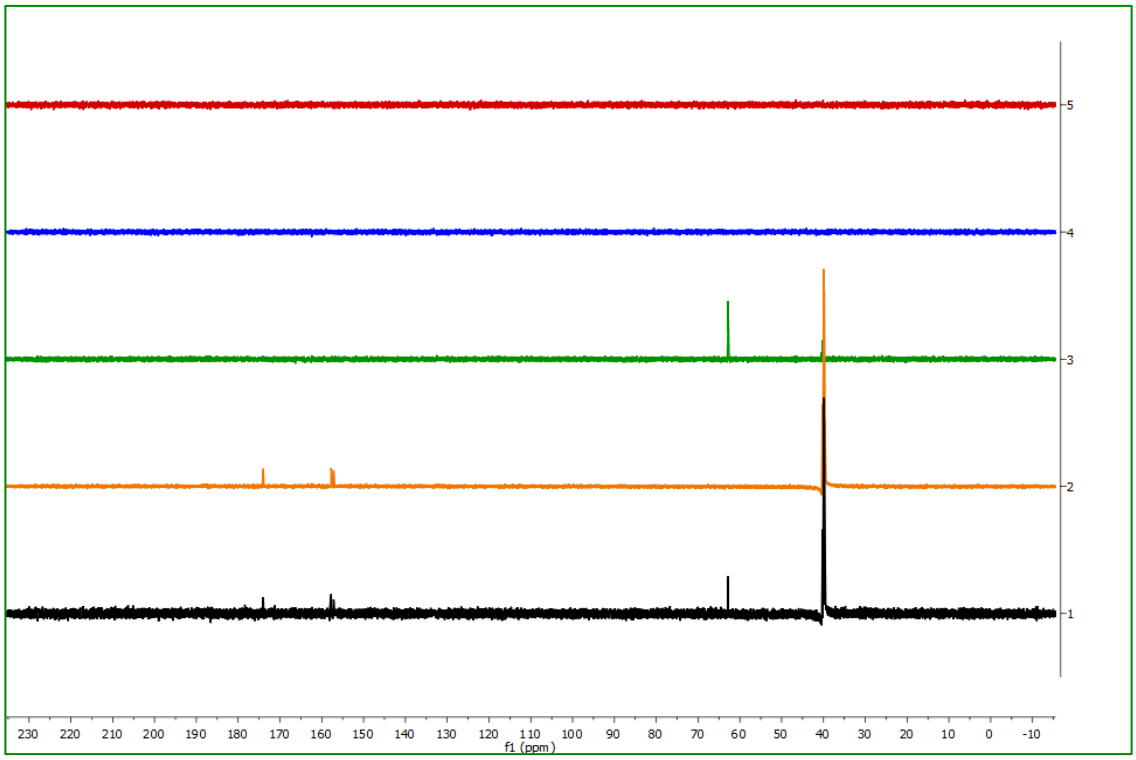
Özel ismi Paphlagonica-1 olan ve Jupac isimlendirmesi 5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on olarak yapısı belirlenen CPÇ-12 molekülünün 5 nolu karbonu kiral karbondur. Bu nedenle optikçe aktif bir moleküldür. Molekülün izole edilebilen miktarı çok düşük olduğu için molekülün optik çevirme açısı belirlenememiştir. Buna yönelik çalışmalar devam ettirilecektir.



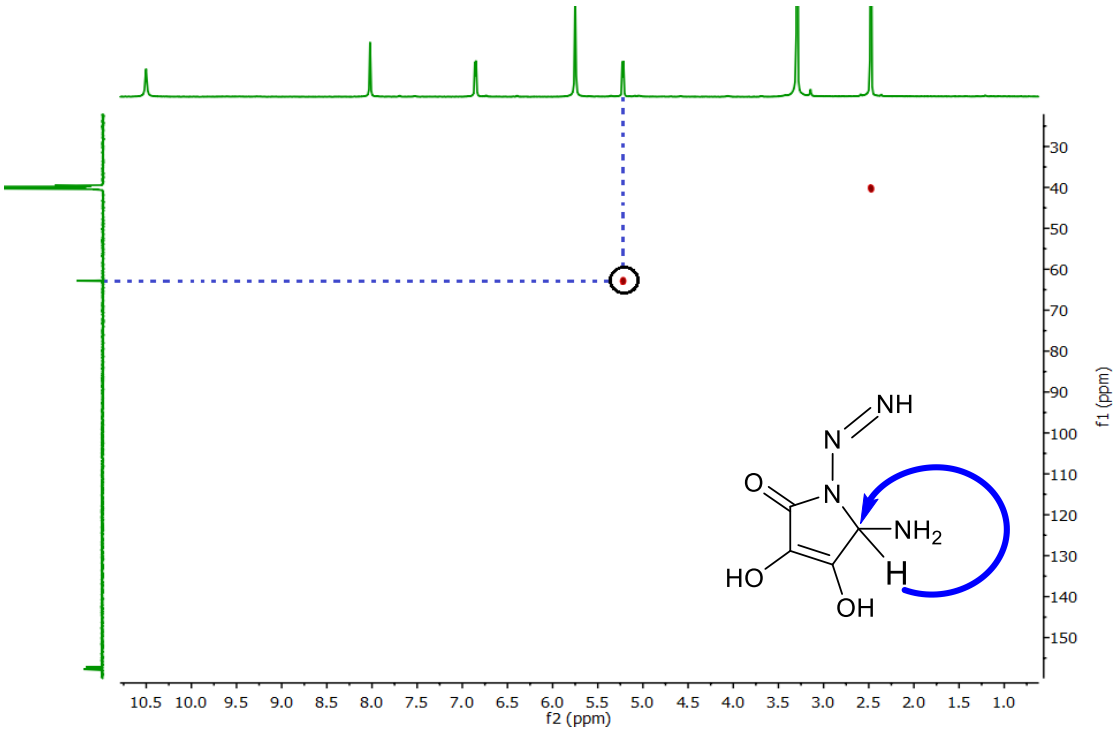
Şekil 4.52 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



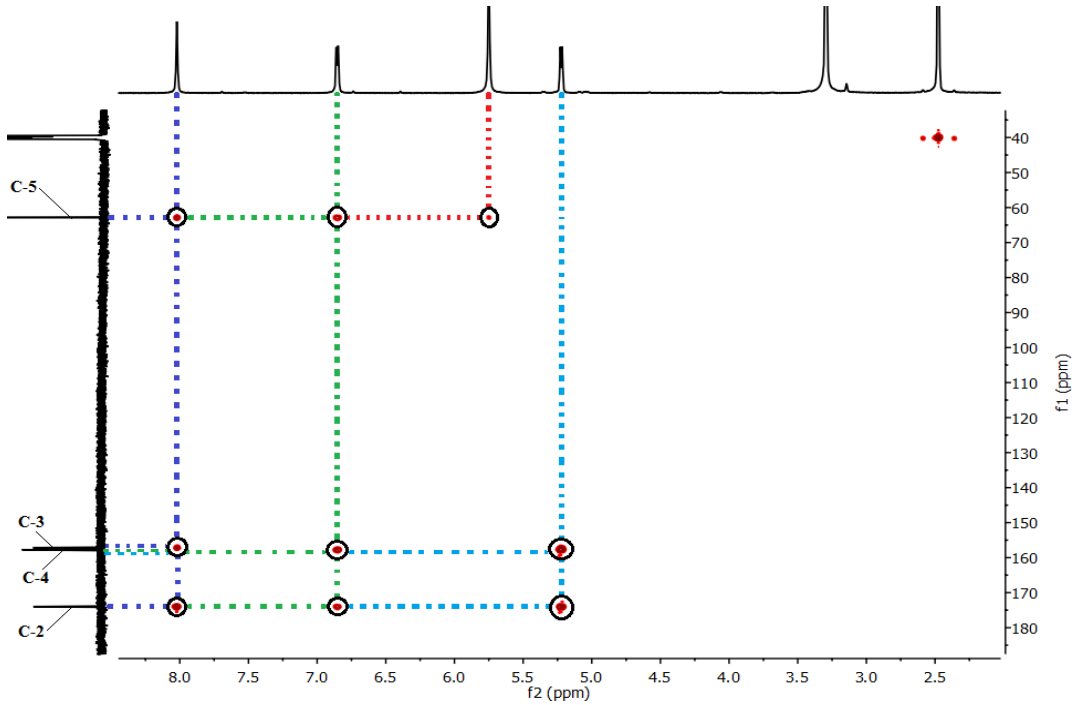
Şekil 4.53 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



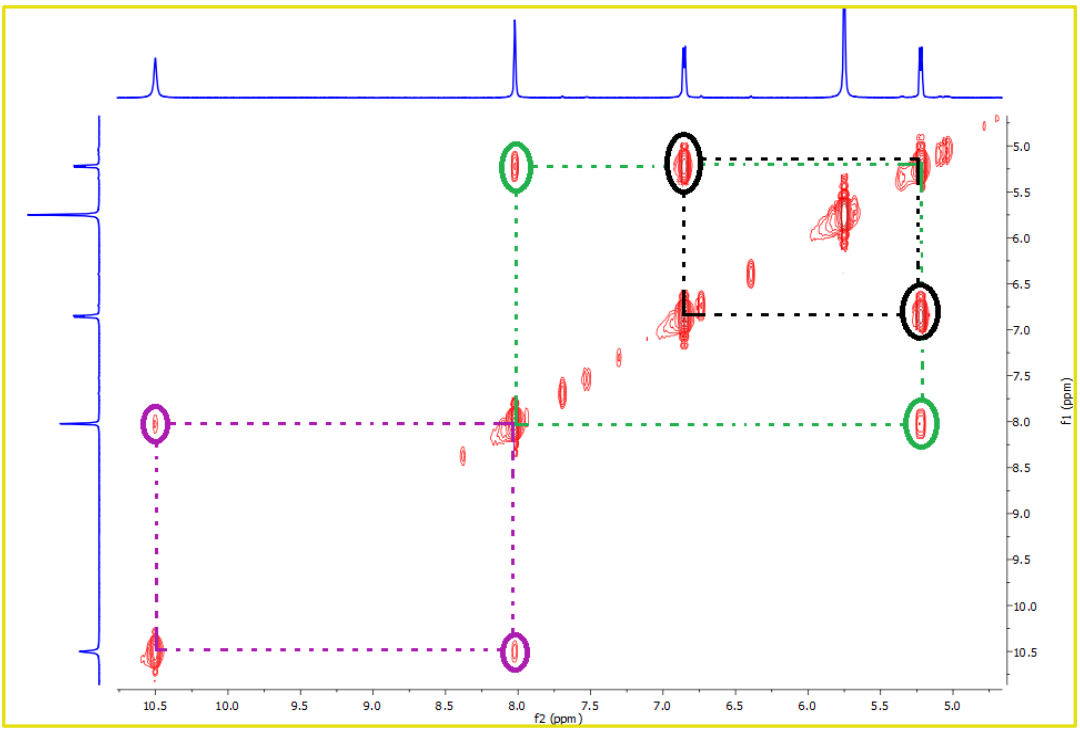
Şekil 4.54 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.55 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



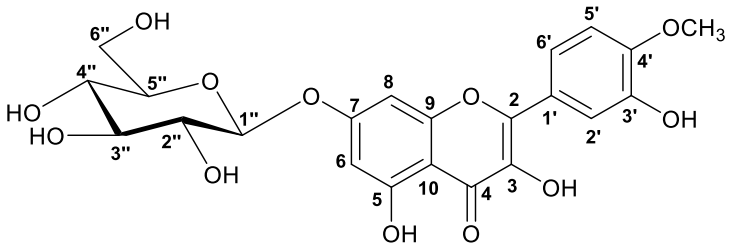
Şekil 4.56 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.57 CPÇ-12 bileşiğinin (5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)

4.8.2 CPÇ-9 Bileşiği (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit)

CPÇ-9 bileşiği (Şekil 4.58) parlak sarı renkli katı kristal şeklinde elde edildi. Bu bileşiğin ana bileşenlerden birisi olduğu NMR ve İTK sonuçlarının değerlendirilmesi ile belirlendi. HPLC-TOF/MS spektrumunda negatif modda m/z $[M-H]^-$ 477.139 ve [M-164-H] glikozit grubunun molekülden ayrılması ile 315.2601 moleküler iyon piki gözlendi. Bileşiğin kapalı formülü $C_{22}H_{22}O_{12}$ olarak belirlendi.



Şekil 4.58 CPÇ-9 (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) bileşiğinin kimyasal yapısı

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 4.59) incelendiği zaman, bileşiğin B halkasında 3' ve 4' pozisyonundaki 3,4-disübstitüe sinyalleri ABX sisteminin var olduğunu göstermektedir. Spektruma göre, bileşiğin B halkası için kimyasal kayma değeri (δ= 7.75 ppm olan (*d, J*= 2.02 Hz) ve *meta* etkileşimi yapan 2' protonu, δ= 7.71 ppm olan (*dd, J_1*= 8.4 ve *J_1*= 2.02 Hz) *orto* ve *meta* etkileşimi yapan 6' protonu, δ= 6.93 ppm olan (*d, J*= 8.4 Hz) *orto* etkileşimi yapan 5' protonu ve bileşiğin A halkası için kimyasal kayma değeri (δ= 6.83 ppm olan (*d, J*= 2.4 Hz) meta etkileşimi yapan H-8 protonu ve δ= 6.40 ppm olan (*d, J*= 2.4 Hz) meta etkileşimi yapan sinyaller verdiği belirlendi. Ayrıca bileşikte δ= 3.83 ppm'de rezonans olan metoksi sinyalinin bulunduğu hem integrasyon değerinin 3 olmasından hemde HMBC korelasyonuna (Şekil 4.63) göre bu sinyalin δ= 147.9 ile korelasyonu sonucunda metoksi grubunun C-4'-konumundan bağlı olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca δ= 5.03 ppm deki protonun dublet şeklinde yarılma gösterdiği ve *J*= 7.02 Hz'lik bir β etkileşimi göstermiştir.

Bileşiğe ait DEPT spektrumundan (Şekil 4.62) bir tane metil ($-CH_3$) karbonu, bir tane metilen ($-CH_2$) (C-6", şeker grubunda), on tane metin (-CH) karbonu ve on tane kuarterner (-C) karbon sinyali gözlenmiş olup yapı ile uyumludur.

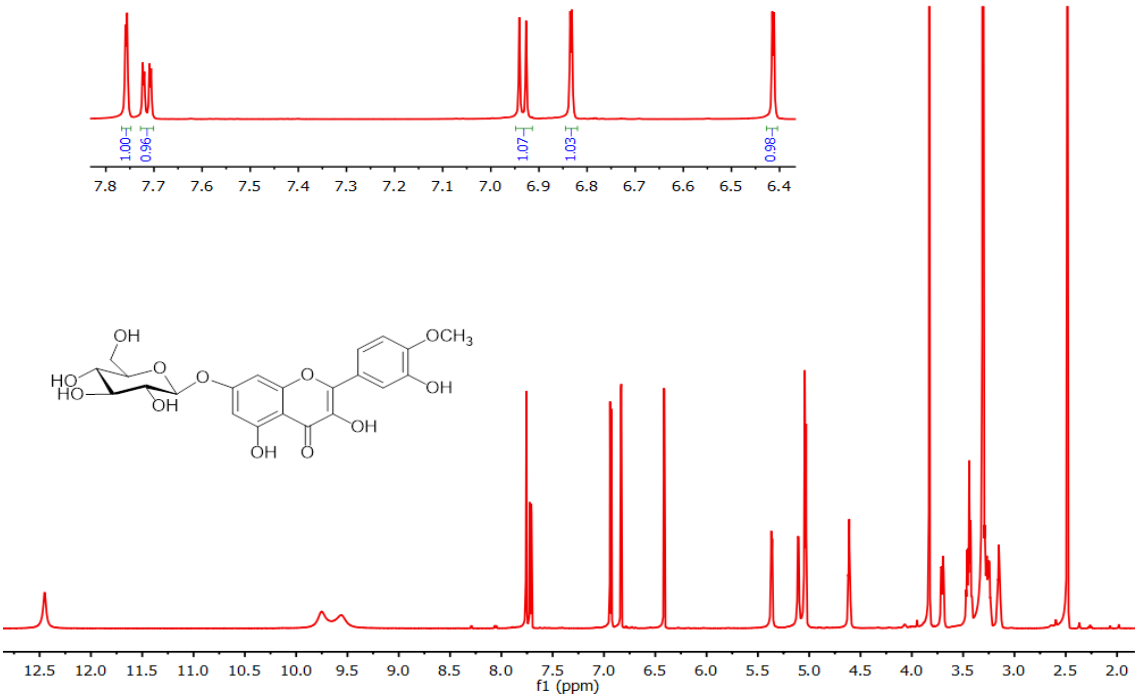
Bileşiğe ait HSQC spektrumunda (Şekil 4.65) yapı ile uyumlu olarak, δ= 6.40 ppm (δ= 99.2 ppm) H-6, δ= 6.83 ppm (δ= 95.1 ppm) H-8, δ= 7.75 ppm (δ= 112.2 ppm) H-2', δ= 6.93 ppm (δ= 116.0 ppm) H-5' ve δ= 7.71 ppm (δ= 122.4 ppm) H-6' konumlarında ^{1}J etkileşimler belirlenmiştir. Ayrıca aromatik halkaya bağlı olan şeker grubundaki 5.03 ppm'deki anomerik protonun 100.49 ppm rezonans olan anomerik karbona bağlı olduğu belirlenmiştir.

Bileşiğin HMBC spektrumundan (Şekil 4.63), C5 konumunda bağlı olan OH protonunun C5 ile ^{2}J etkileşimi, C6 ile ^{3}J etkileşimi ve C10 ile ^{3}J etkileşimi görülmüştür. Flavonol bileşiğinin A halkasında bulunan H-6 protonu sırasıyla C7 (δ= 163.2 ppm) ile ^{2}J, C8 (δ= 95.1 ppm) ile ^{3}J, C5 (δ= 160.8 ppm) ile ^{2}J ve C10 (δ= 105.1 ppm) ile ^{3}J uzak mesafe etkileşimleri yaptıkları belirlenmiştir. H-8 protonu sırasıyla C6 (δ= 99.2 ppm) ile ^{3}J, C7 (δ= 163.2 ppm) ile ^{2}J, C9 (δ= 156.1 ppm) ile ^{2}J, C10 (δ= 105.1 ppm) ile ^{3}J ve C6 (δ= 99.2 ppm) ile ^{3}J uzak mesafe korelasyonları Şekil 4.59'da detaylı olarak verilmiştir. Flavonolun B halkasındaki simetrik olarak konumlanan H-2' proton sinyallerinin C3' (δ= 149.5 ppm) ile ^{2}J, C1' (δ= 122.3 ppm) ile ^{2}J ve C6' (δ= 122.4 ppm) ile ^{3}J korelasyonları, H-5' konumundaki protonun C6' (δ= 122.4 ppm) ile ^{2}J, C4' (δ= 147.9 ppm) ile ^{2}J, C1' (δ= 122.3 ppm) ile ^{3}J ve C2 (δ= 147.8 ppm) ile ^{4}J üzerinden **W** etkileşimi göstermiştir. Şeker grubunun δ= 5.03 ppm'de rezonans olan anomerik protonu, bileşiğin A halkasında δ= 163.2 ppm ile rezonansından belirlendi. Moleküldeki metoksi grubunun (δ= 3.83 ppm) C4' konumundan (δ= 147.9 ppm) ^{3}J bağ üzerinden bağlı olduğu HMBC etkileşimi ile belirlendi. Tüm korelasyonlar yapı ile tam olarak uyumludur (Şekil 4.58).

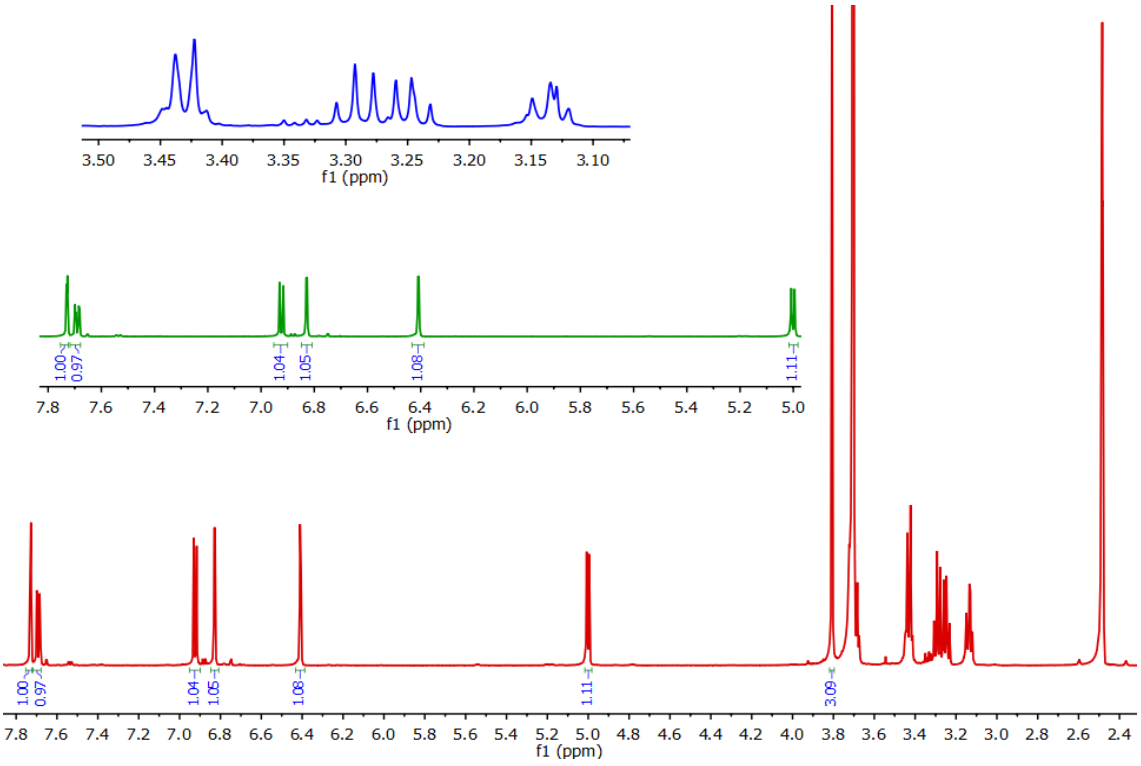
Bileşiğe ait homonükleer COSY spektrumuna (Şekil 4.66) göre; H-5' protonu H-6' ile ^{3}J bağ üzerinden etkileşimi, H-2' protonu -OCH_3 grubundaki özdeş protonlar ile ^{6}J çok uzak mesafe etkileşimi yapması tamamen molekülün yönlenmesi ile ilgili olup, H-8 protonu H-6 ile ^{4}J bağ üzerinden etkileşimi ve şeker grubundaki H-1" protonu H-2" ile etkileşimleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.13 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)

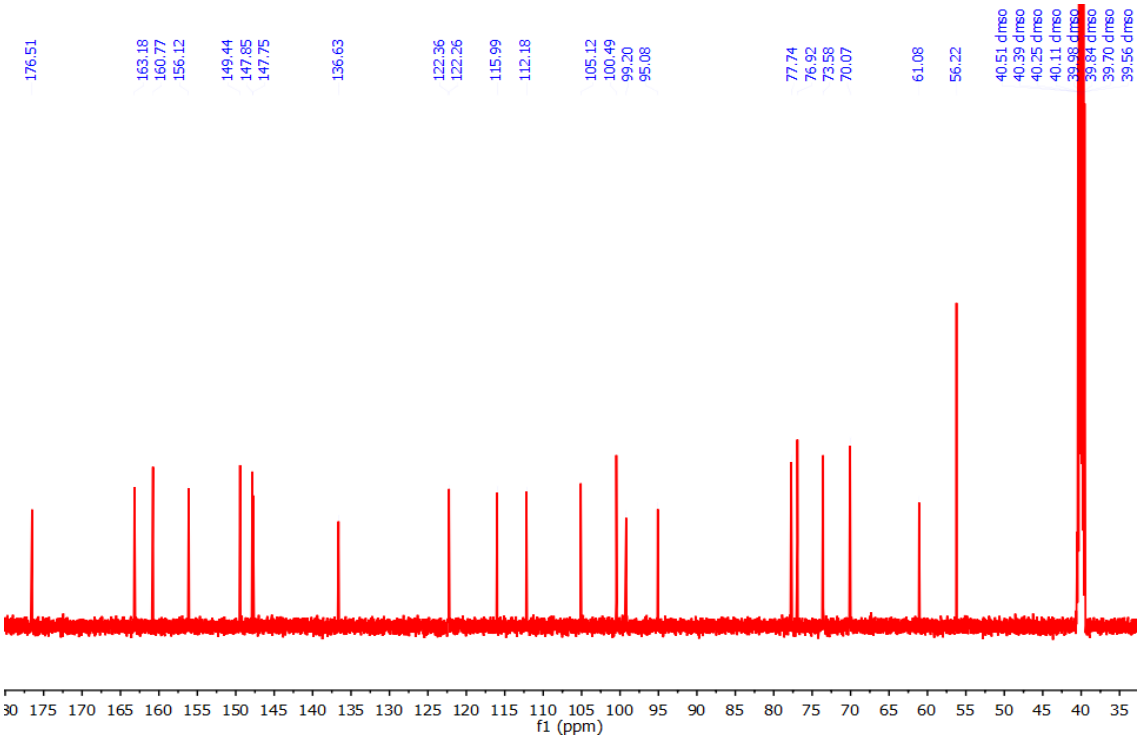
Konum	^{13}C **(ppm)**	^{1}H**(ppm) (*J*, Hz)**
2	147.8	-
3	136.6	-
4	176.5	-
5	160.8	12.45 (*s*, -OH)
6	99.2	6.40 (*d*, *J*= 2.4 Hz, *m*)
7	163.2	-
8	95.1	6.83 (*d*, *J*= 2.4 Hz, *m*)
9	156.1	-
10	105.1	-
1'	122.3	-
2'	112.2	7.75 (*d*, *J*= 2.02 Hz, *m*)
3'	149.5	-
4'	147.9	-
5'	116.0	6.93 (*d*, *J*= 8.4 Hz, *o*)
6'	122.4	7.71 (*dd*, J_1= 8.4 ve J_2= 2.02 Hz)
1''	100.5	5.03 (*d*, *J*= 7.2 Hz)
2''	73.5	3.24 (*m*)
3''	77.7	3.42 (*m*)
4''	76.9	3.28 (*m*)
5''	70.0	3.14 (*m*)
6''	61.1	3.44-3.69 (*m*)
-OCH_3	56.2	3.83 (*s*)



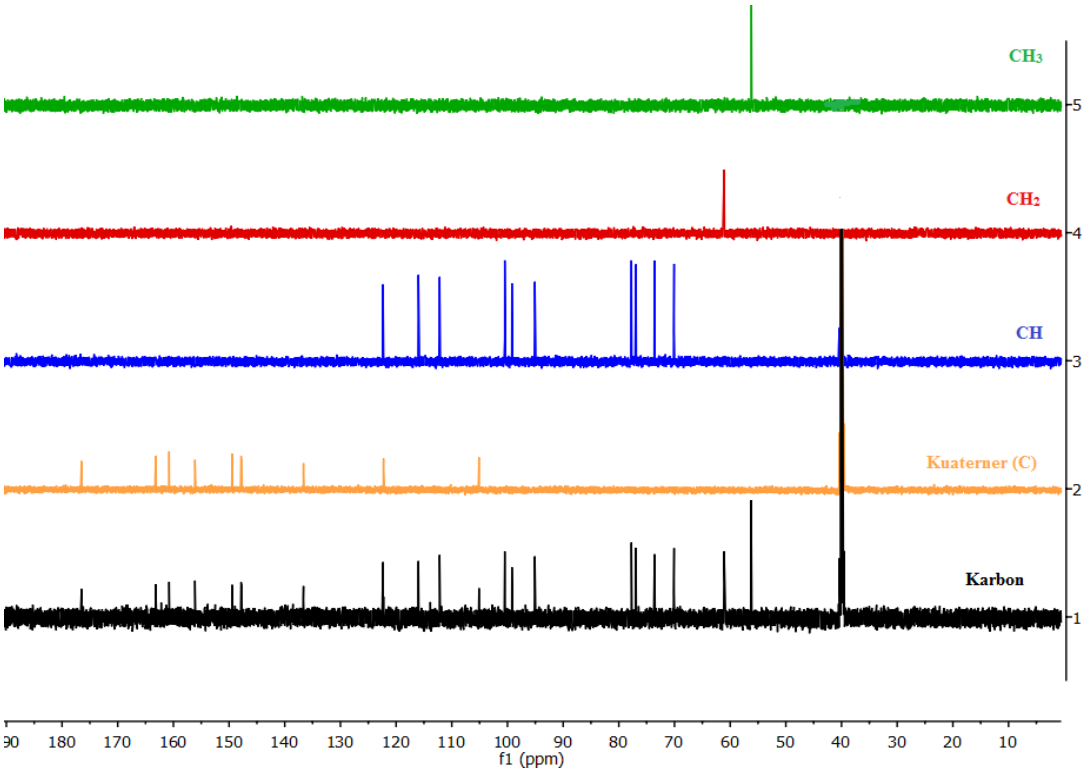
Şekil 4.59 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



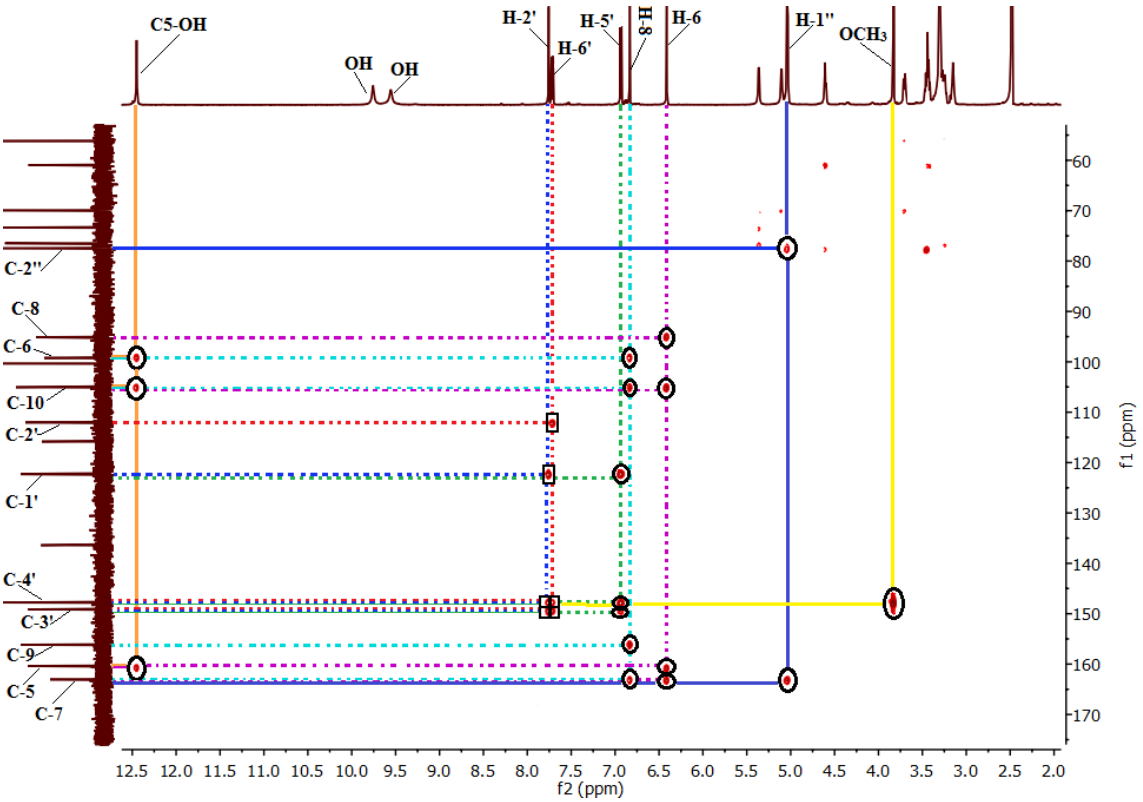
Şekil 4.60 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{1}H NMR spektrumu (D_2O ilavesi ile)



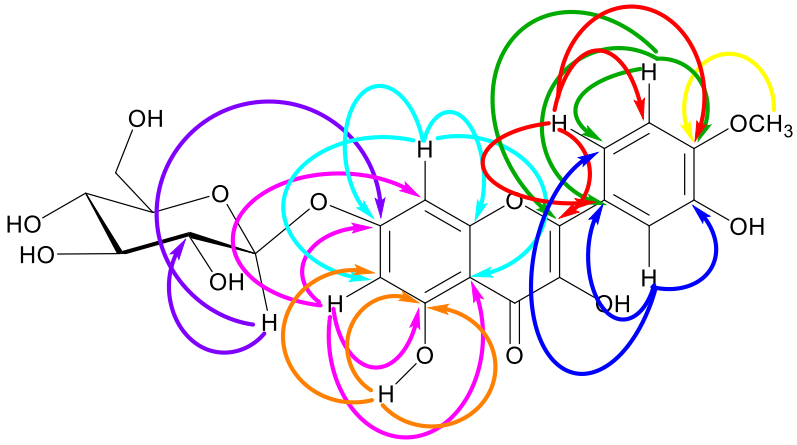
Şekil 4.61 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



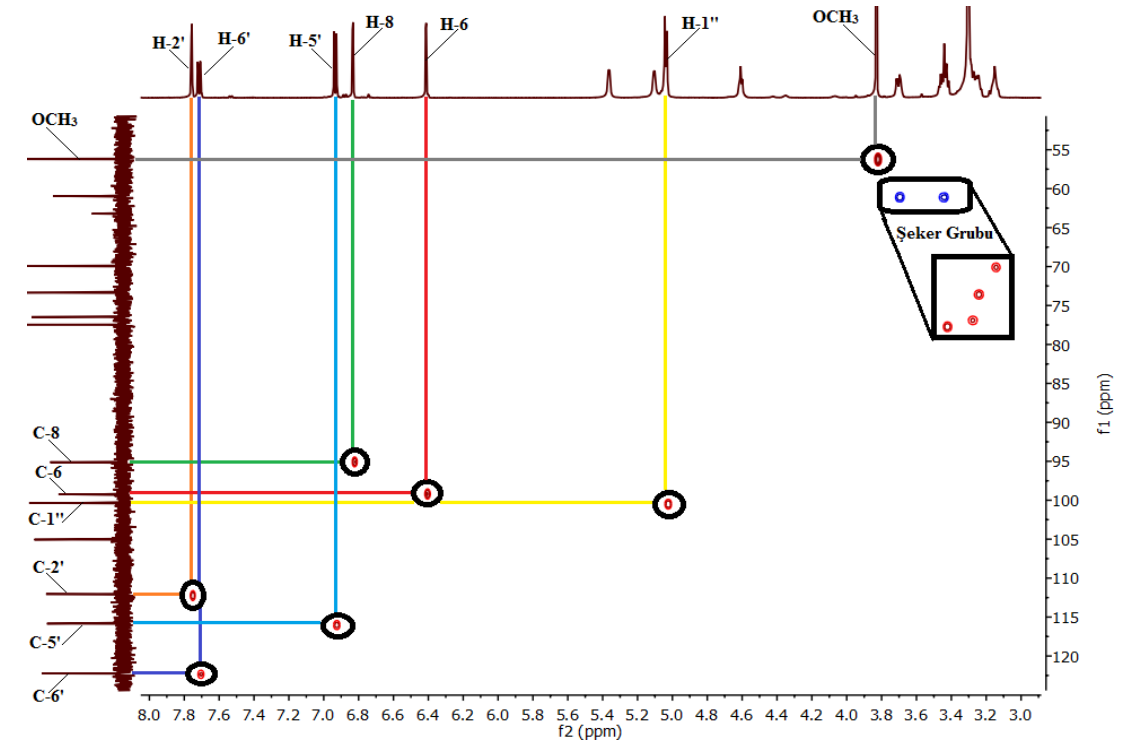
Şekil 4.62 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



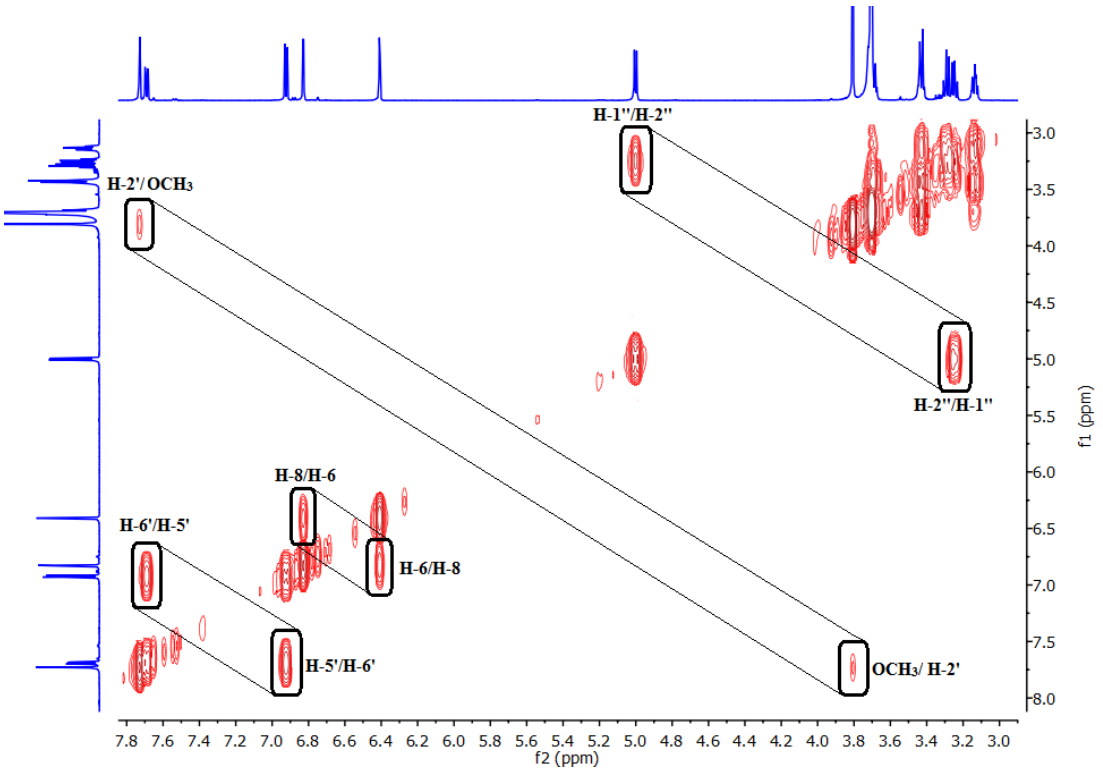
Şekil 4.63 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.64 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) HMBC etkileşimi



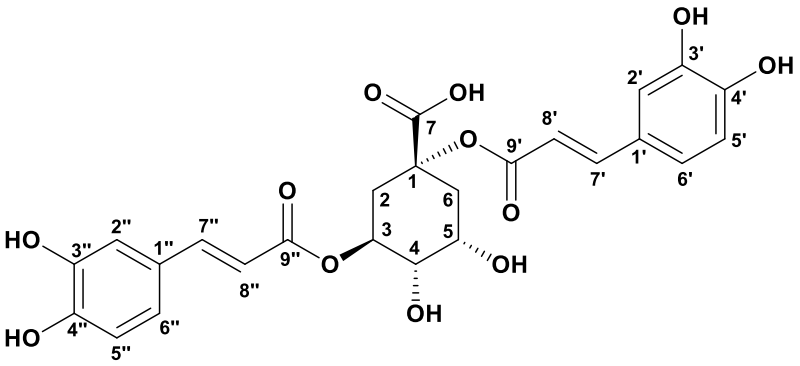
Şekil 4.65 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 4.66 CPÇ-9 bileşiğinin (Tamariksetin 7-*O*-β-D glukopiranozit) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)

4.8.3 CPÇ-8 Bileşiği (1,3-dikafeoilkuinik asit)

1,3-Dikafeoilkuinik asit (CPÇ-8) molekülü toz halde toprak renginde elde edildi. LC-MS/MS analizi sonucunda molekülün negatif modda m/z $[M-H]^-$ 515.12 moleküler iyon piki gözlendi. Bileşiğin kapalı formülü $C_{25}H_{24}O_{12}$ olarak belirlendi.



Şekil 4.67 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) kimyasal yapısı

Bileşiğin ^{1}H NMR (Şekil 4.68) spektrumuna göre; iki tane aynı ABX sistemi: birinci kafeoil grubu için δ= 7.02 (*s*), δ= 6.70 (*d*, *J*= 7.9 Hz) ppm'de orto etkileşimi ve δ= 6.90 (*dd*, J_1= 7.9 Hz ve J_2= 2.01 Hz) ppm'de *orto* etkileşimi ve *meta* etkileşim yaptığı belirlenmiş ayrıca kafeoil grubunun α, β olefinik protonlarının [δ= 7.39 ppm (*d*, *J*=15.6 Hz) ve δ= 6.15 ppm (*d*, *J*=15.6 Hz)] etkileşim sabitleri ile *trans* olarak konumlandığı, ikinci kafeoil grubu için δ= 7.09 (*s*), δ= 6.72 (*d*, *J*=8.28 Hz) ppm'de *orto* etkileşimi ve δ= 6.92 (*dd*, J_1= 8.28 Hz ve J_2= 1.80 Hz) ppm'de *orto* ve *meta* etkileşimi yaptığı belirlenmiş olup ayrıca kafeoil grubu için α, β olefinik protonlarının [δ= 7.45 ppm (*d*, *J*= 15.9 Hz] ve δ= 6.23 ppm (*d*, *J*= 15.9 Hz] *trans* olarak konumlandığı belirlenmiştir. Moleküle ait ^{1}H ve ^{13}C atomlarına ait kimyasal kayma değerleri Çizelge 4.14'de özetlenmiştir.

Bileşiğe ait ^{13}C-DEPT NMR spektrumu (Şekil 4.70) incelendiğinde bileşiğe ait 2 tane metilen (-CH_2), normalde 13 adet fakat iki metin grubunun aynı yerde rezonans olmasından dolayı 12 adet metin (-CH), normalde 10 adet fakat iki karbon atomunun

aynı yerde rezonans olması ile birlikte 9 adet kuaterner karbonunun var olduğu belirlenmiştir**.**

Bileşiğin HSQC NMR (Şekil 4.72) spektrumundan, birinci kafeoil grubu için δ= 7.02 ppm'deki H-2' protonunun δ= 115.5 ppm'deki C-2' karbona, H-5' in (δ= 6.70 ppm) C-5' (δ= 116.4 ppm) ile, H-6' in (δ= 6.90 ppm) C-6' (δ= 120.6 ppm) ile, H_β-7' in (δ= 7.39 ppm) C-7' (δ= 144.1 ppm) ile ve H_α-8' in (δ= 6.15 ppm) C-8' (δ= 116.5 ppm) ile bağlı olduğu ayrıca ikinci kafeoil grubu için δ= 7.09 ppm'deki H-2'' protonunun δ= 115.5 ppm'deki C-2'' karbona, H-5'' in (δ= 6.72 ppm) C-5'' (δ= 116.3 ppm) ile, H-6'' in (δ= 6.92 ppm) C-6'' (δ= 121.8 ppm) ile, H_β-7'' in (δ= 7.45 ppm) C-7'' (δ= 145.3 ppm) ile ve H_α-8'' in (δ= 6.23 ppm) C-8'' (δ= 114.8 ppm) atomu ile ^{1}J korelasyonları elde edilmiştir.

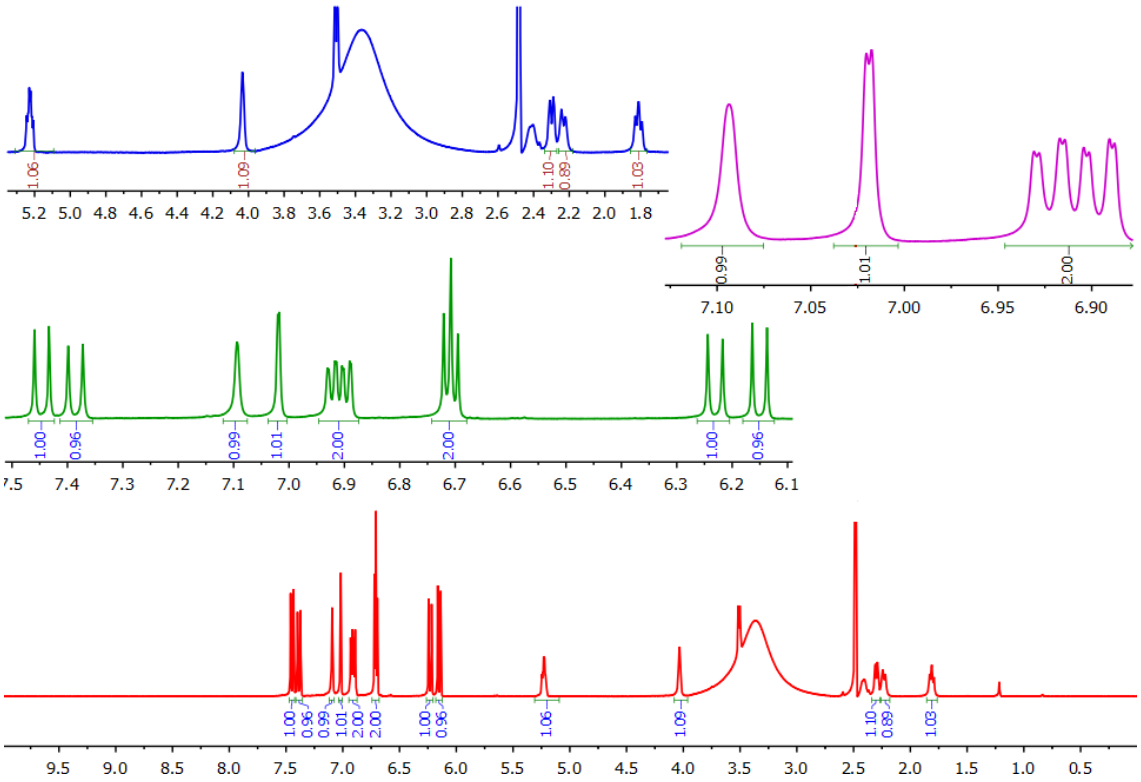
Bileşiğin HMBC NMR (Şekil 4.74) spektrumundan, birinci kafeoil grubu için δ= 6.15 ppm'de rezonans olan H_α-8' protonunun δ= 126.2 ppm (C-1' ^{2}J etkileşimi) ile, δ= 165.5 ppm'deki C-9' ile ^{2}J etkileşimi ve δ= 144.1 ppm'deki C-7' ile ^{2}J etkileşimlerini; δ= 7.39 ppm'de rezonans olan H_β-7' protonun δ= 116.5 ppm'deki C-8' ile ^{2}J etkileşimi, δ= 165.5 ppm'deki C-9' ile ^{3}J etkileşimi, δ= 120.6 ppm'deki C-6' ile ^{3}J etkileşimi ve δ= 126.2 ppm'deki C-1' ile ^{2}J etkileşimlerini; δ= 7.02 ppm'de rezonans olan H-2' protonunun δ= 120.6 ppm'deki C-6' ile ^{3}J etkileşimi, δ= 126.2 ppm'deki C-1' ile ^{2}J etkileşimi, δ= 144.1 ppm'deki C-7 ile ^{3}J etkileşimi ve δ= 146.4 ppm'deki C-3' ile ^{2}J etkileşimlerini; δ= 6.70 ppm'de rezonans olan H-5' protonunun δ= 144.0 ppm'deki C-7' ile ^{4}J bağ üzerinden W etkileşimi, δ= 120.6 ppm'deki C-6' ile ^{2}J etkileşimi, δ= 126.2 ppm'deki C-1' ile ^{3}J etkileşimi ve δ= 148.6 ppm'deki C-4' ile ^{2}J etkileşimlerini; δ= 6.90 ppm'deki H-6' protonu δ= 144.1 ppm'deki C-7' ile ^{3}J etkileşimi, δ= 115.5 ppm'deki C-2' ile ^{3}J etkileşimi, δ= 126.2 ppm'deki C-1' ile ^{2}J etkileşimi, δ= 116.5 ppm'deki C-5' ile ^{2}J etkileşimi ve δ= 148.6 ppm'deki C-4' ile ^{3}J etkileşimleri belirlenmiştir. İkinci kafeoil grubunda yapı ile uyumlu olarak H-8'' hidrojeni (δ= 6.23 ppm**)** sırasıyla C-9'' (δ= 166.8 ppm), C-7'' (δ= 145.3 ppm) ve C-1'' (δ= 125.8 ppm) ile ^{2}J ve ^{3}J etkileşimleri yapmıştır. Yine yapı ile uyumlu olarak H-7'' e ait δ= 7.45 ppm' deki H sinyali sırasıyla δ= 114.8 ppm (C-8''), δ= 166.8 ppm (C-9''), δ= 125.8 ppm (C-1'') ve δ= 121.8 ppm (C-6'') ile korele olmuştur. Kafeoil gruplarının kuinik aside 1 ve 5 nolu pozisyonlardan bağlandığı yine HMBC korelasyonlarından anlaşılmıştır. Kuinik asitin δ= 174.3 ppm'deki karbonil karbonu δ= 2.30 ppm'deki metilen protonlarından birisi ile körele olduğu belirlenmiştir.

Kafeoil gruplarının kuinik asite bağlı olduğu pozisyon karbonil gruplarının etkileşimleri ile belirlenmiştir. Buna göre ikinci kafeoil grubunun karbonil grubu kuinik asit ile HMBC etkileşimi göstermemesi bu grubun kuinik asitin C-1 grubundan bağlı olduğunu göstermektedir. Diğer kafeoil grubunun δ= 165.5 ppm'deki karbon pikinin kuinik asidin δ= 5.22 ppm'deki H-5 protonu ile körele olması C-5 pozisyonundan bağlı olduğuna işaret etmektedir. δ= 5.22 ppm'deki H-5'e ait sinyalin δ= 72.6 ppm'deki C-4 karbonu ile körele olması da bunu doğrulamaktadır.

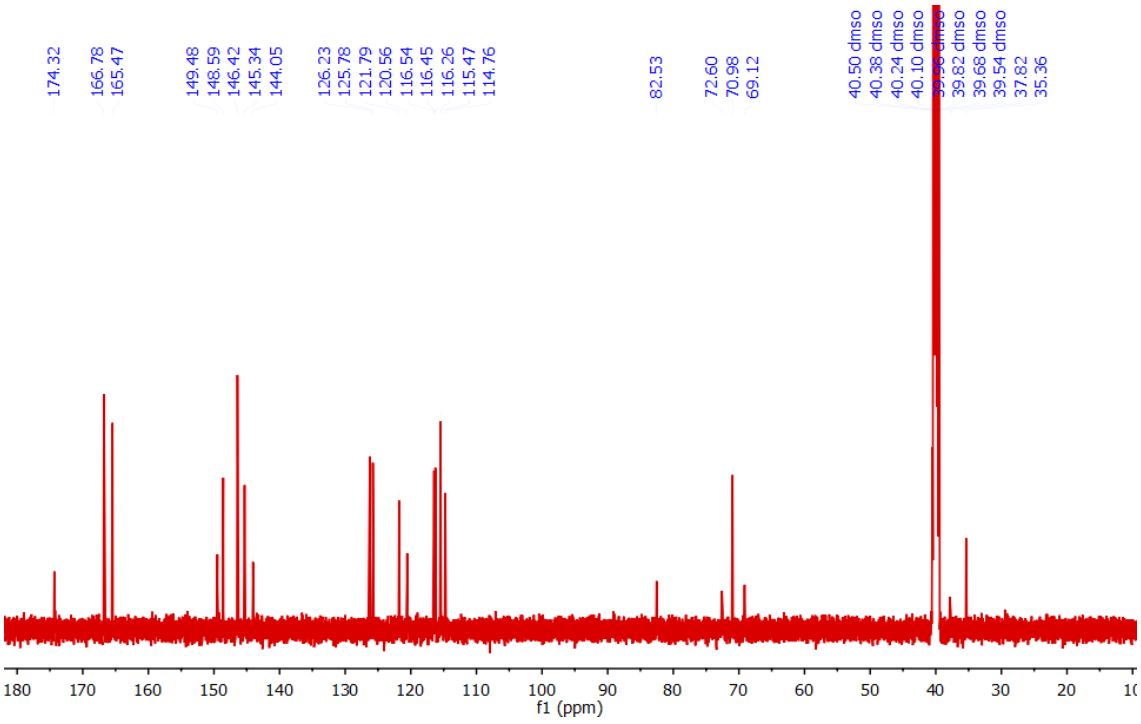
Bileşiğin COSY spektrumu H_{β}-7'→H_{α}-8' ^{3}J, H_{β}-7"→H_{α}-8" ^{3}J, H-6'→H-5' ^{3}J, H-6"→H-5" ^{3}J, Ha-6→Hb-6 ^{1}J, H-5→Ha-6 ^{3}J, H-5→Hb-6 ^{3}J, H-3→H-4 ^{3}J ve H-5→H-4 ^{3}J etkileşimleride yapı ile tam uyumludur. Bileşiğin 1,3-dikafeoilkuinik asit olduğu ayrıca literatür ile desteklendi.

Çizelge 4.14 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)

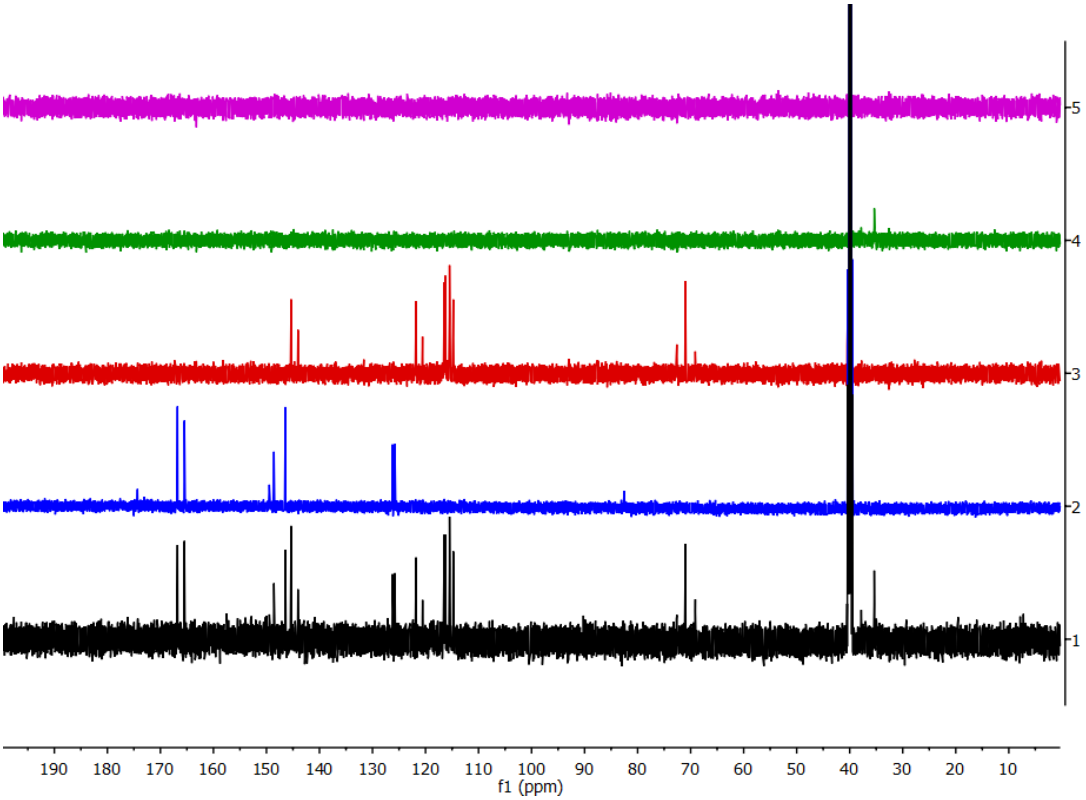
Konum	^{13}C (ppm)	^{1}H (ppm) (*J*, Hz)
1	82.5	-
2	35.4	2.42-2.23 (2H, *d*,*m*)
3	69.1	4.03 (*m*)
4	72.6	3.51 (1H, *dd*, J_1= 8.70 ve J_2= 2.94 Hz)
5	71.0	5.22 (*m*)
6	37.8	2.30-180 (2H, *d*, t)
7	174.3	-
1'	126.2	-
2'	115.5	7.02 (1H, *s)*
3'	146.4	-
4'	148.6	-
5'	116.4	6.70 (*d*, *J*= 7.9 Hz, *o*)
6'	120.6	6.90 (*dd*, J_1= 7.9 ve J_2= 2.01 Hz, *o*, *m*)
7'(-β)	144.1	7.39 (*d*, *J*= 15.6 Hz, *trans*)
8'(-α)	116.5	6.15 (*d*, *J*= 15.6 Hz, *trans*)
9'	165.5	-
1''	125.8	-
2''	115.5	7.09 (1H, *s*, *m*)
3''	146.4	-
4''	149.6	-
5''	116.3	6.72 (*d*, *J*= 8.28 Hz, *trans*)
6''	121.8	6.92 (*dd*, J_1= 8.28 ve J_2= 1.80 Hz, *o*, *m*)
7''(-β)	145.3	7.45 (*d*, *J*= 15.9 Hz, *trans*)
8''(-α)	114.8	6.23 (*d*, *J*= 15.9 Hz, *trans*)
9''	166.8	-



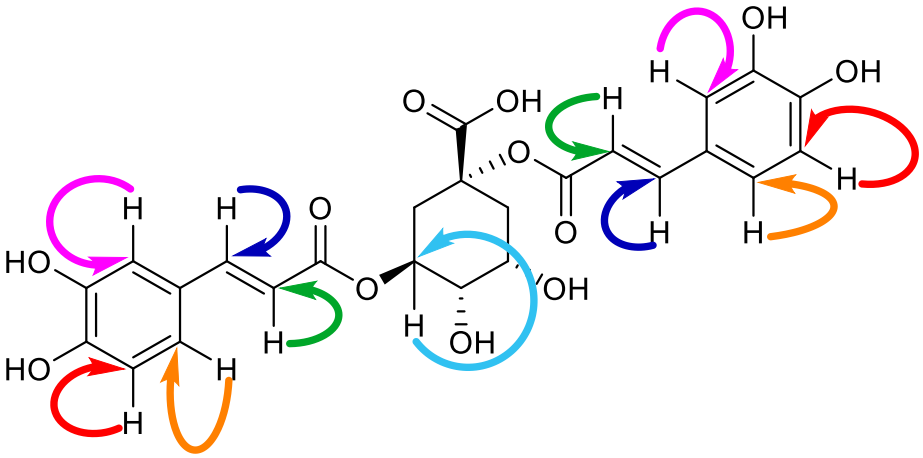
Şekil 4.68 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d$_6$)



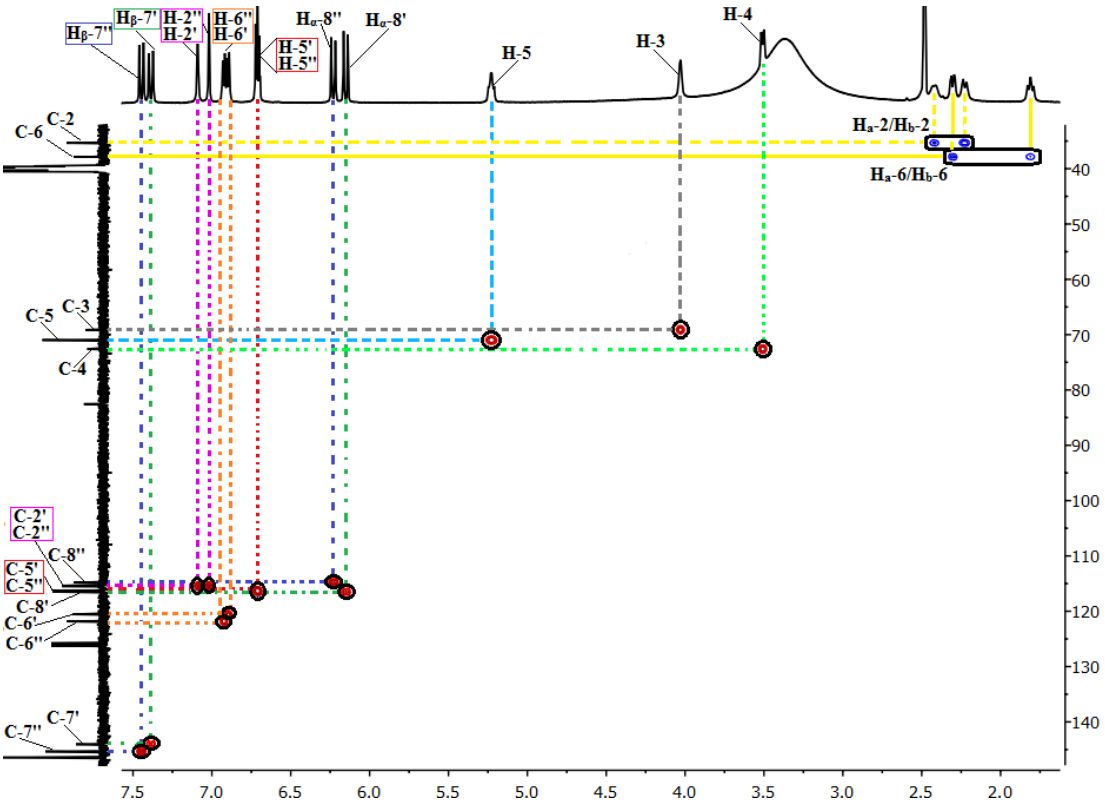
Şekil 4.69 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d$_6$)



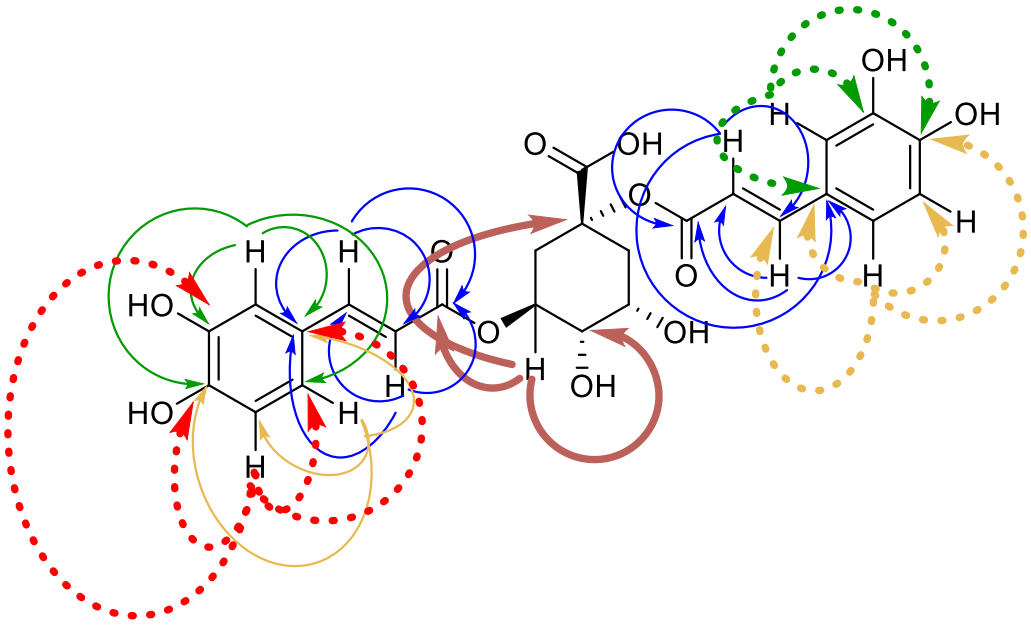
Şekil 4.70 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



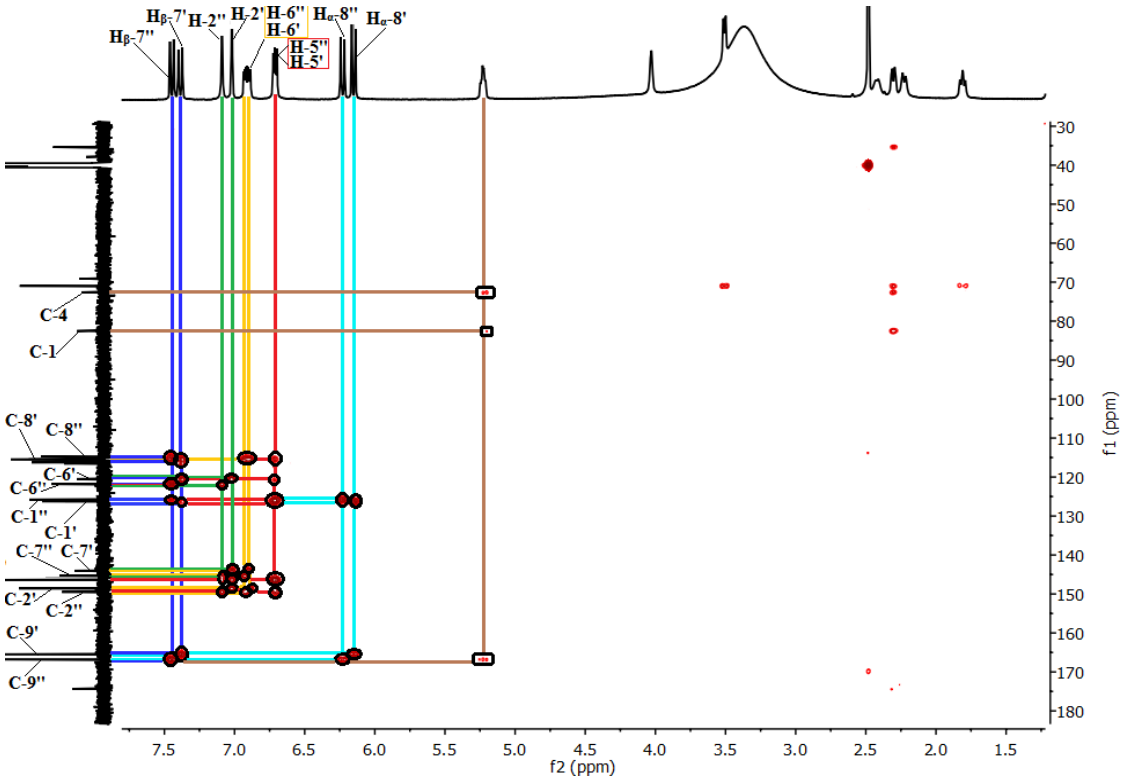
Şekil 4.71 CPÇ-8 bileşiğine ait heteronükleer korelasyonlu HSQC etkileşimi



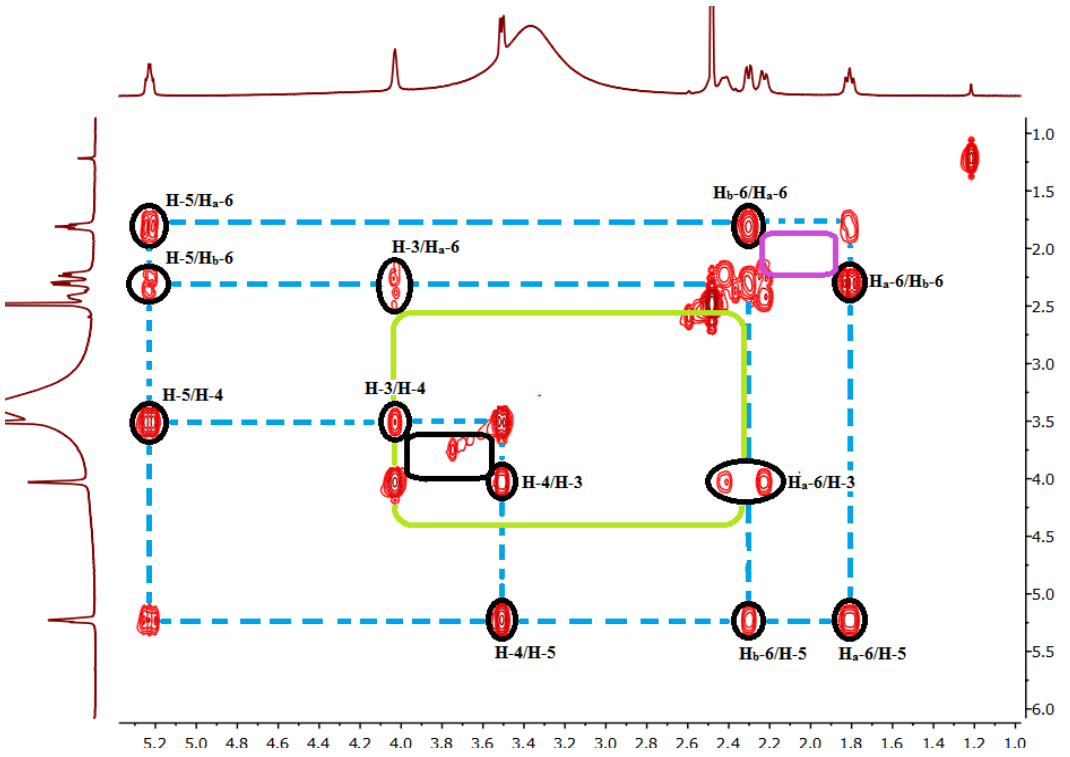
Şekil 4.72 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



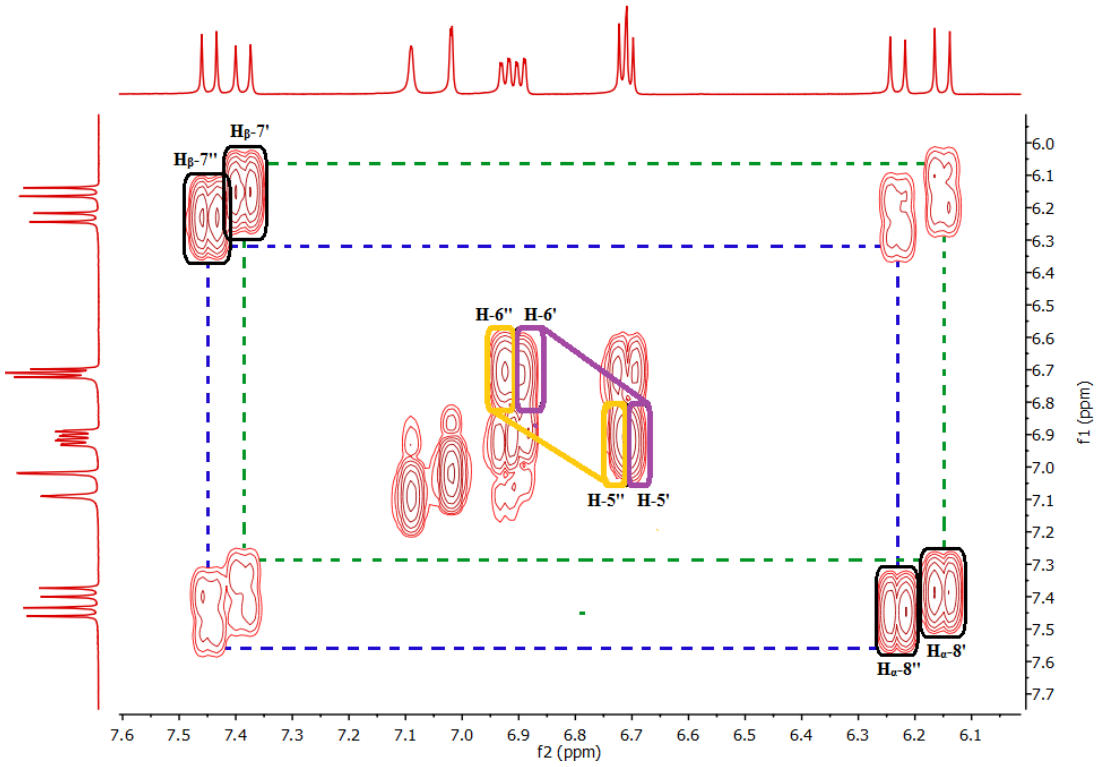
Şekil 4.73 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) HMBC etkileşimi



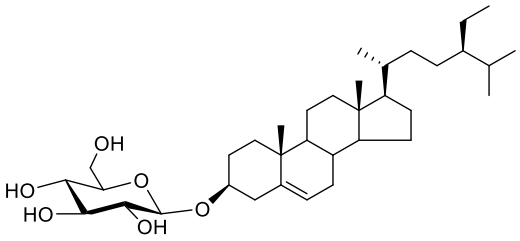
Şekil 4.74 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



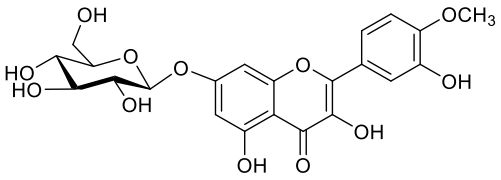
Şekil 4.75 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



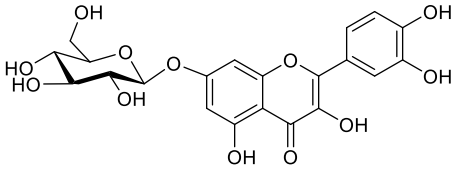
Şekil 4.76 CPÇ-8 bileşiğinin (1,3-dikafeoilkuinik asit) COSY NMR spektrumu (devam)



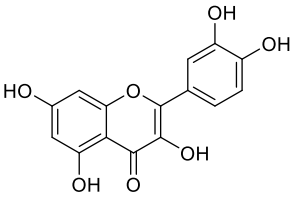
CPÇ-11
Daucosterin



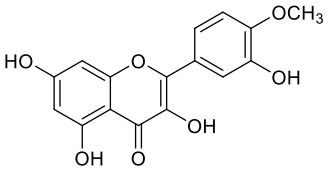
CPÇ-9
Tamariksetin 7-*O*-β glukozit



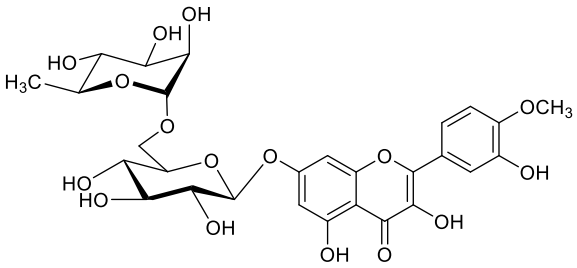
CPÇ-10
Kuersimetrin



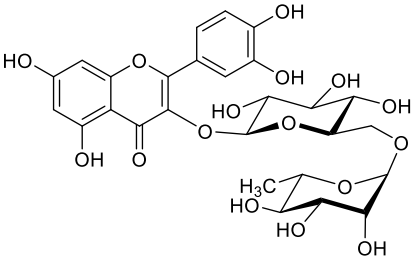
CPÇ-7
Kuersetin



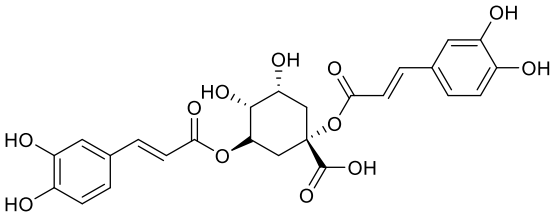
CPÇ-5
Tamariksetin



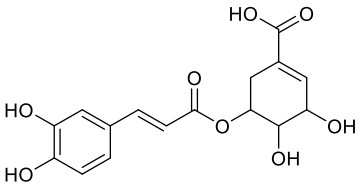
CPÇ-13
Tamariksetin 7-O-β rutinozit



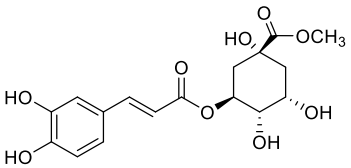
CPÇ-14
Rutin



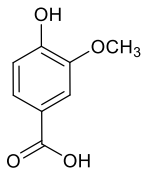
CPÇ-8
1,3-dikafeoilkuinik asit



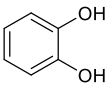
CPÇ-4
5-*O*-kafeoil şikimik asit



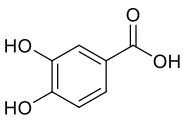
CPÇ-6
Klorojenik asit metil ester



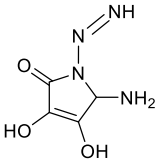
CPÇ-2
Vanilik asit



CPÇ-1
Pirokateşol



CPÇ-3
3,4-dihidroksi benzoik asit



CPÇ-12
Paphlagonica-1

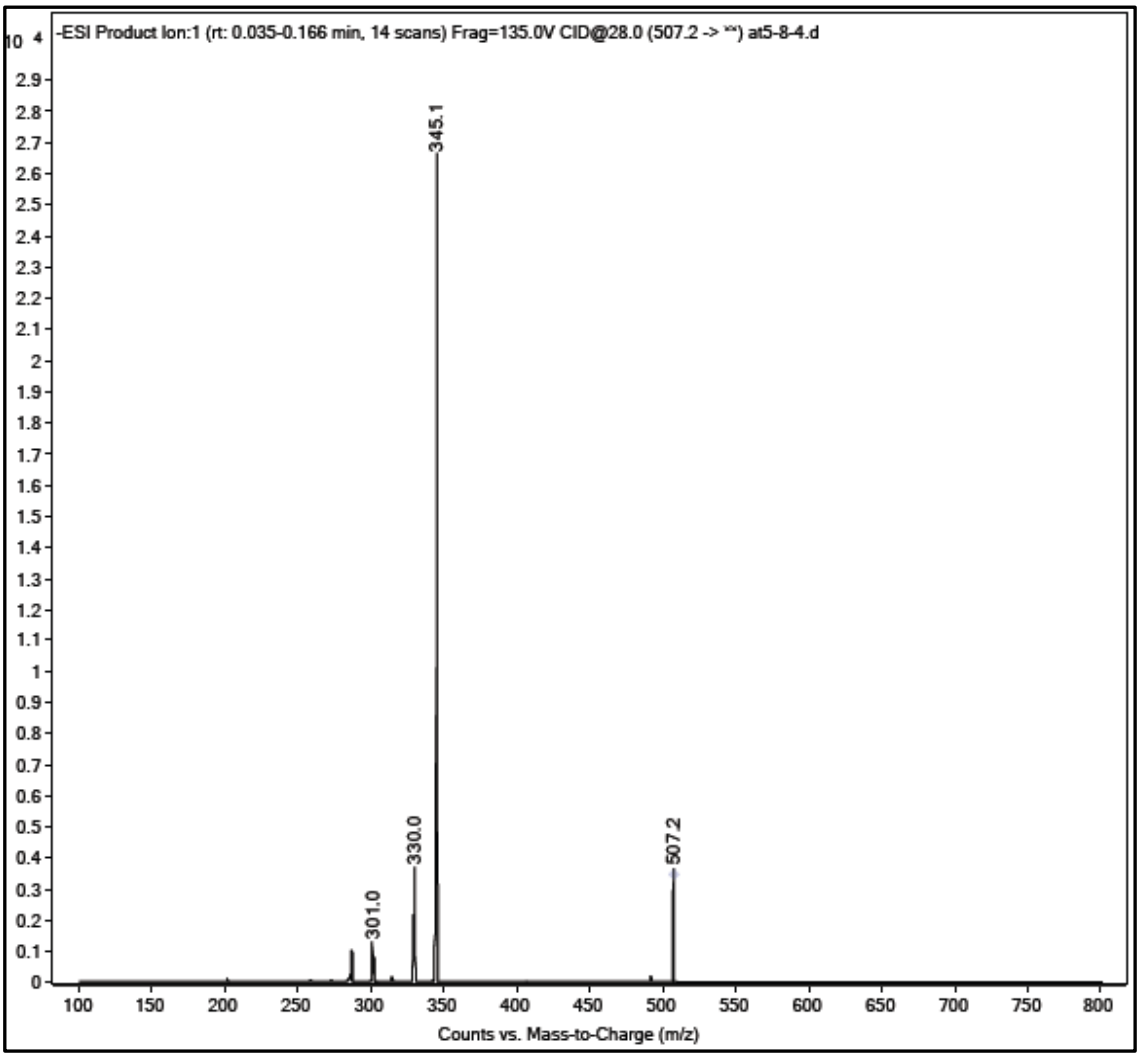
Şekil 4.77 *C. paphlagonica* Çiçek (CPÇ) kısmından izole edilen bileşikler

4.9 *C. paphlagonica* Bitkisinin Gövde-Yaprak (CPGY)'dan İzole Edilen Bileşikler

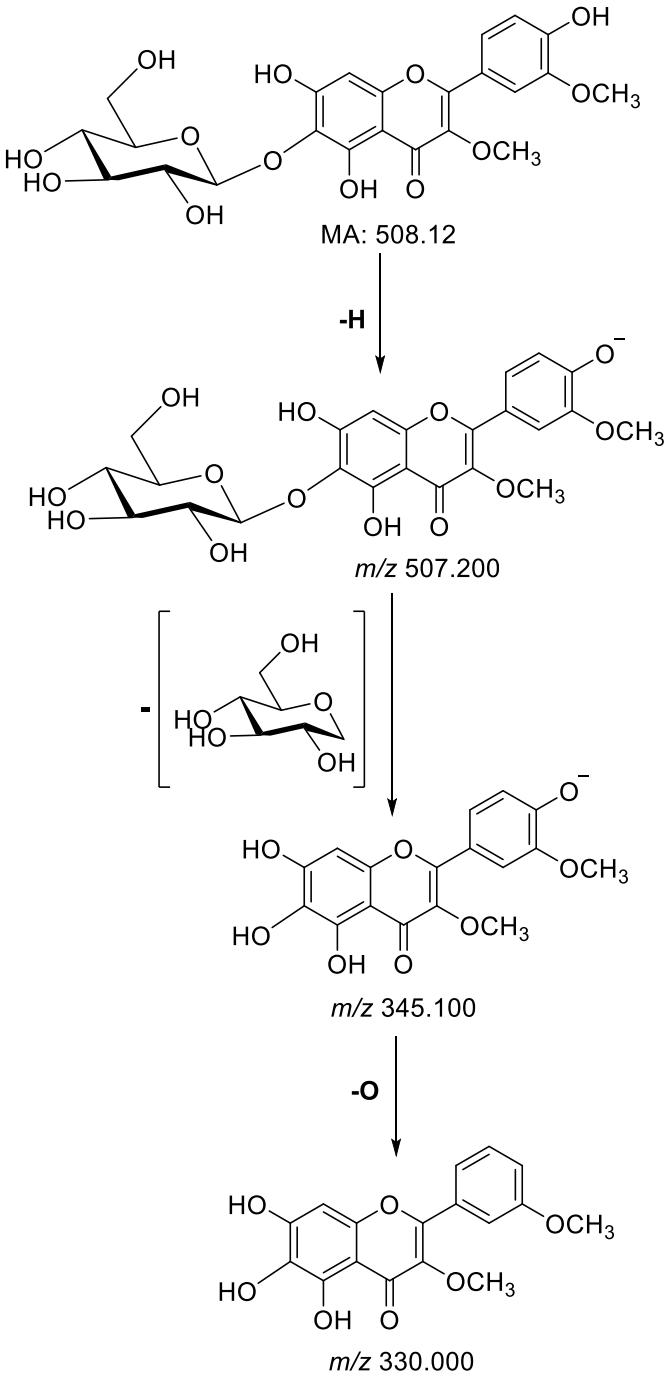
Antiproliferatif aktiviteye sahip *C. paphlagonica* bitkisinin gövde-yaprak (CPGY) kısmından elde edilen bitki ekstrelerinin aktivite yönlendirmeli izolasyonu ve buna ait detaylı izolasyon şeması Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir. Bu bitki kısmından 1 tane yeni flavon türevi bileşik (CPGY-8) ve 11 tane bilinen bileşik saflaştırılarak yapısı aydınlatıldı. Bilinen bileşikler arasında iki adet hidroksisinamik asit türevi [CPGY-1: Klorojenik asit (Özbilgin 2010), CPGY-4: 3-*O*-feruloilkuinik asit (Jin and Yoshida 2005)] ve yedi adet flavon türevi [CPGY-2: Luteolin-6-*C*-β-glikozit-İzoorientin (Bello *et al.* 2019), CPGY-3: Luteolin-8-*C*-β-glikozit-Orientin (Jang *et al*. 2015), CPGY-5: Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (Bohm *et al.* 1977), CPGY-6: Diosmetin 6-*C*-β glikozit (Zheng *et al.* 2017), CPGY-7: Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (Li *et al.* 1997), CPGY-9: Nepetin-Eupafolin (Zhao *et al.* 2018) ve CPGY-10: Cirsiliol (Sadaka 2017)] ve iki adet seskiterpen lakton bileşiği [CPGY-11: deasilsinaropikrin (Sosa *et al.* 2011) ve CPGY-12: 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) desasiklinaropikrin (Navarro *et al.* 1990)] izole edilmiş ve literatürler ile uyumlu olduğu görüldü.

4.9.1 CPGY-8 Bileşiği (Paphlagonica-2)

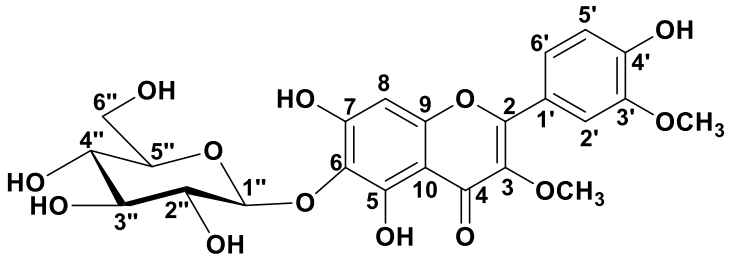
CPGY-8 sarı parlak renkli iğne şeklinde kristaller olarak elde edildi. Bileşiğin NMR spektral verilerinden kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde aydınlatıldı ve literatür için yeni bir bileşik olduğu belirlendi. LC-MS/MS spektrumunda teorik olarak m/z $[M-H]^-$ negatif iyon kütlesi 507.110 iken, analiz sonucunda 507.2000 olarak hesaplanmıştır. Bileşiğin kapalı formülü $C_{23}H_{24}O_{13}$ olarak bulunmuştur. Şekil 4.78'de CPGY-8 bileşiğine ait MS spektrumu ve Şekil 4.79'da tahmini MS-MS parçalanma ürünleri verilmiştir.



Şekil 4.78 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) MS spektrumu



Şekil 4.79 CPGY-8 bileşiği (Paphlagonica-2) için önerilen MS-MS parçalanma ürünleri



Şekil 4.80 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) yapısı

Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 4.81) incelendiğinde, bileşiğin B halkasında H-5' ve H-6' pozisyonundaki 5,6-disübstitüe sinyalleri ABX sisteminin var olduğunu göstermektedir. Spektruma göre, bileşiğin B halkası için kimyasal kayma değeri δ= 7.62 ppm olan (brs) H-2' protonu, δ= 6.94 ppm olan (*d, J*= 8.22 Hz) *orto* etkileşimi yapan H-5' protonu ve δ= 7.56 ppm olan (*d, J*= 8.22 Hz) orto etkileşimi yapan H-6' protonuna ait sinyaller belirlenmiştir. Bileşiğin A halkası için kimyasal kayma değeri δ= 6.58 ppm olan ve H-8'e ait olduğu belirlenen bir sinyal gözlenmiştir. Spektrumdan δ= 3.84 ppm ve δ= 3.77 ppm'de rezonans olan ve integrasyon değerine göre aromatik protona göre üç kat fazla olan sinyaller molekülde iki tane metoksi sinyalinin bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca δ= 4.77 ppm'deki protonun *d* şeklinde yarılma gözlenen (*J*= 7.38 Hz) sinyal β-bağlı anomerik hidrojene (H-1") aittir.

Bileşiğe ait ^{13}C DEPT-NMR spektrumu Şekil 4.83'te verilmiştir. Spektrum incelendiğinde molekülde iki tane metil (-OCH_3), bir tane metilen (-CH_2) karbonu, dokuz adet metin (-CH) karbonu ve on adet kuaterner karbonu olduğu belirlendi.

Bileşiğin HSQC spektrumundan (Şekil 4.84) δ= 6.58 ppm deki sinyal (H-8) δ= 94.7 ppm deki C sinyali (C-8) ile; δ= 7.62 ppm deki sinyal (H-2') δ= 112.4 ppm deki C sinyali (C-2'); δ= 6.9 ppm deki sinyal (H-5') δ= 116.1 ppm deki C sinyali (C-5') ile; δ= 7.56 ppm deki sinyal (H-6') δ= 122.6 ppm deki C sinyali (C-6') ile; δ= 3.8 ppm deki sinyal (OCH_3) δ= 56.1 ppm deki C sinyali (-OCH_3) ile; δ=3.8 ppm deki sinyal (-OCH_3) δ= 60.2 ppm deki C sinyali (-OCH_3) ile; δ= 4.77 ppm anomerik proton sinyali (H-1") δ= 104.6 ppm deki C sinyali (C-1") ile; δ= 3.60-3.44 ppm deki diastrotopik proton sinyalleri (H-6") δ= 61.1 ppm deki C sinyali (C-6") ile; δ=3.3 ppm deki sinyal (H-2")

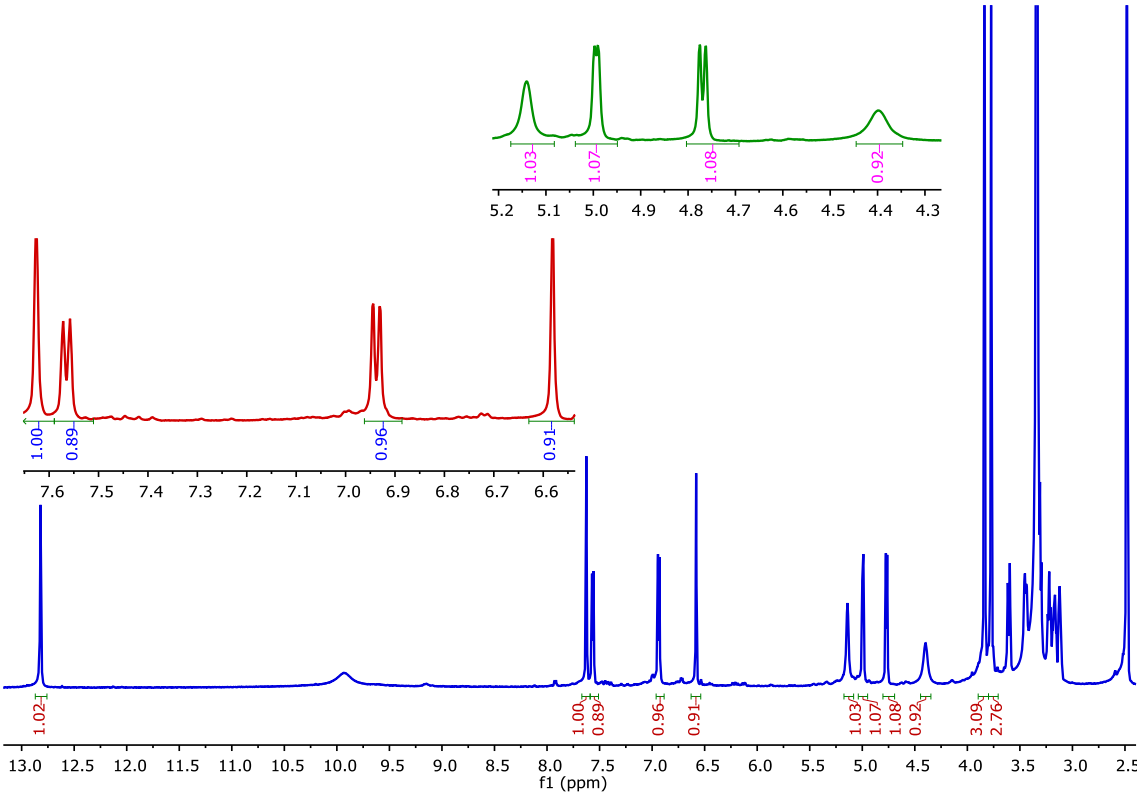
δ= 74.3 ppm deki C sinyali (C-2") ile; δ= 3.11 ppm deki sinyal (H-5") δ= 77.7 ppm deki C sinyali (C-5") ile; δ= 3.22 ppm deki sinyal (H-3") δ= 76.6 ppm deki C sinyali (C-3") ile ve δ=3.17 ppm deki sinyal (H-4") δ= 69.9 ppm deki C sinyali (C-4") ile ^{1}J etkileşimleri yapmış olup önerilen kimyasal yapı ile uyum halindedir.

Bileşiğin HMBC spektrumunda (Şekil 4.86), C5 konumunda bağlı olan OH protonu kendisine bağlı olan C5 (δ= 152.7) ile ^{2}J etkileşimi, C6 (δ= 128.5) ile ^{3}J etkileşimi ve C10 (δ= 104.8) ile ^{3}J korelasyonları yaptığı gözlendi. Flavonolün A halkasında bulunan H-8 protonu sırasıyla C7 (δ= 157.9) ile ^{2}J, C9 (δ= 152.4) ile ^{2}J, C6 (δ=128.6) ile ^{3}J, C10 (δ=104.8) ile ^{3}J, C4 (δ= 178.6) ile ^{4}J dört bağ üzerinden W etkileşimi ve azda olsa C5 (152.70) ile ^{4}J bağ üzerinden uzak mesafe etkileşimleri yaptıkları belirlendi. Flavonolün B halkasında H-2' protonu (δ= 7.62 ppm) sırasıyla C1' (δ= 121.2) ile ^{2}J, C6' (δ= 122.6) ile ^{3}J, C4' (δ= 147.9) ile ^{3}J, C3' (δ= 150.2) ile ^{2}J ve C2 (δ= 155.9) ile ^{3}J korelasyonları, H-5' konumundaki protonu (δ= 6.94 ppm) sırasıyla C1' (δ= 121.2) ile ^{3}J, C3' δ= (147.9) ile ^{2}J ve C4' (δ= 150.2) ile ^{2}J korelasyonları, H-6' konumundaki protonu (δ= 7.56 ppm) sırasıyla C2' (δ= 112.4) ile ^{3}J, C4' (δ= 150.2) ile ^{3}J 3 bağ üzerinden çok azda olsa ve C2 (δ= 155.9) ile ^{3}J üzerinden etkileşimler belirlenmişlerdir. Burada H-6' protonunun δ= 150.2 ppmde etkleşim göstermesi fakat metoksi üzerindeki elektronik rezonans yapısından dolayı daha yukarı alanda rezonans olan δ= 147.9 ppmdeki karbon ile etkileşim göstermemesi B halkasındaki metoksi grubunun moleküle C-3' konumundan bağlı olduğunu göstermiştir ve δ= 4.77 ppm'deki H-1" anomerik protonun δ= 128.6 ppm'deki C6 karbonu ile korelasyonu şeker grubunun A halkasının C6 pozisyonundan bağlı olduğunu göstermiştir. Tüm korelasyonlar molekül yapısının önerildiği şeklinde olduğunu doğrulamaktadır (Şekil 4.80). Molekülün 2D HMBC etkileşimleri Şekil 4.87'de verilmiştir.

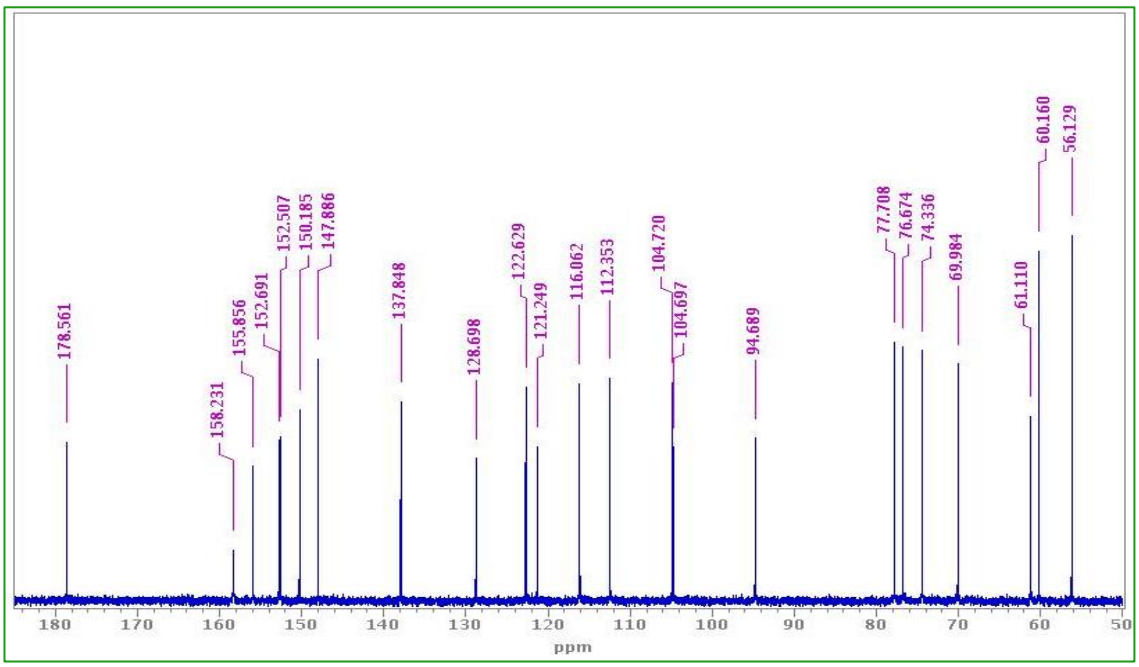
Bileşiğe ait homonükleer COSY spektrumundan; H-5' protonu H-6' ile ^{3}J bağ üzerinden etkileşimi ve şeker grubundaki H-1" protonu H-2" ile ^{3}J bağ üzerinden etkileşimleri belirlenmiş olup önerilen kimyasal yapı ile uyumludur (Şekil 4.88). Önerilen bileşiğe ait ^{1}H ve ^{13} C NMR spektral verileri Çizelge 4.15'te dataylı şekilde sunulmuştur.

Çizelge 4.15 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri (DMSO-d_6)

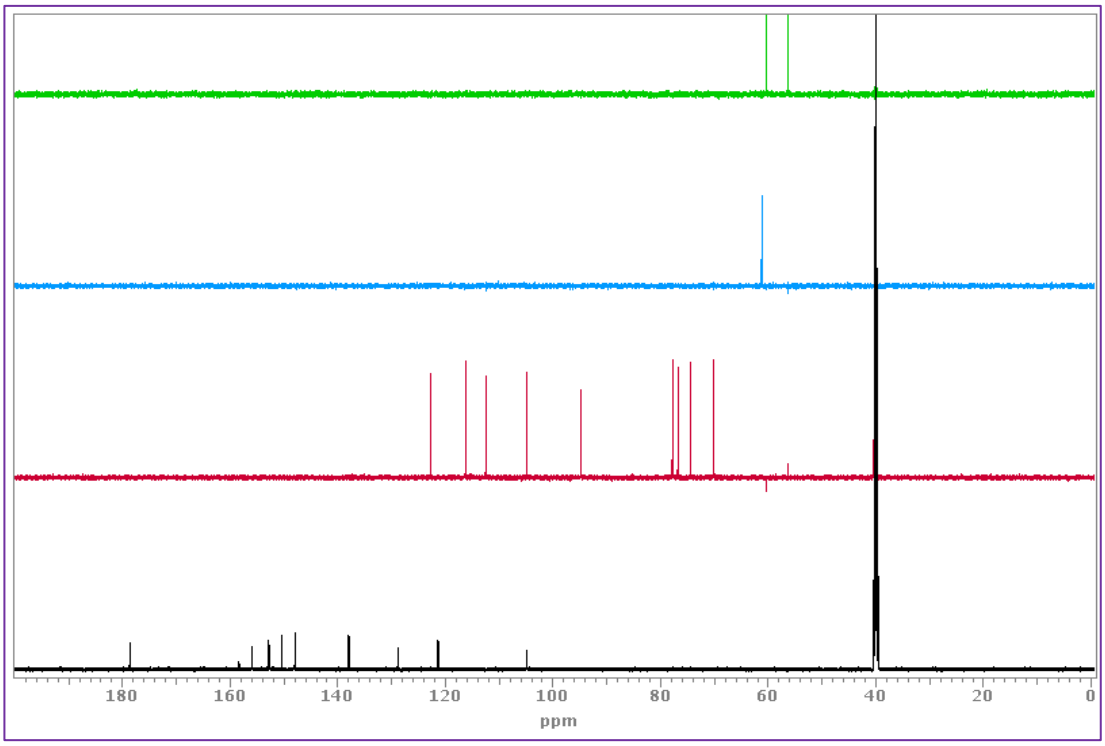
Konum	^{13}C **(ppm)**	^{1}H **(ppm) (*J*, Hz)**
2	155.9	-
3	137.9	-
4	178.6	-
5	152.7	12.82 (*s*, -OH)
6	128.6	-
7	157.9	-
8	94.6	6.58 (*s*)
9	152.4	-
10	104.8	-
1'	121.2	-
2'	112.4	7.62 (*s*)
3'	147.9	-
4'	150.2	-
5'	116.1	6.94 (*d*, *J*= 8.22 Hz, *o*)
6'	122.6	7.56 (*d*, *J*= 8.22 Hz, *o*)
1''	104.7	4.77 (*d*, *J*= 7.38 Hz, β)
2''	74.3	3.32 (*m*)
3''	76.6	3.22 (*m*)
4''	70.0	3.17 (*m*)
5''	77.7	3.11 (*m*)
6''	61.1	3.44-3.60 (*m*)
-OCH_3	56.1	3.84 (*s*)
-OCH_3	60.2	3.77 (*s*)



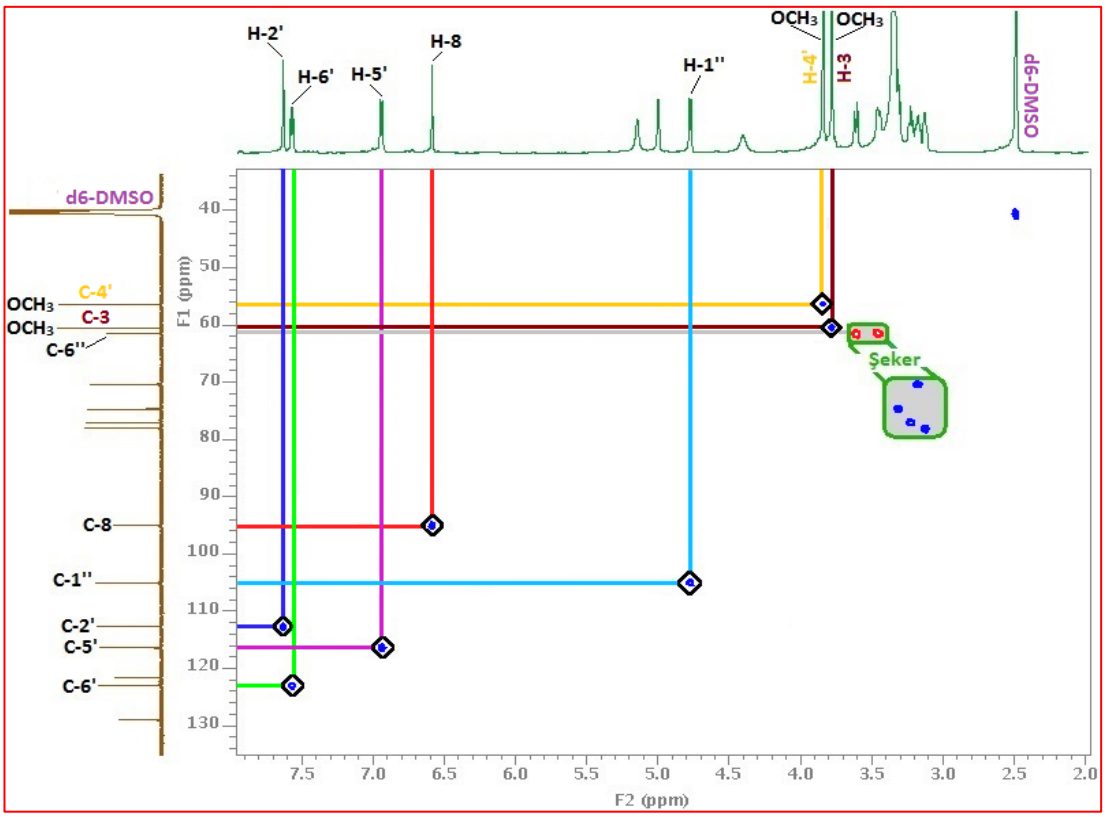
Şekil 4.81 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



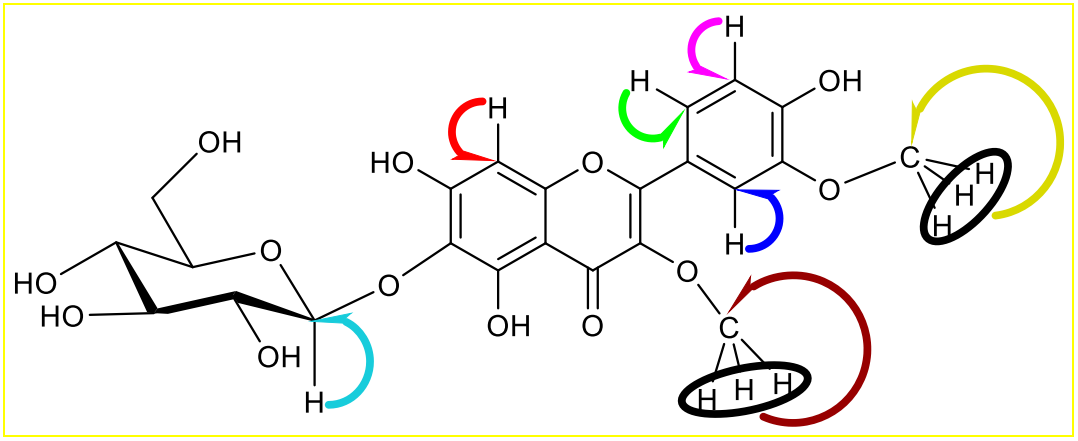
Şekil 4.82 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



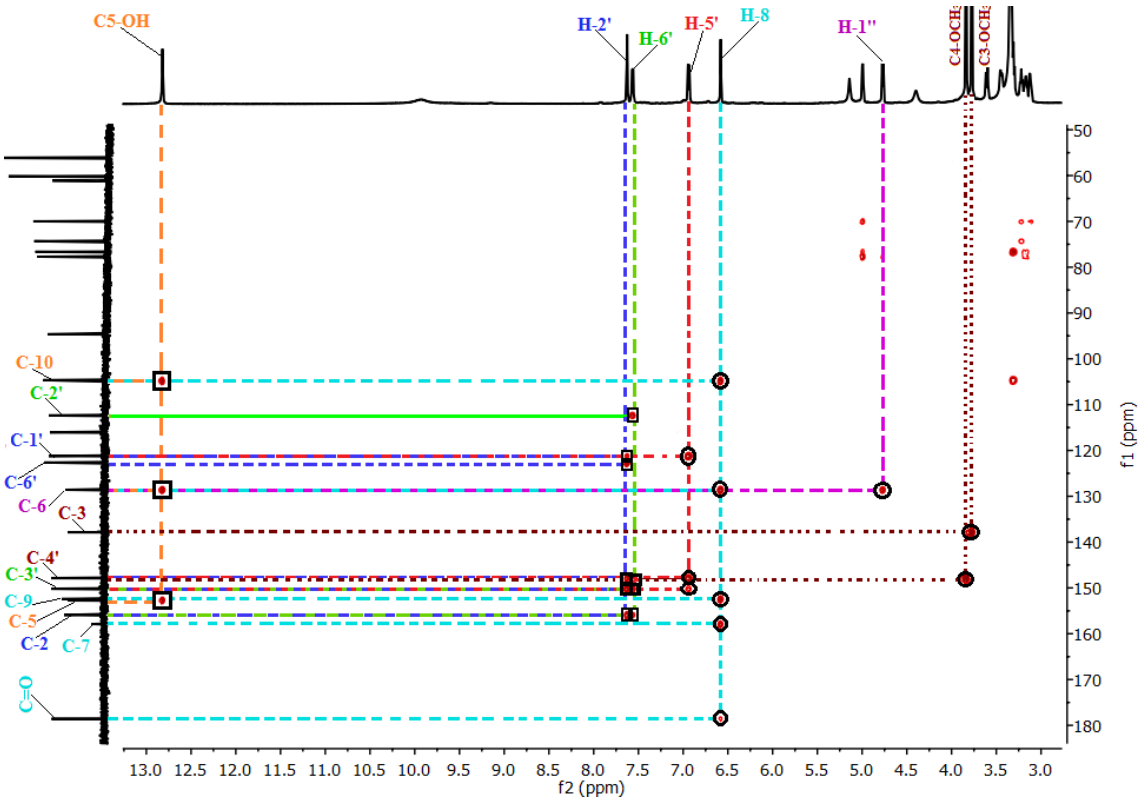
Şekil 4.83 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



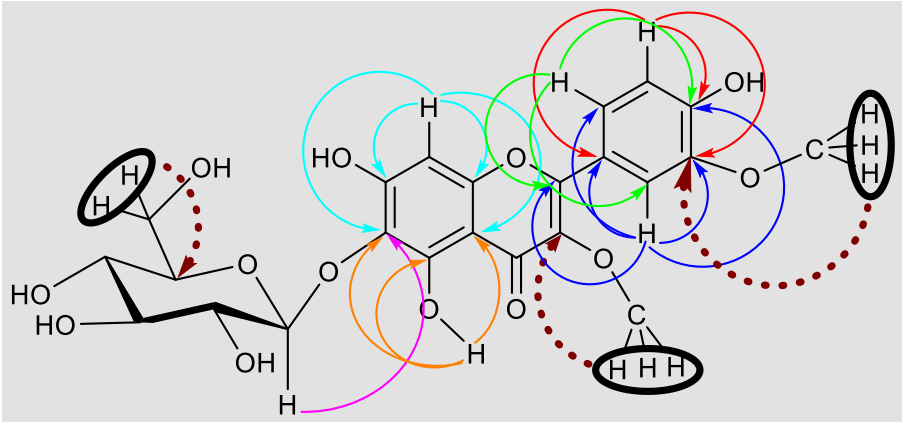
Şekil 4.84 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



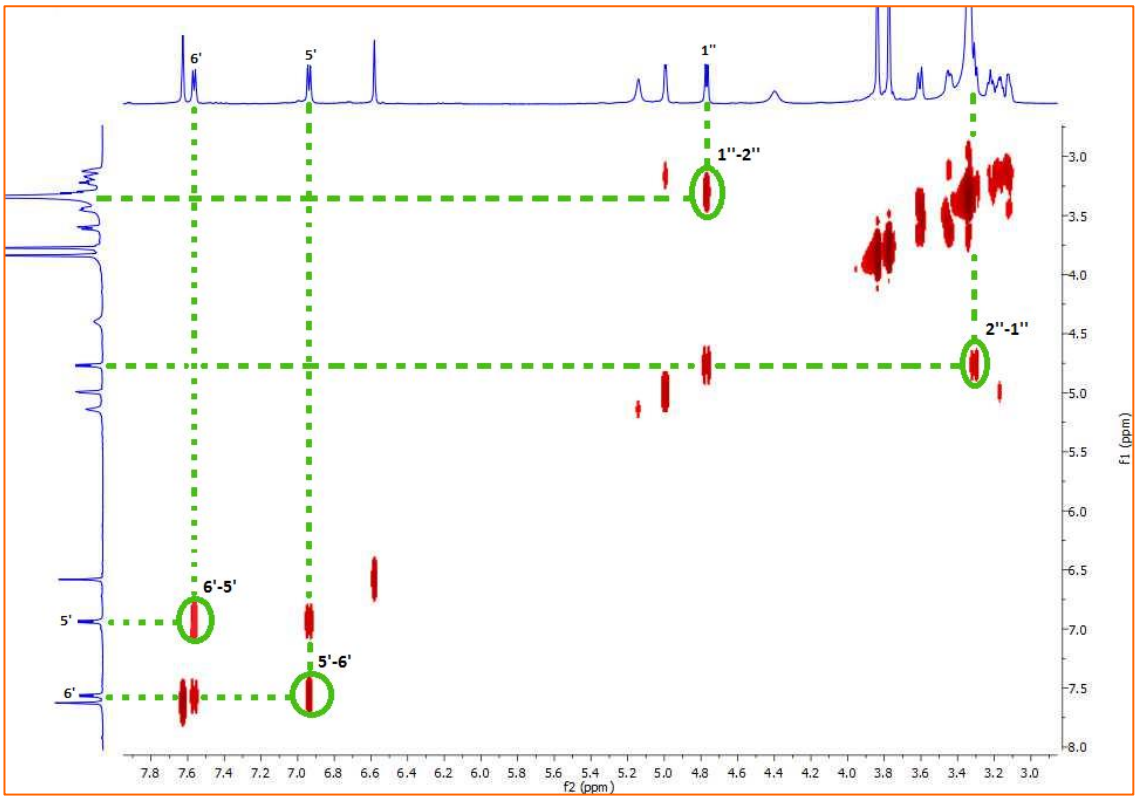
Şekil 4.85 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HSQC etkileşimi



Şekil 4.86 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



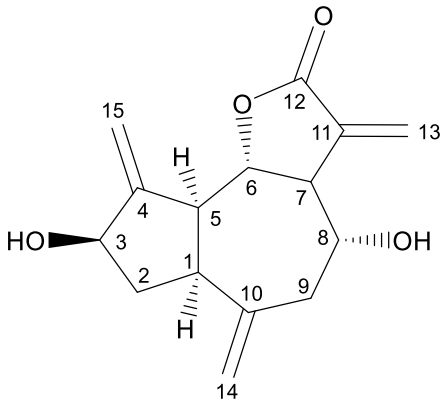
Şekil 4.87 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) HMBC etkileşimleri



Şekil 4.88 CPGY-8 bileşiğinin (Paphlagonica-2) COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)

4.9.2 CPGY-11 Bileşiği (deasilsinaropikrin)

Jelimsi yapıda elde edilen CPGY-11 bileşiğinin kimyasal yapısı spektroskopik yöntemlerle seskiterpen lakton sınıfı deasilsinaropikrin olarak aydınlatıldı. HPLC-TOF/MS spektrumunda negatif modda iyonlaşarak m/z $[M-H]^-$ 261.008 iyon kütlesine sahip olduğu belirlendi. Bileşiğin kapalı formülü $C_{15}H_{18}O_4$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.89 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) kimyasal yapısı

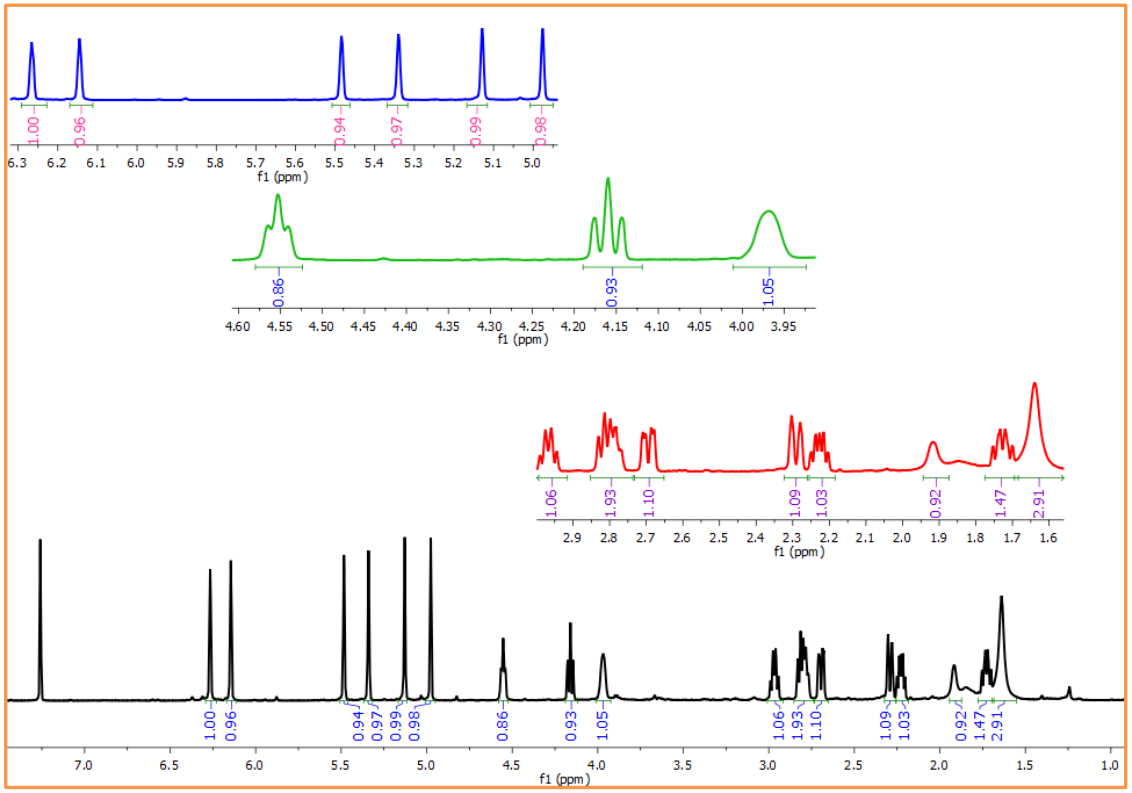
Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 4.90) incelendiğinde; aşağı alanda rezonans olan δ= 6.27 ppm (H-13b, *s*) ve δ= 6.15 ppm (H-13a, *s*) deki iki geniş sinlet sinyalinin bulunması lakton halkasının karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının varlığını işaret etmektedir. Kimyasal kayma değerleri δ= 5.34 ppm (brs, H-15b) ve δ= 5.48 ppm (brs, H-15a), δ= 4.97 ppm (brs, H-14b) ve δ= 5.12 (brs, H-14a) ppm'de gözlenen 4 ayrı singlet sinyali molekülde diğer metilen (=CH_2) gruplarından ileri gelmektedir. Lakton halkasının H-6 protonu δ= 4.16 ppm'de rezonans olmuş *trans* konumundaki H-5 ve H-7 ile aksiyal-aksiyal etkileşimden dolayı δ= 1.73 ppm (dd, J_1=10.2, J_2=9.48 Hz) yarılma göstererek aşağı alanda rezonans olması bu protonun β pozisyonundan bağlı olduğunu göstermiştir.

Bileşiğe ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu Şekil 4.92'de verilmiştir. Spektrumdan bileşiğin 5 tane metilen (-CH_2), 6 adet metin ve 4 adet kuaterner karbon içerdiği belirlendi.

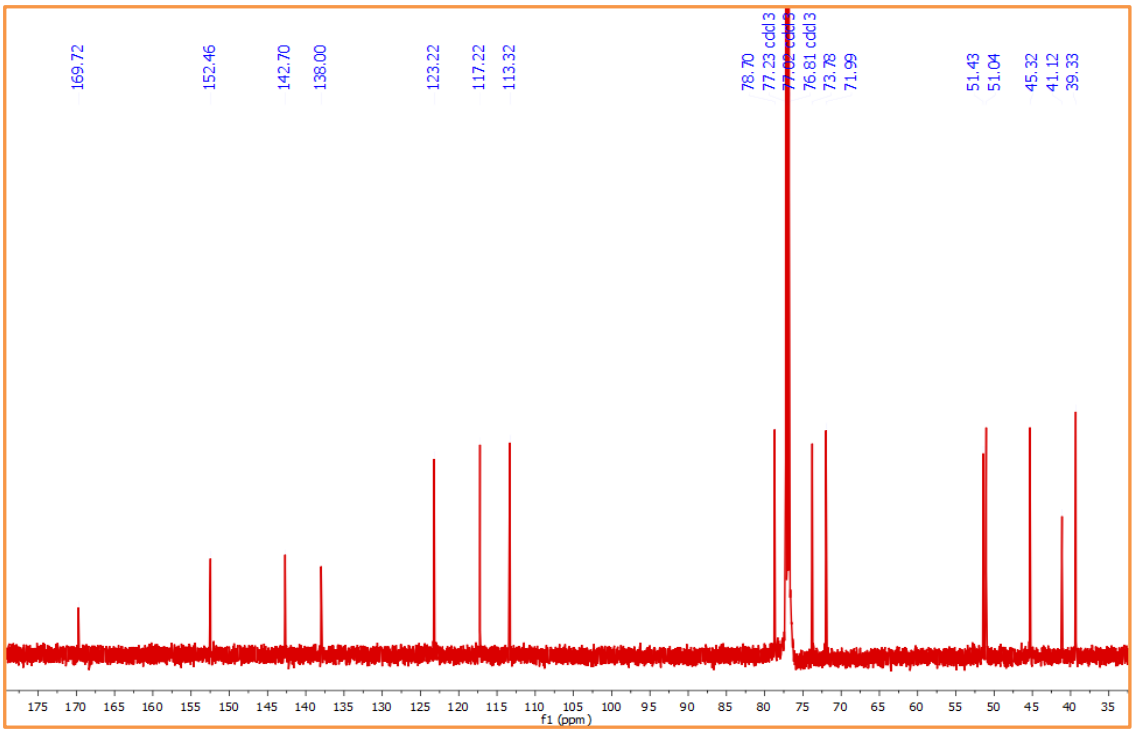
Bileşiğe bağlı ekzosiklik uç alken gruplarının dışında; δ= 1.73 ppm (*dd*, J_1=13.6, J_2= 10.9 Hz, H-2b), δ= 2.23 ppm (*ddd*, J_1=13.5, J_2=7.20, J_3=6.36 Hz) H-2 protonlarının δ= 39.4 ppm'deki C-2 ile, δ=2.69 ppm (dd, J_1=14.0, J_2=3.12 Hz, H-9a), 2.28 (dd, J_1=14.2, J_2=4.32 Hz, H-9b) ppm H-9 protonlarının δ= 41.1 ppm'deki C-9 pozisyonunda siklik yapı içerisinde bağlı olduğu HSQC spektrumundan (Şekil 4.94) belirlenmiştir. Bileşiğin 1D (Çizelge 4.16) ve 2D NMR (Şekil 4.94, Şekil 4.96 ve Şekil 4.97) sonuçları incelendiğinde bileşiğin deasilsinaropikrin bileşiği olduğu ve literatür ile uyumlu olduğu görüldü.

Çizelge 4.16 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri ($CDCI_3$)

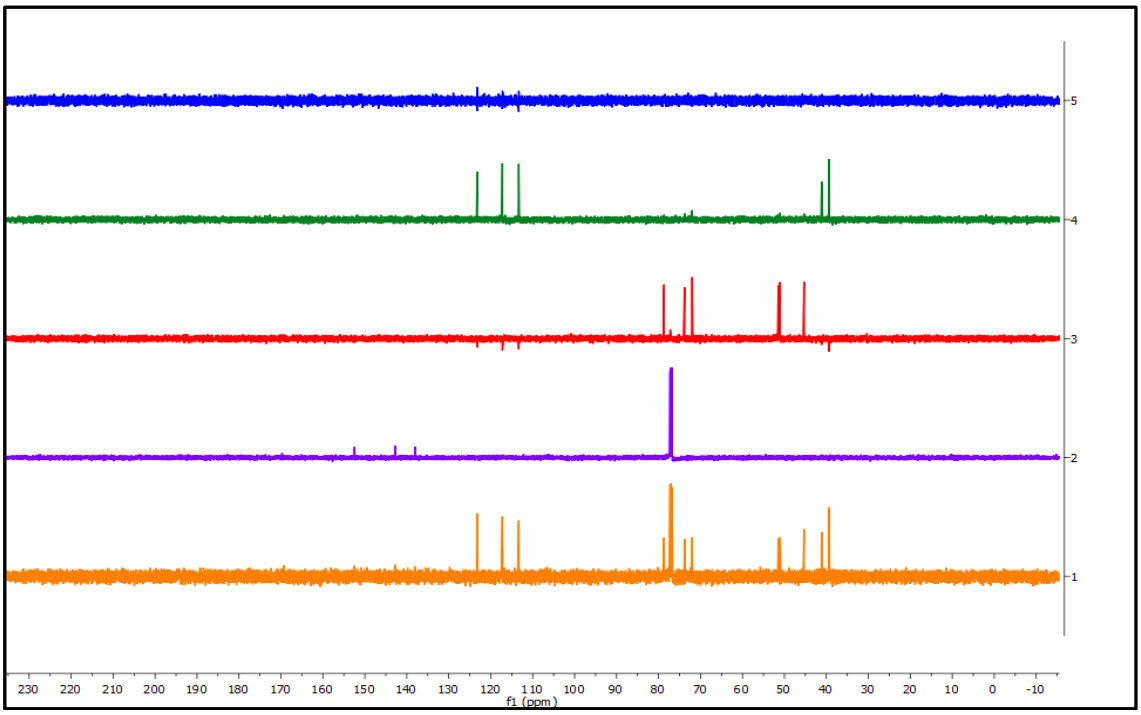
Konum	^{13}C **(ppm)**	^{1}H **(ppm) (*J*, Hz)**
1	45.3	2.97 (*ddd*, J_1= 10.1, J_2= 8.93, J_3= 4.93 Hz)
2	39.4	1.73 (*dd*, J_1= 13.6, J_2= 10.9 Hz, H-2b)
		2.23 (*ddd*, J_1= 13.5, J_2= 7.20, J_3= 6.36 Hz, H-2a)
3	73.8	4.55 (t)
4	152.6	-
5	51.4	2.82 (m)
6	78.7	4.16 (*dd*, J_1= 10.2, J_2= 9.48 Hz)
7	51.1	2.78 (m)
8	71.9	3.97 (m)
9	41.1	2.69 (*dd*, J_1= 14.0, J_2= 3.12 Hz, H-9a)
		2.28 (*dd*, J_1= 14.2, J_2= 4.32 Hz, H-9b)
10	142.8	-
11	138.1	-
12	169.7	-
13	123.1	6.15 (*s*, H-13b)
		6.27 (*s*, H-13a)
14	117.1	4.97 (*s*, H-14b)
		5.13 (*s*, H-14a)
15	113.2	5.34 (*s*, H-15b)
		5.48 (*s*, H-15a)



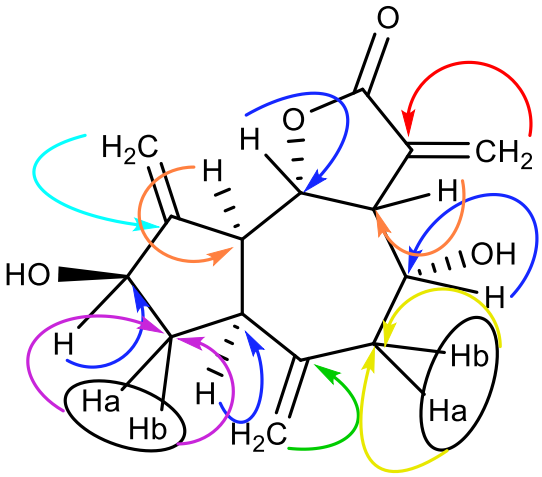
Şekil 4.90 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



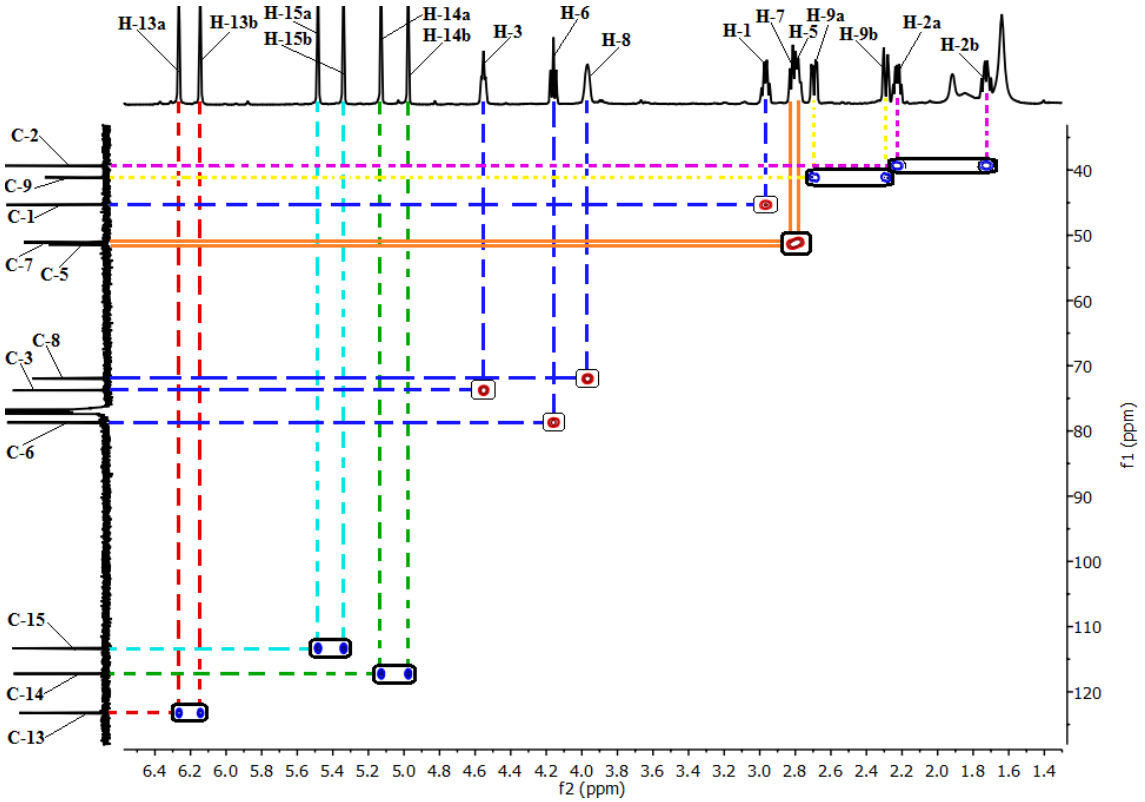
Şekil 4.91 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



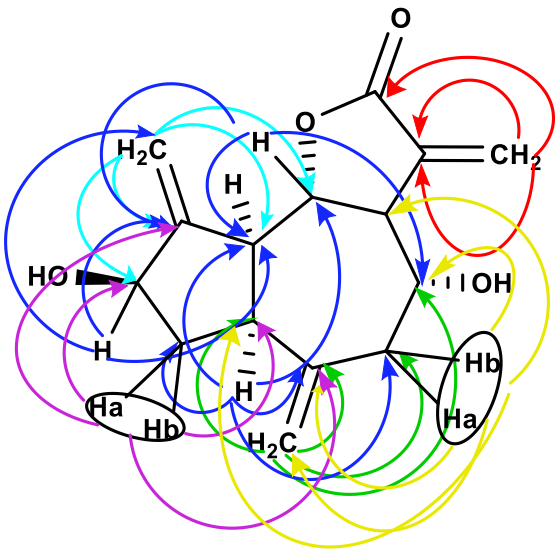
Şekil 4.92 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) ^{13}C DEPT NMR spektrumu ($CDCl_3$)



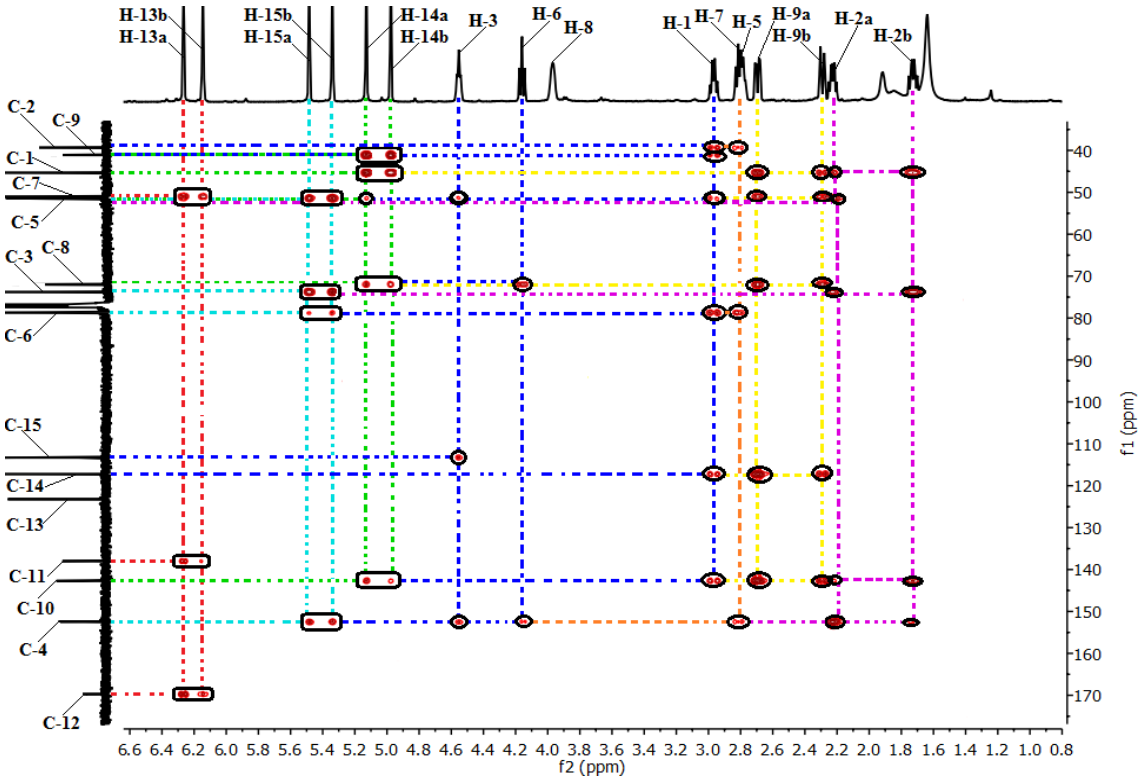
Şekil 4.93 CPGY-11 bileşiğinin HSQC etkileşimleri



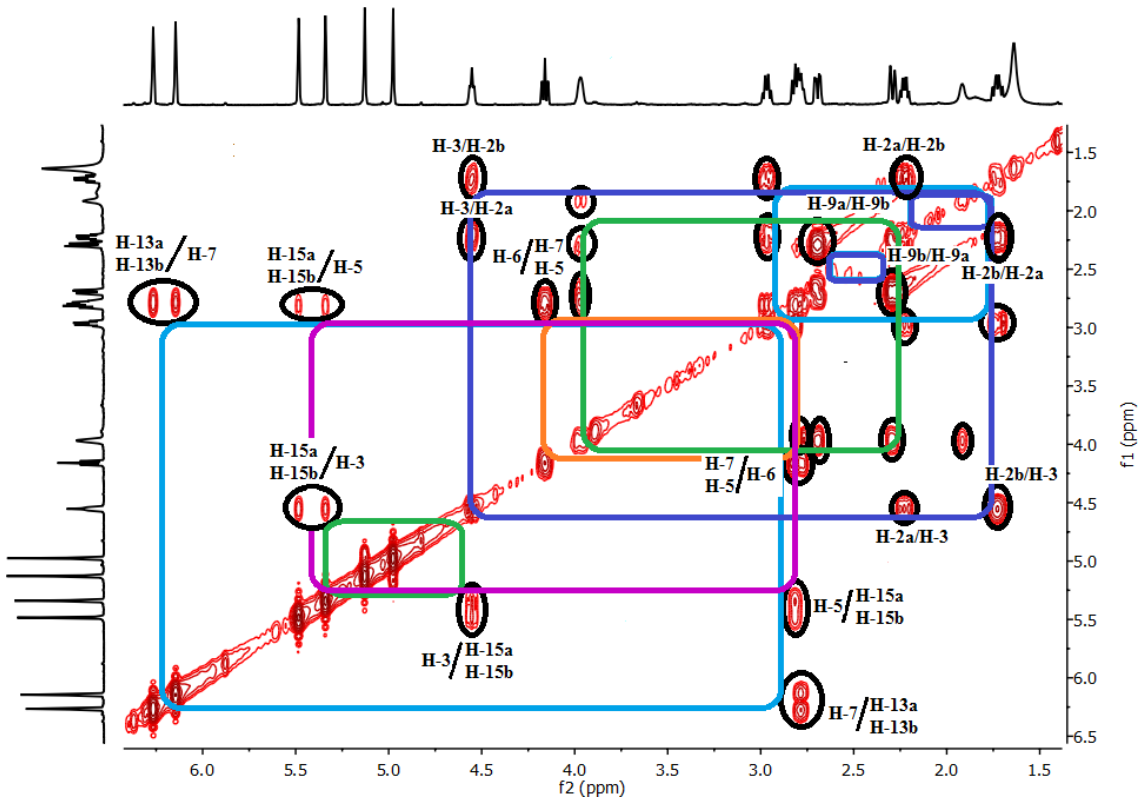
Şekil 4.94 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) HSQC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



Şekil 4.95 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) HMBC etkileşimleri



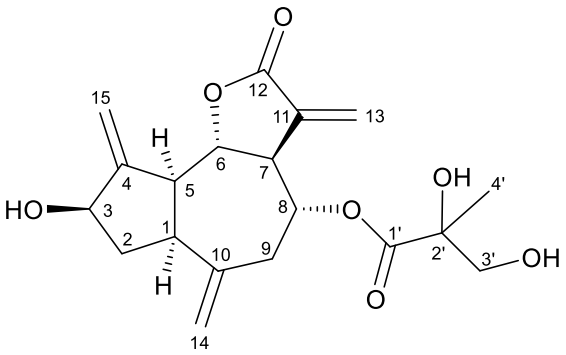
Şekil 4.96 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) HMBC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



Şekil 4.97 CPGY-11 bileşiğinin (deasilsinaropikrin) COSY NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)

4.9.3 CPGY-12 Bileşiği [8α-*O*-(2', 3'-dihidroksiizobütiril) desasiklinaropikrin]

CPGY-12 beyaz renkli küp şeklinde kristaller halinde elde edildi ve kimyasal yapısı spektroskopik yöntemler ile 8α-*O*-(2',3'-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin olarak aydınlatıldı. HPLC-TOF/MS spektrumunda pozitif modda m/z $[M-H]^-$ 364.05 moleküler iyon piki gözlendi. Bileşiğin kapalı formülü $C_{19}H_{24}O_7$ olarak belirlendi.



Şekil 4.98 CPGY-12 bileşiğinin [8α-*O*-(2',3'-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] yapısı

$CDCl_3$ çözücü ile analizi yapılan bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4.99'da verilmiştir. Spekrum incelendiğinde; aşağı alanda rezonans olan δ= 6.20 ppm (H-13b, *s*) ve δ= 5.59 ppm (H-13a, *s*) deki iki geniş sinlet sinyalinin bulunması, molekülde H-7 ile alilik bağlanma şeklinden dolayı lakton halkasının tipik ekzosiklik metilen protonlarının varlığının göstergesidir. C-14 karbonuna bağlı protonların kimyasal kayma değerleri δ= 5.05 ppm (brs, H-14b) ve δ= 5.12 ppm (brs, H-14a) de gözlenmiş olup C-10 ile; C-15 karbonuna bağlı protonların kimyasal kayma değerleri δ= 5.35 ppm (brs, H-15b) ve δ=5.47 ppm (brs, H-15a) da gözlenmiş olup C-4 ile HMBC etkileşimleri (Şekil 4.102) bu pozisyonlara bağlı ekzometilen ($=CH_2$) gruplarının varlığını doğrulamaktadır. Lakton halkasının H-6 protonu *trans* H-5 ve *trans* H-7 ile aksiyal-aksiyal etkileşimden dolayı *dd* (*J*=9.42 Hz, *J*=8.79 Hz) sinyali vermesi ve δ= 4.30 ppm'de aşağı alanda rezonans olması bu protonun β pozisyonundan bağlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.99).

Bileşiğe ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu Şekil 4.101'de verilmiştir. Spektrum incelendiğinde bileşiğe ait 1 adet metil, 6 tane metilen (-CH_2), 6 adet metin ve 6 adet kuaterner karbonun varlığı tespit edildi.

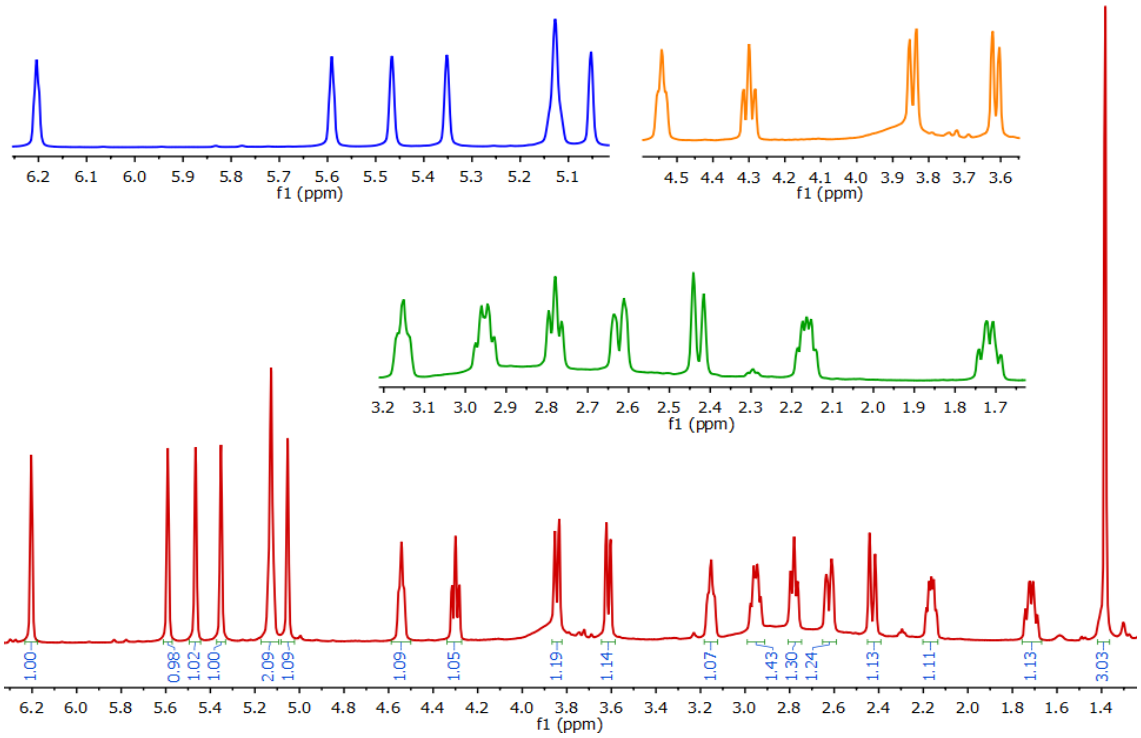
Bileşiğe bağlı ekzosiklik uç alken gruplarının dışında; δ= 2.62 (*dd*, *J*= 14.8, *J*= 3.12 Hz, H-2b), δ= 2.43 (*d*, *J*= 15.3 Hz H-2a) ppm H-2 protonlarının δ= 35.4 ppm'deki C-2 ile; δ= 1.71 (*dd*, *J*= 12.1 Hz, *J*= 5.8 Hz, H-9a), δ= 2.16 (*dd*, *J*= 12.2 Hz, *J*= 4.9 Hz, H-9b) ppm H-9 protonlarının 38.9 ppm'deki C-9 pozisyonunda siklik yapı içerisinde bağlı olduğu ve 3.61(d, *J*=11.22 Hz), δ= 3.84 (d, *J*= 11.22 Hz) ppm H-3' protonlarının δ= 68.6 ppm'deki C-3' ile doğrudan bağlı olduğu HSQC spektrumundan belirlenmiştir (Şekil 4.104).

Bileşiğin HMBC spektrumu, elektronegatif bir atoma bağlı olması sebebi ile aşağı alanda rezonans olan δ= 5.13 ppm'deki multiplet sinyale sahip H-8 protonu ^{3}J bağ üzerinden δ= 175.1 ppm'deki C-1' karbonil karbonu ile körele olmuştur. Bu etkileşime göre bileşikte izo bütirat grubunun varlığı ve α,β-dihidroksi-izobutirat grubunun C-8 karbonundan bağlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca singlet olarak rezonans olan, integrasyon değeri 3 kat fazla olan ve kimyasal kayma değerinden yapıdaki 1.38 ppm'de H-4' metil grubunun (δ= 21.5 ppm C-4') bileşikteki δ= 75.9 ppm'deki C-2' ile HMBC etkileşimi göstermesi yapıyı doğrulamaktadır.

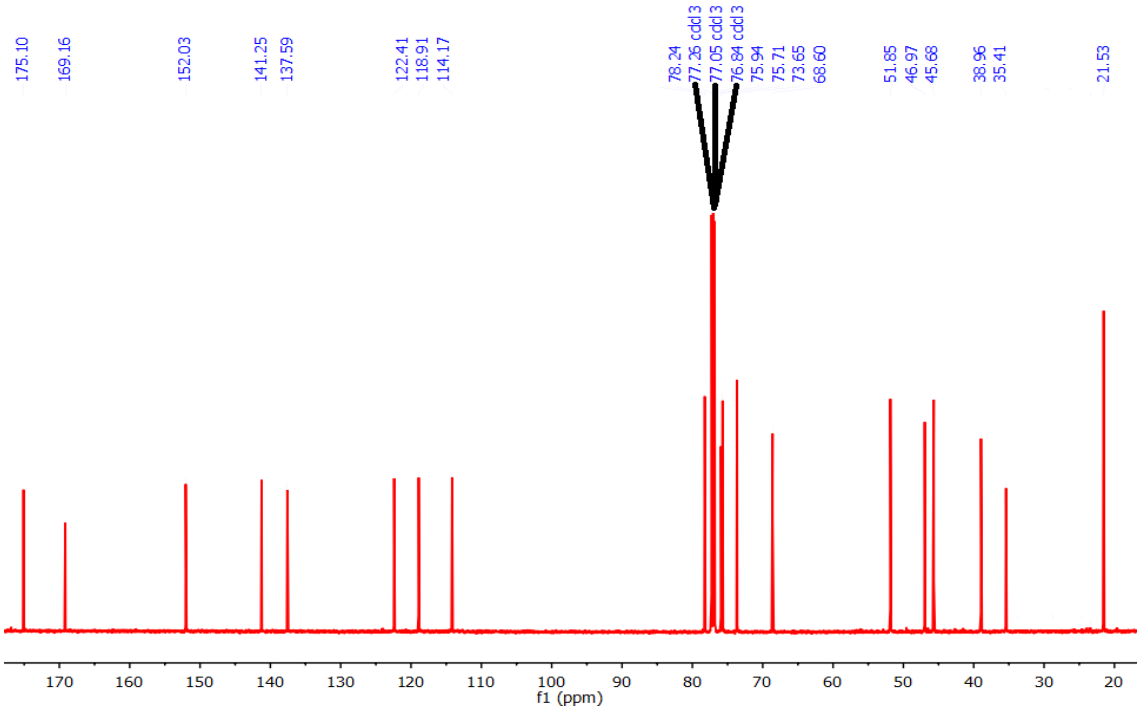
Bileşiğe ait NMR değerleri ^{13}C ve ^{1}H NMR değerleri Çizelge 4.17'de verilmiş olup literatürde verilenler ile uyumluluk göstermiştir ve bileşiğin 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin olduğu teyit edilmiştir.

Çizelge 4.17 CPGY-12 bileşiği [8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{1}H ve ^{13}C-NMR değerleri ($CDCI_3$)

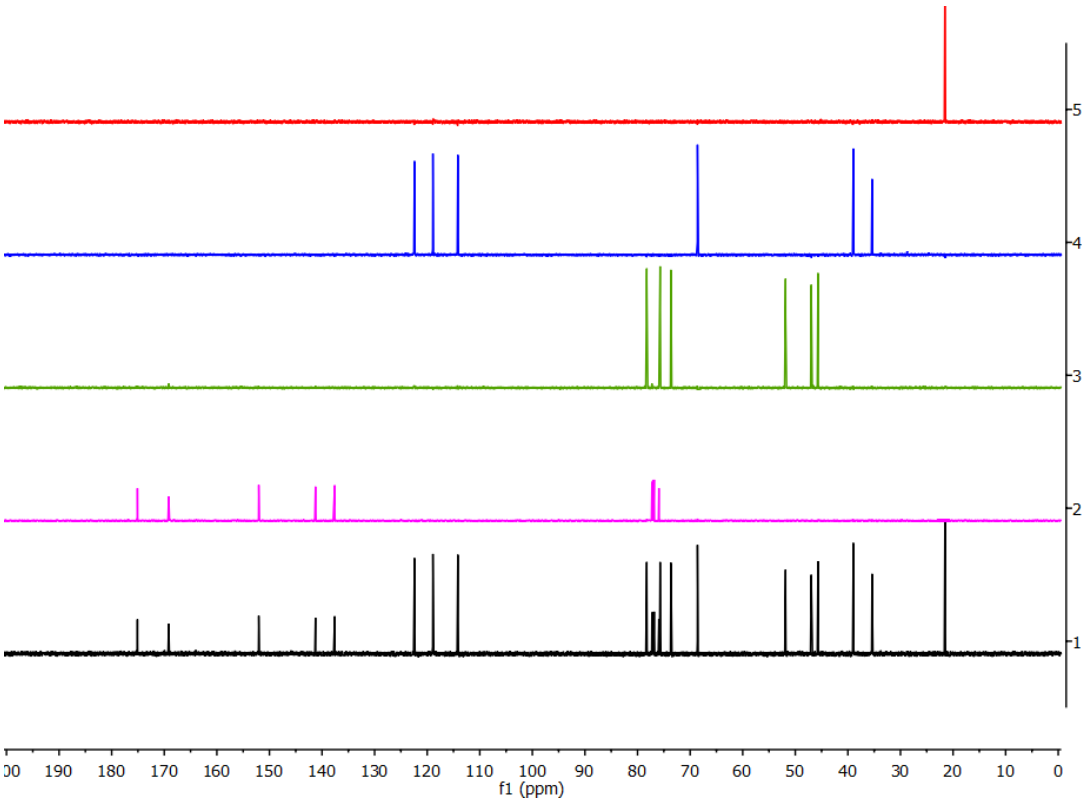
Konum	^{13}C **(ppm)**	^{1}H **(ppm) (*J*, Hz)**
1	45.6	2.95 (*ddd*, J_1= 10.0, J_2= 8.52 ve J_3= 7.62 Hz)
2	35.4	2.62 (*dd*, J_1=14.8, J_2=3.12 Hz, H-2b)
		2.43 (*d*, *J*= 15.3 Hz, H-2a)
3	73.6	4.54 (*t*)
4	152.3	-
5	51.8	2.78 (*dd*, J_1= 10.1, J_1= 8.8 Hz)
6	78.2	4.30 (*d*, *J*= 9.42 Hz)
7	46.9	3.15 (m)
8	75.7	5.13 (brs)
9	38.9	1.71 (*dd*, J_1= 12.1, J_2= 5.8 Hz, H-9a) 2.16 (*dd*, J_1= 12.2, J_2= 4.9 Hz, H-9b)
10	141.2	-
11	137.6	-
12	169.1	-
13	122.4	6.20 (brs, H-13b) 5.59 (brs, H-13a)
14	118.9	5.05 (brs, H-14b) 5.12 (brs, H-14a)
15	114.2	5.35 (brs, H-15b) 5.47 (brs, H-15a)
1'	175.1	-
2'	75.9	-
3'	68.6	3.61(*d*, *J*=11.22 Hz) 3.84 (*d*, *J*=11.22 Hz)
4'	21.5	1.38 (*s*, 3H)



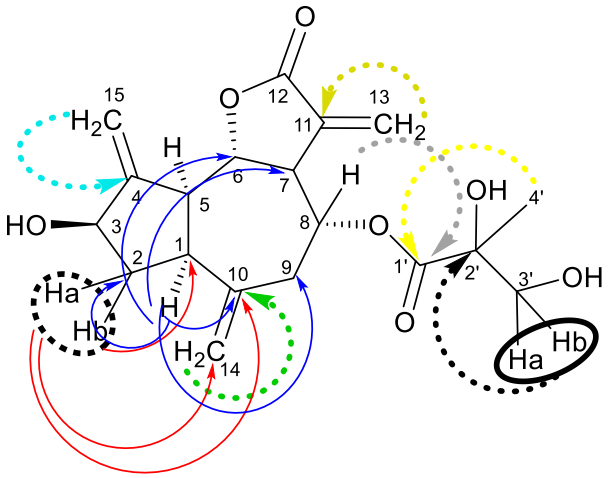
Şekil 4.99 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



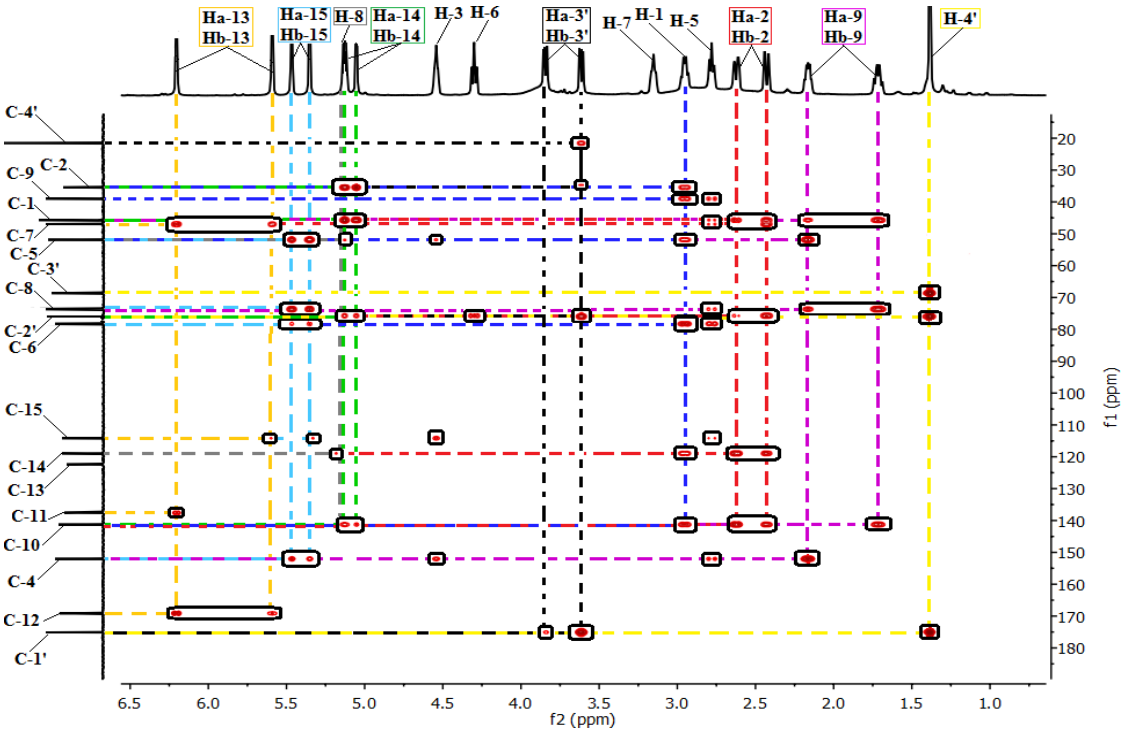
Şekil 4.100 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{13}C NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



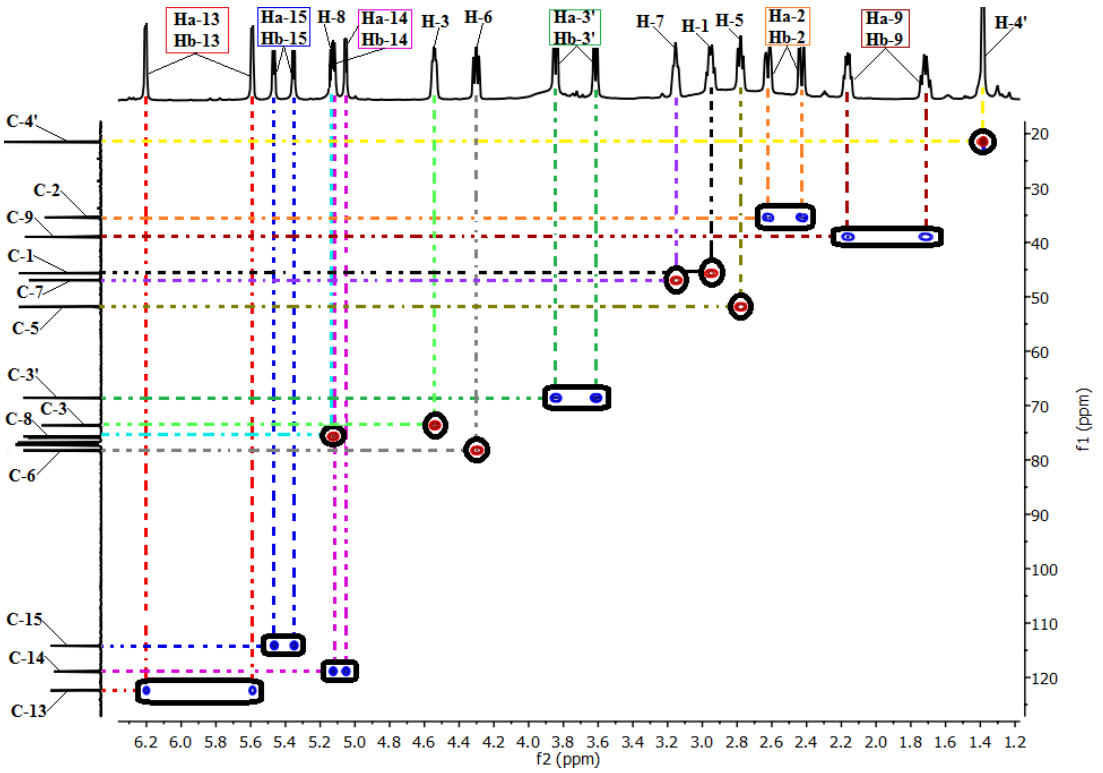
Şekil 4.101 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin] ^{13}C DEPT NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



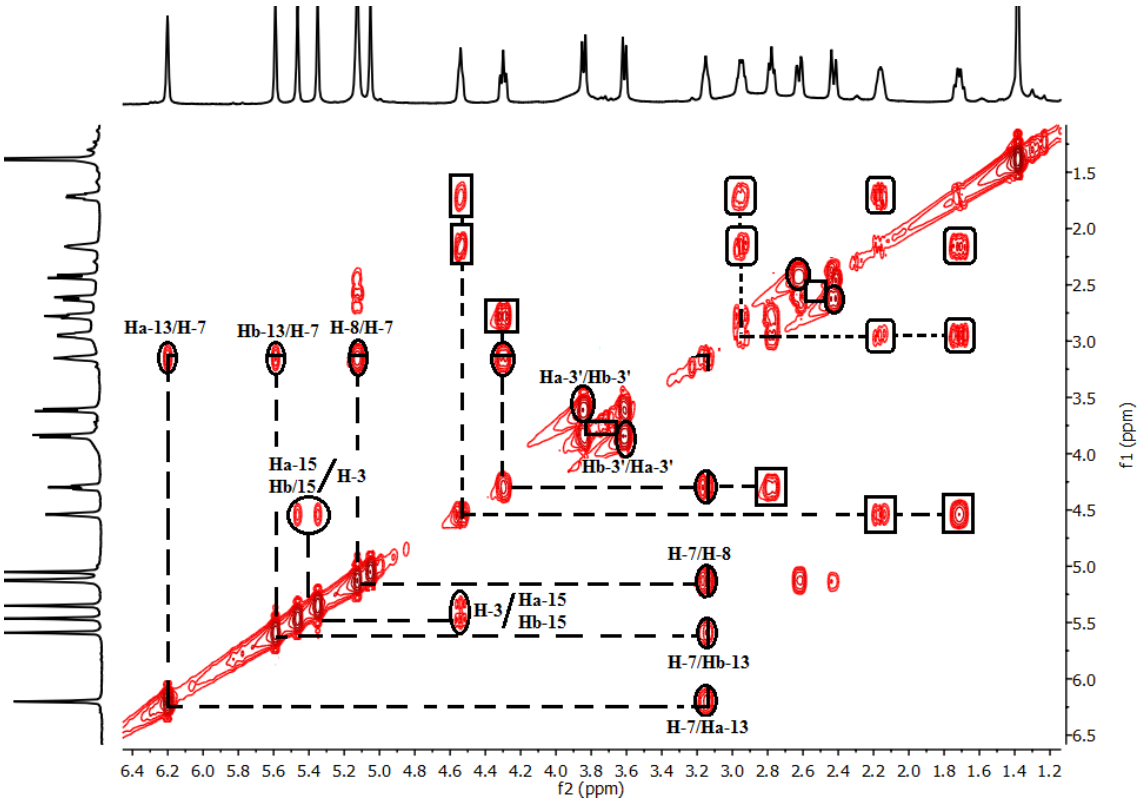
Şekil 4.102 CPGY-12 bileşiğine ait **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** HMBC etkileşimleri



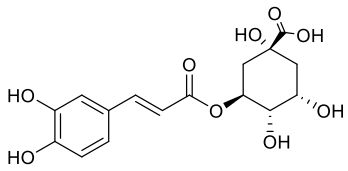
Şekil 4.103 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** HMBC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



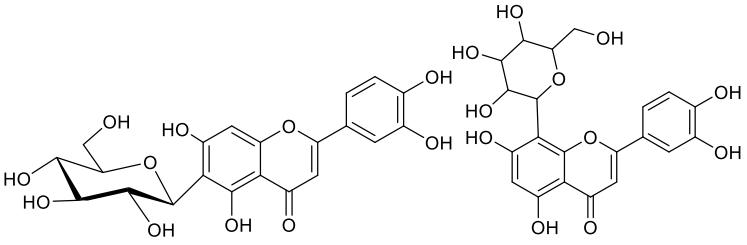
Şekil 4.104 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** HSQC NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)



Şekil 4.105 CPGY-12 bileşiğinin **[**8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobutiril) desasiklinaropikrin**]** ^{1}H-^{1}H COSY NMR spektrumu ($CDCl_3$-d_1)

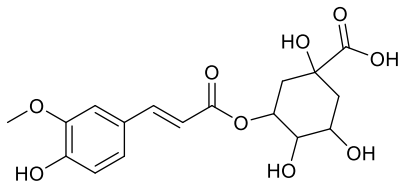


CPGY-1
Klorojenik asit

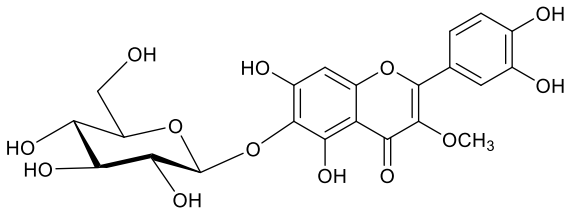


CPGY-2
İzoorientin

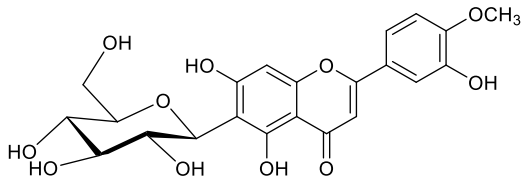
CPGY-3
Orientin



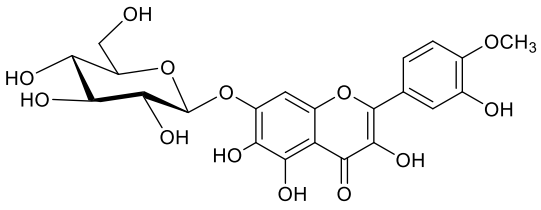
CPGY-4
3-*O*-feruloilkuinik asit



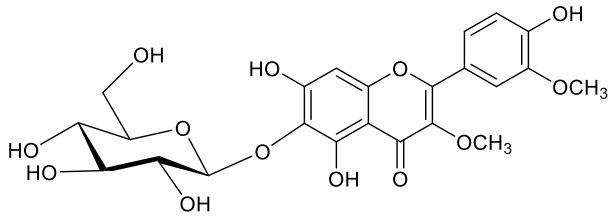
CPGY-5
Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit



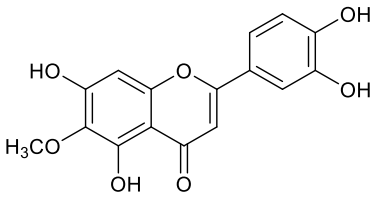
CPGY-6
Diosmetin 6-*C*-β glikozit



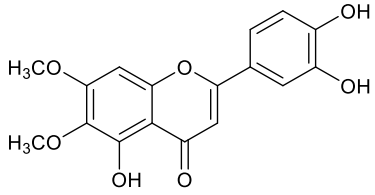
CPGY-7
Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit



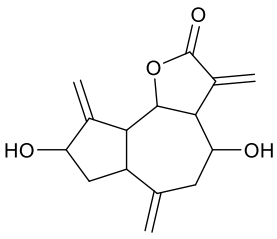
CPGY-8
Paphlagonica-2



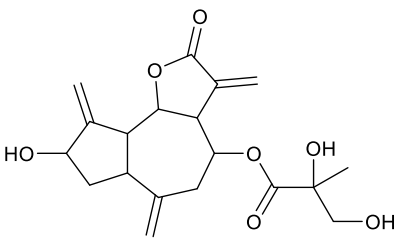
CPGY-9
Nepetin



CPGY-10
Cirsiliol



CPGY-11
Deasilsinaropikrin

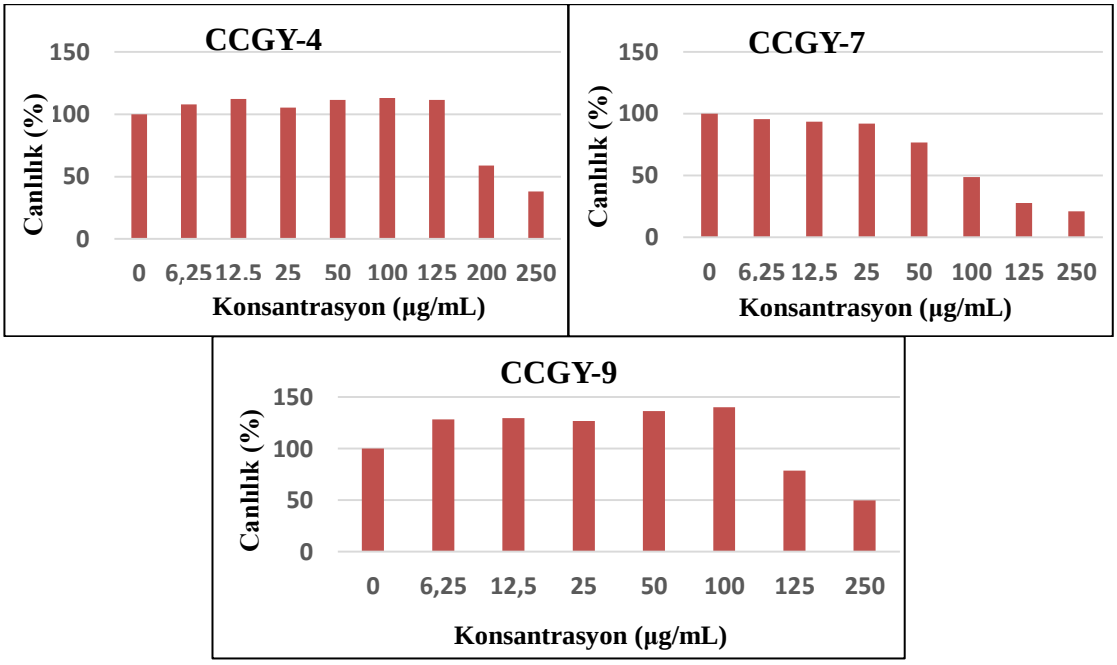


CPGY-12
8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) Desasiklinaropikrin

Şekil 4.106 *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) kısmından izole edilen bileşikler

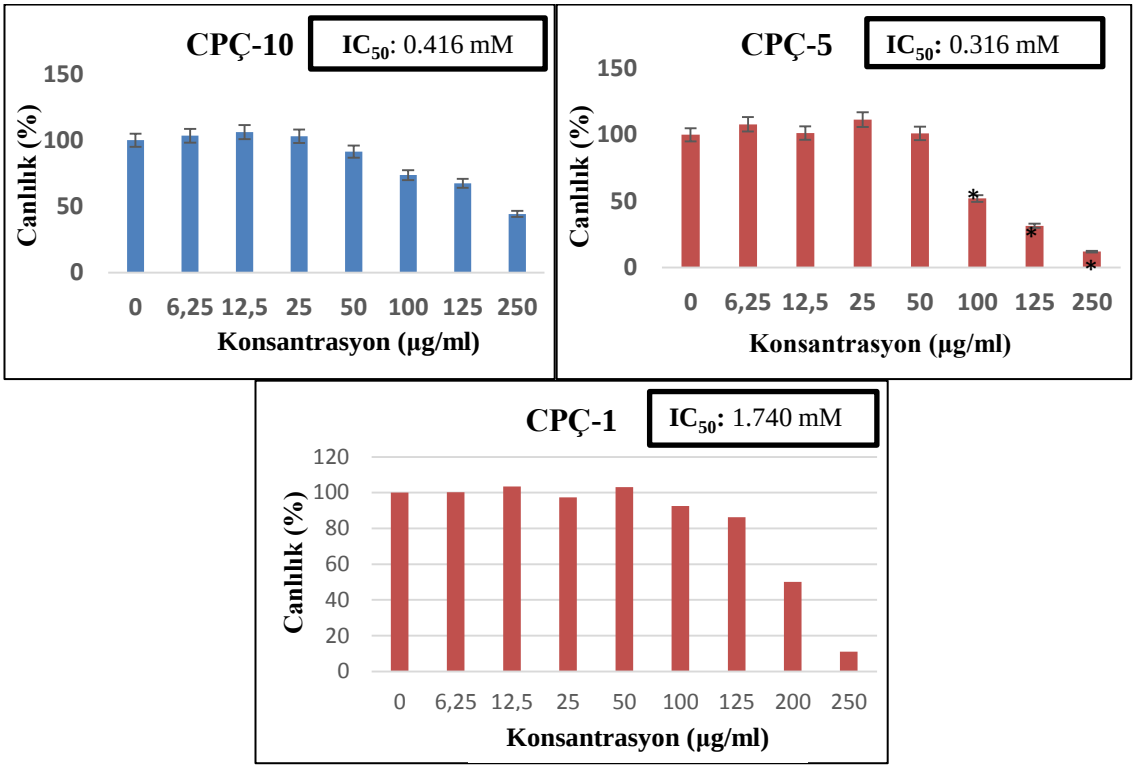
4.10 İzole edilen bileşiklerin Antikanser Aktivite Sonuçları

Endemik iki *Centaurea* türünden izole edilen bileşiklerin HeLa (rahim kanser hücresi) hücresine karşı antikanser aktivite sonuçları Şekil 4.107, Şekil 4.108, Şekil 4.109'daki grafiklerde detaylı olarak verilmiştir. Grafiklerde değişik konsantrasyonlarda (6.25, 12,5, 25, 50, 100, 125, 200 ve 250 µg/mL) hazırlanan bileşiklerin HeLa hücresine karşı % canlılık şeklinde verilmiştir. Şekil 4.107'de *C. cankiriense* gövde-yaprak (**CCGY**) kısımlarından izole edilen nepetin (**CCGY-7**) flavonoid bileşiğinin düşük konsantrasyonlarda kanser hücresinin inhibisyon etkisi başlamış 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında konsantrasyon artışı ile beraber inhibisyon etkisi çok artmış ve hatta canlı hücre sayısı %20'nin altına inmiştir. Yeni bileşik cankiriense-2 (**CCGY-9**) 0-100 µg/mL konsantrasyon aralığında prolifere olurken, 125-250 µg/mL konsantrasyon aralığında hücre canlılığı %50'ye düşmektedir. Benzer etki kafeik asit (**CCGY-4)** bileşiği içinde geçerli olduğu görülmüştür. Konsantrasyon artışı ile beraber (200-250 µg/mL) hücre canlılığı %40'ın altında olduğu belirlenmiştir. *C. cankiriense* gövde-yaprak (CCGY) ekstresinden izole edilen diğer bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri bulunmadığından grafiksel sonuçları değerlendirilmemiştir.



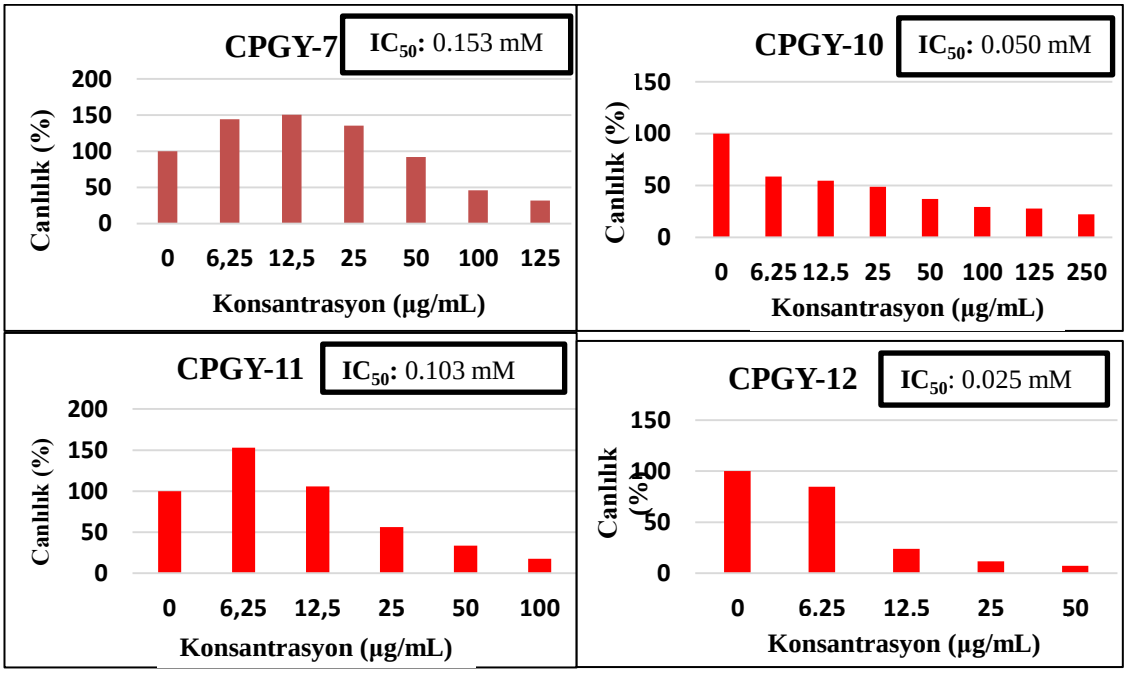
Şekil 4.107 *C. cankiriense* gövde-yaprak (CCGY) kısımlarından izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antikanser aktivite grafikleri

Şekil 4.108 incelendiğinde *C. paphlagonica* çiçek (**CPÇ)** ekstresinden izole edilen bileşiklerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlenmiştir. Tamariksetin (**CPÇ-5)** flavonol bileşiği 0-50 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığına herhangi etkisi olmadığı hatta biraz canlılık oranı arttığı görülmüşken 100-250 µg/mL konsantrasyon araliğinda ise hücre canlılığını %15 civarına kadar düşürmüştür. Fenolik asit türevi olan pirokateşol bileşiği (CPÇ-1) 0-50 µg/mL konsantrasyonda kanser hücresine herhangi bir etkisi olmaz iken 100 µg/mL konsantrasyondan itibaren hücrenin canlılığı azalmaya başlamış hatta 200 µg/mL'de yarıya inmiş ve 250 µg/mL konsantrasyonda %10 civarında bir canlı hücre varyantı kalmıştır. Bir tane şeker grubuna sahip flavonol türevi bir bileşik olan kuersimetrin **(CPÇ-10)** molekülü 0-25 µg/mL konsantrasyon aralığında kanser hücresine karşı herhangi bir etki göstermez iken 50-250 µg/mL konsantrasyon aralığında %50'ye kadar kanser hücresinin canlılığını azaltmıştır. Bu kısımdan izole edilen diğer bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri bulunmadığından grafiksel sonuçları değerlendirilmemiştir.



Şekil 4.108 *C. paphlagonica* çiçek (CPÇ) ekstresinden izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafikleri

C. paphlagonica gövde-yaprak (**CPGY)** ekstresinden izole edilen ve HeLa hücrelerine karşı antikanser özelliği en fazla olan bileşiklerin konsantrasyona bağlı olarak kanser hücresinin canlılığındaki değişim sayısal olarak ifadesi gösterilmiştir (Şekil 4.109). Bu grafiklere göre, kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7)** kodlu monoglikozit bağlı flavonol türevi bileşiğin önce hücre canlılığına ters bir etki yani prolifere bir etkisi görülürken 25 µg/mL konsantrasyondan itibaren canlı kanser hücresi azalmaya hatta 125 µg/ml konsantrasyonda %25 civarında bir canlı hücre kaldığı görülmüştür. Cirsiliol (**CPGY-10)** molekülünün her konsantrasyon artışı ile birlikte hücre canlılığı azalırken 250 µg/mL konsantrasyonda %20 oranında canlı hücre kaldığı belirlenmiştir. Gayonolid tipi seskiterpen lakton bileşiği türevi olan deacylcynaropicrin molekülü (**CPGY-11**) ilk konsantrasyonlarda kanser hücresinin büyümesine hatta %50'lik bir artışa neden olurken 12.5 µg/mL konsantrasyonda artan kanserli hücre artış miktarı kadar azalmış olup bundan sonraki 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonda %10 oranında canlı kanserli hücrenin kaldığı görülmüştür. Yine aynı tip seskiterpen lakton türevi **CPGY-12** kodlu bileşiği her konsantrasyonda kanserli hücreleri azalttığı ve düşük konsantrasyonlarda bile %5'lik bir canlı hücre kalmasını sağladığı görülmüştür. İzole edilen diğer bileşiklerin antiproliferatif aktiviteleri bulunmadığından sunulmamıştır.



Şekil 4.109 *C. paphlagonica* gövde-yaprak (CPGY) ekstresinden izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivite grafikleri

Bileşiklerin HeLa kanser hücresine karşı IC_{50} değerleri çizelge 4.20'de özetlenmiştir. Bu verilere göre düşük IC_{50} değeri yüksek antikanser aktivite anlamına gelmektedir. Sırasıyla CPGY-12, CPGY-10, CPGY-11 ve CPGY-7 bileşikleri HeLa kanser hücresine karşı antikanser ajan olarak kabul edilebilir. Bunun için ileri tetkiklerin yapılması gerekmektedir.

Çizelge 4.20 HeLa hücresine karşı aktivite gösteren bileşiklere ait IC_{50} değerleri

	HeLa Hücresi	
Kod	**Bileşik ismi**	**IC_{50} (mM)**
CCGY-4	Kafeik asit	l.190
CCGY-7	Nepetin	0.295
CCGY-9	Cankiriense-2	0.385
CPÇ-10	Kuersimetrin	0.416
CPÇ-5	Tamariksetin	0.316
CPÇ-1	Pirokateşol	1.740
CPGY-7	Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit	0.153
CPGY-10	Cirsiliol	0.050
CPGY-11	Deasilsinaropikrin	0.103
CPGY-12	8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin	0.026

5. TARTIŞMA

Mevcut tez çalışması kapsamında çalışılan iki bitki türünden birisi olan ve endemik özellikli *Centaurea paphlagonica* bitkisinin farklı kısımlarından hazırlanan MeOH/$CHCl_3$ ekstrelerinin HeLa (insan rahim kanser hücresi) antiproliferatif aktiviteleri değerlendirilmiştir. Aktivite değeri olan ekstre/ekstrelerden biyo-aktivite izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *C. paphlagonica* bitkisinin çiçek (**CPÇ**) ve gövde-yaprak (**CPGY**) ekstrelerinin yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Aktif ekstrelerden **CPÇ** için: bir tane yeni ve onüç adet bilinen bileşik, **CPGY** için: bir tane yeni ve oniki adet bilinen bileşik izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma bitkilerinden bir diğeri endemik özellik tanımına sahip hatta lokal endemik olduğu da literatür kayıtlarında mevcut olan *Centaurea cankiriense* bitkisi olup buradan hazırlanan MeOH/$CHCl_3$ ekstreleri de diğer bitkideki gibi HeLa (insan rahim kanser hücresi) hücre hattına karşı antiproliferatif aktiviteleri değerlendirilmiştir. Aktiviteye sahip ekstre (**CCGY**, gövde-yaprak) üzerinden aktif bileşen izolasyonu gerçekleştirilmiştir. **CCGY** için: iki adet yeni ve yedi adet bilinen bileşik elde edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerin yapıları 1D ve 2D NMR tekniklerinin yanı sıra kütle spektroskopisi tekniği kombine bir şekilde değerlendirilmiştir. Türler arası izole edilen bileşiklerin doğal olarak farklılık göstermesinin yanı sıra aynı moleküle sahip olmalarıda doğaldır. Buna göre; onsekiz flavon, üç basit fenolik asit, beş hidrosinnamik asit, bir steroid, iki seskiterpen lakton ve bir azot atomu içeren fenolik bileşen izole edilmiştir.

C. cankiriense bitkisinin gövde-yaprak (CCGY) kısmından izole edilen kafeik asit **(CCGY-4)**, nepetin **(CCGY-7)** ve cankiriense-2 **(CCGY-9)** bileşiklerinin antiproliferatif aktivite kapasiteleri doza bağlı olarak artarken, orientin (**CCGY-3)** bileşiğinin aktivitesi 250 mg/ml konsantrasyonda hücrenin proliferasyonunu %25 inhibe etmiştir. 3,4-dihidroksi benzoik asit (**CCGY-1),** klorojenik asit **(CCGY-2)** ve cankiriense-1 **(CCGY-5**-yeni bileşik) hücre üzerinde negatif yada pozitif bir etkisi yok

iken, vanilik asit (**CCGY-6)** ve diosmin (**CCGY-8)** bileşikleri kanser hücresinin proliferasyonuna katkı sağladığı tespit edilmiştir.

C. paphlagonica bitkisinin çiçek (**CPÇ**) kısmından izole edilen daucosterin (**CPÇ-11),** tamariksetin 7-*O*-β glukozit (**CPÇ-9),** tamariksetin 7-O-β rutinozit **(CPÇ-13)** ve rutin (**CPÇ-14**) bileşikleri kanser hücresinin çoğalmasını sağlarken, hidrosinamik asit türevli bileşikler 1,3-dikafeoilkuinik asit (**CPÇ-8),** 5-*O*-kafeoil şikimik asit (**CPÇ-4)** ve klorojenik asit metil ester **(CPÇ-6**) yüksek konsantrasyonda %5-20 arasında bir oranda inhibüsyon, 5-amino-1-diazenil-3,4-dihidroksi-1,5-dihidro-2H-pirol-2-on isimli yeni bileşik olan paphlagonica-1 (**CPÇ-12**) bileşiği ve basit fenolik asit türevli bileşikler (vanilik asit (**CPÇ-2)** ve 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CPÇ-3))** ile herhangi bir etkiye sahip olmadığı, flavon iskeletine sahip bileşikler (kuersimetrin (**CPÇ-10)**-önce proliferasyon- kuersetin (**CPÇ-7)** ve tamariksetin **(CPÇ-5))** 50-100 mg/ml konsantrasyon aralığından sonra ciddi bir antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu bileşikler arasında pirokateşol (**CPÇ-1)** fenolik asit türevli bileşiğin 100 mg/ml konsantrasyondan sonra yaklaşık %90 lık bir kanser hücresini inhibe ederek büyümesini engellemiştir.

C. paphlagonica bitkisinin gövde-yaprak (**CPGY**) kısmından izole edilen (cirsiliol (**CPGY-1),** 3-*O*-feruloilkuinik asit (**CPGY-4),** kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit **(CPGY-5)** ve paphlgonica-2 **(CPGY-8-**yeni**))** bileşikleri kanser hücresine pozitif ya da negatif bir etkisi bulunmamıştır. Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7)** bileşiği önce hücreler üzerinde prolife etkiye sahip iken ve daha sonra diğer bileşikler isoorientin (**CPGY-2),** orientin **(CPGY-3)** ve diosmetin 6-*C*-β glikozit **(CPGY-6)** flavon halkasına sahip bileşikler 125-250 mg/ml konsantrasyon aralığında maksimum %20'lik bir hücre proliferasyonunu inhibe etmiştir. Yani antiproliferatif aktiviteleri çok zayıftır. Nepetin **(CPGY-9)** bileşiği 50-250 mg/ml konsantrasyonda %80 oranında kanser hücrelerinin proliferayonunu engellemiştir. Cirsiliol **(CPGY-10)** flavon bileşiği her ne kadar yüksek aktiviteye sahip olsa da deasilsinaropikrin **(CPGY-11)** ve 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12)** bileşikleri kadar düşük konsantrasyonda etkili olmadığı görülmüştür.

Seskiterpen lakton bileşikleri **CPGY-11** ve **CPGY-12** düşük konsantrasyonlarda bile yüksek aktiviteye sahip moleküllerdir.

C. cankiriense bitkisinden izole edilen bileşiklerden aktif bileşikler olan fenolik asit (kafeik asit **(CCGY-4))** ve flavonoid sınıfı (nepetin **(CCGY-7)** ve cankiriense-2 **(CCGY-9))** bileşiklerinin HeLa kanser hücre hattına karşı antiproliferatif aktivite sonuçları IC_{50} değerleri olarak verilmiş olup IC_{50} değerleri; kafeik asit **(CCGY-4):** 1.19 mM, nepetin **(CCGY-7):** 0.295 mM ve cankiriense **(CCGY-9):** 0.385 mM olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.20).

C. paphlagonica bitkisinin çiçek kısmından (**CPÇ**) izole edilen aktif bileşikler flavonoid (kuersimetrin **(CPÇ-10)** ve tamariksetin **(CPÇ-5)**) ve fenolik asit (pirokateşol **(CPÇ-1)**) şeklindedir. Bu bileşiklerin HeLa kanser hücre hattına karşı antiproliferatif aktivite sonuçları IC_{50} değerleri olarak şu şekilde elde edilmiştir; kuersimetrin **(CPÇ-10):** 0.416 mM, tamariksetin **(CPÇ-5):** 0.316 mM ve pirokateşol **(CPÇ-1):** 1.74 mM.

C. paphlagonica bitkisinin gövde-yaprak kısmından (**CPGY**) izole edilen aktif bileşikler flavonoid (kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7)** ve cirsiliol (**CPGY-10)**) ve seskiterpen laktonlar (deasilsinaropikrin (**CPGY-11)** ve 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12)**) şeklindedir. Bu aktif bileşiklerin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları IC_{50} olarak sunulmuştur; kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7):** 0.153 mM, cirsiliol **(CPGY-10):** 50.56 μM, deasilsinaropikrin **(CPGY-11):** 0.103 mM ve 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12):** 25.90 μM.

Hidrosinnamik asit türevli bileşikler C6-C3 yapısına kurulu bileşiklerdir. Bu bileşikler çok geniş bir grubu oluşturmaktadır. Bu bileşiklerin temel öncüleri kafeik asit, *p*-kumarik asit ve ferulik asit bileşikleridir. Bu bileşiklerden en öncü olanı ise kafeik asit ve kafeik aside bağlı kuinik asitin oluşturduğu türevlerdir. Genellikle bitkilerde bu asidin esterleri kuinik asidin C-5 karbonu üzerinden, C-4 ve C-3 karbonu üzerinden bağlı olmaktadır. Çok az da olsa C-1 karbonu üzerinden de bağlı olarak

bulunabilmektedir (Farah and Donangelo 2006). Bitkilerde biotik ve abiyotik stres durumunda ilk sorumlu bileşik klorojenik asit türevli bileşikdir (Lou *et al.* 2011). Klorojenik asit içerildiği konsantrasyona bağlı olarak tatlı, acı ve büzücü tatları güçlü bir şekilde verirken bitkilerde uzun demleme sonucunda oluşan karmaşık tadın oluşmasını sağlamaktadır. Yapısındaki konjugasyondan dolayı ve konjugasyona etkinlik sağlayan α, β protonlarının rezonans kararlılık vermesi sonucunda yüksek radikal yakalama özellikler göstermektedir. Aynı zamanda ortamda Fe (III) iyonunun bulunması ile kompleks bir yapı oluşturup yeşil-siyah karışımı bir hal almaktadır (Cheel *et al.* 2007). Klorojenik asitin sağlık açısından pek çok yararlı etkiye sahiptir ve sağlık merkezlerinde içeriğinde klorojenik asitin kayda değer oranda bulunduğu takviye edici gıdalar önerilmektedir (Monteiro *et al.* 2007). Diyetlerine eklendiğinde hayvanları dejeneratif, yaşa bağlı hastalıklara karşı koruduğu bilinmektedir ve bazı kanser ve kalp hastalıklarının azaltılmasını sağladığı (Nogueira and do Lago 2007), anti-hipertensif (Yamaguchi *et al.* 2008), anti viral, anti bakteriyel, Tip-2 diyabet riskini azaltabilme (Legrand and Scheen 2007) ve glikozun kan dolaşımına salınımını yavaşlattığı (Bassoli *et al.* 2008) gibi pek çok biyolojik olgunun oluşumunu yararlı yönde etkisi olmaktadır.

Aynı iskelet yapısına sahip bileşiklere bağlanan sübstitüentlerin ve türevlerinin değişmesi bileşikte bağlandıkları konum ile beraber aktivitede ciddi değişikliklere neden olmaktadır. Çalışmamızda bu türden bileşiklerin bulunduğu görüldü. kafeik asit **(CCGY-4)** bileşiğinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivitesine baktığımız zaman, bileşiğin antiproliferatif aktivitesi çok iken (IC_{50}: 1.19 mM değeride destekliyor), klorojenik asit **(CCGY-2)** bileşiğinin bu hücre hattı için antiproliferatif etkisinin olmadığı hatta proliferatif bir etkiye sahip olduğu görüldü. Yine aynı yapı formundan 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(CPÇ-4)** bileşiğinde yüksek konsantrasyonda kanserli hücrenin sayısında %6'lık azalma ve klorojenik asit metil ester **(CPÇ-6)** bileşiğinde %25'lik bir azalma mevcuttur. Buda kafeoil grubun bağlı kuinik asitin ester formu oluşturarak aynı pozisyondan bağlanması (klorojenik asit: **CCGY-2**) aktiviteyi azaltmıştır. Kafeoil grubuna ester grubundan şikimik asit grubunun bağlanması (5-*O*-kafeoil şikimik asit: **CPÇ-4**) bu aktiviteye %6'lik azaltıcı bir etki etmiştir. Buda şikimat grubundaki çift bağdan kaynaklanmaktadır. Yine kafeoil grubundaki sübstitüentlerin yeri ve türü değişmeden kuinik asit metil esterin bağlanması (klorojenik asit metil ester:

CPÇ-6) kanser hücresinin %25'lik bir azalmaya sebep vermiştir. 3-O-feruloilkuinik asit **(CPGY-4)** bileşiği için klorojenik asit gibi kuinik asidin bağlanma pozisyonu değişmemektedir. Benzil grubunun C-3 numaralı karbonuna metoksi bulunması feruloilkuinik asit bileşiğini oluşturmaktadır. Fakat kafoil grubunda bir OH yerine –OCH_3 grubunun bağlı olması aktivitede bir değişikliğe neden olmamıştır. Yani HeLa kanser hücresi için 3-O-feruloilkuinik asit **(CPGY-4)** bileşiğinin antiproliferatif etkisi yoktur. Klorojenik asit **(CCGY-2)** bileşiğindeki şikimat grubundaki C-1 pozisyonundaki –OH grubu yine aynı pozisyondaki karboksilik asidin oksijen atomu ile moleküller arası bir hidrojen bağı yapmaktadır. Oysaki klorojenik asit metil ester **(CPÇ-6)** bileşiğinde C-1 pozisyonundaki –OH ile aynı pozisyondan bağlı metoksi grubunun böyle molekül içi hidrojen bağı söz konusu olmamıştır ve buda aktivitesinin klorojenik asit metil ester **(CPÇ-6)** bileşiği için daha fazla olduğunun sebebi gibi görünmektedir. Bazı bilimsel çalışmalarda, kafeik asidin esterlerinin çok aktif olduğu ve bu ester formlarının dış etkenler neticesinde (stres, yara ve haşere gibi) sentezlendiği bilgileri sunulmuştur.

Propolis içerisinde bulunan ve hatta bazı bitkilerden izole edilen kafeik asidin benzil ester ve fenil etil ester türevli bileşiklerinin oral kanserlere karşı potansiyel ajanlar oldukları (Lee *et al.* 2000), oksidadif stresi azaltarak HeLa, BEAS-2B, HL-60, MCF-7 ve sıçan ME 308 hücre hatları gibi kanser hücrelerinin proliferasyonunu önleyerek bu hücreler için sitotoksik etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Bhimani *et al.* 1993, Lee *et al.* 1999). Ayrıca bu tür bileşiklerin antikarsinojenik, immünomodülatör, antiinflamatuvar ve antioksidan özelliklerinin olduğu (Parlakpınar *et al.* 2012), normal hücrelere düşük toksisiteye sahip olmaları, antimetastatik ve antianjiyojenik ajan olabilme potansiyellerinden dolayı akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılabilmesine (Biray *et al.* 2006), hücresel farklılaşmanın oluşumu, proliferasyon ve apoptoz üzerindeki etkileri ile; bu tür işlemlerde moleküler düzeydeki bulunan proteinlerin ve enzimlerin üzerine etkileri ve farklılaşan bağışıklık fonksiyonunun yanında kimyasal metabolik etkileri ile önemli bir kapı açtığı literatür çalışmalarında önemle vurgulanmıştır (Rocha *et al.* 2012). Couteau ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, hidrosinamik asit türevli bileşiklerin ince bağırsakta emilmeyip kalın bağırsağa giderken bazı esteraz enzimleri tarafından kafeik asit ve diğer metabolitleri hidrolize ettiğini ortaya koymuşlardır.

Bunun sonucunda birincil metabolitleri (kafeik asit, ferulik, izoferulik ve p-kumarik) emilebilen ve metabolize edilebilen klorojenik asidin sinnamik asidini serbest bırakabilir, vücütta daha rahat kana geçebilir ve kanser hücresi içinde aynı şekilde kolay girebildiğinden antikanser aktivite gösterebilir (Couteau *et al.* 2001).

Hidroksisinamik asidin mono, di hatta tri kafeoil türevlerinin yanında, kafeik asit fenil esterlerinin pek çok kanser hücresine karşı çok önemli etkileri bilinmektedir. Bir diğer kafeik asit türevi olan **CPÇ-8** bileşiği yapısında iki tane kafeik asit bulundurmakta ve molekül bir kuinik asit ile C1 ve C-3 karbonundan birbirine bağlanmaktadır. HeLa kanser hücresine karşı yüksek konsantrasyonda yaklaşık %15-20 arasında kanser hücresini inhibe ettiği görülmüştür. Bu bileşik çok yaygın bir bileşik türü değildir. Yapılan aktivite çalışması sonucunda bileşiğin kafeik asit türevi ne kadar fazla ise aktivite o kadar arttığı görülmüştür (Miyamae *et al.* 2011). Bu sonucu destekler çalışmalar mevcuttur. Yapının di kafeoil grubu içermesi ile tri kafeoil grubu içermesi arasında aktivite yönünden çok fazla fark bulunmaktadır. Kurata *et al*. (2007) yapmış oldukları çalışmada tatlı patates türünde izole ettikleri kafeik asit, klorojenik asit, 3,4-di-*O*-kafeoilkuinik asit, 3,5-di-*O*-kafeoilkuinik asit, 4,5-di-*O*-kafeoilkuinik asit ve 3,4,5-tri-*O*-kafeoilkuinik asit bileşiklerini izole etmişler. Bu bileşiklerin Kato III, DLD-1 ve HL-60 kanser hücrelerine karşı proliferasyonuna etkileri incelemişlerdir. Spesifik olarak, 3,4,5-tri-*O*-kafeoilkuinik asit, üç çeşit kanser hücresinin büyümesini etkili bir şekilde bastırmış ve spesifik de olsa kafeik asit HL-60 hücrelerine karşı diğer di- ve tri-kafeoilkuinik asitlerden çok daha yüksek bir etkiye sahip olduğunu ifade etmişlerdir (Kurata *et al.* 2007).

Yoshimoto *et al*. (2001) yaptıkları bir çalışmada flavon iskeletindeki C3 konumundan bağlı olan şeker grubuna di kafeoil ya da tri kafeoil grubunun konumlanmasının antimutajenik aktivitenin çok değiştirdiğini bununda kafeoil grublarındaki tek OH (*p*-hidroksi benzoik asit) içermesi ve ferulik asitin OH içermesine göre çok fazla olduğunu belirlemişlerdir. Buda kafeoil türevlerinin fizyolojik aktiviteler üzerindeki önemi ve kafeoil türevlerindeki kateşol yapılarının sayısı bu fizyolojik fonksiyonlar için önemli bir rol oynadığını ifade etmektedir (Yoshimoto *et al.* 2001).

İzole edilen hidroksisinamik asit türevlerinin biyo-sentetik yolak ile *trans* formunu ürettiği ve bu bileşiklerin bu formunun bitki ekstraktları içerisinde pek çoğunda bulundurması baskın olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca *cis* formunun bulunması bir dönüşüm neticesinde oluşmaktadır özellikle UV ışığına maruz kalma bu dönüşümü çok kolaylaştırmaktadır.

3,5-dikafeoil kuinik asit, Hidrosinnamik asit türevli bileşikler ve onların ester formundaki bileşikleri *Centaurea* bitkisinden bulunduğu ve izolasyonu konusunda bazı raporlar vardır (Zengin *et al.* 2019b). Fakat 1-kafeoilkuinik asit, 3-*O*-kafeoilkuinik asit metil ester (**CPÇ-6**) ve 1,3-dikafeoilkuinik asit (**CPÇ-8**) bileşiği doğadaki bitki türlerinde zaten az bulunmakla beraber *Centaurea* türlerinden sadece *C. lycopifolia* (1-kafeoilkuinik asit) ve *C. drabifolia* (**CPÇ-8**) ve *C. bracteata* (**CPÇ-6**) bitki türlerinde rapor edilmiş fakat bu türden izolasyonu konusunda bilimsel bir makale yada proje çalışmasına rastlanmamıştır (Flamini *et al.* 2001b, Flamini *et al.* 2001a, Zengin *et al.* 2018). Doğal olarak herhangi bir içerik analizi yada izolasyon çalışması olmayan değerli iki endemik *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitki türleri üzerine bu çalışma ilk rapordur. Ana bileşenlerden biri olan 1,3-dikafeoilkuinik asit (**CPÇ-8)** bileşiği *C. paphlagonica* bitkisinin çiçek kısmında bu bitkiyi karakterize edebilen bir bileşik olup bir biyo-belirteç olarak kabul edilebilir.

Bu çalışmada ekstrelerin HeLa hücrelerine karşı antikanser aktivitesinin yüksek olması kafeik asidin ana bileşen olarak bulunması başta olmak üzere pekçok hidroksinamik asit türevi ile birlikte fenolik asitler ve flavonoidler ile beraber bulunmalarından ileri gelmektedir. Pek çok yayında olduğu gibi bu çalışmada da ekstrenin yüksek aktiviteye sahip olması fakat izole edilen bileşiklerin aktivitelerinin düşük ya da tam ters etki yapması bu bileşiklerin diğer bileşikler ile sinerjik veya antagonistik etkileşimlere yatkın olmaları ve bunun sonucunda pek çok kombinasyonlar oluşturmaları ile bağlantılı olabilmektedir (Zheng *et al.* 2013).

Çalışma sonuçları ile paralel olarak Asteraceae familyasına ait pekçok bitki türünde, potansiyel hipoglisemik ve hipolipidemik özelliklere sahip olan önemli miktarlarda

kafeoilkuinik asit içerdiği rapor edilmiştir (Meng *et al.* 2013, Mondolot *et al.* 2006, Spinola and Castilho 2017). Ayrıca kafeoilkuinik asit türevlerinin oksidatif stresin neden olduğu reaktif türlere karşı indirgeyici ajanlar olarak, hidrojen donatörleri veya tekli oksijen söndürücüler olarak görev yaptığı bilinmektedir.

C. paphlagonica ve *C. cankiriense* bitki türlerinden izole edilen bir diğer bileşik sınıfı, hidroksi benzoik asit türevi yada basit fenolik asit türevindeki bileşiklerden oluşmaktadır. Bitkilerde genellikle hücre duvarı ve ligninlerde doğal olarak bulunan C6-C1 (fenilmetil tipi) yapısına kurulu olan hidroksi benzoik asit türevli bileşikler fenolik asit grubunun en önemli ve en fazla bulunan polifenol bileşikleridir. Fenolik asitlere olan ilginin eskiden günümüze kadar yüksek olmasının en önemli sebebi, meyve ve sebzelerde bulunup tüketildiğinde oksidatif hasarın oluşturduğu hastalıklara (koroner kalp hastalığı, inme, astım, kronik hastalıklar ve kanserler vb.) karşı sundukları potansiyel korumadan ileri gelmektedir. Fenolik asitler bazı mekanizmalarla tümör başlangıcını azaltırlar, genotoksik moleküllerin oluşumunu önlerler ve mutajen oluşumunu etkileyen bazı enzimlerin aktivitesini bloke ederek, hem faz I enzimlerini, kanserojen-detoksifiye edici faz II enzimlerini düzenleyerek ayrıca DNA eklentilerinin oluşumunu durdurarak etki edebilirler (Basheer and Kerem 2015, Kou *et al.* 2013, Lu *et al.* 2008, Munday and Munday 2004, Rodeiro *et al.* 2009, Słoczyńska *et al.* 2014). Fenoliklerin çoğu, farklı kanser türlerini tedavi etmek veya durdurmak üzere farklı etki mekanizmaları sergilemektedir (Choi *et al.* 2014).

Centaurea türlerinden izole edilen fenolik asitlerden yapısına ait bileşiklerin aktivitesi HeLa hücresine karşı bir seçicilik arz etmektedir. Bileşikler arasındaki aktivite değerlendirmesinde 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CCGY-1)** ve vanilik asit **(CCGY-6)** bileşikleri azda olsa kanser hücresinin proliferasyonuna neden olup aktivite göstermez iken, pirokateşol **(CPÇ-1)** bileşiği 50 µg/ml konsantrasyondan itibaren etkisini göstererek, 250 µg/ml da oransal olarak aktivite artmaktadır. En yüksek konsantrasyon olan 250 µg/ml konsantrasyonda canlı kanser hücrelerinin sayısını %15 seviyesine kadar düşürdüğü görülmüştür. Bileşikler arasındaki bu önemli farkın tamamen yapıdaki sübstitüentlerin farkından kaynaklandığı belirlenmiştir. 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CCGY-1)** ve vanilik asit **(CCGY-6)** bileşikleri arasındaki tek fark C-3 konumunda

CCGY-1 için –OH grubu bağlı iken, aynı konuma **CCGY-6** bileşiğinde $–OCH_3$ grubunun bağlanması aktivitede herhangi bir etki oluşturmamıştır. Oysa pirokateşol **(CPÇ-1)** bileşiğindeki fenil grubuna bağlı hidroksi (-OH) grubunun sayısı ve pozisyonu 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CCGY-1)** bileşiği ile aynı olmasına rağmen pirokateşol **(CPÇ-1)** bileşiğinde karboksilik asit grubu bulunmamaktadır. Aktivitenin temel sebebi bu grubun eksikliği olabilir.

3,4-dihidroksi benzoik asit (**CCGY-1**) bileşiğinin yanında bu bileşiğin aldehit formu ile birlikte yapılan antioksidan çalışmalarında çok yüksek DPPH radikali giderme aktivitesinin olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan pekçok farklı bilimsel çalışmada 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CCGY-1)**; antioksidan, antiinflamatuvar, antibakterial, anti-ülser, antifibrotik, antiviral ve anti-tümör gibi bazı farmakolojik özelliklere sahip olduğu (Khan *et al.* 2015, Liu *et al.* 2002, Min *et al.* 2010), bununla beraber bu bileşik bazı kanser hücreleri üzerine melanoma, lösemi, meme, akciğer, karaciğer ve serviks hücrelerinin çoğalmasını engelleyici etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Lin *et al.* 2011, Tseng *et al.* 2000). Yin *et al* (2009) yılındaki çalışmalarında 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CCGY-1)** bileşiğinin 1-8 μmol/L arasındaki dozlarda bazı kanser hücreleri (MCF7, A549, HepG2, HeLa ve LNCaP) üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu ve bu etkinin doz artışına bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Yin *et al.* 2009). Bu bulgular eşiğinde etki mekanizması incelenip bu bileşiğin bu beş kanser hücresinde apoptoza veya invasyon ve metastaza neden olan güçlü bir antikanser ajanı olduğunu sonucunu ortaya çıkarmaktadır (Öztopcu-Vatan and İnan 2008). Bizim elde ettiğimiz antiproliferatif aktivite sonuçları 3,4-dihidroksi benzoik asit **(CCGY-1)** bileşiğinin etkisinin olmadığını hatta zayıf proliferatif aktivitesinin olduğu belirlendi. Yukarıdaki çalışmalar ile ters bir etki bulunmasının sebebi dozun farklı olması ya da deney koşullarına bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir.

Vanilik asit **(CCGY-6)** bileşiğinin; HT-29, HCT116, COLO320, NCM460 ve MCF-7 kanser hücreleri karşı yüksek sitotoksik fakat normal hücreye karşı yüksek toksisite (Dhingra *et al.* 2013, Gunasekaran *et al.* 2015), B16F0, HCT *ve* Hs68 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi yüksek konsantrasyonlarda fazla (Almeida *et al.* 2016) olduğu ortaya

konulmuş, etki mekanizmaları ve yolakları ayrıntılı olarak rapor edilmiştir. Pek çok kanser aktivitesinin literatür verilerinde var olduğu belirtilen çalışmalara ek olarak Cheng *et al*. 2007 grubunun yaptığı çalışma bizim için ilginç sonuçlar doğurmuştur. Cheng et al. 2007 her kuyucukta $1x10^{-4}$ HeLa kanser hücresi olacak şekilde dizayn ettikleri deney prosedürleri sonucunda **CCGY-6** bileşiğinin aralarında HeLa kanser hücresinin de olduğu dokuz kanser hücresi üzerine antiproliferatif aktivitesini değerlendirmişler, sonuç olarak **CCGY-6** bileşiğinin seçici olmakla beraber HeLa ve bazı kanser hücrelerine herhangi bir antiproliferatif etkisini görememişlerdir. Bu sonuçlar mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar ile uyumlu olup **CCGY-6** bileşiğinin HeLa kanser hücresine karşı sitotoksik olmadığını göstermektedir (Cherng *et al.* 2007).

C. paphlagonica bitki ekstreleri içerisinde varlığı HPLC-TOF/MS analizi ile belirlenen vanilik asidin miktarsal analizi Çizelge 4.6'da verilmiştir. Buna göre antikanser aktivitesi yüksek olan ekstreler içerisinde ana bileşenlere eş değer miktarda bulunmaktadır. Fakat *C. cankiriense* bitki ekstreleri içerisinde var olduğu HPLC-TOF/MS cihazı ile belirlenememiştir. Fakat bu bitkiye ait aktif ekstreden az fakat *C. paphlagonica* bitki ekstresine (**CPÇ**) ait fraksiyonlardan (**CPÇ-2**) çok izole edilmiştir. Bitkiye kanser aktivitesi bakımından diğer bileşikler ile birlikte pozitif etkisi var iken saf hali kanser bileşiği üzerinde etki göstermemektedir. Bu sinerjik bir etkinin olduğunu ifade edebilir. Bu çıkarımı destekler çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bir tanesi, Aktaş-Gümüşhan 2018, yılındaki çalışmasında keçiboynuzu ekstrelerinin HeLa kanser hücresi üzerine etki çalışmasında belirtilmiştir. Ekstrelerin HeLa hücrelerinin DNA sentezini inhibe ederek mitotik aktivitesini ve proliferasyonunu baskıladığını görmüşler ve ekstreler içerisindeki bileşen analizinde vanilik asidin çok yüksek miktarda ana bileşen olduğunu belirlemişlerdir. Mevcut çalışma ile benzer olan kısım, ekstreye diğer bileşikler ile antiproliferatif bir etkide bulunabilmeleridir (Aktaş 2018).

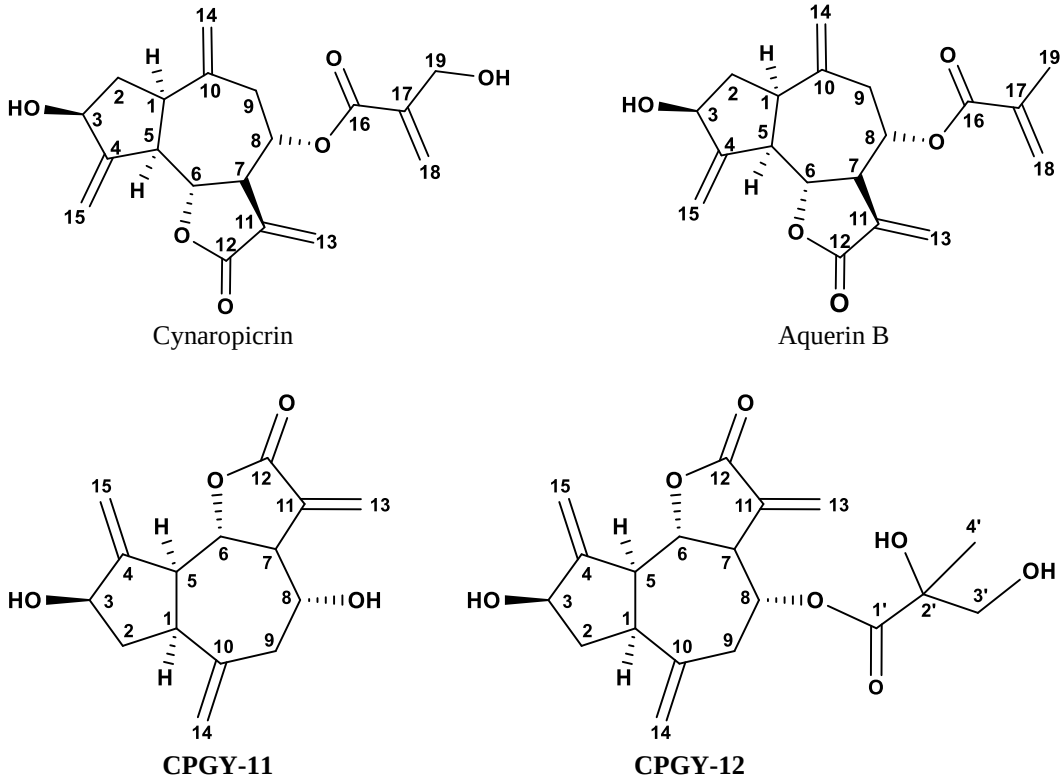
Guaianolid tipi seskiterpen laktonlar C4-C5-C3 genel iskelet yapısına sahip bileşik türleridir. Asteraceae familyasındaki bitki türlerine biyolojik aktivite özelliği katan aktif bileşen grubunu oluşturmaktadırlar. Bu bileşikler bulunduğu familyaya kemo-taksonomik özellik kazandırmaktadır. Seskiterpen laktonlar; antitümör, antiülser, antimikrobiyal, antimigren, antiinflamatuar, antikanser, antiülser, insektisit, artrit gibi

pekçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Bu bileşiklerin biyolojik aktivite orjini kazanmaları yapısal olarak α-metilen γ-lakton, α-β doymamış siklopentenon veya konjüge ester gibi α,β doymamış karbonil yapılarının üzerinden etkinlik kazanmaları ile olmaktadır. Bu tür yapıdaki bileşiklerin yapı ilişkileri Michael tipi katılma reaksiyonları ile sistein proteindeki sülfidhidrin gruplarının nükleofilleri ile reaksiyona girmeleridir (Kupchan *et al.* 1970, Picman 1986).

Tez bitkileri içerisinden *C. paphlagonica* ana bileşenlerden olan iki tane guaianolid tipi seskiterpen lakton bileşiği izole edilmiştir. HeLa hücrelerine karşı deasilsinaropikrin **(CPGY-11)** ve 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12)** bileşiklerinin aktivitesi (IC_{50}: 0.103 mM ve 0.026 mM) en yüksek bileşiklerdir. 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12)** daha düşük konsantrasyonda yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu fark iki bileşiğin ana A, B ve C lakton halkalarının aynı olmasına rağmen bağlı olan sübstitüentin farklı olmasından ileri gelmektedir. Deasilsinaropikrin **(CPGY-11)** bileşiğinde C-8 konumunda –OH grubu bulunurken, 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12)** bileşiğinde aynı C-8 pozisyonunda α,β-dihidroksi-izobutirat grubu bulunmaktadır. İzobütirat grubu, hidroksi grubuna göre bu hücre yapısı için DNA yapısına daha kolay bağlanıp onun etkinliğini ve büyümesini inhibe edebilir. Bununla beraber etki mekanizması ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Bizim çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, Li ve arkadaşları (2019) yılındaki seskiterpen lakton türevi olan cynaropicrin bileşiğinin NF-kB inhibüzyonu vasıtasıyla anti fitokimyasal yaşlanma aktivitesinin yapı aktivite ilişkisi incelemişlerdir (Şekil 5.1). Sentezledikleri yaklaşık 23 seskiterpen analoğunun aktivitesi inceleyip sonucun cynaropicrin bileşiğinde daha fazla yüksek aktiviteye sahip olduğunu görmüşlerdir. Sonuç olarak, cynaropicrin bileşiğin C-8 karbonuna bağlı OH-19 ve C-3 karbonuna bağlı OH-3 hidroksi gruplarının bulunmasının ve C17-C18 α, β konumundaki ekzo olefinik grubunun bulunması NF-kB'ye karşı inhibitör aktivitenin artmasını sağladığını göstermiştir (Li *et al.* 2019). Benzer şekilde, Chicca *et al.* 2011 yaptığı çalışmada *C. deflexa* bitkisinden deacylcynaropicrin ana iskeletine sahip olan ve C-8 pozisyonunda metakrilat grubunun olduğu aguerin B bileşiği ve 15-nor-guaianolide bileşiğini

saflaştırmışlardır. Saf bileşiklerin insan pankreas (MIA PaCa-2) ve kolon kanser (COLO320) hücrelerine karşı antiproliferatif etkisini araştırmışlardır. Bulguları sonucunda, her iki bileşiğin de anti proliferatif etkilerinin yüksek olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Aguerin B bileşiğinin, apoptotik hücre ölümünü indüklediğini ve bu bileşikte A halkasındaki α-metilen γ-lakton grubunun pro-apaptotik bir şekilde görev yaptığını mekanistik olarak da belirlemişlerdir (Chicca *et al.* 2011).



Şekil 5.1 İzole edilen bazı seskiterpen laktonların

Bizim çalışmalarımızı doğrular şekilde, Liu *et al*. 2019 yılında yaptıkları çalışmada cynaropicrin bileşiğinin thioredoksin redüktaz inhibisyonunu ve oksidatif stresin indüklenmesini sağlayarak HeLa hücrelerinin apaptozuna etkisini incelemişlerdir. Veriler, cynaropicrin bileşiğinin HeLa, HepG2 ve SMMC-7721 hücresine karşı belirgin inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Cynaropicrin bileşiği HeLa hücresine karşı IC_{50}: 20 μM-24 h, 10 μM-48h doza bağlı olarak ve zamana bağlı olarak çok yüksek bir sitotoksik etki göstermiştir (Liu *et al.* 2019).

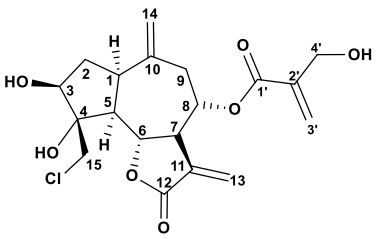
Benzer şekilde Zong *et al*. 1994 yılındaki çalışmalarında Cynaropicrin ve desacylcynaropricrin bileşiklerinin (S-180 sarcoma ve Ehrlich carcinoma) tümörlerine karşı cynaropicrin için 2.5 μg/mL ve 2.4 μg/mL IC_{50} değerliğinde ve desacylcynaropricrin bileşiği için 1.5 μg/mL ve 1 μg/mL IC_{50} değerliğinde yüksek antitümör aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir (Zong *et al.* 1994).

Zimmermann et al. 2012, çalışma ekibi afrika kıtasını sahra altı bölgesinde yetişen bir sinek türüne ait *Trypanosoma brucei* parazitine karşı cynaropicrin ve deacylcynaropicrin bileşiklerinin yapı-aktiviteye ilişkisini değerlendirmişlerdir. 2-hidroksimetil-2-propenoil grubunun çıkarılmasının aktiviteyi azalttığı hatta 10 kat daha da düşürdüğünü göstermiştir (Zimmermann *et al.* 2012).

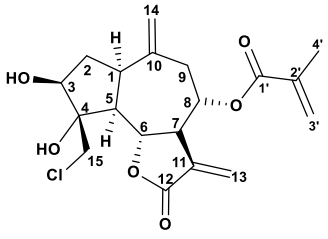
Aynı iskelet yapısına sahip fakat a glikon yapısında bulunan dehydrocostus lakton bileşiğinin a glikon halinde C3 ve C8 konumlarında OH grubu bulunmamaktadır. Bu bileşiğin HeLa kanser hücresi üzerine etkilerini bazi bilim insanları incelemişlerdir (Yang *et al.* 2016). Bu bilim insanları aglikon halindeki guaianolid tipi seskiterpen lakton olan dehydrocostus lakton isimli bileşiğin IC_{50}: 12 μM gibi konsantrasyonda çok iyi bir inhibisyon etkisine sahip olduğunu rapor etmiş, ayrıca normal hücrelere karşı çok az bir toksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Hatta farklı seskiterpen lakton halkasına bileşikler olan ve dünya çapında çok iyi bir sıtma ilacı olarak kullanılan artemisin bileşiği ve costunolide bileşiklerinden daha fazla inhibisyon aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir (Zhang *et al.* 2012).

Tastan ve ekibi 2019, deli tülübaş olarakta bilinen ve *Centaurae* ailesine yakın bitki türü olan *Psephellus pyrrhoblepharus* bitkisinden bazı flavonoid türevli bileşiklerin yanı sıra çoğunlukla seskiterpen lakton türevi maddeler izole etmişlerdir (Şekil 5.2). Bu bileşikleri insan jinekolik kanser hücrelerine (SiHa, HeLa ve MDA-MB-231) karşı denemişlerdir. Bileşiklerden klorojanerin, 19-deoksiklorojanerin, aguerin B, sinoropikrin, eleganin, apigenin, jaceosidin ve 6-metoksiluteolin bileşikleri HeLa kanser hücreleri üzerinde orta derecede aktif olduğunu bulmuşlardır. En yüksek aktivite ise, üçlü negatif meme kanseri modeli MDA-MB-231 hücrelerine karşı IC_{50} değerleri: 2.21

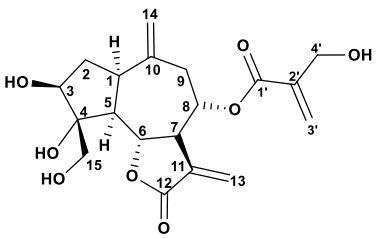
ve 2.88 μM olan ve yapısında klor atomu bulunan seskiterpen lakton türevli klorojanerin ve 19-deoksiklorojanerin bileşikleri için bulunmuştur (Tastan *et al.* 2019). Seskiterpen laktonların aktivitelerindeki farklılığının temel nedeni molekülün temel iskeletine bağlı olan alkil gruplarının sayısı, bağlanma yeri ve bağlı olan fonksiyonel grubun polaritesi gibi bileşiğin kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Bunu yanında bileşiğin kazandığı lipofilik özellik, molekül geometrisi ve hedef nükleofilin yapısıda alkilleyici yapısal elemanların aktiviteye kattığı etkilerdir (Heilmann *et al.* 2001, Karabunarliev *et al.* 1996, Kupchan *et al.* 1971).



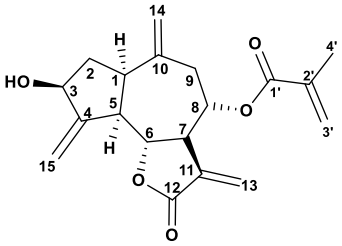
Chlorojanerin



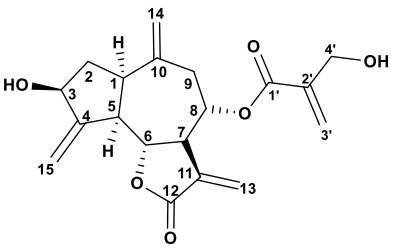
19-deoxychlorojanerin



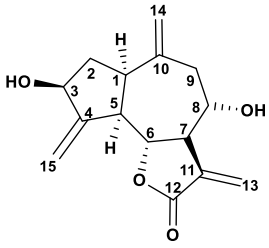
15-hydroxyjanerin



Aguerin B



Cynaropicrin



Eleganin

Şekil 5.2 *Psephellus pyrrhoblepharus* bitkisinden izole edilen seskiterpen laktonlar

Flavonlar iki fenil halkasının bir propan grubu ile birleşerek C6-C3-C6 temel aglikon iskeleti üzerine kurulu difenilpropan yapısındaki bileşik sınıfındandır. Ön oluşumları kankonlar ile birlikte bitkiler aleminde en fazla bulunan sekonder bileşik grubunu oluşturmaktadır. Flavonoidlerin yapısında bulunan OH grupları reaksiyona girebilme özelliklerinin fazla olmalarından dolayı O glikozitlerini oluşturmaktadır. Bunun yanında C glikozit yapısında da türevi bulunmaktadır. Fakat C glikozit yapılar çok yaygın değildir. Flavonoidler, büyük hücrelerin enzim fonksiyonlarını kontrol etme yeteneklerinden dolayı antikanser, antioksidan, antiviral, antikanser, Alzheimer, astım

ve bazı kalp-damar hastalıkları (damar çeperi kalınlaşması vb) gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili biyokimyasal etkileri vardır (Frabasile *et al.* 2017).

Jo *et al*. 2020, yılındaki çalışmalarında 21 yüzyılın en kuvvetli viral salgını olan SARS-CoV (Covid-19) 3CL proteaz enziminin inhibüsyonuna bazı flavonoidlerin etkisini incelemişler ve bu çalışmalarını doking testleri ile bir basamak daha ileri taşımak için tahminlerde bulunmuşlardır. Flavonoidler arasında herbasetin, rihoifolin ve pektolinarin bileşiklerinin SARS-CoV 3CLpro virüsünün enzim aktivitesi önemli ölçüde inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Sırasıyla IC_{50} değerleri 33.17, 27.45 ve 37.78 μM olarak bulunmuştur. Doking testlerinde herbasetin bileşiğindeki C-8 pozisyonundaki hidroksi (-OH) grubunun aktiviteyi artırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca, docking testlerinde S1 ve S2 ceplerinin rhoifolin ve pektolinarinin bileşiklerinin karbonhidrat grupları tarafından kullanılmasının glikoz grubuna sahip flavonoidlerin SARS-CoV 3CL pro'ya karşı yüksek afinite elde etmenin başka bir yolu olabileceği hipotezini sunmuştur (Jo *et al.* 2020).

Tez bitkileri içerisinden *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitkilerinden toplam 17 adet flavon bileşiği izole edilmiştir. Flavon türevli bileşiklerin HeLa kanser hücresine karşı aktivitesini incelediğimiz zaman cirsiliol **(CPGY-10)**, kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7)**, nepetin **(CCGY-7)**, tamariksetin **(CPÇ-5)**, Cankiriense-2 **(CCGY-9)** ve kuersimetrin **(CPÇ-10)** bileşiklerinin aktivitesi yüksek çıktığı dolayısıyla IC_{50} değerleri düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bileşiklere ait IC_{50} değerleri Çizelge 4.20'de verilmiştir. Buna göre cirsiliol **(CPGY-10)** bileşiğinin IC_{50} 50 μM ile test edilen moleküller arasında en yüksek ikinci antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Cirsiliol **(CPGY-10)** bileşiği flavanon bileşiğidir ve aglikon halinde A halkasına C6-C7 pozisyonunda iki tane metoksi grubunun bağlı olması ve B halkasında C3'-C4' pozisyonunda iki hidroksi grubu bağlı olması aktivitenin yüksek çıkmasının nedenidir. Bunu nepetin **(CCGY-7)** bileşiğine bakarak daha iyi anlayabiliriz. Nepetin **(CCGY-7)** bileşiğinde B halkasındaki sübstitüentlerin yeri ve sayısı aynı iken sadece C7 konumunda metoksi yerine hidroksi grubunun bağlı olması aktiviteyi yaklaşık 6 kat azaltmıştır. Nepetin **(CCGY-7)** bileşiğinde C6 konumundaki metoksi grubunun yerine isoorientin **(CPGY-2)** bileşiğindeki gibi C glikozit grubunun bağlı olması önce

proliferasyona neden olurken aynı yüksek konsantrasyonda nepetin **(CCGY-7)** bileşiğine göre çok az aktivite göstermiştir.

Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7)** bileşiği ile tamariksetin 7-*O*-β glukozit **(CPÇ-9)** bileşiği karşılaştırıldığı zaman her iki bileşiğinde A halkasının C-7 konumundan 7-*O* glikozit grubu bulunmakta ve B halkasının ve C halkasının sübstitüentleri her iki bileşik de aynı pozisyonda konumlanmışlardır. Tek fark kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit **(CPGY-7)** bileşiğinde C-6 konumundan bağlı olan OH grubu olup bu durumun aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Hatta tamariksetin 7-*O*-β glukozit **(CPÇ-9)** bileşiği proliferasyona neden olmuştur.

Tamariksetin 7-*O*-β glukozit **(CPÇ-9)** bileşiği ile kuersimetrin **(CPÇ-10)** bileşiğinin aktivitesini kıyaslarsak iki bileşik de C-7 konumunda 7-*O*-β glikozit grubuna ve C-3 konumunda OH grubuna sahiptir. Yapısal farklılık iki bileşiğinde B halkasındaki C-4 pozisyonundaki OCH_3 ile OH gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu fark hidroksi (-OH) grubu içeren kuersimetrin **(CPÇ-10)** bileşiğine çok yüksek bir antiproliferatif aktivite kazandırmıştır. Tamariksetin 7-*O*-β glukozit **(CPÇ-9)** ile tamariksetin **(CPÇ-5)** bileşiği karşılaştırıldığında iki bileşik arasındaki fark A halkasındaki C-7 konumundaki 7-O-β glikozitin olmasıdır. C-7 konumundaki şeker grubu aktivitenin azalmasına neden olmaktadır. Şeker grubu içermeyen aglikon yapısındaki tamariksetin **(CPÇ-5)** bileşiğinin antiproliferatif aktivitesi çok yüksektir. Kuersimetrin **(CPÇ-10)** ve kuersetin **(CPÇ-7)** bileşikleri karşılaştırıldığında iki bileşikteki tek fark kuersimetrin **(CPÇ-10)** bileşiğinin C-7 konumundaki 7-O-β glikozitin varlığıdır. Şeker grubunun olması aktiviteyi artırmıştır. Genelde şeker grubunun olması aktiviteye pek olumlu yansımamaktadır. Aglikon yapısına sahip kuersetin **(CPÇ-7)** ile tamariksetin **(CPÇ-5)** bileşikleri karşılaştırıldığında yapıda C-4' konumundaki metoksi grubunu içeren tamariksetin **(CPÇ-5)** bileşiğinde antiproliferatif aktivite daha fazladır.

Şeker gruplarının relativiteye negatif etkisi **CPÇ-13** ve **CPÇ-9** bileşiklerinde açıkça görülmektedir. İki bileşikte tek fark **CPÇ-13** bileşiğinde diğerine göre aynı konumda 1

tane glikozit grubunun fazla olmasıdır. Fakat aktivite etkisi kanserli hücrelerin proliferasyonu yönünde olmuştur.

CPÇ-13 bileşiği ile **CCGY-8** bileşikleri arasındaki aktivite yapı ilişkisini incelenecek olursa, her iki bileşikte şeker grupları aynı ve aynı konumdan bağlı bulunmaktadır. B halkası sübstitüentleride aynı ve aynı konumdan bağlıdır. Tek fark **CCGY-8** bileşiğinin C-3 konumunda hidroksi grubunun bulunmamasıdır. Aktiviteye bu farklılık **CPÇ-13** bileşiği için yüksek konsantrasyonda dahil olmak üzere proliferasyon sağlamıştır. **CCGY-8** bileşiği 125 μg/ml konsantrasyona kadar proliferasyona neden olmuş iken 125 μg/ml konsantrasyonda proliferasyon durmuş ve bileşiğin ilave edilmediği %100 durumuna gelmiştir. Burada tek eksik daha yüksek konsantrasyonların denemesinin yapılmamış olmasıdır.

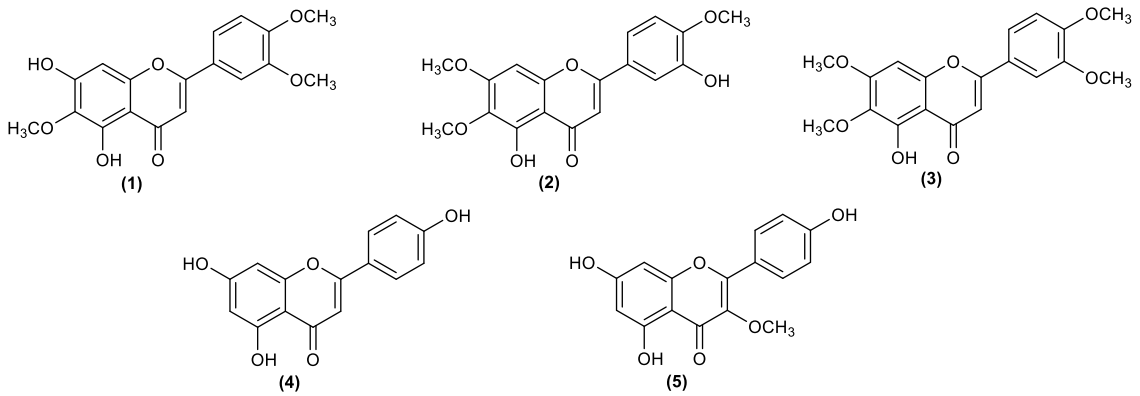
Cankiriense-2 **(CCGY-9)** bileşiğinin yapısında C-7 konumundan 7-*O*-β pozisyonunda iki şeker bulunmasına rağmen A halkasındaki C-6 konumundaki metoksinin bulunması ve B halkasındaki C-3' konumunda metoksinin olması bu bileşiğe aktivite kazandırmıştır. Bu da A halkasındaki ilave sübstitüentlerin antiproliferatif aktiviteyi artırdığına işaret etmektedir. Bu gruplar metoksi olduğunda bu bileşik için yüksek aktivite anlamına gelmektedir.

CPGY-8 bileşiği ile **CPGY-5** bileşiklerinin karşılaştırdığımız zaman, iki bileşiğin şeker grubu aynı şeker grubu ve aynı konumdan bağlı, A halkasındaki sübstitüentler aynıdır. C halkasındaki C-3 konumunda her iki bileşik için metoksi grubu bulunmaktadır. Bileşikler arasındaki fark C-3' konumları için söylenebilir. **CPGY-8** bileşiği için azda olsa kanser hücresinin proliferasyonunda % 20'lik bir inhibüsyon bulunmaktadır. Buda B halkasındaki metoksi grubunun C-3' konumundan bağlı olması ile ilişkilidir.

CPGY-2 ile **CPGY-6** bileşikleri yapı aktivite ilişkisini inceleyecek olursak, her iki bileşik için C-6 konumundan bir tane C glikozit bağlıdır ve C-7 pozisyonunda hidroksi grubu bulunmaktadır. Tek fark C3'-C4' konumunda **CPGY-2** için OH grubu bulunur iken, C3' için OH ve C4' için OCH_3 grubunun bulunmasıdır. C-4' konumunda OH

yerine metoksi grubunun bulunması aktiviteyi artırmıştır. Çünkü **CPGY-2** bileşiği için 250 μg/ml konsantrasyonda % 20'lik inhibisyon olurken **CPGY-6** bileşiği için 125 μg/ml konsantrasyonda % 20'lik inhibüsyon değeri mevcuttur**.** Buda metoksi grubunun önemini göstermektedir.

Csapi et al (2010) yılındaki çalışmalarında, *Centaurea arenaria* bitkisinden izole etikleri biz dizi bileşiğin MTT deneyini kullanarak MCF-7, A431 ve HeLa hücreleri üzerine antiproliferatif aktivitesini incelemişlerdir. İzole edilen flavonoid yapısına sahip bileşikler Şekil 5.3'te verilmiştir. Flavonoid bileşikleri arasında apigenin bileşiğinin en yüksek inhibisyona (HeLa:10.64 μM, MCF-7:13.88 μM ve A431:12.34 μM) sahip olduğunu belirlemişlerdir. İlginçtir ki bu çalışmada 3′-Methileupatorin (**3**) bileşiğinin kanser hücreleri üzerine inaktif bir etkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Eupatilin (**1**) bileşiğinin C-7 konumunda OH olması HeLa ve MCF-7 hücreleri için inaktif iken A431 hücresi için 24.16 μM IC_{50} değeri ile yüksek aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Eupatorin (**2**) bileşiğinin HeLa (29.79 μM) ve A431 (52.50 μM) hücrelerine karşı antiproliferatif etkisi var iken MCF-7 hücresine karşı yoktur. 3′-methileupatorin (**3**) bileşiği izole ettiğimiz bileşiklerden **CPGY-10** ile karşılaştırıldığı zaman B halkasında OH yerine metoksi grubunun olması HeLa kanser hücresine karşı antiproliferatif aktiviteyi ortadan kaldırmaktadır. Fakat eupatorin (**2**) bileşiğindeki gibi C-3' konumunda OH C-4' OCH_3 olması **CPGY-10** bileşiğinden iki kat daha fazla aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. İzole ettiğimiz bir diğer bileşikte CCGY-7 ile Eupatilin (**1**) bileşikleri karşılaştırıldığında yukarıdaki yapı aktivite bağlantısı bu iki bileşikte de mevcuttur. B halkasındaki hidroksi gruplarının yerine metoksi gruplarının gelmesi antiproliferatif aktiviteyi ortadan kaldırmıştır (Csapi *et al.* 2010).



Şekil 5.3 *Centaurea arenaria* bitkisinden izole edilen bazı flavonoidler

Forgo *et al.* 2012 yılındaki çalışmalarında *Centaurea jacea* bitkisinden aktivite yönlendirmeli izolasyonda bir sıra bileşiğin yanı sıra cirsiliol **(CPGY-10)** bileşiğinin HeLa, MCF-7 ve A431 kanser hücreleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, cirsiliol **(CPGY-10)** bileşiğinin aktivitesini mevcut çalışmadaki IC_{50} değeri ile oldukça uyumludur. Fakat flavon grupları arasında centaureidin tüm kanser hücresini 0.08-0.35 μM IC_{50} değerinde bir değere sahip olarak inhibe ettiğini bunun dışında hispudulin bileşiğinin seçici olmakla beraber ikinci en yüksek (5.68 μM) aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Centaureidin bileşiğinde bağlı olan metoksi gruplarının aktiviteyi çok değiştirdiğini diğer flavon türevleri ile karşılaştırmışlardır (Forgo *et al.* 2012). HeLa hücresi için hispidulin bileşiği ile izole ettiğimiz **CCGY-7** bileşiğini karşılaştırıldığı zaman, hispidulin bileşiği **CCGY-7** bileşiğinden 20 kat daha fazla antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu ortaya çıkmıştır. İki bileşik için aglikon halinde A ve C halkasına bağlı sübstitüentlerin türü ve yeri aynı iken B halkasında **CCGY-7** bileşiğinde C-3' konumunda 1 tane fazla OH grubu bulunmaktadır. Hispidulin bileşiği için C-3' pozisyonunda sübstitüent bulunmaması aktiviteyi çok fazla artırmaktadır. Bu grubun bulunması cirsiliol bileşiğinin iki kat fazla aktiviteye sahip olmasına neden olmuştur.

Flavonoidlerin yapısal farklılıkları biyolojik etkilerinin farklı olması anlamına gelmektedir. Bu bileşiklerden örneğin hidroksi gruplarının konumu mikroorganizmaların büyümesini inhibe edebilme özelliğinin artımına önemli etki eder buda membran geçirgenliğini etkileyen hidrofobik özelliğini etkilemektedir (Cushnie

and Lamb 2005). Flavon bileşiklerinde A halkasının 5 ve 7 pozisyonlarındaki prenil, metoksi, hidroksil gruplarının yanında ve hatta bi flavon yapısında olması flavonların antibakteriyal etkisini artırmaktadır. Ayrıca C halkasındaki hidroksil ve glikozitlerin bağlı olması mikroorganizmalar üzerinde ciddi etkiye sahiptir (Bitchagno *et al.* 2015, Farhadi *et al.* 2019). Sigaranın yol açtığı karaciğer temelli kanser oluşumlarını tetikleyen CYP2A6 ve CYP2A13 insan sitokrom enzimleri C-3 ve C-5' konumundaki hidroksi gruplarının flavon bileşiklerinde inhibüsyon etkinliğini artırmaktadır (Boonruang *et al.* 2020).

Genellikle flavonoidlerin kimyasal yapısı ve bunların damar daralma hastalıklarında genişletici etkiye sahip olması arasında muazzam bir ilişki vardı. Bu ilişki flavonoidlerin C halkasındaki C4 konumunda bulunan (C=O) karbonil grubunun varlığı ile birlikte C6-C3-C6 iskelet yapısının düzlemsel olması ve A halkasındaki C5-C7 konumları ve B halkasının C3 konumunda bağlı sübstitüentlerin var olması ile bağlantılı olduğu bilimsel bir çalışma sonucunda bulunmuştur (Loh *et al.* 2020). Son olarak bazı çalışmalarda, daha yüksek bir dipol momente (yük asimetrisi) sahip ya da yüksek negatifliğe sahip bazı flavonoid bileşiklerinin daha güçlü antigenotoksik aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (de Melo *et al.* 2010, Hatch *et al.* 2000). Bu sonuçlarda yapı ile aktivite arasında sıkı ilişki olduğunu göstermektedir.

Chen *et al*. (2020), yaptıkları çalışmalarında HepG2 karaciğer kanser hücrelerine karşı etkili olan chrysin bileşiği ve türevleri üzerine sentez bileşikleri elde etmişlerdir. İzole edilen bileşiklerden C-7 pozisyonuna tridekanoik asit bağlı olan chrysin bileşiği aglikon halindeki yapısının sahip olduğu aktiviteden 4-5 kat daha fazla yüksek aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu uzun zincir aynı zamanda moleküle DMSO çözücüsünde daha iyi çözünürlük kazandırmıştır (Chen *et al.* 2019).

Tez çalışmasında keşfedilen yeni moleküllerin antikanser etkilerinin olup olmadığını ve var ise bu etkilerinin hangi makromolekül hedeflerini hedeflediğinin belirlenmesi in-siliko çalışma ile belirenmiştir. Çalışmada ilk defa izole edilip yapısı aydınlatılan yeni moleküllerin antikanser etkilerini hangi hedef moleküller üzerinde ortaya koyduğunun

belirlenmesi SEA (Similarity Search Approach) sunucusu kullanılarak tespit edilmiştir (https://sea.bkslab.org). SEA araştırma sonuçları yeni moleküller [**CPGY-8** (Paphlagonica-2), **CCGY-5** (Cankiriense-1) ve **CCGY-9** (Cankiriense-2)] için Çizelge 5.1, Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'te listelenmiştir (listelemede en düşük P-değeri öncelik sırasına göre yapılmıştır). **CPÇ-12** (Paphlagonica-1) için herhangi bir hedef molekül kütüphanede tespit edilememiştir.

Çizelge 5.1 CPGY-8 (Paphlagonica-2) bileşiğinin in siliko hedef molekülleri

Hedef Anahtar	**Hedef isim**	**Tanımlama**	**P değeri**	**Mak. TC**
FAS_CHICK	FAS	Yağ asidi sentaz	3.613e-55	0.53
O96394_LEIAM		Arjinaz	5.773e-47	0.52
PDIA1_HUMAN	P4HB	Protein disülfit-izomeraz	7.463e-43	0.52
VE6_HPV16	E6	Protein E6	1.395e-38	0.29
Q965D6_PLAFA	fabG	3-oksoaçil-açil-taşıyıcı protein redüktaz	1.009e-37	0.50
AK1CL_MOUSE	Akr1c21	Aldo-keto redüktaz ailesi 1 üye C21	1.15e-36	0.35
DDL_HELPH	ddl	D-alanin-D-alanin ligaz	1.15e-36	0.35

Çizelge 5.1 CPGY-8 (Paphlagonica-2) bileşiğinin in siliko hedef molekülleri (devam)

MDR1A_MOUSE	Abcb1a	Multi ilaç dirençli protein 1A	6.576e-34	0.47
S28A3_HUMAN	SLC28A3	Çözünen taşıyıcı aile 28 üye 3	1.23e-32	0.31
Q95D7_PLAFA	fabz	Beta-hidroksiaçil-ACP-dehidrataz	1.906e-31	0.35
ALDR_RAT	Akr1B1	Aldoz redüktaz	4.841e-31	0.66
FPS_FUJSV	V-FPS	Tirozin-protein kinaz taşıyıcı prıtein Fps	2.801e-30	0.29
CP1B1_HUMAN	CYP1B1	Sitokrom P450 1B1	4.563e-24	0.50
Q66HS9_RAT	Slc6a7	Monokarboksilat taşıyıcı 2	7.897e-24	0.35
IL2_HUMAN	IL2	İnterlökin-2	5.731e-23	0.38
SIAT1_RAT	St6gal1	Beta-galaktozit alfa-2,6-sialiltransferaz 1	2.146e-20	0.30
PPAC_BOVIN	ACP1	Düşük protein ağırlıklı fosfotirozin protein fosfataz	9.896e-20	0.29
R1AB_CVHSA	rep	Replikaz poliprotein 1AB	2.643e-18	0.35
ARGI1_RAT	Arg1	Arjinaz-1	1.11e-16	0.31
NANH_CLOPF	nanH	Sialidaz	4.441e-16	0.38
SYN1_BOVIN	SYN1	Sinapsin-	6.661e-16	0.30
SC5A2_RAT	Slc5a2	Sodyum/glukoz yradımcı taşıyıcı 2	7.772e-16	0.30

Çizelge 5.2 CCGY-9 (Cankiriense-2) bileşiğinin in siliko hedef molekülleri

Hedef Anahtar	Hedef İsim	Tanımlama	P değeri	Mak. TC
FAS_CHICK	FASN	Yağ asidi sentaz	4.655e-51	0.49
PDIA1_HUMAN	P4HB	Protein disülfit-izomeraz	1.558e-40	0.48
O96394_LEIAM		Arjinaz	5.18e-37	0.48
S28A3_HUMAN	SLC28A3	Çözünen taşıyıcı aile 28 üye 3	2.077e-31	0.30
AK1CL_MOUSE	Akr1c21	Aldo-keto redüktaz ailesi 1 üye C21	2.287e-31	0.30
DDL_HELPH	ddl	D-alanin-D-alanin ligaz	2.287e-31	0.30
IL2_HUMAN	IL2	İnterlökin-2	1.589e-23	0.39
ALDR_RAT	Akr1b1	Aldoz redüktaz	8.063e-22	0.60
Q66HS9_RAT	Slc6a7	Monokarboksilat taşıyıcı 2	1.983e-20	0.30
MDR1A_MOUSE	Abcb1a	Multi ilaç dirençli protein 1A	2.337e-18	0.41
TYRO_HUMAN	TYR	Tirozinaz	2.749e-17	0.33
Q965D6_PLAFA	fabG	3-oksoaçil-açil-taşıyıcı protein redüktaz	7.772e-16	0.42

Çizelge 5.3 CCGY-5 (Cankiriense-1) bileşiklerinin in siliko hedef molekülleri

Hedef Anahtar	Hedef İsim	Tanımlama	P değeri	Mak TC
FAS_CHICK	FASN	Yağ asidi sentaz	1.313e-51	0.49
PDIA1_HUMAN	P4HB	Protein disülfit-izomeraz	2.311e-40	0.49
O96394_LEIAM		Arjinaz	1.345e-37	0.49
AK1CL_MOUSE	Akr1c21	Aldo-keto redüktaz ailesi 1 üye C21	3.232e-33	0.31
DDL_E-HELPH	ddl	D-alanin-D-alanin ligaz	3.232e-33	0.31
S28A3_HUMAN	SLC28A3	Çözünen taşıyıcı aile 28 üye 3	2.287e-31	0.30
CP1B1_HUMAN	CYP1B1	Sitokrom P450 1B1	1.206e-29	0.42
IL2_HUMAN	IL2	İnterlökin-2	3.848e-27	0.38
MDR1A_MOUSE	Abcb1a	Multi ilaç dirençli protein 1A	1.079e-26	0.40
ALDR_RAT	Akr1b1	Aldoz redüktaz	4.43e-25	0.58
Q1R2J4_ECOUT	fimH	TİP 1 fimbiral adhezin FimH	1.078e-22	0.32
Q965D6_PLAFA	fabG	3-oksoaçil-açil-taşıyıcı protein redüktaz	1.453e-22	0.42
Q66HS9_RAT	Slc6a7	Monokarboksilat taşıyıcı 2	1.289e-21	0.31
FIMH_ECOLI	fimH	Tip 1 fimbrin D-mannoz spesifik adhezin	1.062e-17	0.31

ABCG2_HUMAN	ABCG2	ATP-bağlanma kaseti alt ailesi G üye 2	2.494e-17	0.54
LEG1_HUMAN	LGALS1	Galektin-1	2.22e-16	0.31

Sitophilus granarius böcek türü üzerine yürütülen kontak etki çalışmalarında 24, 48 ve 72 saat sonunda MeOH/$CHCl_3$ ekstreleri arasında %10'luk ölüm oranı ile *C. paphlagonica*-Çiçek (CPÇ) kodlu ekstresinin olduğu belirlendi. MeOH/$CHCl_3$ çözücükarışımı ile ektraksiyonu yapılmadan önce hekzan ile elde edilen *C. paphlagonica* ekstresi (CPÇ (Hek)) %12'lik bir ölüm oranına sahip olduğu bulundu. Tüm ekstreler içerisinde kaynatma sonucu sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen CPÇ (EA) kodlu ekstre % 90 ve su buharı destilasyon yöntemi ile elde edilen CPÇ (EO) uçucu yağ % 96'lık bir ölüm oranına sahip olduğu ve bu oranın çok önemli olduğu ortaya konuldu. *C. cankiriense* bitkisinden elde edilen ekstrelerde oranlar çok düşük olarak belirlenmiştir. Her iki bitkilere ait tek doz fumigant etki çalışmasında herhangi bir olumlu sonuç alınamamıştır. CPÇ (EA) ekstresinin *S. granarius* zararlısına karşı yüksek kontak toksisite göstermesi bu ekstre içerisinde bulunan fazla miktardaki basit fenolik asitler, hidroksisinamik asit türevli bileşiklerin, fenil propenoidler ve seskiterpen lakton bileşikleri olan CPGY-11 ve CPGY-12 bileşiklerinin CPÇ içerisinde ana bileşenlerden olmasından ileri gelmektedir. Bu çıkarımın ispatı flavonoid içeriği bakımından zengin olan ekstrelerde bu etkinin olmayışı ile belirlenmiştir. CPÇ (EO) uçucu yağının aktivite göstermesi ana bileşen olan spatulenol ve γ-elemen bileşiklerinin ana bileşen olması bu bileşiklerin çok yüksek insektisit aktivite özelliği taşımasından kaynaklanmaktadır. Spatulenol bileşiğinin tek başına insektisit aktivitesi üzerine çalışma bulunmamaktadır fakat γ-elemen bileşiğinin *Spodoptera litura* böceğine karşı (LC_{50}: 10.64 μg/ml) yüksek değerde toksik etkisinin olduğu belirlenmiştir (Benelli *et al.* 2018). Ayrıca uçucu yağların yüksek sinerjik etkisine dair literatür çalışmaları mevcuttur (Liu *et al.* 2011). Dünyada depo zararlısı olan böceklerin kontrolünün sağlanabilmesi, çevrenin bozulması, uygulama maliyetlerinin artırılması, böcek ilacına karşı haşere direncinin artması ve ek olarak hedef olmayan organizmalar üzerinde ölümcül etkilerin ortaya çıkmasına neden olan sentetik böcek öldürücülerin ve fumigantların kullanımına dayanmaktadır (Zettler and Arthur 2000). Son yıllarda tarım ile uğraşan pek çok işçi ilgisini, 19. yy modern tarımın başlamasından itibaren kullanılan geleneksel böcek ilacı ve fumigantların yerine alternatif doğal ürünlerin kaynağı olan bitkilere yoğunlaştırmışlardır. Doğada böcek bitki ilişkisini daha dikkatli

incelemişler ve buradan çıkaracakları önemli bulguları kendi yararlarına kullanılabilirliği üzerine ciddi denemeler yapmışlardır (Tuncer and Saruhan 2009).

C. paphlagonica bitkisinin uçucu yağ analizi üzerine sadece bir çalışma mevcuttur. Köse ve arkadaşları (2009) yılındaki çalışmalarında *C. paphlagonica* bitkisini aynı yıl içerisinde Yozgat ili içerisinde toplamışlar ve bitkinin toprak üstü kısımlarını kullanarak uçucu yağını su buharı destilasyonu yöntemi ile elde etmişlerdir. Toplam 53 bileşenin varlığını GC-MS ile belirlemişlerdir. Ana bileşen olarak hekzadekanoik asit (% 28.9) ve dodekanoik asit (% 22.8) yağ asitlerini bulmuşlardır. Uçucu yağ olarak karyopilen oksit (% 9.2) bileşiğini ana bileşen olarak belirlemişlerdir (Kose *et al.* 2009). Bizim çalışmamızda *C. paphlagonica* bitkisinin çiçek kısmından toplam 38 bileşenin varlığı tanımlanarak, spatulenol (% 10.02) ve γ-elemen (% 9.84) uçucu yağ bileşenlerini ana bileşen olarak ve dodekanoik asit yağ asidi bileşenini (% 7.03) oranında var olduğunu tanımladık. Bitkinin uçucu bileşenleri arasındaki farkın nedeni yöresel farklılık, yükselti ve bunun getirdiği ekolojik stres koşulları olabilir.

Çinko metalinin içerisinde bulunan ve metaloenzim ailesi üyelerinden olan karbonik anhidraz (CA), bikarbonatın ($HCO3^-$) dehidrasyonu ve karbondioksitin (CO_2) hidratasyonunu hızlı ve dönüşümlü olarak katalizleyen bir enzim türüdür. CA bu olayı saniyede 104-106 reaksiyon hızına ulaştıracak şekilde yapılmasını sağlamaktadır. (Supuran 2008). Bu enzim, asit-baz dengesinin sağlanması, gaz dengesinin oluşturulması, kemik erimesinin önlenmesi, kalsiyum fazlalığının oluşturduğu doku sertleşmesinin engellenmesi, solunumun düzenlenmesi ve biyokimyasal bazı olayların oluşturulup yada düzenli devam ettirilmesi gibi pekçok işlevde yer alarak önemli bir görev üstlenmektedir (Akbaba *et al.* 2014, Arabaci *et al.* 2014, Kucuk and Gulcin 2016). Bir ilacın tedavi edici özelliği onun CA enzimlerini ne kadar hedef alabildiği ile orantılıdır. Bunun için geliştirilen ister hayvan ister insan olsun pek çok ilaç CA enzim sistemleri ile ilişkide olmak zorundadır. CA enzimleri, çeşitli görevlere ssahip olmasından dolayı ve pekçok dokuda bulunabilme kabiliyetinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisi için hedef enzim olarak seçilmiştir (Supuran 2010). Günümüzde bilimin gelişmesi ile bu enzimler obezite, kanser, osteoporoz, sıtma ve sinir hasarı hastalıklarının iyileştirilmesi amacı ile şu anda farklı hastalıkları tedavi etmek için

kullanılmaktadır (Alterio *et al.* 2012). Bazı sülfonamit türevli ilaçlar (asetazolamit, dorzolamit, brinzolamit vb.) CA izo-enzimlerini inhibe edebilmektedir (Bülbül *et al.* 2002). Bitkilerin içerdiği çok geniş fenolik yapıdaki bileşiklerin iyileştirici etkisi sahip olduğu bileşiklerin enzimler ile ilişkisi ile de ifade edilebilmektedir. Bileşiğin yapısındaki OH sayısı artıkça etkileşim artmakta ve doğal olarak enzim inhibitörü ya da aktivatörü olarak anlam kazanmaktadır. Bu bileşiklerden flavonoid yapısındaki bileşikler enzimlere karşı yüksek aktif bileşiklerdir. Hatta glikozit yapısına sahip flavonoidler daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bazı literatürler de belirtilmiştir.

Innocenti *et al*. (2010) yılındaki çalışmalarında bir dizi polifenolik bileşiğin CA I ve CA XIV enzimleri üzerine inhibisyon çalışmasını yapmışlardır. Burada *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, gallik asit, sirinjik asit, kersetin ve elajik asit gibi bazı basit fenolik asitlerin ve fenolik bileşiklerin enzimlere etkilerini değerlendirmişlerdir. Düşük konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik asit ve fenol türevli bileşiklerin CA I, XII, XIII ve XIV enzimlerini inhibe ettiklerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda çinko iyonuna bağlanan sülfonamid türevli bileşiklerin tersine fenolik bileşikleri, Zn(II) koordinatlı su molekülüne bağlanarak aktif bölgenin dışına doğru meyil göstermektedir. Bu bağlanma şeklinin bu bileşiklerin tıbbi açıdan ilgili CA enzimlerine bağlanmasını bu bileşiğe seçicilik kattığı gibi inhibisyon aktiviteside yüklemektedir (Innocenti *et al.* 2010).

Doktora çalışmasının içerisindeki biyolojik aktivitelerin arasında bulunan CA-I ve CA-II hidrataz enzim aktivitesi için *C. cankiriense* ve *C. paphlagonica* bitki ekstreleri kullanıldı. CA-I ve CA-II enzimlerine karşı hidrataz enzim aktivitesi incelenmiştir. Tüm ekstrelerin güçlü CA-I ve CA-II enzimleri için güçlü inhibitör adayı oldukları IC50 değerlerinden belirlenmiştir. Her iki enzimede aktivitesi bulunan CPÇ bitkisinden MeOH/$CHCl_3$ sistemi ile elde edilen CPÇ ekstresi için farklı bir durum söz konusudur. Bu haliyle IC_{50} değeri (CA-I: 12.17 µg/mL, CA-II: 18.79 µg/mL) belirtildiği ekstrenin, hekzan ile önce ekstre edilip daha sonra MeOH/$CHCl_3$ ile ekstraksiyonu yapılan CPÇa ekstresi CA-I enzimi için çok farklılık arz etmemiştir. Fakat CPÇ ekstresinin CA-II için IC_{50} değeri 18.79 µg/mL iken, ekstraksiyon sistemi değişik olan CPÇa ekstresinin CA-II için IC_{50} değeri olan 9.89 µg/mL olarak bulunmuştur. Buda enzim aktivitesinin iki kat

artığını göstermiştir. Bunun nedeni ekstrenin içeriğinin farklı olması ile ifade edilmektedir. Hekzan ile apolar bileşiklerin uzaklaştırılarak fenolik asit yada sekonder bileşen konsantrasyonu artmıştır. Artan fenolik bileşen konsantrasyonu CA-II enzimi için yüksek inhibisyon aktivitesi anlamına gelmektedir. Zaten fenolik yapıdaki sekonder metabolitlerin enzim aktivitesinin destekleyen çalışmalarda mevcuttur (Akkemik, 2019). CCÇ ekstresi ilginç bir şekilde iki enzim türü içinde herhangi bir inhibisyon etki göstermemiştir. Her iki bitki için CA-I enzimi üzerine kök ekstrelerinin aktivitesinde azalma mevcuttur. Buda bu kısımdaki sekonder bileşenlerin kantitatif ve kalitatif olarak az olması ile ilgilidir. *C. cankiriense* bitkisine ait ekstrelerin CA-II enzimi üzerine inhibisyon etkisi bulunmamaktadır. Bu durum bu bitkinin enzime spesifik inhibütör olabileceği sonucunu ortaya koymuştur. Ön işlem yapılamayan ekstreler arasında CPGY ekstresi CA-1 enzimi için IC_{50} değeri en düşük olan ekstredir yani en aktif ekstredir. İnhibisyon aktivitesinin yüksek olmasının nedeni HPLC-TOF/MS sonuçlarından da anlaşılacağı üzere kantitatif olarak fenolik bileşen miktarının en fazla CPGY (*C.paphlagonica*- gövde-yaprak) ekstresinde bulunması ile açıklanabilir.

Tez çalışması içerisinde diğer bir biyolojik aktivite çalışmasını antioksidan aktivite çalışmaları oluşturmaktadır. *C. paphlagonica ve C. cankiriense* bitkilerinden elde edilen ekstrelerin izolasyon yöntemi önceki bölümlerde detaylı şekilde verilmiştir. Miktarları fazla olan bitkiler kaynatılarak sulu kısım etilasetat ve n-butanol ile ekstrakte edilerek ve hekzan ile ekstraksiyonu yapılarak farklı kısımlarına ait ekstreler elde edilmiştir. Tablo 2 incelendiği zaman süperoksit anyon radikali giderme aktiviteleri genel olarak standartlar ile aynı seviyededir fakat kök ekstrelerinin aktiviteleri yaklaşık 2-3 kat daha az olarak belirlenmiştir. En etkili ekstre CPÇ (*C. paphlagonica*-çiçek) ekstreleridir. Fakat MeOH/$CHCl_3$ ekstrelerinin aktiviteleri düşüktür bu etki CPÇ (He_2), CPÇ (EA) ve CPÇ (n-Bu) ve CPÇ (EO)'de yüksek antioksidan etkili ekstrelerdir. Uçucu yağları oluşturan oksijenli ve oksijensiz mono terpenler etkili antioksidan bileşiklerdir.

Çalışma bitkilerine ait ekstrelerin ve ucu yağın indirgeme gücü aktivitesi çok yüksek olmamakla beraber, 204.64±3.05 $A_{0.5}$ değeri ile aktivitesi en yüksek olan CPK (M/K) ekstresidir. 463.41±0.45 $A_{0.5}$ değeri ile ekstreler içerisinde en düşük aktiviteye CCK

(M/K) ekstresinin sahip olduğu belirlenmiştir. Buna göre kayda değer bir sonuç çok fazla elde edilememiştir.

CPÇ (M/K) ve CPÇa (M/K) ekstreleri içerisinde yüksek miktarda renk maddesi ve şeker bulunduğu için bu ekstrenin süperoksit anyon radikali giderme etkisi az olabilir. Şekerlerden uzaklaştırılmış olan ekstrelerin hem fenolik bileşen konsantrasyonu artmış hemde klorofilden uzaklaştırılmıştır. Ayrıca antioksidan etkileri belirlenen 4-hidroksi benzoik asit, vanilik asit ve kafeik asit bileşiklerinin toplam kütlede konsantrasyonu artmıştır ve özellikle kafeik asit şeker grubu uzaklaştırılan ekstrelerde var olduğu belirlenmiştir. Elzaawely ve Tawata tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada, *Convolvulus arvensis* L. bitkisinin yapraklarından elde edilen etil asetat ekstresinin güçlü antioksidan aktivite gösterdiği ve içeriğindeki ana bileşeler olan *p*-hidroksibenzoik asit, şiringik asit, vanilik asit, benzoik asit ve ferulik asit bileşiklerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Elzaawely and Tawata 2012).

Tablo 2 incelendiği zaman *Centaurea* türlerine ait ekstrelerin total antioksidan aktivite, indirgeme gücü, DPPH· serbest radikali giderme, süperoksit anyon radikali giderme ve ABTS+· radikali giderme aktiviteleri verilmiştir. Buna göre tüm ekstrelerin DPPH radikali giderme aktivitesi BHA standardından daha yüksektir. CCGY (EA) ve CCGY (n-Bu) ekstreleri α-tokaferol standartından fazla aktivite göstermiştir. Hatta CPÇ bitkisinden hekzan ile alınan apolar karakterli ekstreleri ortam sıcaklığı değiştirilerek esterleştirme işlemleri yapılmıştır (CPÇ (He_2) ve CPÇ (He_3)). Ester halindeki ekstrelerin estersiz halindeki ekstreden daha fazla DPPH aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıkta esterleştirilmesi yapılmış olan CPÇ (He_3) (65 °C) ekstresi daha fazla DPPH ve Toplam antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Fakat tüm antioksidan yöntemleri için aynı durum söz konusu değildir. Her deney yöntemi için çalışmaya spesifik oluşumlar ve aktivite özelliğinin varlığı belirlenmiştir. Bitkilerin içerdiği fenolik bileşikler, bitkinin antioksidan etkisinin etkilenmesine neden olmaktadır. Bu etki çoğu zaman olumlu olsa da her zaman bu bileşikler antioksidan etki göstermeyebilir (Djeridane *et al.* 2007). Çalışmamızda tüm ekstrelerin özellikle yüksek seviyede DPPH serbest radikal süpürücü aktivite göstermesi bitkinin kendi içerisinde sahip olduğu biyo-aktif özellikli bileşikler ile bağıntılıdır. Özellikle CCGY ekstresi

içerisinde fenolik asit türevlerinin fazla olması ve izolasyonunu gerçekleştiremediğimiz terpenlerin oldukça kuvvetli antioksidan aktivite göstermesi nedeni ile meydana gelmiş olmasıdır. Flavanoid bileşiklerinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. CCGY bileşiğinin yüksek DPPH radikali gidermesinin nedenlerinden bir sebebi de izolasyonu gerçekleştirilen yeni bileşiklerden ileri gelmektedir. Özellikle bitki ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden birincisi kullanılan çözücünün polaritesidir. Bitkilerde farklı yöntemlerle kazanılan ekstrelerin içeriğinin, çözücü sistemine ve ekstraksiyon sistemine bağlı olarak değişkenlik göstermesi antioksidan birbirinden farklı olmasına neden olmaktadır. Ayrıca polar çözücüler ile elde edilen ekstrelerin, polar olmayan çözücüler ile elde edilen ekstrelerden çok daha yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite göstermesine neden olabilmektedir (Miliauskas *et al.* 2004, Vundać *et al.* 2007).

İkinci en önemli etken, ekstrenin içerdiği bileşiklerin konsantrasyonu ve içerisinde proton verebilme özelliğinde olan ve DPPH radikali ile reaksiyona girebilme özelliğine sahip bileşik yada bileşik gruplarının bulunmasıdır. Heinonen ve ark. (1998) yılındaki çalışmada bitki temelli doğal bileşiklerin bitkideki bulunma şeklinin ve yapısındaki grupların bağlanma şeklinin antioksidanların etkinliğini belirlemede önemli faktörler olduğunu ortaya koymuştur (Heinonen *et al.* 1998).

Montoro ve ark. Tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada, Mersin meyvesinden elde edilen ekstrelerin ana bileşenlerini flavonoidler ve antosiyaninler olarak belirlemişlerdir. Antioksidan aktivitesi yüksek olan ekstrelerde mirisetin ve kuersetin bileşiklerinin diğerlerine oranla daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir. Antioksidan etkisi kanıtlanan bu tür bileşiklerin antioksidan etkisinin yapı ile ilişkili olduğu ve bazı yapıların otooksidasyonun önlenmesine neden olduğu belirtilmiştir (Montoro *et al.* 2006). Antioksidan özelliklere sahip bir bileşiğin antioksidatif etki özelliğini kazanabilmesi için radikalleri giderebilme, peroksitleri parçalayabilme, geçiş metallerini bağlama ve hidrojen koparılmasını engelleme gibi kabiliyetlere sahip olması gerekmektedir (Diplock 1997). Sekonder bileşiklerin antioksidan etkisi, serbest radikalleri giderme, metal iyonlarla bileşik oluşturma ve singlet oksijenin engellenmesi yada azaltma gibi biyokimyasal özelliklerinden kaynaklanır (Miller *et al.* 1996). Bu özellikleri ile

sekonder yapısındaki fenolik bileşikler kanser gibi çeşitli hastalıkların oluşumunda rol alan oksidan yapıların bertaraf edilmesi, antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek hücre içerinde oksidatif stresi azaltılması, nitrik oksit ve peroksit radikallerinin tamamen temizlenmesini sağlaması bir dizi mekanistik reaksiyon ile oluşmaktadır (Havsteen 2002).

Karamenderes ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada (2007), *C. cadmea, C. calolepis, C. cariensis* subsp. *maculiceps, C. cariensis* subsp. *microlepis, C. depressa, C. ensiformis, C. hierapolitana ve C. urville*i subsp. *urvillei* bitkilerinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi ve total fenolik içeriklerini araştırmışlardır. Çalışma bulgularına göre, *C. urvillei, C. cadmea* ve *C. ensiformis* bitkilerine ait metanol ekstreleri sırasıyla % 90,41, % 86,66 ve % 86,19 oranında inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Ekstre ait total fenol miktarları ile antioksidan kapasiteleri arasında bir doğrusal ilişkinin olduğunu rapor etmişlerdir (Karamenderes *et al.* 2007c).

Centaurea pterocaula bitkisinin etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin antioksidan kapasitelerini, mutajenik/antimutajenik özelliklerini ve enzim inhibitör etkilerini Uysal ve çalışma grubu araştırmışlardır. Araştırma sonuçları, özütlerin mutajenik etkisinin olmadığı fakat bazı ekstrelerin önemli antimutajeniteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Etil asetat ve metanol ekstrelerinin 2-aminofloren'e karşı 5000 μg/plak dozunda güçlü antimutajenik etkiye sahip olduğu görülmüştür (Uysal *et al.* 2016).

Uruç ve Çakılcıoğlu tarafından 2019 yılında yaptıkları çalışmada, *C. kurdica* Reichardt ve *C. urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz'nın bitkilerinin element içeriği ve antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesine yaptıkları çalışmayı paylaşmışlardır. Çalışma sonucuna göre, *C. kurdica*'nın değerlendirilen tüm enzim aktivitelerinde çok önemli aktivite verileri elde etmişlerdir (Parlak and Çakılcıoğlu).

6. SONUÇ

İnsanlar geçmişte sağlık verici etkilerinden dolayı bitki, hayvan ve mineralleri kullanmışlardır. Bunların arasında bitki dünyası eşsizdir. Birçok eski kültürün bir parçası olan bitki aleminin kullanım şekli insan ve canlılar arasında nesilden nesile aktarılan bilgilerle açıklanmaktadır. Tıbbi bitkilerin aktif bileşenlerini araştırmak ve izole etmek için geleneksel tıbbı bir başlangıç noktası olarak kullanmak çok umut verici olabilir. Bu değere sahip ya da olması çok muhtemel olan bitkilerden izole edilmiş aktif bileşikler modern tıbbi kimyada ilaç benzeri yapılar olarak kullanılabilir. Bazı durumlarda, aktif bileşiğin izolasyonu geleneksel kullanım ne kadar doğru olduğunu doğrular nitelikte olmuştur. En iyi bilinen örneklerden biri, Çin'deki *Artemisia annua* bitkisinin sıtmanın tedavisinde tarihsel kullanımı ve son 15 yıldır sıtmaya karşı ilaçların

temelini oluşturan doğal bileşik artemisinin izolasyonudur (Boufridi and Quinn 2018, Graziose *et al.* 2010, Yang *et al.* 2008).

Dünya doğal ürün kaynaklı üretilen pekçok ilaç, kozmetik, parfümeri ve gıda ürünün bitkisel bir sektörü oluşturmaktadır. Tarih öncesinden 21.yy kadar gelen ve kendini mutasyona uğratarak her defasında farklı bir forma karşımıza çıkan mutajenik. viral, bakteriyel etki hastalıkları insana zarar vermesinden dolayı günden güne artış göstermektedir. Bu durum neticesi insan hep yönünü doğaya dönmüştür. Ülkemiz, farklı iklim ve ekolojik koşulları ile doğadan toplanan ister aromatik ister aromatik olmasın bitkiler açısından oldukça zengindir. Bitki kaynaklı içecek, ilaç ya da gıda takviyelerinin içerisinde bulunan fenolik bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antitümor yada antikanser gibi birçok etkiye sahiptir. Bitki temelli doğal ürünlerin çoğu geleneksel kullanımı ile ün kazanmıştır ve tıbbi kullanımı için bilimsel çalışma hedefi oluşturmuştur. Önemli etkileri olan bitkiler çağımızın hastalığı olan kanserin canlıda gelişimini hormon ve enzim aktiviteleri kontrol altına alabilme yeteneği ile engelleyebilmektedir.

Sitotoksik etkiye sahip ilaçlar antitümor ya da antikanser özelliklerini kanser hücrelerine ait hücresel yapıyı tamamen bozulması, hücre döngüsünün sekteye uğratılması, çoğalmasının engellenmesi, DNA yapılarına zarar vererek apoptoza neden olunması ve metabolik yolakların engellenmesinin sağlayarak yapabilmektedir.

Asteracea familyasına ait *Centaurea* türleri çok fazla olup; antikanser ve antioksidan özellikleri ile ilgili olarak fenolik asitler, flavonoidler ve vitaminler gibi çeşitli biyolojik aktif bileşikler bakımından zengindir ve çeşitli kanser türlerinde tümör oluşumunu inhibe etme özellikleri vardır. Tez çalışmasının birinci içeriği, Çankırı iline ait Orta ilçesinde toplanan ve endemik bitki türleri olan *C. paphlagonica* ve *C. cankiriense* bitkilerinin çeşitli kısımlarından elde edilen farklı ekstrelerin fenolik madde miktarları, kimyasal içerikleri, antioksidan aktiviteleri, enzim aktiviteleri, insektisit aktivitesi, HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivitelerinin belirlenmesini içermektedir. Ekstrelerin antiproliferatif aktivitesi xCELLigence yöntemi ile saf bileşiklerin

antikanser aktiviteleri elisa yöntemi ile yapılmıştır. Antiproliferatif aktivitesi yüksek olan ekstrelerden aktif bileşen/bileşenler izolasyonunu gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında bu bitkilerden izolasyon, içerik bileşen analizi ve aktivite çalışmaları ilk defa tarafımızdan gerçekleştirilmiştir. Bazı bilinen bileşiklerin izolasyonunun gerçekleştirilmesinin yanında ilk defa literatüre yeni dört tane bileşik kazandırılmıştır. Bu bitkilerin bazı ekstrelerinin ve izolasyonu yapılan kısımlardan elde edilen bazı bileşiklerin yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada saflaştırılan bileşikler flavonoid, steroid, seskiterpen lakton, hidrosinnamik asit, basit fenolik asit ve alkaloit sınıfına ait bileşiklerdir. Seskiterpen lakton bileşikler *Centaurea* türlerinde bol bulunan ve marker olabilen bileşik sınıfından özel bileşiklerdir.

İzolasyonu gerçekleştirilen bileşiklerin HeLa kanser hücresine karşı etkileri incelenmiştir. Cirsiliol **(CPGY-10)**, deasilsinaropikrin **(CPGY-11)** ve 8α-*O*-(2′,3′-dihidroksiizobütiril) deasilsinaropikrin **(CPGY-12)** kodlara sahip bileşikler sırasıyla 50, 25, 103 μM'lık IC_{50} değerleriyle güçlü antiproliferatif etkiye sahip bileşiklerdir. Diğer bileşiklerin de kayda değer IC_{50} değerleri bulunmaktadır. Hatta izolasyonu yapılmayan aktif ekstrelerin izolasyonuna devam edilmektedir. Yeterli ekstre sağlanırsa bu değerli sonuçlara göre izolasyon çalışmaları devam edecektir.

Centaurea bitki türlerinin pekçok biyolojik etkisinin olduğu bilimsel temelli çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bu derece önemli etkilerini de gördüğümüz iki *Centaurea* türü insektisit aktivitesi uçucu yağında ve etilasetat ekstresinde çok yüksektir. Bu çalışmalara diğer zararlı böcekler üzerinde de insektisit aktivite çalışmaları yapılabilir ve bu bitkilere ait değerlilik bulguları sunulabilir. Kanser aktivitesi de yüksek olan bu bitki türlerinin ileriki çalışmalar ile (*in vitro, in vivo*) pekçok hastalığın tedavisinde kullanılabilirliği gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

Abay, G., Karakoç, Ö. C., Tüfekçi, A. R., Koldaş, S. and Demirtas, I. 2012. Insecticidal activity of *Hypnum cupressiforme* (Bryophyta) against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research, 51 (2012), 6-10.

Acet, T. 2020. Determining the phenolic components by using HPLC and biological activity of *Centaurea triumfetti*. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 1-6.

Aguilar Urbano, M., Pineda Priego, M. and Prieto, P. 2013. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. Analytical Biochemistry, 269 (2), 337-341.

Ahmed, S.A. and Kamel, E. M. 2014. Cytotoxic activities of flavonoids from *Centaurea scoparia*. The Scientific World Journal, 2014, 1-7.

Akbaba, Y., Akıncıoğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ. and Supuran, C. T. 2014. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of

aminoindanes and aminotetralins. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 29 (1), 35-42.
Akçalı, A. 2010. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. Türk Onkoloji Dergisi, 25(3): 119-123.
Akkal, S., Benayache, F., Medjroubi, K., Tillequin, F. and Seguin, E. 2003. Flavonoids from *Centaurea furfuracea* (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology, 31 (6), 641-643.
Akkal, S., Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Jay, M., Tillequin, F. and Seguin, E. 1999. A new flavone glycoside from *Centaurea furfuracea*. Fitoterapia, 70 (4), 368-370.
Akkol, E. K., Arif, R., Ergun, F. and Yesilada, E. 2009. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. Journal of Ethnopharmacology, 122 (2), 210-215.
Aktaş, H. G. 2018. Keçiboynuzu ekstrelerinin insan servikal kanser hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkileri. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 15 (3), 199-206.
Akyüz, T. 2016. *Centaurea pseudoscabiosa* Boiss. & Buhse (Asteraceae) tür kompleksi ve yakın ilişkili taksonların akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
Almeida, I., Cavalcante, F. and Vicentini, V. 2016. Different responses of vanillic acid, a phenolic compound, in htc cells: Cytotoxicity, antiproliferative activity, and protection from DNA-induced damage. Genetics and Molecular Research, 15 (4), 1-12.
Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T. and De Simone, G. 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? Chemical Reviews, 112 (8), 4421-4468.
Anderberg, A., Baldwin, B., Bayer, R., Breitwieser, J., Jeffrey, C., Dillon, M., Eldenäs, P., Funk, V., Garcia-Jacas, N. and Hind, D. 2007. Compositae, In: Flowering Plants· Eudicots. Springer, 61-588,
Andersen-Ranberg, J., Kongstad, K. T., Nielsen, M. T., Jensen, N. B., Pateraki, I., Bach, S. S., Hamberger, B., Zerbe, P., Staerk, D. and Bohlmann, J. 2016. Expanding the landscape of diterpene structural diversity through stereochemically controlled combinatorial biosynthesis. Angewandte Chemie International Edition, 55 (6), 2142-2146.
Anonim. 2015. Web Sitesi: https://avys.omu.edu.tr, Erşim Tarihi: 31/05/2020.
Arabaci, B., Gulcin, I. and Alwasel, S. 2014. Capsaicin: a potent inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. Molecules, 19 (7), 10103-10114.
Arif, R., Küpeli, E. and Ergun, F. 2004. The biological activity of *Centaurea* L. species. Gazi University Journal of Science, 17 (4), 149-164.
Aslan, Ü. and Öksüz, S. 1999. Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*. Turkish Journal of Chemistry, 23 (1), 15-20.
Astari, K. A., Erel, S. B., Bedir, E. and Karaalp, C. 2013. Secondary metabolites of *Centaurea cadmea* Boiss. Records of Natural Products, 7 (3), 242-244.
Atasagun, B., Aksoy, A., Martin, E. and Uzun, O. 2013. Morphological, anatomical, palynological, karyological and autecological characters of *Centaurea amaena* Boiss. & Balansa [Sect. Phalolepis (*Centaurea*/Asteraceae)]. Plant Systematics and Evolution, 299 (9), 1761-1767.

Austin, M. B. and Noel, J. P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. Natural Product Reports, 20 (1), 79-110.

Ayad, R., Ababsa, Z., Belfadel, F. Z., Akkal, S., León, F., Brouard, I. and Medjroubi, K. 2012. Phytochemical and biological activity of Algerian *Centaurea melitensis*. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2 (1), 151-154.

Aytac, Z., Duman, H. and Ekici, M. 2016. Two new *Achillea* L.(Asteraceae) species from Turkey. Turkish Journal of Botany, 40 (4), 373-379.

Aytaç, Z. and Kaptaner, B. 2012. Bitki sistematiği, Nobel Yayınevi, Ankara.

Baatouche, S., Cheriet, T., Sarri, D., Mekkiou, R., Boumaza, O., Benayache, S., Benayache, F., Brouard, I., Leon, F. and Seghiri, R. 2019. *Centaurea microcarpa* Coss. & Dur.(Asteraceae) extracts: New cyanogenic glucoside and other constituents. Natural Product Research, 33 (21), 3070-3076.

Bach, S. M., Fortuna, M. A., Attarian, R., de Trimarco, J. T., Catalán, C. A., Av-Gay, Y. and Bach, H. 2011. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin. Natural Product Communications, 6 (2), 163-166.

Bahmani, F., Esmaeili, S., Bashash, D., Dehghan-Nayeri, N., Mashati, P. and Gharehbaghian, A. 2018. *Centaurea albonitens* extract enhances the therapeutic effects of Vincristine in leukemic cells by inducing apoptosis. Biomedicine Pharmacotherapy, 99 (2018), 598-607.

Bakr, R. O., Mohamed, S. A. E. H. and Ayoub, N. 2016. Phenolic profile of *Centaurea aegyptiaca* L. growing in Egypt and its cytotoxic and antiviral activities. African Journal of Traditional, Complementary Alternative Medicines, 13 (6), 135-143.

Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C. and Preston, C. A. J. s. 2006. Volatile signaling in plant-plant interactions:" talking trees" in the genomics era. Science, 311 (5762), 812-815.

Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Cabrera, E. and Rodriguez-Garcia, I. 1997. Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborescens*, *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. Fitoterapia, 68 (3), 281-283.

Basheer, L. and Kerem, Z. 2015. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. Oxidative Medicine Cellular Longevity, 2015 1-15.

Bassoli, B. K., Cassolla, P., Borba-Murad, G. R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C. L., Bazotte, R. B., da Silva, R. S. d. S. F. and de Souza, H. M. 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. Cell Biochemistry and Function, 26 (3), 320-328.

Baykan-Erel, S., Bedir, E., Khan, I. A. and Karaalp, C. 2010. Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* PH Davis. Biochemical Systematics Ecology, 38 (5), 1056-1058.

Baytop, T. 1999. Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün, Nobel Tıp Kitabevleri.

Belkacem, S., Belbache, H., Boubekri, C., Mosset, P., Rached-Mosbah, O., Marchioni, E., Benayache, S. and Benayache, F. 2014. Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 5 (3), 1275-1279.

Bello, O. M., Ogbesejana, A. B., Adetunji, C. O. and Oguntoye, S. O. 2019. Flavonoids Isolated from *Vitex grandifolia*, an underutilized vegetable, exert monoamine A & B inhibitory and anti-inflammatory effects and their structure-activity relationship. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 16 (4), 437-443.

Beltagy, A. M. 2015. Chemical composition and cytotoxic activity of *Centaurea scoparea* Sieb against four human cell Lines. Journal of Pharmaceutical Sciences Research, 7 (3), 103-107.

Benelli, G., Govindarajan, M., AlSalhi, M. S., Devanesan, S. and Maggi, F. 2018. High toxicity of camphene and γ-elemene from *Wedelia prostrata* essential oil against larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Science and Pollution Research, 25 (11), 10383-10391.

Bentamène, A., Benayache, S., Crèche, J., Petit, G., Bermejo-Barrera, J., Leon, F. and Benayache, F. 2005. A new guaianolide and other sesquiterpene lactones from *Centaurea acaulis* L.(Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology, 10 (33), 1061-1065.

Bergman, M. E., Davis, B. and Phillips, M. A. 2019. Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. Molecules, 24 (21), 3961.

Bhadra, K. and Kumar, G. S. 2011. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: Binding aspects and implications for drug design. Medicinal Research Reviews, 31 (6), 821-862.

Bhimani, R. S., Troll, W., Grunberger, D. and Frenkel, K. 1993. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. Cancer Research, 53 (19), 4528-4533.

Biray, Ç., Gündüz, C., Yılmaz, B., Şahin, F. and Topçuoğlu, N. 2006. Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester (cape) ve sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (ccrf-cem)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. Ege Tıp Dergisi, 45 (2), 83-92.

Bitchagno, G. T. M., Tankeo, S. B., Tsopmo, A., Mpetga, J. D. S., Tchinda, A. T., Fobofou, S. A. T., Wessjohann, L. A., Kuete, V. and Tane, P. J. P. L. 2015. Lemairones A and B: Two new antibacterial tetraflavonoids from the leaves of *Zanthoxylum lemairei* (Rutaceae). Phytochemistry Letters, 14 (2015), 1-7.

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181 (4617), 1199-1200.

Bohm, B. A., Collins, F. W. and Bose, R. 1977. Flavonoids of *Chrysosplenium tetrandrum*. Phytochemistry, 16 (8), 1205-1209.

Bona, M. 2014. Achene characteristics of Turkish Centaurea (Asteraceae) and their systematic application. Bangladesh Journal of Botany, 43 (2), 163-168.

Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Prasopthum, A., Rongnoparut, P. and Sarapusit, S. 2020. Structure–activity relationship and in vitro inhibition of human cytochrome CYP2A6 and CYP2A13 by flavonoids. Xenobiotica, 50 (6), 630-639.

Boufridi, A. and Quinn, R. J. 2018. Harnessing the properties of natural products. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 58 (2018), 451-470.

Boukhary, R., Aboul-ElA, M., Al-Hanbali, O. and El-Lakany, A. 2017. Phenolic compounds from *Centaurea horrida* L growing in Lebanon. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 9 (1), 1-4.

Bouzghaia, B., Moussa, M. T. B., Goudjil, R., Harkat, H. and Pale, P. 2020. Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Centaurea resupinata* subsp. *dufourii* (dostál) greuter. Natural Product Research, 1-5.

Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, R. and Arnold, N. 2005. Guaianolides from *Centaurea babylonica*. Biochemical Systematics and Ecology, 33 (8), 817-825.

Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Çiftçi, M. 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1, 3, 4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 10 (8), 2561-2567.

Chang, H.-J., Kim, H. J. and Chun, H. S. 2007. Quantitative structure−activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. Life Sciences, 80 (9), 835-841.

Cheel, J., Schmeda-Hirschmann, G., Jordan, M., Theoduloz, C., Rodríguez, J. A., Gerth, A. and Wilken, D. 2007. Free radical scavenging activity and secondary metabolites from in vitro cultures of *Sanicula graveolens*. Zeitschrift für Naturforschung C, 62 (7-8), 555-562.

Chen, N., Wang, R., Lu, L.-J., Yan, L.-J., Bai, L.-L., Fu, Y., Wang, Y., Peng, D.-Q., Chen, X. and Wang, C.-H. 2019. Synthesis of chrysin derivatives and screening of antitumor activity. Journal of Asian Natural Products Research, 22 (5), 444-451.

Chen, W., Zheng, R., Zhang, S., Zeng, H., Zuo, T., Xia, C., Yang, Z. and He, J. 2017. Cancer incidence and mortality in China in 2013: an analysis based on urbanization level. Chinese Journal of Cancer Research, 29 (1), 1-10.

Cherng, J.-M., Shieh, D.-E., Chiang, W., Chang, M.-Y. and Chiang, L.-C. 2007. Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 71 (6), 1500-1504.

Chicca, A., Tebano, M., Adinolfi, B., Ertugrul, K., Flamini, G. and Nieri, P. 2011. Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. European Journal of Medicinal Chemistry, 46 (7), 3066-3070.

Choi, J., Jiang, X., Jeong, J. B. and Lee, S.-H. 2014. Anticancer activity of protocatechualdehyde in human breast cancer cells. Journal of Medicinal Food, 17 (8), 842-848.

Ciric, A., Karioti, A., Glamoçlija, J., Sokovic, M. and Skaltsa, H. 2011. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. Journal of the Serbian Chemical Society, 76 (1), 27-34.

Costa, F. L. P., das Neves, F., de Albuquerque, A. C. F., dos Santos, J., Martins, F., Leitão, G. G. and de Amorim, M. B. 2014. Bathysa australis vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) isolation by countercurrent chromatographic and Characterization by NMR 1H and 13C experimental and theoretical GIAO-B3PW91/cc-pVDZ//B3PW91/cc-pVDZ chemical shifts. Journal of Computational Theoretical Nanoscience, 11 (8), 1732-1737.

Costa, J., Ferreira, P., De Sousa, D., Jordan, J. and Freitas, R. 2012. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. Neuroscience Letters, 523 (2), 115-118.

Costa, J. P., de Oliveira, G. A. L., de Almeida, A. A. C., Islam, M. T., de Sousa, D. P. and de Freitas, R. M. 2014. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission. Brain Research, 1547 (2014), 34-42.

Couteau, D., McCartney, A., Gibson, G., Williamson, G. and Faulds, C. 2001. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. Journal of Applied Microbiology, 90 (6), 873-881.

Crowell, P.L and Gould, M. N. 2004. Cancer chemopreventive activity of monoterpenes and other isoprenoids, In: Cancer Chemoprevention. Springer, 371-378.

Csapi, B., Hajdu, Z., Zupko, I., Berenyi, A., Forgo, P., Szabo, P. and Hohmann, J. 2010. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. Phytotherapy Research, 24 (11), 1664-1669.

Csupor, D., Widowitz, U., Blazsó, G., Laczkó-Zöld, E., Tatsimo, J. S., Balogh, Á., Boros, K., Dankó, B., Bauer, R. and Hohmann, J. 2013. Anti-inflammatory activities of eleven *Centaurea* species occurring in the carpathian basin. Phytotherapy Research, 27 (4), 540-544.

Cushnie, T. T. and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26 (5), 343-356.

Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A. M., Raccuglia, R. A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K. and Bruno, M. 2006. Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptosimopappa*. Biochemical Systematics and Ecology, 34 (4), 349-352.

De Kraker, J.-W., Franssen, M. C., Joerink, M., De Groot, A. and Bouwmeester, H. J. 2002. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. Plant Physiology, 129 (1), 257-268.

de Melo, E.B., Martins, J.P.A., Jorge, T.C.M., Friozi, M.C. and Ferreira, M.M.C. 2010. Multivariate QSAR study on the antimutagenic activity of flavonoids against 3-NFA on *Salmonella typhimurium* TA98. European Journal of Medicinal Chemistry, 45 (10), 4562-4569.

Demir, S., Karaalp, C. and Bedir, E. 2017. Specialized metabolites from the aerial parts of *Centaurea polyclada* DC. Phytochemistry, 143 (2017), 12-18.

Demir, S., Karaalp, C. and Bedir, E. 2016. Unusual sesquiterpenes from *Centaurea athoa* DC. Phytochemistry Letters, 15 (2016), 245-250.

Demir, S., Erel, Ş. B., Bedir, E. and Karaalp, C. 2009. Secondary metabolites of *Centaurea depressa* Bieb. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 38 (1), 1-7.

Demirtas, I., Tufekci, A. R., Yaglioglu, A. S. and Elmastas, M. 2017. Studies on the antioxidant and antiproliferative potentials of *Cirsium arvense* subsp. *vestitum*. Journal of Food Biochemistry, 41 (1), 1-10.

Dereli, F.T.G., Ilhan, M. and Akkol, E.K. 2020. Identification of the main active antidepressant constituents in a traditional Turkish medicinal plant, *Centaurea kurdica* Reichardt. Journal of Ethnopharmacology, 249, 112373.

Dewick, P. M. 2001. Medicinal natural products: A biosynthetic approach, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester.,

Dewick, P. M. 1995. The biosynthesis of shikimate metabolites. Natural Product Reports, 12 (2), 101-133.

Dewick, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach., John Wiley & Sons,

Dhingra, N., Sharma, R. and Kar, A. 2013. Antioxidative and antiproliferative activities of isolated compounds from *Prunus domestica:* an in vitro study. International Journal of Phytomedicine, 5 (3), 341.

Diaz, G., Miranda, I. L. and Diaz, M. A. N. 2015. Quinolines, isoquinolines, angustureine, and congeneric alkaloids occurrence, chemistry, and biological activity, In: Venket Rao A, Rao LG (eds), Phytochemicals-isolation, characterisation and role in human health, INTECH, pp, 141–162.

Diplock, A. T. 1997. Will the 'good fairies' please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? Free Radical Research, 27 (5), 511-532.

Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C. and Skaltsa, H. 2008. A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. Bioorganic Medicinal Chemistry, 16 (7), 3725-3731.

Djeddi, S., Argyropoulou, C. and Skaltsa, H. 2008. Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*. Biochemical Systematics and Ecology, 36 (5-6), 336-339.

Djeridane, Y., Abramov, A. and i Cabarrocas, P. R. 2007. Silane versus silicon tetrafluoride in the growth of microcrystalline silicon films by standard radio frequency glow discharge. European Food Research and Technology, 515 (19), 7451-7454.

Doğan, B. 2007. Türkiye Jurinea Cass.(Asteraceae) Cinsinin Revizyonu. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Dombekci, O. and Duman, R. 2019. In vitro evaluation of enti-RSV activity of *Centaurea kotschyi* (Boıss et Heldr.) Hayek var. *decumbens* Wagenitz. International Journal of Scientific and Technological Research, 5 (5), 99-107.

Dubey, V. S., Bhalla, R. and Luthra, R. 2003. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. Journal of Biosciences, 28 (5), 637-646.

Duman, H., Tugay, O., Dirmenci, T. and Ertuğrul, K. 2017. A new species of *Cirsium* sect. Epitrachys (Asteraceae: Cardueae) from the south of Turkey. Turkish Journal of Botany, 41 375-382.

Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M. and Sarek, J. 2006. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. Natural Product Reports, 23 (3), 394-411.

El-Najjar, N., Dakdouki, S., Darwiche, N., El-Sabban, M., Saliba, N. A. and Gali-Muhtasib, H. 2008. Anti-colon cancer effects of Salograviolide A isolated from *Centaurea ainetensis*. Oncology Reports, 19 (4), 897-904.

El-Sayed, A. 2011. The Pherobase: Database of insect pheromones and semiochemicals. Available at: http://www. pherobase. com.

Elzaawely, A. and Tawata, S. 2012. Antioxidant activity of phenolic rich fraction obtained from *Convolvulus arvensis* L. leaves grown in Egypt. Asian Journal of Crop Science, 4 (1), 32-40.

Encarnación-Dimayuga, R., Agúndez-Espinoza, J., García, A., Delgado, G., Molina-Salinas, G. M. and Said-Fernández, S. 2006. Two new cassane-type

diterpenes from *Calliandra californica* with antituberculosis and cytotoxic activities. Planta Medica, 72 (08), 757-761.

Erel, S., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S. and Krenn, L. 2011. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. Pharmaceutical Biology, 49 (8), 840-849.

Erel, S. B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S. and Krenn, L. 2011. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. Pharmaceutical Biology, 49 (8), 840-849.

Escher, G.B., Santos, J.S., Rosso, N.D., Marques, M.B., Azevedo, L., do Carmo, M.A.V., Daguer, H., Molognoni, L., do Prado-Silva, L. and Santana, A.S. 2018. Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of *Centaurea cyanus* L. petals aqueous extract. Food Chemical Toxicology, 118 439-453.

Eskin, B. 2011. *Centaurea kilaea* Boiss. ve *C. consanguinea* DC.(Compositae/Asteraceae) endemik türlerinin autekolojik özelliklerinin karşılaştırılması. Marmara Universitesi Dergisi, 188, İstanbul.

Esmaeili, A., Mousavi, Z., Shokrollahi, M. and Shafaghat, A. 2012. Antioxidant activity and isolation of luteoline from *Centaurea behen* L. grown in Iran. Journal of Chemistry, 2013, 1-5.

Farah, A. and Donangelo, C.M. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18 (1), 23-36.

Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M. and Iranshahy, M. 2019. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. Phytotherapy Research, 33 (1), 13-40.

Farrag, N.M., Abd El Aziz, E., El-Domiaty, M. and El Shafea, A. 1993. Phytochemical investigation of *Centaurea araneosa* growing in Egypt. Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences, 2 (1), 29-45.

Fischer, N.H. 1986. The function of mono and sesquiterpenes as plant germination and growth regulators. In: Putnam, A.R., Tang, C.S. (Eds.), The Science of Allelopathy. Whiley-Interscience, New York, pp. 203-218.

Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., Allen, C., Hansen, G., Woodbrook, R. and Wolfe, C. 2015. The global burden of cancer 2013. JAMA Oncology, 1 (4), 505-527.

Flamini, G., Pardini, M. and Morelli, I. 2001b. A flavonoid sulphate and other compounds from the roots of *Centaurea bracteata*. Phytochemistry, 58 (8), 1229-1233.

Flamini, G., Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Tugay, O. and Demirelma, H. 2004. Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance. Biochemical Systematics Ecology, 32 (6), 553-557.

Flamini, G., Bulleri, C. and Morelli, I. 2002. Secondary constituents from *Centaurea horrida* and their evolutionary meaning. Biochemical Systematics Ecology, 30 (11), 1051-1054.

Flamini, G., Antognoli, E. and Morelli, I. 2001a. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. Phytochemistry, 57 (4), 559-564.

Forgo, P., Zupko, I., Molnar, J., Vasas, A., Dombi, G. and Hohmann, J. 2012. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. Fitoterapia, 83 (5), 921-925.

Frabasile, S., Koishi, A.C., Kuczera, D., Silveira, G.F., Verri Jr, W.A., Dos Santos, C.N.D. and Bordignon, J. 2017. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. Scientific Reports, 7 (2017), 1-10.

Fraga, B.M., Díaz, C.E., Guadaño, A. and González-Coloma, A. 2005. Diterpenes from *Salvia broussonetii* transformed roots and their insecticidal activity. Journal of Agricultural Food Chemistry, 53 (13), 5200-5206.

Franks, L., Teich, N. and Fey, M. 1998. Cellular and molecular biology of cancer. Annals of Oncology, 9 (5), 568-568.

Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yesilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T. and Takaishi, Y. 1995. Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. Economic Botany, 49 (4), 406-422.

Gao, T., Yao, H., Song, J., Zhu, Y., Liu, C. and Chen, S. 2010. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. BMC Evolutionary Biology, 10 (1), 324.

Ghosh, S. 2016. Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases. Proceedings of the Indian National Science Academy, 82 (4), 1189-1210.

Gledhill, T., Leicester, R., Addis, B., Lightfoot, N., Barnard, J., Viney, N., Darkin, D. and Hunt, R.H. 1985. Epidemic hypochlorhydria. The British Medical Journal, 290 (6479), 1383-1386.

Gokgoz, N. B. and Akbulut, B. S. 2015. Proteomics evidence for the activity of the putative antibacterial plant alkaloid (-)-roemerine: mainstreaming omics-guided drug discovery. Omics: A journal of Integrative Biology, 19 (8), 478-489.

Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H.-S. and Patra, J. K. 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. Frontiers in Microbiology, 7 1538.

Gousiadou, C. and Skaltsa, H. 2003. Secondary metabolites from *Centaurea orphanidea*. Biochemical Systematics Ecology, 31 (4), 389-396.

Graziose, R., Ann Lila, M. and Raskin, I. 2010. Merging traditional Chinese medicine with modern drug discovery technologies to find novel drugs and functional foods. Current Drug Discovery Technologies, 7 (1), 2-12.

Grienke, U., Radic Brkanac, S., Vujčić, V., Urban, E., Ivanković, S., Stojković, R., Rollinger, J. M., Kralj, J., Brozovic, A. and Radić Stojković, M. 2018. Biological activity of flavonoids and rare sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea ragusina* L. Frontiers in Pharmacology, 9, 972.

Gunasekaran, S., Venkatachalam, K. and Namasivayam, N. 2015. p-Methoxycinnamic acid, an active phenylpropanoid induces mitochondrial mediated apoptosis in HCT-116 human colon adenocarcinoma cell line. Environmental Toxicology Pharmacology, 40 (3), 966-974.

Guria, M., Mitra, P., Ghosh, T., Gupta, S., Basu, B. and Mitra, P.K. 2013. 3, 4-dihydroxybenzoic acid Isolated from the leaves of *Ageratum conyzoides* L. European Journal of Biotechnology and Bioscience, 1 25-28.

Gülcemal, D., Alankuş-Çalışkan, Ö., Karaalp, C., Örs, A.U., Ballar, P. and Bedir, E. 2010. Phenolic glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp. *urvillei*. Carbohydrate Research, 345 (17), 2529-2533.

Gürkan, E., Sarioglu, I. and Öksöz, S. 1998. Cytotoxicity assay of some plants from Asteraceae. Fitoterapia, 69 (1), 81-82.

Hadjiakhoondi, A., Yassa, N., Amin, M., Damankash, S. B. and Moradkhani, F. 2019. Bio-guided fractionation of *Centaurea bruguierana* subsp. *belangeriana* extract based on anti-helicobacter pylori activity. Research Journal of Pharmacognosy, 7 (1), 61-67.

Häffner, E. 2000. On the phylogeny of the subtribe Carduinae (tribe Cardueae, Compositae). Englera, 3-208.

Hamedeyazdan, S., Niroumand, F. and Fathiazad, F. 2017. Phytochemical analysis and antioxidative properties of *Centaurea albonitens*. Research Journal of Pharmacognosy, 4 (4), 57-64.

Hammoud, L., Seghiri, R., Benayache, S., Mosset, P., Lobstein, A., Chaabi, M., León, F., Brouard, I., Bermejo, J. and Benayache, F. 2012. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. Natural Product Research, 26 (3), 203-208.

Hamzaoğlu, E. and Budak, Ü. 2009. *Centaurea aksoyi* sp. *nov*.(Asteraceae: Cardueae) from Turkey and a contribution to the sectional taxonomy. Nordic Journal of Botany, 27 (1), 16-20.

Han, J. Y., Kwon, Y. S., Yang, D. C., Jung, Y. R. and Choi, Y. E. 2006. Expression and RNA interference-induced silencing of the dammarenediol synthase gene in Panax ginseng. Plant Cell Physiology, 47 (12), 1653-1662.

Harborne, J. B. and Mabry, T. J. 2013. The flavonoids: advances in research, Springer,

Hatch, F., Lightstone, F.C. and Colvin, M. 2000. Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35 (4), 279-299.

Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, 96 (2-3), 67-202.

Heilmann, J., Wasescha, M. R. and Schmidt, T. J. 2001. The influence of glutathione and cysteine levels on the cytotoxicity of helenanolide type sesquiterpene lactones against KB cells. Bioorganic Medicinal Chemistry, 9 (8), 2189-2194.

Heinonen, I. M., Meyer, A. S. and Frankel, E. N. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (10), 4107-4112.

Hodaj, E., Tsiftsoglou, O., Abazi, S., Hadjipavlou-Litina, D. and Lazari, D. 2017. Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. Natural Product Research, 31 (10), 1195-1200.

Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. and Tanaka, T. 1996. Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydin provinces. Journal of Ethnopharmacology, 53 (2), 75-87.

Huang, S., Zhang, C.P., Li, G.Q., Sun, Y.Y., Wang, K. and Hu, F.L. 2014. Identification of catechol as a new marker for detecting propolis adulteration. Molecules, 19 (7), 10208-10217.

Huvaere, K. and Skibsted, L.H. 2015. Flavonoids protecting food and beverages against light. Journal of the Science of Food Agriculture, Ecosystems and Environment, 95 (1), 20-35.

Ignea, C., Raadam, M.H., Motawia, M.S., Makris, A.M., Vickers, C.E. and Kampranis, S.C. 2019. Orthogonal monoterpenoid biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate. Nature Communications, 10 (1), 1-15.

Innocenti, A., Sarıkaya, S.B.Ö., Gülçin, I. and Supuran, C.T. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I–XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18 (6), 2159-2164.

Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annual Review of Entomology, 51 (2006), 45-66.

Ivanova, A., Mikhova, B., Kostova, I. and Evstatieva, L. 2010. Bioactive chemical constituents from *Smilax excelsa*. Chemistry of Natural Compounds, 46 (2), 295-297.

Janackovic, P., Tešević, V., Marin, P.D., Milosavljević, S., Duletić-Laušević, S., Janaćković, S. and Veljić, M. 2008. Brine shrimp lethality bioassay of selected *Centaurea* L. species (Asteraceae). Archives of Biological Sciences, 60 (4), 681-685.

Jin, S. and Yoshida, M. 2005. Accumulation of 3-*O*-feruloylquinic acid induced by low temperature in wheat (Papers presented at the 51.st annual meeting). Cryobiology and Cryotechnology, 51 (2), 57-62.

Jo, S., Kim, S., Shin, D.H. and Kim, M.S. 2020. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 35 (1), 145-151.

Kahraman, A., Serteser, M. and Koken, T. 2002. Flavonoidler. Kocatepe Tıp Dergisi, 3 (1), 1-8.

Kaij-a-Kamb, M., Amoros, M. and Girre, L.J.P.A.H. 1992. The chemistry and biological activity the the genus *Centaurea*. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 67 (7), 178-188.

Kalkhorani, M., Hadjiakhoondi, A., Yassa, N., Amin, M., Damankash, S., Moradkhani, F. and Vazirian, M. 2020. Bioguided fractionation of *Centaurea bruguierana* subsp. *belangeriana* extract based on anti-helicobacter pylori activity. Research Journal of Pharmacognosy, 7 (1), 59-65.

Karabunarliev, S., Mekenyan, O.G., Karcher, W., Russom, C.L. and Bradbury, S.P. 1996. Quantum-chemical descriptors for estimating the acute toxicity of electrophiles to the fathed minnow (*Pimephales promelas*): An analysis based on molecular mechanisms. Quantitative Structure-Activity Relationships, 15 (4), 302-310.

Karakoç, Ö. and Gökçe, A. 2012. Contact toxicities of plant extracts to *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Türkiye Entomoloji Dergisi, 36 (3), 423-431.

Karamenderes, C., Konyalioglu, S., Khan, S. and Khan, I.A. 2007c. Total phenolic contents, free radical scavenging activities and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight *Centaure*a L. species. Phytotherapy Research, 21 (5), 488-491.

Karamenderes, C., Bedir, E., Abou-Gazar, H. and Khan, I. 2007b. Chemical constituents of *Centaurea cadmea*. Chemistry of Natural Compounds, 43 (6), 694-695.

Karamenderes, C., Bedir, E., Pawar, R., Baykan, S. and Khan, I. A. 2007a. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. Phytochemistry, 68 (5), 609-615.

Kargün, K. 2011. B7 Elazığ bölgesinde yetişen *Centaurea*, *Psephellus ve Cyanus* cinslerine ait türler üzerinde morfolojik ve palinolojik araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 155, Bartın.

Karp, G. 2009. Cell and molecular biology: concepts and experiments, John Wiley & Sons.

Kasterova, E., Zibareva, L. and Revushkin, A. 2019. Secondary metabolites of some *Siberian* species of plants tribe Cynareae (Asteraceae). South African Journal of Botany, 125, 24-29.

Keiser, M.J., Roth, B.L., Armbruster, B.N., Ernsberger, P., Irwin, J.J., Shoichet, B.K. 2007. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. Nature Biotechnology, 25 (2), 197-206.

Khan, A.K., Rashid, R., Fatima, N., Mahmood, S., Mir, S., Khan, S., Jabeen, N. and Murtaza, G. 2015. Pharmacological activities of protocatechuic acid. Acta Poloniae Pharmaceutica, 72 (4), 643-650.

Kittakoop, P., Mahidol, C. and Ruchirawat, S. 2014. Alkaloids as important scaffolds in therapeutic drugs for the treatments of cancer, tuberculosis, and smoking cessation. Current Topics in Medicinal Chemistry, 14 (2), 239-252.

Klug, W. and Cummings, M. 2002. Genetik Kavramlar, Palme yayıncılık, Ankara.

Knaggs, A.R. 2001. The biosynthesis of shikimate metabolites. Natural Product Reports, 18 (3), 334-355.

Kolli, E.H., León, F., Benayache, F., Estévez, S., Quintana, J., Estévez, F., Brouard, I., Bermejo, J. and Benayache, S. 2012. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23 (5), 977-983.

Korga, A., Józefczyk, A., Zgórka, G., Homa, M., Ostrowska, M., Burdan, F. and Dudka, J. 2017. Evaluation of the phytochemical composition and protective activities of methanolic extracts of *Centaurea borysthenica* and *Centaurea daghestanica* (Lipsky) Wagenitz on cardiomyocytes treated with doxorubicin. Food Nutrition Research, 61 (1), 1344077.

Kose, Y.B., Altintas, A., Demirci, B., Celik, S. and Baser, K. C. 2009. Composition of the essential oil of endemic *Centaurea paphlagonica* (Bornm.) Wagenitz from Turkey. Asian Journal of Chemistry, 21 (3), 1719.

Kou, X., Kirberger, M., Yang, Y. and Chen, N. 2013. Natural products for cancer prevention associated with Nrf2–ARE pathway. Food Science Human Wellness, 2 (1), 22-28.

Krasnov, E., Raldugin, V., Kadyrova, T. and Kaminskii, I. 2006. Isolation of grosshemin from the Siberian population of *Centaurea scabiosa*. Chemistry of Natural Compounds, 4 (42), 495-496.

Kschowak, M. J., Wortmann, H., Dickschat, J. S., Schrader, J. and Buchhaupt, M. 2018. Heterologous expression of 2-methylisoborneol/2 methylenebornane biosynthesis genes in Escherichia coli yields novel C11-terpenes. PloS one, 13 (4), 1-15.

Kubacey, T.M., Haggag, E.G., El-Toumy, S.A., Ahmed, A.A., El-Ashmawy, I.M. and Youns, M.M. 2012. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. Journal of Pharmacy Research, 5 (6), 3352-3361.

Kucuk, M. and Gulcin, İ. 2016. Purification and characterization of the carbonic anhydrase enzyme from Black Sea trout (*Salmo trutta labrax coruhensis*) kidney and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. Environmental Toxicology and Pharmacology, 44 (2016), 134-139.

Kupchan, S.M., Eakin, M. and Thomas, A. 1971. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. Journal of Medicinal Chemistry, 14 (12), 1147-1152.

Kupchan, S.M., Fessler, D.C., Eakin, M.A. and Giacobbe, T. J. 1970. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. Science, 168 (3929), 376-378.

Kurata, R., Adachi, M., Yamakawa, O. and Yoshimoto, M. 2007. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. Journal of Agricultural Food Chemistry, 55 (1), 185-190.

Labed, F., Masullo, M., Mirra, V., Nazzaro, F., Benayache, F., Benayache, S. and Piacente, S. 2019. Amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Centaurea pungens* and evaluation of their antimicrobial activity. Fitoterapia, 133 (2019), 51-55.

Lakhal, H., Boudiar, T., Kabouche, A., Kabouche, Z., Touzani, R. and Bruneau, C. 2010. New sesquiterpene lactone and other constituents from *Centaurea sulphurea* (Asteraceae). Natural Product Communications, 5 (6), 849-850.

Lazari, D., Tsioumela, C., Pegklidou, K., Karioti, A., Demopoulos, V., Skaltsa, H. and Arfan, M. 2008. Inhibitory activity of extracts and bioactive constituents of *Centaurea phyllocephala* Boiss.(Asteraceae) on aldose reductase in vitro. Planta Medica, 74 (9), 974-975.

Lee, J.Y., Cha, M.R., Kim, M. R., Lee, K., Choi, S.U. and Ryu, S.Y. 2015. Two novel guaiane sesquiterpenes from the whole plant of *Youngia japonica*. Planta Medica Letters, 2 (01), 31-34.

Lee, S.K., Song, L., Mata-Greenwood, E., Kelloff, G., Steele, V. and Pezzuto, J. 1999. Modulation of in vitro biomarkers of the carcinogenic process by chemopreventive agents. Anticancer Research, 19 (1), 35-44.

Lee, Y.J., Liao, P.H., Chen, W.K. and Yang, C.C. 2000. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. Cancer Letters, 153 (1-2), 51-56.

Legault, J., Perron, T., Mshvildadze, V., Girard-Lalancette, K., Perron, S., Laprise, C., Sirois, P. and Pichette, A. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin 7-*O*-β-D-glucopyranoside from the leaves of *Brasenia schreberi*. Journal of Medicinal Food, 14 (10), 1127-1134.

Legrand, D. and Scheen, A. 2007. Does coffee protect against type 2 diabetes? Revue Medicale de Liege, 62, 554-559.

Lengweiler, S., Schaller, J., DiScipio, R.G. and Rickli, E.E. 1997. Elucidation of the disulfide-bonding pattern in the factor I modules of the sixth component (C6) of human complement. Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure Molecular Enzymology, 1342 (1), 13-18.

Li, J., Yoshida, Y., Kurita, M. and Usuki, T. 2019. Cynaropicrin and inhibition of NF-κB activation: A structure activity relationship study. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, 29 (12), 1518-1521.

Li, R., Ding, Z. and Ding, J. 1997. Chemical constituents from *Eupatorium adenophorum*. Acta Botanica Yunnanica, 19 (2), 196-200.

Li, Z., Howell, K., Fang, Z. and Zhang, P. 2020. Sesquiterpenes in grapes and wines: Occurrence, biosynthesis, functionality, and influence of winemaking processes. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19 (1), 247-281.

Lin, H. H., Chen, J. H., Chou, F. P. and Wang, C. J. 2011. Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-κB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. British Journal of Pharmacology, 162 (1), 237-254.

Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T. and Tseng, T.H.J.F. 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. Food Chemical Toxicology, 40 (5), 635-641.

Liu, H., Mou, Y., Zhao, J., Wang, J., Zhou, L., Wang, M., Wang, D., Han, J., Yu, Z. and Yang, F. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. Molecules, 15 (11), 7933-7945.

Liu, T., Zhang, J., Han, X., Xu, J., Wu, Y. and Fang, J. 2019. Promotion of HeLa cells apoptosis by cynaropicrin involving inhibition of thioredoxin reductase and induction of oxidative stress. Free Radical Biology and Medicines, 135, 216-226.

Liu, W., Nisar, M.F. and Wan, C. 2020. Characterization of phenolic constituents from *Prunus cerasifera* Ldb leaves. Journal of Chemistry, 2020, 1-5.

Liu, Z.L., Chu, S.S. and Jiang, G.H. 2011. Insecticidal activity and composition of essential oil of *Ostericum sieboldii* (Apiaceae) against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum*. Records of Natural Products, 5 (2), 74-81.

Loh, Y.C., Chan, S.Y., Tew, W.Y., Oo, C.W. and Yam, M.F. 2020. New flavonoid-based compound synthesis strategy for antihypertensive drug development. Life Sciences, 249, 117512.

Lopez-Rodriguez, M., García, V.P., Zater, H., Benayache, S. and Benayache, F. 2009. Cynaratriol, a sesquiterpene lactone from *Centaurea musimomum*. Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online, 65 (8), 1867-1868.

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C. and Wang, Z. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. Journal of Food Science, 76 (6), 398-403.

Lu, F., Zahid, M., Wang, C., Saeed, M., Cavalieri, E.L. and Rogan, E.G. 2008. Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells. Cancer Prevention Research, 1 (2), 135-145.

Luhata, L.P. and Luhata, W.G. 2017. Tiliroside: biosynthesis, bioactivity and structure activity relationship (SAR)-A review. Phytophatmacol, 6 (6), 343-348.

Ma, Y., Yuan, L., Wu, B., Li, X. e., Chen, S. and Lu, S. 2012. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. Journal of Experimental Botany, 63 (7), 2809-2823.

Matsuda, K. and Senbo, S. 1986. Chlorogenic acid as a feeding deterrent for the Salicaceae-feeding leaf beetle, Lochmaeae capreae cribrata (Coleoptera: Chrysomelidae) and other species of leaf beetles. Applied Entomology Zoology, 21 (3), 411-416.

Melikoglu, G., Ozsoy, N., Yilmaz-Ozden, T., Erbay, M.S., Anil, S. and Celik, B.O. 2018. Flavonoids and biological activities of *Centaurea nerimaniae* S. Kultur. Farmacia, 66 (6), 1070-1075.

Melikoğlu, G., Kurtoğlu, S. and Kültür, Ş. 2015. Türkiye'de astım tedavisinde geleneksel olarak kullanılan bitkiler. Marmara Pharmaceutical Journal, 19 (1), 1-11.

Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J. and Hu, Y. 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine, 2013 1-11.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. and Van Beek, T. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food Chemistry, 85 (2), 231-237.

Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M. and Rice-Evans, C.A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Letters, 384 (3), 240-242.

Min, S.W., Ryu, S.N. and Kim, D.H. 2010. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-*O*-β-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. International Immunopharmacology, 10 (8), 959-966.

Mirzahosseini, G., Manayi, A., Khanavi, M., Safavi, M., Salari, A., Madjid Ansari, A., Sanati, H. and Vazirian, M. 2019. Bio-guided isolation of *Centaurea bruguierana* subsp. *belangerana* cytotoxic components. Natural Product Research, 33 (11), 1687-1690.

Mishio, T., Honma, T. and Iwashina, T. 2006. Yellow flavonoids in *Centaurea ruthenica* as flower pigments. Biochemical Systematics Ecology, 2 (34), 180-184.

Miyamae, Y., Kurisu, M., Han, J., Isoda, H. and Shigemori, H. 2011. Structure–activity relationship of caffeoylquinic acids on the accelerating activity on ATP production. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59 (4), 502-507.

Mohamed, R., Pineda, M. and Aguilar, M. 2007. Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the Mediterranean region. Journal of Food Science, 72 (1), 59-63.

Mondolot, L., La Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., De Kochko, A. and Campa, C. 2006. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. Annals of Botany, 98 (1), 33-40.

Monteiro, M., Farah, A., Perrone, D., Trugo, L.C. and Donangelo, C. 2007. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. The Journal of Nutrition, 137 (10), 2196-2201.

Montoro, P., Tuberoso, C.I., Piacente, S., Perrone, A., De Feo, V., Cabras, P. and Pizza, C. 2006. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41 (5), 1614-1619.

Morimoto, M. and Komai, K. 2000. Plant secondary metabolites as plant defense systems. Recent Research Developments in Phytochemistry, 4 (48), 99-114.

Moritomo, Y., Kusuya, H., Akimoto, T. and Machida, A. 2000. Room-temperature magnetoresistance in Fe-site-substituted Sr2FeMoO6. Japanese Journal of Applied Physics, 39 (4B), L360.

Mostafa, E., Fayed, M. A., Radwan, R. A. and Bakr, R. O. 019. *Centaurea pumilio* L. extract and nanoparticles: A candidate for healthy skin. Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 182 110350.

Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C. and Benkhaled, M. 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. Records of Natural Products, 6 (3), 292-295.

Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M.C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H. E., Mirata, M. A., Schrader, J. and Ulber, R. 2011. Biotransformation of triterpenes. Process Biochemistry, 46 (1), 1-15.

Munday, R. and Munday, C.M. 2004. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. Journal of Agricultural Food Chemistry, 52 (7), 1867-1871.

Navarro, J., Caballero, M., Moran, J., Medarde, M., Grande, M. and Anaya, J. 1990. Guaianolides and eudesmanolides from *Centaurea ornata*. Journal of Natural Products, 53 (3), 573-578.

Nikolova, M. and Bancheva, S. 2013. Surface flavonoids of *Centaurea stenolepis* and the local endemics *Centaurea davidovii* and *C. parilica* (Asteraceae, sect. Lepteranthus) from Bulgaria. Phytologia Balcanica: International Journal of Balkan Flora Vegetation, 19 (3), 357-360.

Nishimiki, M., Rao, N. and Yagi, K. 2002. The antioxidant activity, reducing power, superoxide anion radical scavenging. Journal of Ethnopharmacology, 79 (2002), 325-332.

Nogueira, T. and do Lago, C.L. 2007. Determination of caffeine in coffee products by dynamic complexation with 3, 4-dimethoxycinnamate and separation by CZE. Electrophoresis, 28 (19), 3570-3574.

Nothias-Scaglia, L.F., Retailleau, P., Paolini, J., Pannecouque, C., Neyts, J., Dumontet, V., Roussi, F., Leyssen, P., Costa, J. and Litaudon, M. 2014. Jatrophane diterpenes as inhibitors of chikungunya virus replication: structure–activity relationship and discovery of a potent lead. Journal of Natural Products, 77 (6), 1505-1512.

Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriate, E. and Calleja, J. 1998. Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of centaurein and centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corcubionensis*. Planta Medica, 64 (02), 116-119.

Ostad, S. N., Rajabi, A., Khademi, R., Farjadmand, F., Eftekhari, M., Hadjiakhoondi, A. and Khanavi, M. 2016. Cytotoxic potential of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana*: the MTT assay. Acta Medica Iranica, 54 (9), 583-589.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction. The Japanese Journal of Nutrition Dietetics, 44 (6), 307-315.

Ozsoy, N., Kultur, S., Yilmaz-Ozden, T., Ozbek Celik, B., Can, A. and Melikoglu, G. 2015. Antioxidant, anti-inflammatory, acetylcholinesterase inhibitory and antimicrobial activities of Turkish endemic *Centaurea antiochia* var. *praealta*. Journal of Food Biochemistry, 39 (6), 771-776.

Özbilgin, S. 2010. Türkiye'de bulunan karaciğer ve sindirim sistemi hastalıklarında kullanılan *Cynara scolymus* L.(Enginar) preparatlarının standardizasyonunun ve fitoeşdeğerliğinin kontrolü. Y.Lisans tezi (yayınlanmamış), Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı, 80 p, Ankara.

Özçelik, B., Gürbüz, I., Karaoglu, T. and Yeşilada, E. 2009. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from Centaurea solstitialis L. ssp. solstitialis. Microbiological Research, 164 (5), 545-552.

Özhatay, N. and Kültür, Ş. 2006. Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey III. Turkish Journal of Botany, 30 (4), 281-316.

Öztopcu-Vatan, P. and İnan, E. 2008. Determination of growth inhibitory and apoptotic effects of protocatechuic acid on prostate carcinoma cells. Biological Diversity and Conservation, 11 (1), 80-86.

Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. 2009. Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism, 34 (6), 1093-1097.

Parajuli, P., Pandey, R.P. and Sohng, J.K. 2018. Regiospecific biosynthesis of tamarixetin derivatives in *Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal, 133 (2018), 113-121.

Parlak, K.U. and Çakılcıoğlu, U. Evaluation of antioxidant enzymes and elements content of *Centaurea kurdica* Reichardt and *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekian*a Wagenitz. Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 12 (1), 74-86.

Parlakpınar, H., Örüm, M. and Acet, A. 2012. Kafeik asit fenetil ester (KAFE) ve miyokardiyal iskemi reperfüzyon (Mİ/R) hasarı. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1 (1), 10-15.

Pavlopoulou, A., Spandidos, D.A. and Michalopoulos, I. 2015. Human cancer databases. Oncology Reports, 33 (1), 3-18.

Pedersen, M., Andersen, Z.J., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Galassi, C., Sørensen, M., Eriksen, K.T., Tjønneland, A., Loft, S. and Jaensch, A. 2017. Ambient air pollution and primary liver cancer incidence in four European cohorts within the ESCAPE project. Environmental Research, 154 226-233.

Pemberton, T.A., Chen, M., Harris, G.G., Chou, W.K., Duan, L., Köksal, M., Genshaft, A.S., Cane, D.E. and Christianson, D.W. 2017. Exploring the influence of domain architecture on the catalytic function of diterpene synthases. Biochemistry, 56 (14), 2010-2023.

Picman, A.K. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. Biochemical Systematics and Ecology, 14 (3), 255-281.

Pimentel, M.A.G., Faroni, L.R.D.A., Batista, M.D. and Silva, F.H.d. 2008. Resistance of stored-product insects to phosphine. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43 (12), 1671-1676.

Radan, M., Carev, I., Tešević, V., Politeo, O. and Čulić, V.Č. 2017. Qualitative HPLC-DAD/ESI-TOF-MS analysis, cytotoxic, and apoptotic effects of croatian endemic *Centaurea ragusina* L. aqueous extracts. Chemistry and Biodiversity, 14 (9), 1-9.

Ramak, P., Osaloo, S.K., Sharifi, M., Ebrahimzadeh, H. and Behmanesh, M. 2014. Biosynthesis, regulation and properties of plant monoterpenoids. Journal of Medicinal Plants Research, 8 983-991.

Ramawat, K.G., Dass, S. and Mathur, M. 2009. Herbal drugs: Ethnomedicine to modern medicine, Springer, pp.40.,

Ramirez, A.M., Saillard, N., Yang, T., Franssen, M.C., Bouwmeester, H.J. and Jongsma, M.A. 2013. Biosynthesis of sesquiterpene lactones in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*). PLoS One, 8 (5), 1-13.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology Medicines, 26 (9-10), 1231-1237.

Reaka-Kudla, M.L., Wilson, D.E. and Wilson, E.O. 1996. Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources, Joseph Henry Press.

Rengasamy, K.R., Khan, H., Gowrishankar, S., Lagoa, R.J., Mahomoodally, F.M., Khan, Z., Suroowan, S., Tewari, D., Zengin, G. and Hassan, S.T. 2019. The role of flavonoids in autoimmune diseases: therapeutic updates. Pharmacology Therapeutics, 194 107-131.

Rickli, E.E., Ghazanfar, S., Gibbons, B.H. and Edsall, J.T. 1964. Carbonic anhydrases from human erythrocytes preparation and properties of two enzymes. Journal of Biological Chemistry, 239 (4), 1065-1078.

Rocha, L.D., Monteiro, M.C. and Teodoro, A.J. 2012. Anticancer properties of hydroxycinnamic acids-A Review. Cancer Clinical Oncology, 1 (2), 109-121.

Rodeiro, I., Donato, M.T., Jimenez, N., Garrido, G., Molina-Torres, J., Menendez, R., Castell, J.V. and Gómez-Lechón, M.J. 2009. Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. Phytotherapy Research, 23 (2), 279-282.

Rosselli, S., Maggio, A.M., Raccuglia, R.A., Simmonds, M.S., Arnold, N.A. and Bruno, M. 2006. Guaianolides from the aerial parts of *Centaurea hololeuca*. Natural Product Communications, 1 (4), 281-285.

S Tuzun, B., Hajdu, Z., Orban-Gyapai, O., P Zomborszki, Z., Jedlinszki, N., Forgo, P., Kıvcak, B. and Hohmann, J. 2017. Isolation of chemical constituents of *centaurea virgata* lam. and xanthine oxidase inhibitory activity of the plant extract and compounds. Medicinal Chemistry, 13 (5), 498-502.

Sadaka, M.W.M. 2017. A new neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium polium* Linn. International Journal of Pharmacognosy, 4 (9), 287-293.

Salem, H., Elhela, A.A. and Abdelhady, N.M. 2018. Utility of silver nanoparticles for the analysis of diosmin and rutin in Persicaria salicifolia extract, authentic and pharmaceutical dosage forms monitored with their haemostatic activity. African Journal of Pharmacy Pharmacology Therapeutics, 12 (20), 248-262.

Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabès, F., Duffé, P., Giacalone, C., Thoraval, S., Escoffier, C., Herbette, G. and Leonhardt, N. 2009. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato Solanum habrochaites. The Plant Cell, 21 (1), 301-317.

Santosh, S., Rajagopalan, M.D., Pallavi, B.A., Rudramurthy, G.R., Rajashekar, V., Sridhar, K.A. and Swamy, M.K. 2017. Cancer Therapies: Current Scenario, Management, and Safety Aspects, In: Anticancer Plants: Clinical Trials and Nanotechnology. Springer, 1-25,

Sarker, S.D., Laird, A., Nahar, L., Kumarasamy, Y. and Jaspars, M. 2001. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). Phytochemistry, 57 (8), 1273-1276.

Sary, H.G., Singab, A.N.B. and Orabi, K.Y. 2016. New cytotoxic guaianolides from *Centaurea aegyptiaca*. Natural Product Communications, 11 (6), 711-714.

Seghiri, R., Boumaza, O., Mekkiou, R., Benayache, S., Mosset, P., Quintana, J., Estevez, F., Leon, F., Bermejo, J. and Benayache, F. 2009. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. Phytochemistry Letters, 2 (3), 114-118.

Sen, A., Ozbas Turan, S. and Bitis, L. 2017. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. Pharmaceutical Biology, 55 (1), 541-546.

Sen, A., Ozbas Turan, S. and Bitis, L. 2017. Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. Pharmaceutical Biology, 55 (1), 541-546.

Serin, S. 1997. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. Phytochemistry, 46 (3), 545-548.

Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. and Tanaka, T. 2001. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia. Journal of Ethnopharmacology, 75 (2-3), 95-115.

Shakeri, A., Masullo, M., Bottone, A., Asili, J., Emami, S.A., Piacente, S. and Iranshahi, M. 2019. Sesquiterpene lactones from *Centaurea rhizantha* CA Meyer. Natural Product Research, 33 (14), 2016-2023.

Shakeri, A., Amini, E., Asili, J., Masullo, M., Piacente, S. and Iranshahi, M. 2018. Screening of several biological activities induced by different sesquiterpene lactones isolated from *Centaurea behen* L. and *Rhaponticum repens* (L.) Hidalgo. Natural Product Research, 32 (12), 1436-1440.

Sharkey, T.D., Wiberley, A.E. and Donohue, A.R. 2008. Isoprene emission from plants: why and how. Annals of Botany, 101 (1), 5-18.

Shi, G.Q., Yang, J., Liu, J., Liu, S.N., Song, H.X., Zhao, W.E. and Liu, Y.Q. 2016. Isolation of flavonoids from onion skins and their effects on K562 cell viability. Bangladesh Journal of Pharmacology, 11 18-25.

Shoeb, M., MacManus, S.M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P. and Sarker, S.D. 2006. Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. Tetrahedron, 62 (48), 11172-11177.

Shoeb, M., MacManus, S.M., Jaspars, M., Kong-Thoo-Lin, P., Nahar, L., Celik, S. and Sarker, S. D. 2007. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea species* and their major constituents. Revista Brasileira de Farmacognosia, 17 (2), 155-159.

Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S.M., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K. and Sarker, S.D. 2005. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. Tetrahedron, 61 (38), 9001-9006.

Shoeb, M., Rahman, M.M., Nahar, L., Delazar, A., Jaspars, M. and Macmanus, S.M. 2004. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 12 (3), 87-93.

Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E. and Waszkielewicz, A.M. 2014. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. Journal of Applied Genetics, 55 (2), 273-285.

Smanski, M.J., Peterson, R. M. and Shen, B. 2012. Platensimycin and platencin biosynthesis in Streptomyces platensis, showcasing discovery and characterization of novel bacterial diterpene synthases, In: Methods in Enzymology. Elsevier, pp.163-186,

Smit, S.J., Vivier, M.A. and Young, P.R. 2019. Linking terpene synthases to sesquiterpene metabolism in grapevine flowers. Frontiers in Plant Science, 10 (177), 1-18.

Sosa, A., Fusco, M.R., Rossomando, P., Juárez, A., Robles, S., Petenatti, E. and Pelzer, L. 2011. Anti-inflammatory properties from isolated compounds of *Cyclolepis genistoides*. Pharmaceutical Biology, 49 (7), 675-678.

Sotes, G.J., Cavieres, L.A., Montesinos, D., Coutinho, A.X.P., Peláez, W.J., Lopes, S.M. and e Melo, T.M.P. 2015. Inter-regional variation on leaf surface defenses in native and non-native *Centaurea solstitialis* plants. Biochemical Systematics Ecology, 62 208-218.

Spinola, V. and Castilho, P.C. 2017. Evaluation of Asteraceae herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (in vitro). Phytochemistry, 143 (2017), 29-35.

Staneva, J.D., Todorova, M.N. and Evstatieva, L.N. 2008. Sesquiterpene lactones as chemotaxonomic markers in genus Anthemis. Phytochemistry, 69 (3), 607-618.

Stevens, P. 2001. Asteraceae. Angiosperm Phylogeny, 7, 28-04.

Supuran, C.T. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20 (12), 3467-3474.

Supuran, C.T. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature Reviews Drug Discovery, 7 (2), 168-181.

Takeda, K., Kumegawa, C., Harborne, J.B. and Self, R. 1988. Pelargonidin 3-(6 ″-succinyl glucoside)-5-glucoside from pink *Centaurea cyanus* flowers. Phytochemistry, 27 (4), 1228-1229.

Tashian, R.E., Douglas, D.P. and Yu, Y.S.L. 1964. Esterase and hydrase activity of carbonic anhydrase-I from primate erythrocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 14 (3), 256-261.

Tastan, P., Hajdú, Z., Kúsz, N., Zupkó, I., Sinka, I., Kivcak, B. and Hohmann, J. 2019. Sesquiterpene Lactones and Flavonoids from *Psephellus pyrrhoblepharus* with Antiproliferative Activity on Human Gynecological Cancer Cell Lines. Molecules, 24 (17), 2-9.

Tešević, V., Aljančić, I. S., Milosavljević, S., Vajs, V., Đorđević, I., Jadranin, M., Menković, N. and Matevski, V. 2014. Secondary metabolites of three endemic *Centaurea* L. species. Journal of the Serbian Chemical Society, 79 (11), 1355-1362.

Tošović, J. 2017. Spectroscopic features of caffeic acid: Theoretical study. Kragujevac Journal of Science, (39), 99-108.

Tseng, T.H., Kao, T.W., Chu, C.Y., Chou, F.P., Lin, W.L. and Wang, C.J. 2000. Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia

cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. Biochemical Pharmacology, 60 (3), 307-315.

Tuncer, C. and Saruhan, İ. 2009. Biyolojik Silah Olarak Böcekler. 1. Kimyasal,Biyolojik, Radyolojik, Nükleer (KBRN) Kongresi, İstanbul.,

Tunç, İ., Erler, F., Dağli, F. and Çaliş, Ö. 1997. Insecticidal activity of acetone vapours. Journal of Stored Products Research, 33 (2), 181-185.

Uddin, S., Alnsour, L., Segun, P., Servi, H., Celik, S., Göktürk, R.S., Al-Groshi, A., Al-Majmaie, S., Guetchueng, S.T. and Nahar, L. 2017. Flavonoids from two Turkish *Centaurea* species and their chemotaxonomic implications. Trends in Phytochemical Research, 1 (4), 243-248.

Uysal, A., Zengin, G., Durak, Y. and Aktümsek, A. 2016. *Centaurea pterocaula* özütlerinin antioksidan ve antimutajenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi. Marmara Pharmaceutical Journal, 20 (3), 232-242.

Uysal, I., Çelik, S., Sağlam, H. and Güven, K. 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of some species of *Centaurea* collected from Turkey. Asian Journal of Chemistry, 25 (2), 666-670.

Uzunçar, Ş. 2016. Centaurea kotschyı (Boiss. & Heldr.) Hayek var. Decumbens Wagenitz'in in vitro anti-HSV-1 aktivitesinin değerlendirilmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,

Vattekkatte, A., Garms, S., Brandt, W. and Boland, W. 2018. Enhanced structural diversity in terpenoid biosynthesis: enzymes, substrates and cofactors. Organic Biomolecular Chemistry, 16 (3), 348-362.

Vattekkatte, A. and Boland, W. 2020. Biosynthetic origin of complex terpenoid mixtures by multiproduct enzymes, metal cofactors, and substrate isomers. Natural Products Chemistry and Research, 8 (1), 1-13.

Vundać, V.B., Brantner, A.H. and Plazibat, M. 2007. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. Food Chemistry, 104 (3), 1277-1281.

Wagenitz, G. 1986. Centaurea in South-West Asia: patterns of distribution and diversity. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences, 89 11-21.

Wagenitz, G. 1975. Centaurea L.(Asteraceae) Edinburgh University Press Edinburgh,, UK, 465-585,

Wang, Q., Quan, S. and Xiao, H. 2019. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply. Bioresources Bioprocessing, 6(1), 1-13.

Wellsow, J., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kokubun, T., Lelli, R., Kite, G.C. and Simmonds, M.S. 2006. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of Plectranthus. Phytochemistry, 67 (16), 1818-1825.

Wilbur, K.M. and Anderson, N.G. 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. Journal of Biological Chemistry, 176 (1), 147-154.

Wink, M. 2015. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. Medicines, 2 (3), 251-286.

Yamaguchi, T., Chikama, A., Mori, K., Watanabe, T., Shioya, Y., Katsuragi, Y. and Tokimitsu, I. 2008. Hydroxyhydroquinone-free coffee: A double-blind,

randomized controlled dose–response study of blood pressure. Nutrition, Metabolism Cardiovascular Diseases, 18 (6), 408-414.

Yang, M., Zhang, J., Li, Y., Han, X., Gao, K. and Fang, J. 2016. Bioassay-guided isolation of dehydrocostus lactone from *Saussurea lappa*: A new targeted cytosolic thioredoxin reductase anticancer agent. Archives of Biochemistry and Biophysics, 607 (2016), 20-26.

Yang, S.P., Cai, Y.J., Zhang, B.L., Tong, L.J., Xie, H., Wu, Y., Lin, L.P., Ding, J. and Yue, J.M. 2008. Structural modification of an angiogenesis inhibitor discovered from traditional Chinese medicine and a structure–activity relationship study. Journal of Medicinal Chemistry, 51 (1), 77-85.

Yar Khan, H., Zubair, H., Fahad Ullah, M., Ahmad, A. and Mumtaz Hadi, S. 2012. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. Current Drug Targets, 13 (14), 1738-1749.

Yayli, N., Baltaci, C., Gök, Y., Aydin, E. and Üçüncü, O. 2006. Sesquiterpene lactones from *Centaurea helenioides* Boiss. Turkish Journal of Chemistry, 30 (2), 229-233.

Yesilada, E., Gürbüz, I., Bedir, E., Tatli, I. and Khan, I.A. 2004. Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. Journal of Ethnopharmacology, 95 (2-3), 213-219.

Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M. and Hsu, C.K. 2009. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57 (14), 6468-6473.

Yırtıcı, Ü., Göger, F., Sarimahmut, M. and Ergene, A. 2017. Cytotoxic and apoptotic effects of endemic *Centaurea fenzlii* Reichardt on the MCF-7 breast cancer cell line. Turkish Journal of Biology, 41 (2), 370-377.

Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M. and Yamakawa, O. 2001. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 65 (7), 1652-1655.

Youssef, D.T. 1998. Sesquiterpene lactones of *Centaurea scoparia*. Phytochemistry, 49 (6), 1733-1737.

Zater, H., Huet, J., Fontaine, V., Benayache, S., Stevigny, C., Duez, P. and Benayache, F. 2016. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. *algeriensis* (Coss. & Dur.) Maire. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 9 (6), 554-561.

Zebec, Z., Wilkes, J., Jervis, A.J., Scrutton, N.S., Takano, E. and Breitling, R. 2016. Towards synthesis of monoterpenes and derivatives using synthetic biology. Current Opinion in Chemical Biology, 34 37-43.

Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Gevrenova, R., Aktumsek, A., Sinan, K.I. and Mahomoodally, M.F. 2019a. A comparative assessment of the LC-MS profiles and cluster analysis of four *Centaurea* species from Turkey. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 20 101189.

Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Gevrenova, R., Nedialkov, P., Mocan, A., Ćirić, A., Glamočlija, J., Soković, M., Aktumsek, A. and Mahomoodally, M.F. 2018. Identification of phenolic components via LC–MS analysis and biological activities of two *Centaurea* species: *C. drabifolia* subsp. *drabifolia* and *C. lycopifolia*. Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis, 149 436-441.

Zengin, G., Llorent-Martínez, E., Sinan, K.I., Yıldıztugay, E., Picot-Allain, C. and Mahomoodally, M.F. 2019b. Chemical profiling of *Centaurea bornmuelleri* Hausskn. aerial parts by HPLC-MS/MS and their pharmaceutical effects: From nature to novel perspectives. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 174 (2019), 406-413.

Zettler, J.L. and Arthur, F.H. 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. Crop Protection, 19 (8-10), 577-582.

Zhang, Q., Lu, Y., Ding, Y., Zhai, J., Ji, Q., Ma, W., Yang, M., Fan, H., Long, J. and Tong, Z. 2012. Guaianolide sesquiterpene lactones, a source to discover agents that selectively inhibit acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. Journal of Medicinal Chemistry, 55 (20), 8757-8769.

Zhao, Y., Zhang, D., Liang, C., Li-xin, Y., Sun, P., Ma, Y., Wang, K., Chang, X. and Yang, L. 2018. Chemical constituents from *Matricaria chamomilla* L. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 27 (5), 324-331.

Zheng, R., Su, S., Li, J., Zhao, Z., Wei, J., Fu, X. and Liu, R.H. 2017. Recovery of phenolics from the ethanolic extract of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) baggase and evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities. Industrial Crops and Products, 107 360-369.

Zheng, X., Luo, X., Ye, G., Chen, Y., Ji, X., Wen, L., Xu, Y., Xu, H., Zhan, R. and Chen, W. 2015. Characterisation of two oxidosqualene cyclases responsible for triterpenoid biosynthesis in Ilex asprella. International Journal of Molecular Sciences, 16 (2), 3564-3578.

Zheng, X., Wang, W., Piao, H., Xu, W., Shi, H. and Zhao, C. 2013. The genus *Gnaphalium* L. (Compositae): Phytochemical and pharmacological characteristics. Molecules, 18 (7), 8298-8318.

Zheng, Z., Wang, X., Liu, P., Li, M., Dong, H. and Qiao, X. 2018. Semi-preparative separation of 10 caffeoylquinic acid derivatives using high speed counter-current chromatogaphy combined with semi-preparative HPLC from the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). Molecules, 23 (2), 429-440.

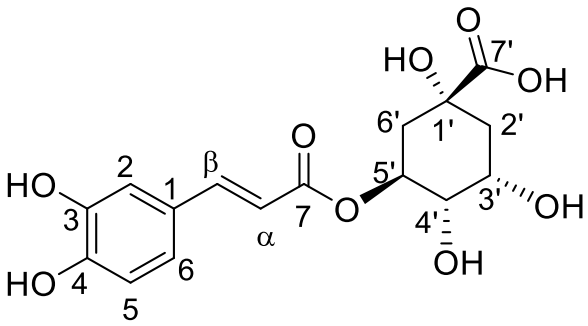
Zidorn, C. 2008. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. Phytochemistry, 69 (12), 2270-2296.

Zimmermann, S., Kaiser, M., Brun, R., Hamburger, M. and Adams, M. 2012. Cynaropicrin: the first plant natural product with in vivo activity against *Trypanosoma brucei*. Planta Medica, 78 (06), 553-556.

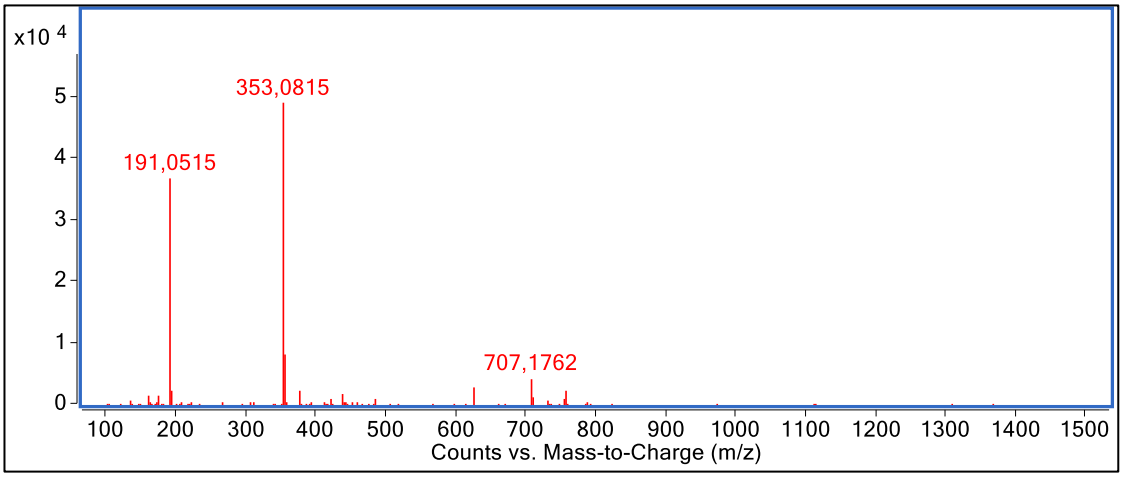
Zong, Y., Yu, M., Huang, L., Chang, Y., Wang, Y. and Che, C.T. 1994. Studies of Tibetan medicinal plants II. Antitumour activity of *Saussurea eopygmaea*. International Journal of Pharmacognosy, 32 (3), 284-293.

EKLER

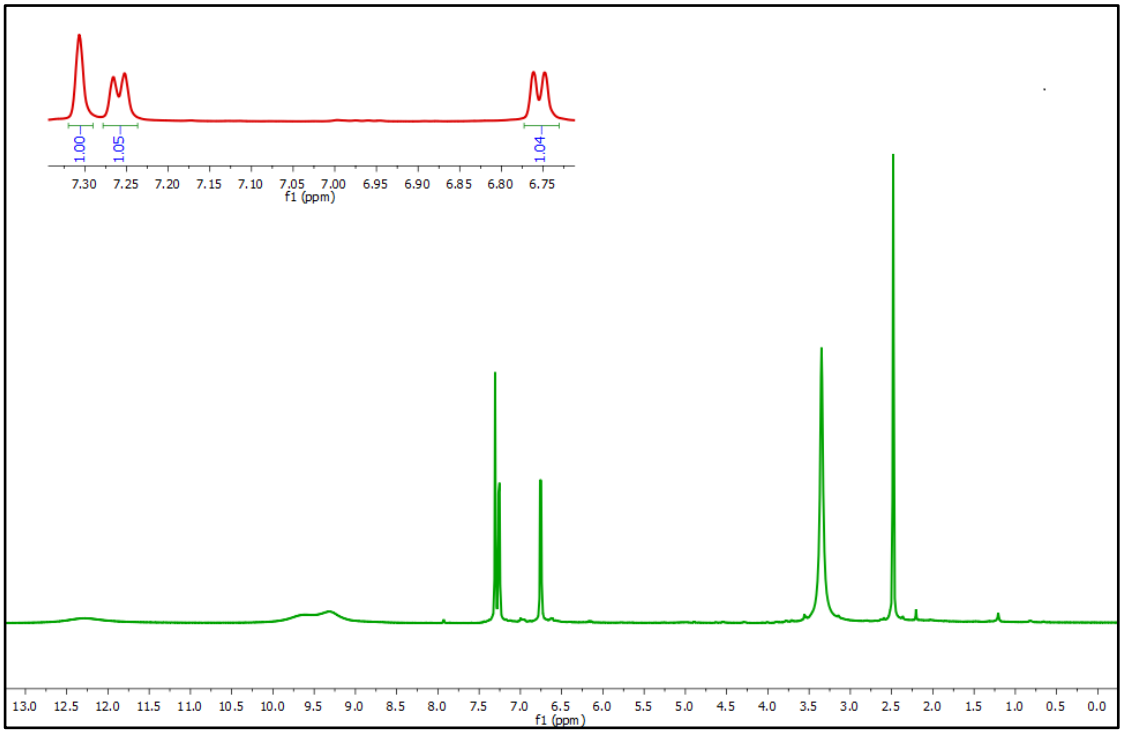
EK 1 CCGY bitkisinden izole edilen bileşiklere ait spektral veriler



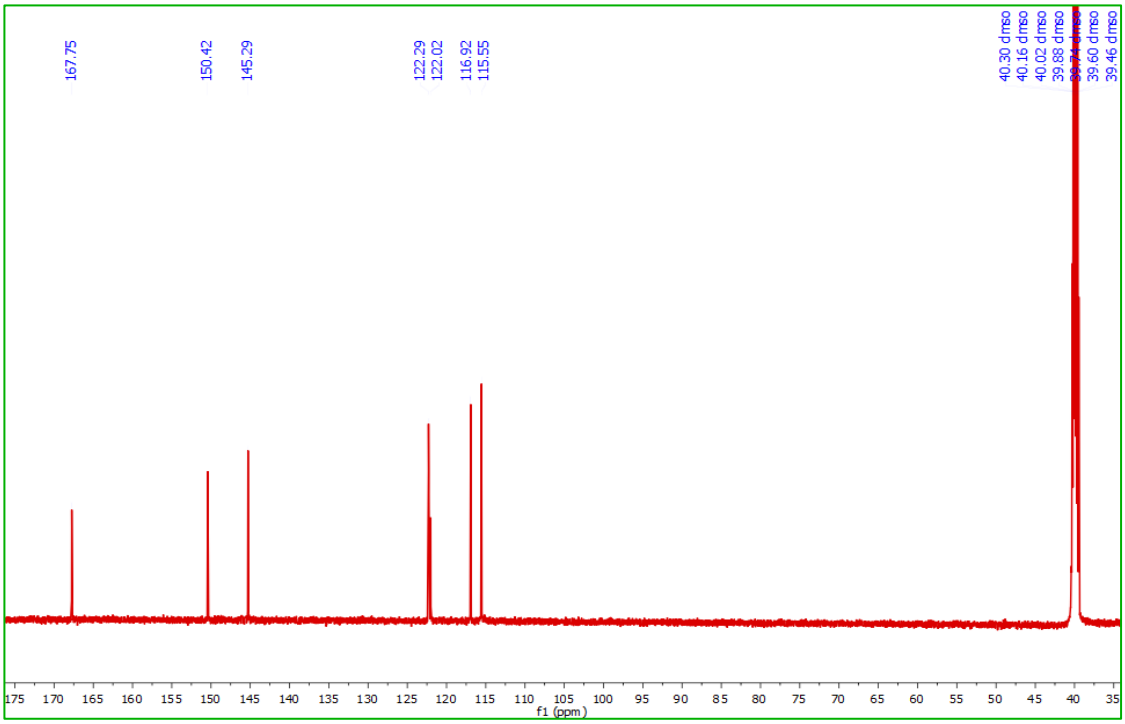
Klorojenik asit (CCGY-2) bileşiğinin kimyasal yapısı



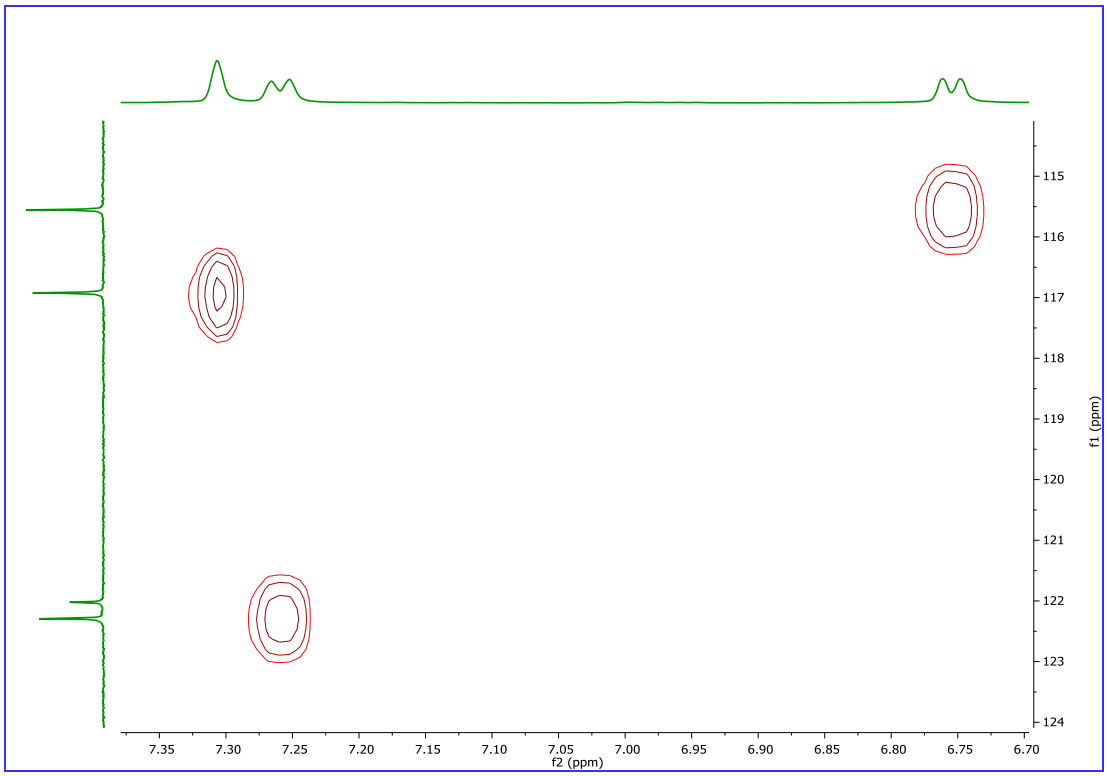
Şekil 1.1 Klorojenik asit (CCGY-2) LC-TOF/MS spektrumu



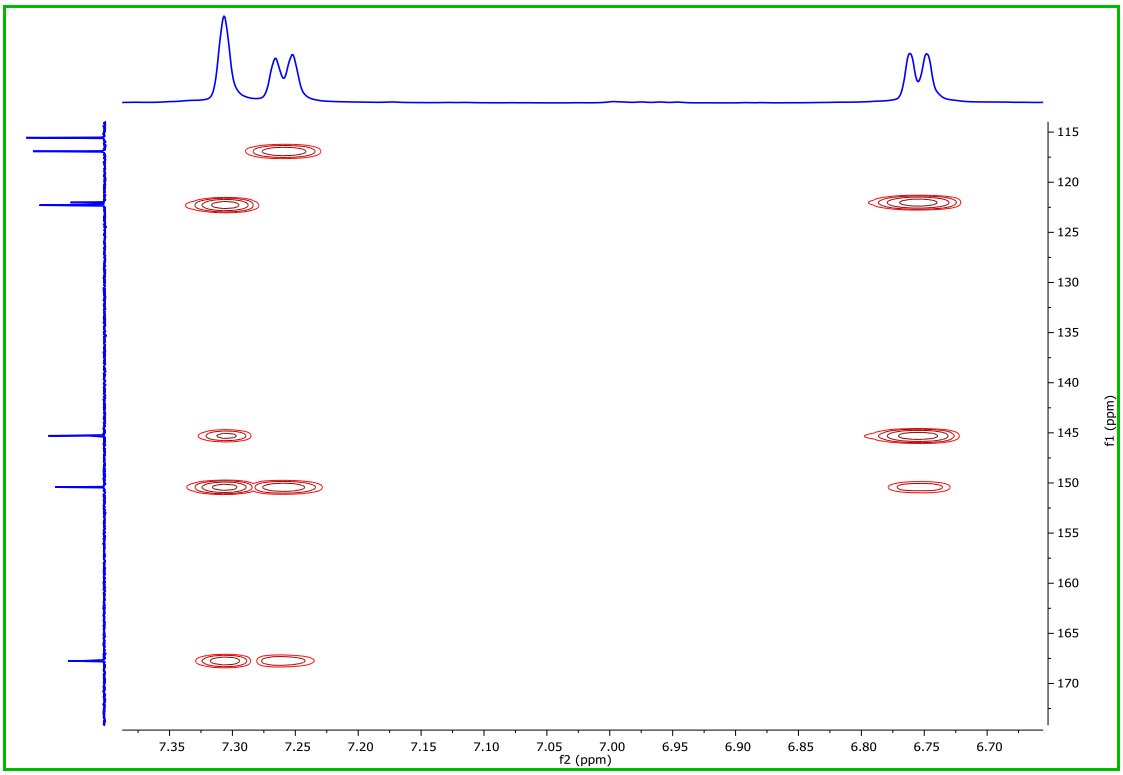
Şekil 1.2 Klorojenik asit (CCGY-2) molekülünün ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



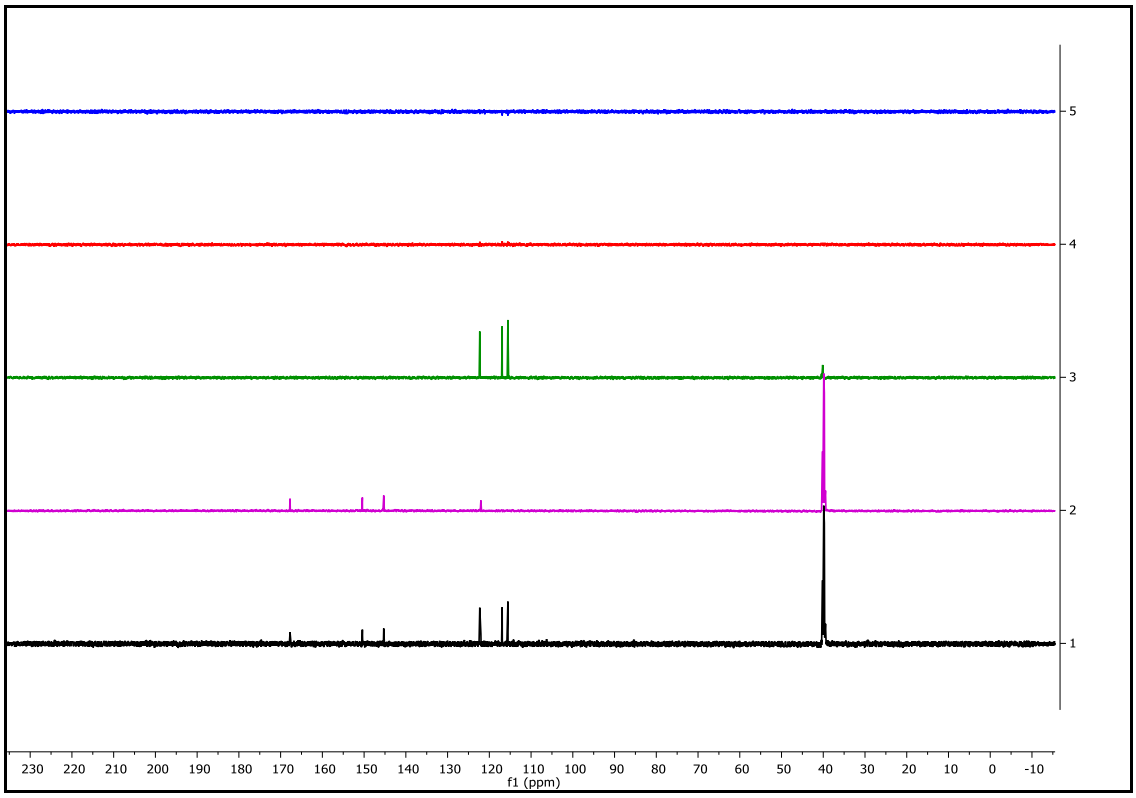
Şekil 1.3 Klorojenik asit (CCGY-2) molekülünün ^{13}C-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



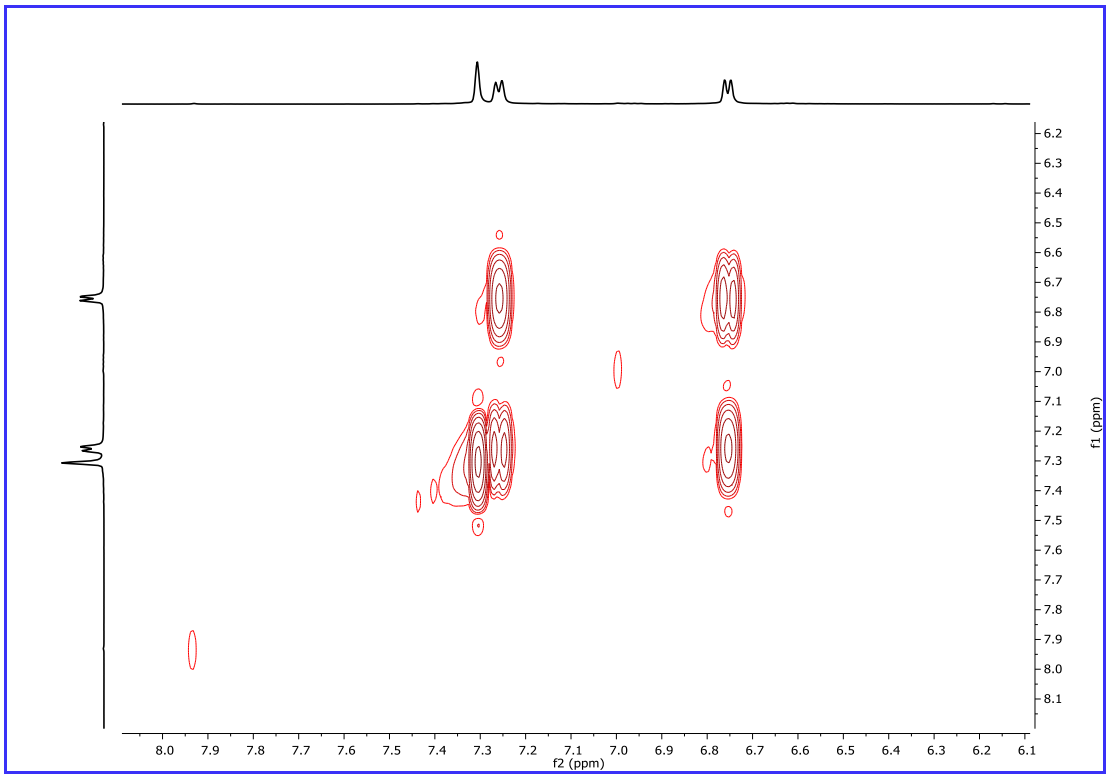
Şekil 1.4 Klorojenik asit (CCGY-2) molekülünün HSQC spektrumu (DMSO-d_6)



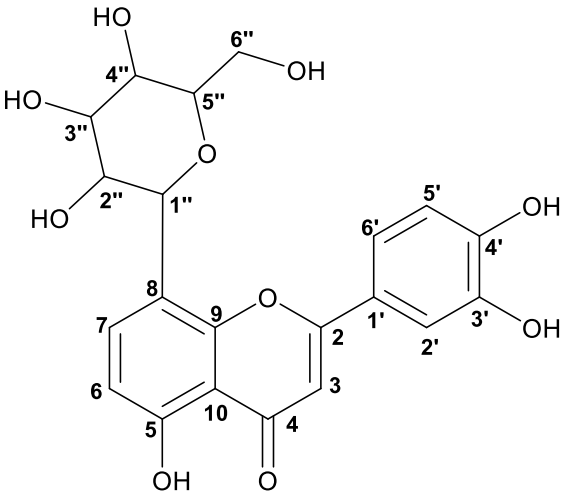
Şekil 1.5 Klorojenik asit (CCGY-2) molekülünün HMBC spektrumu (DMSO-d_6)



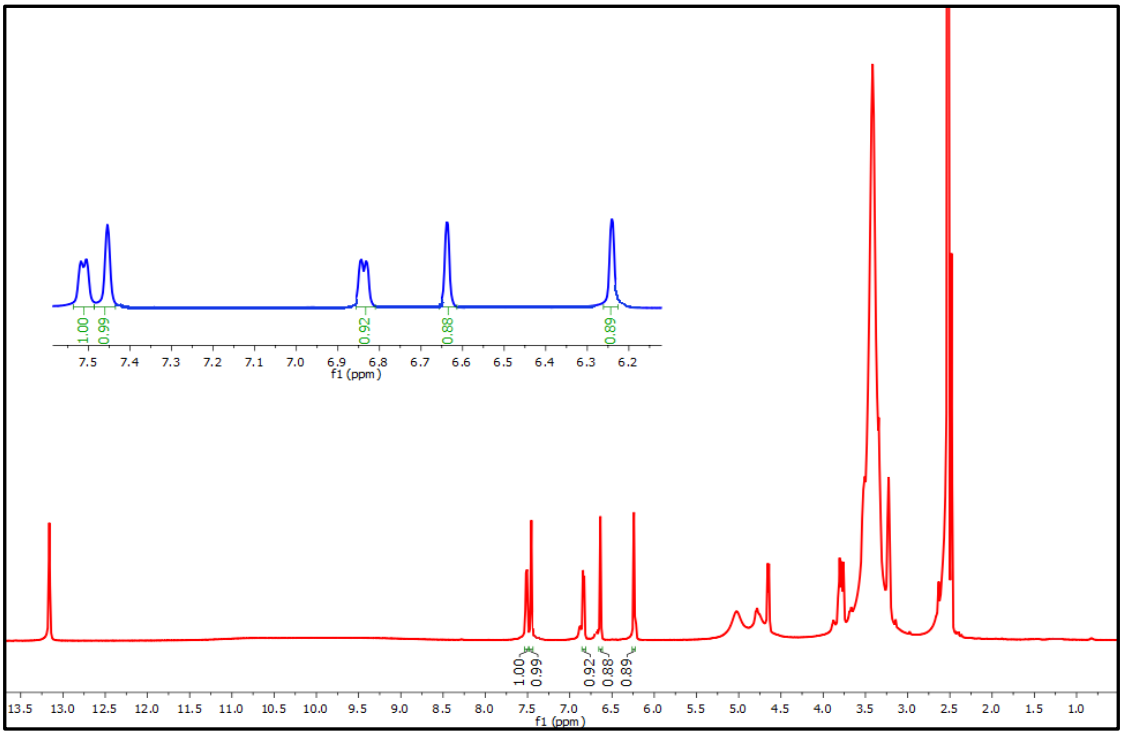
Şekil 1.6 Klorojenik asit (CCGY-2) molekülünün DEPT spektrumu (DMSO-d_6)



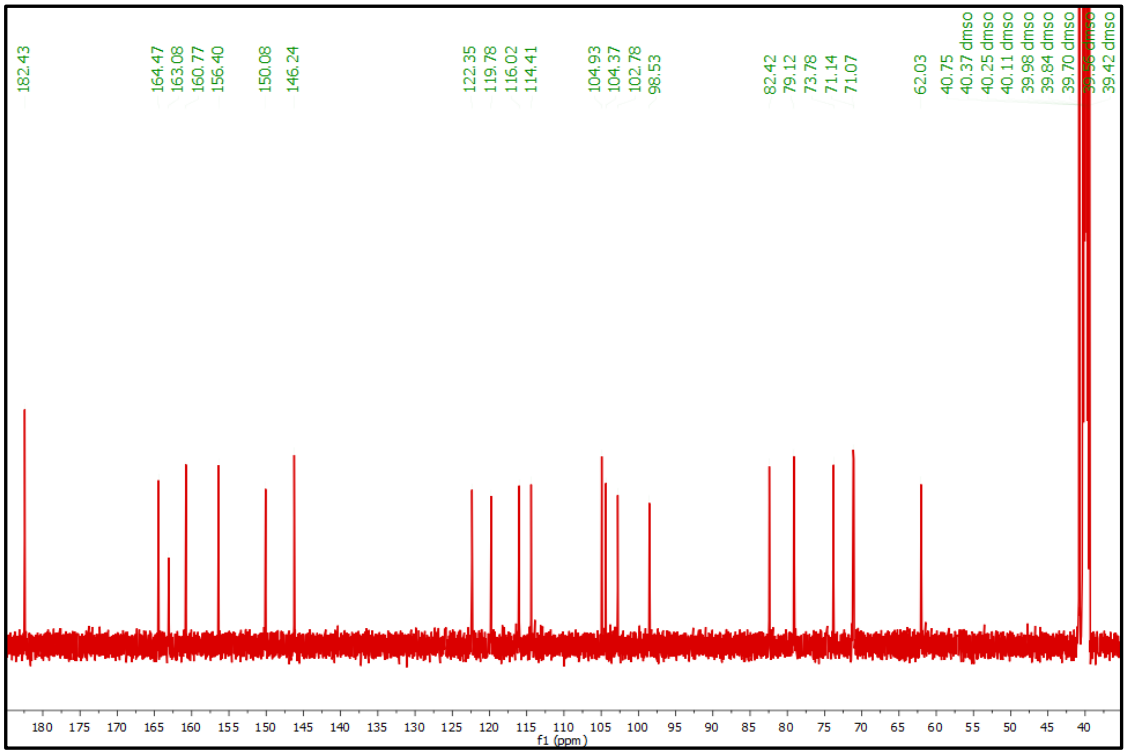
Şekil 1.7 Klorojenik asit (CCGY-2) molekülünün COSY spektrumu (DMSO-d_6)



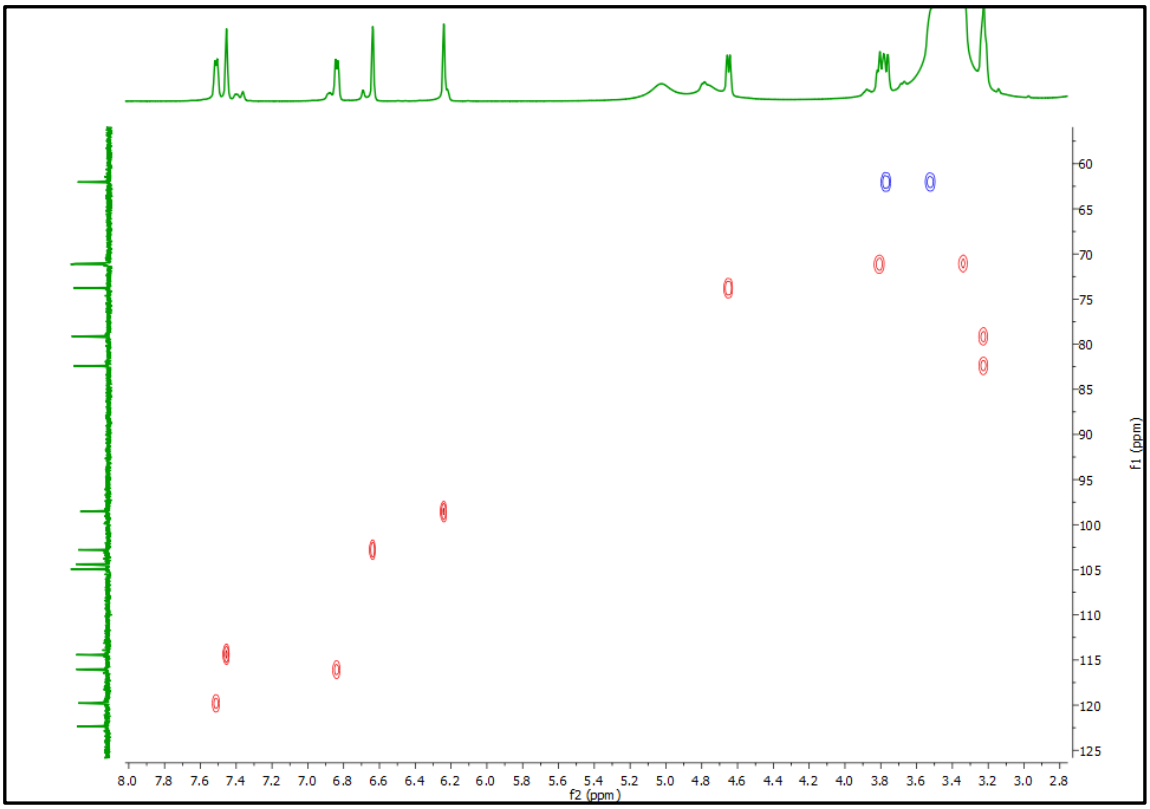
Orientin (CCGY-3) bileşiğinin kimyasal yapısı



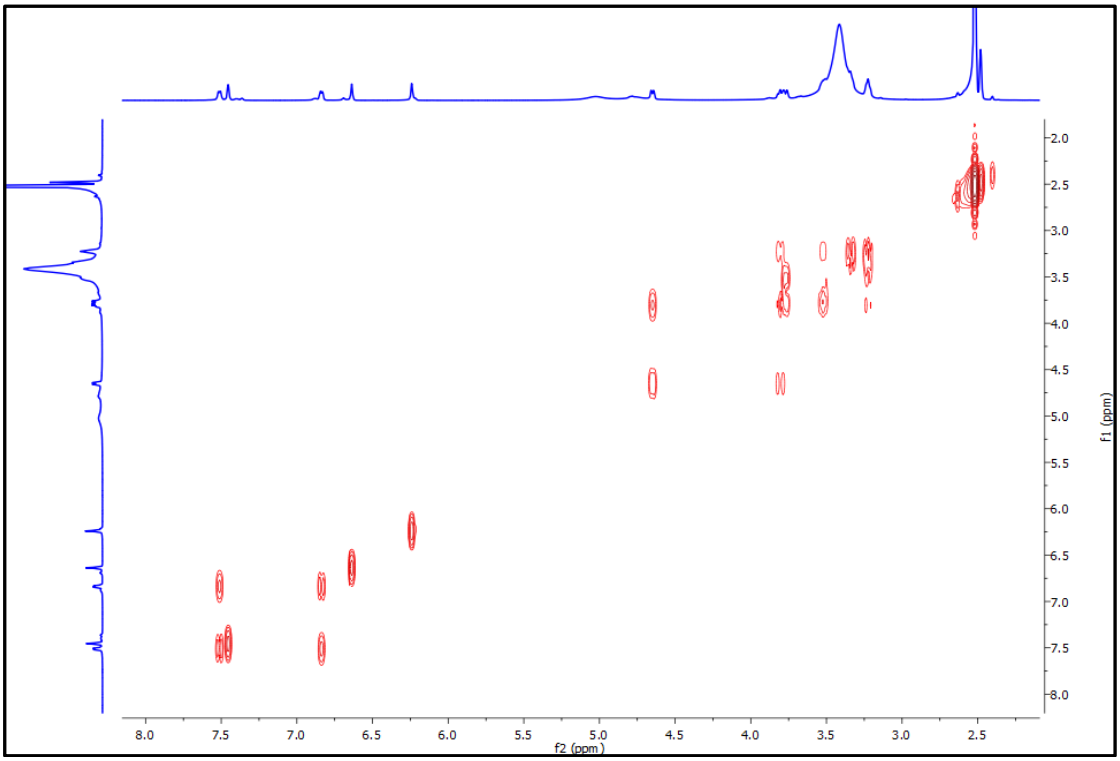
Şekil 1.8 Orientin (CCGY-3) molekülünün ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



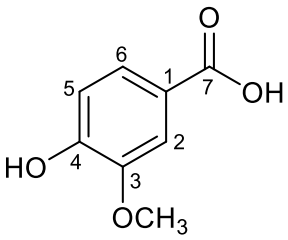
Şekil 1.9 Orientin (CCGY-3) molekülünün ^{13}C-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



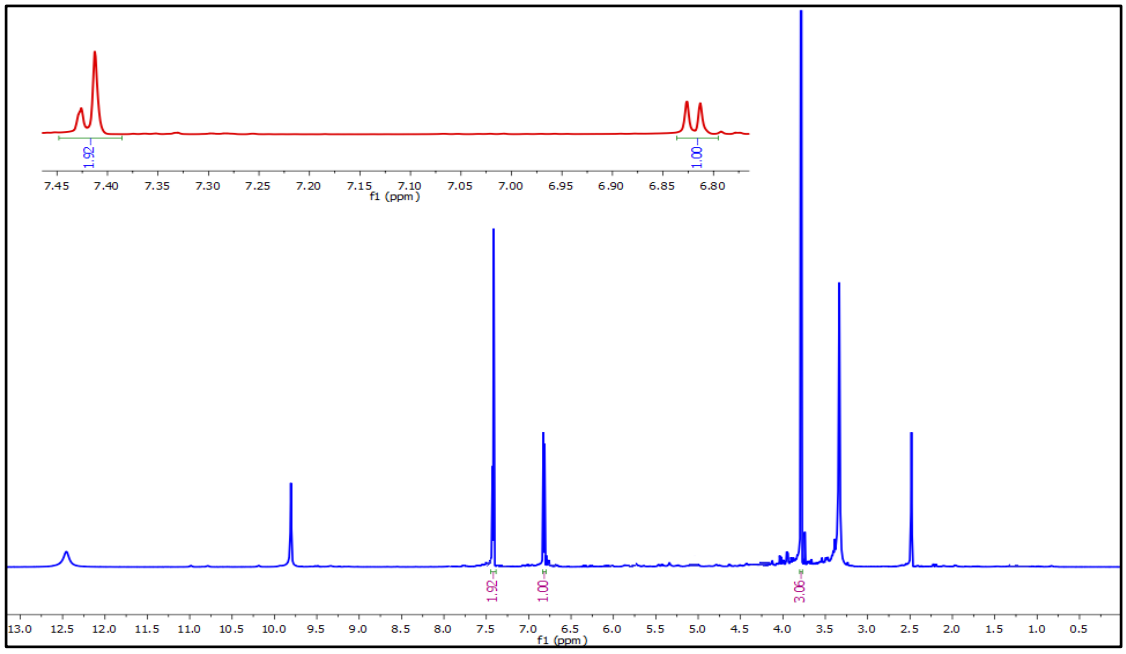
Şekil 1.10 Orientin (CCGY-3) molekülünün HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



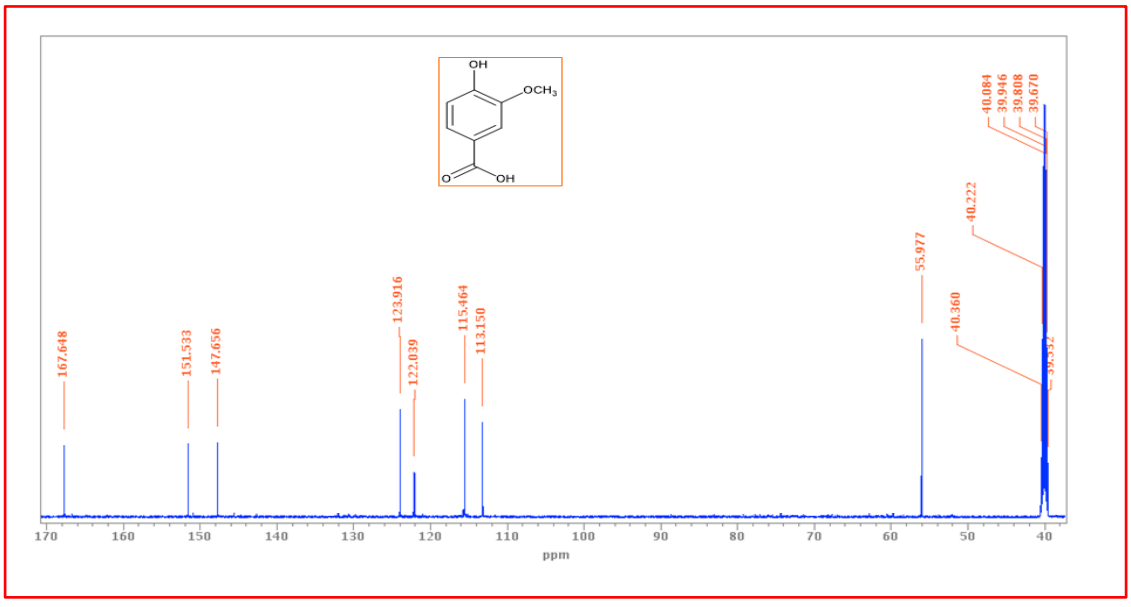
Şekil 1.11 Orientin (CCGY-3) molekülünün HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



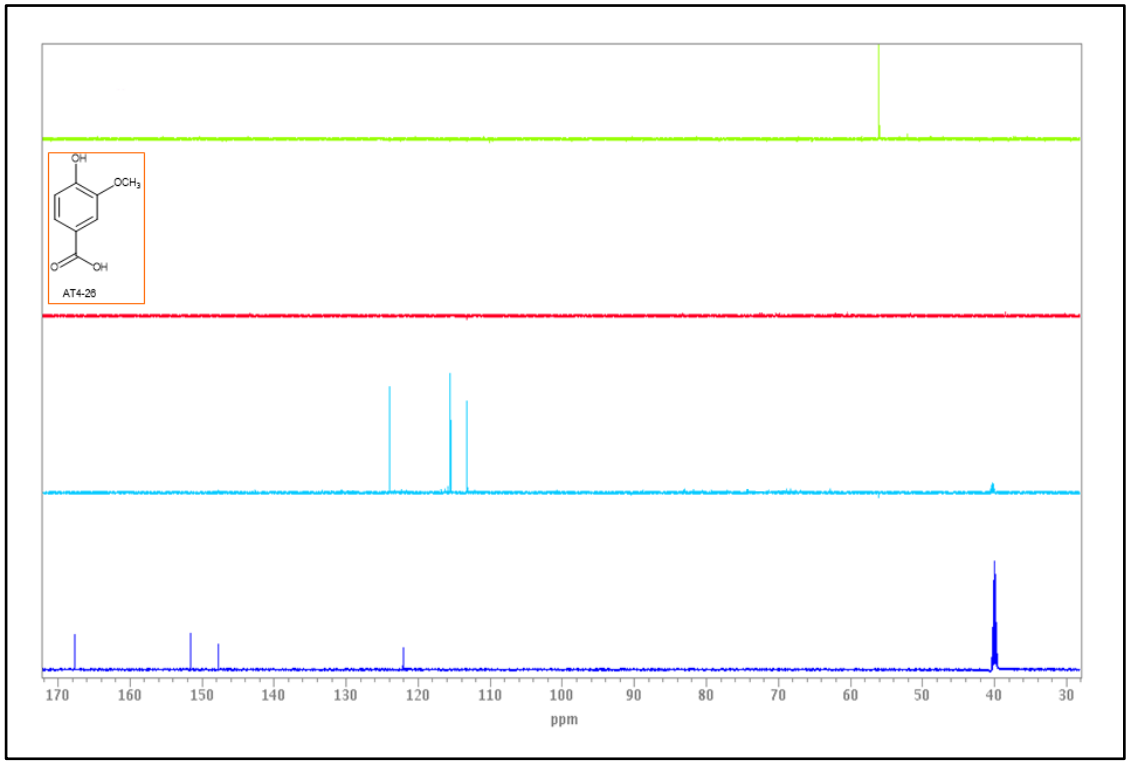
Vanilik asit (CCGY-6) bileşiğinin kimyasal yapısı



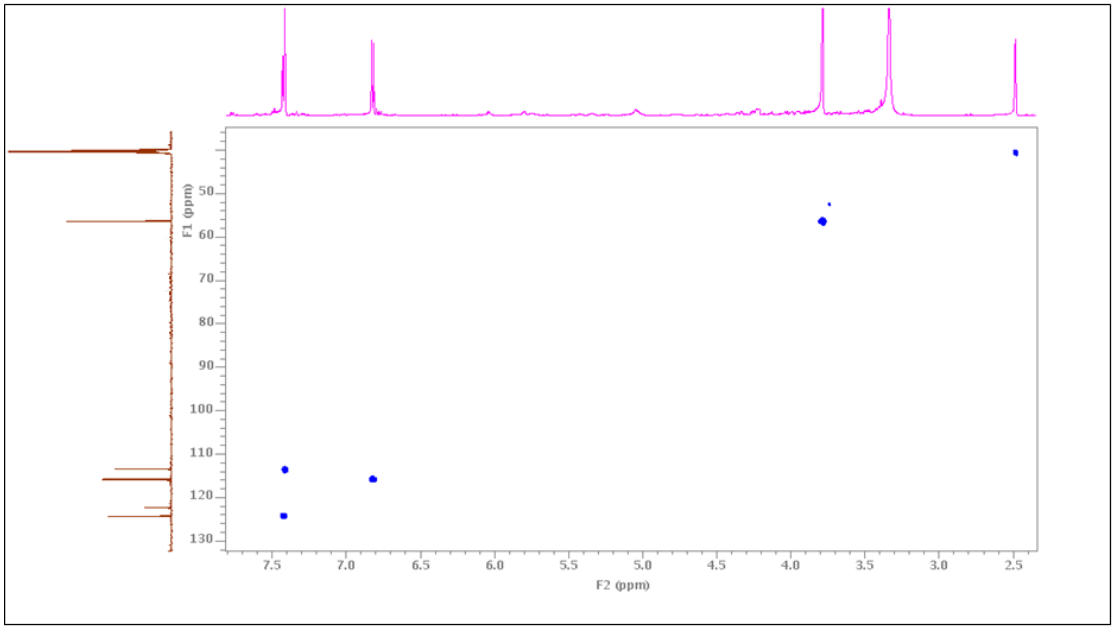
Şekil 1.12 Vanilik asit **(**CCGY-6) molekülü ^{1}H-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



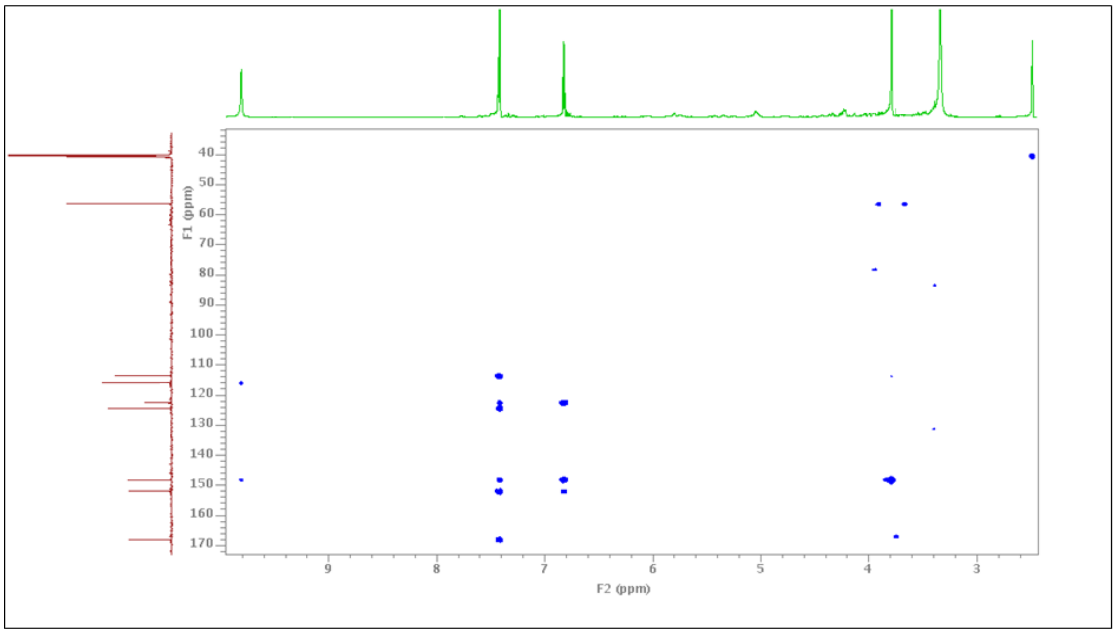
Şekil 1.13 Vanilik asit **(**CCGY-6) molekülü ^{13}C-NMR spektrumu (DMSO-d_6)



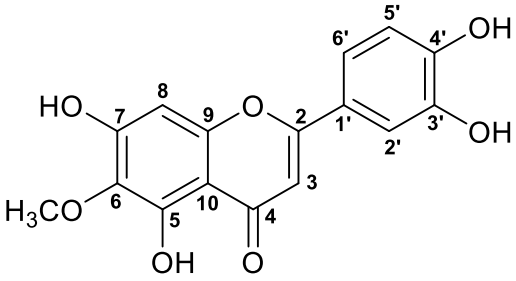
Şekil 1.14 Vanilik asit **(**CCGY-6) molekülü ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



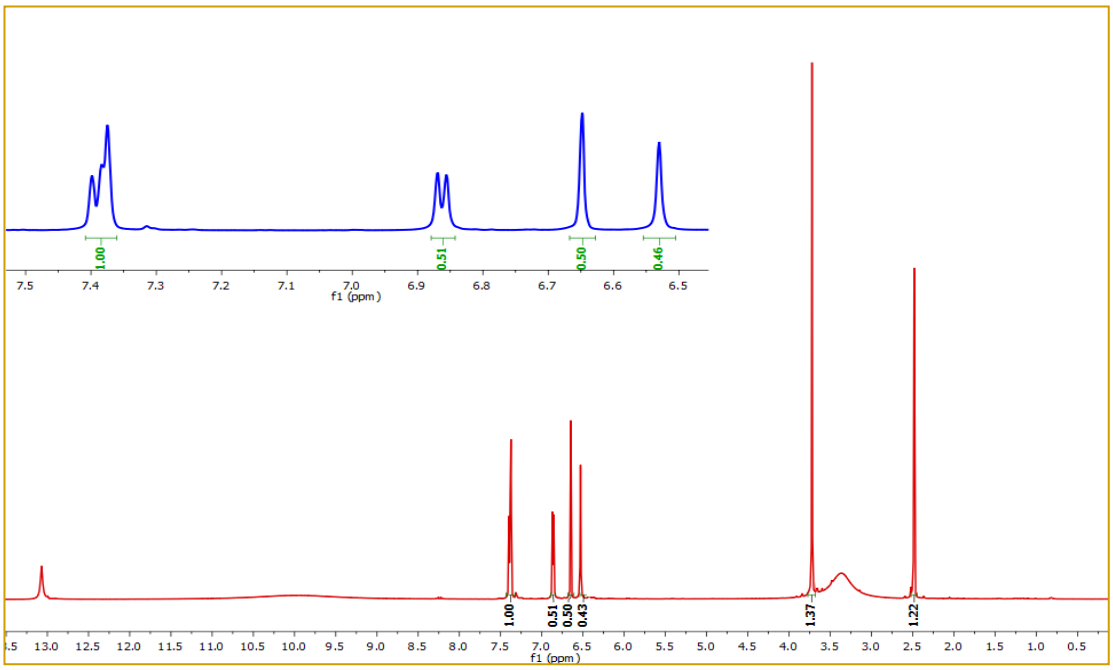
Şekil 1.15 Vanilik asit **(**CCGY-6) molekülü HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



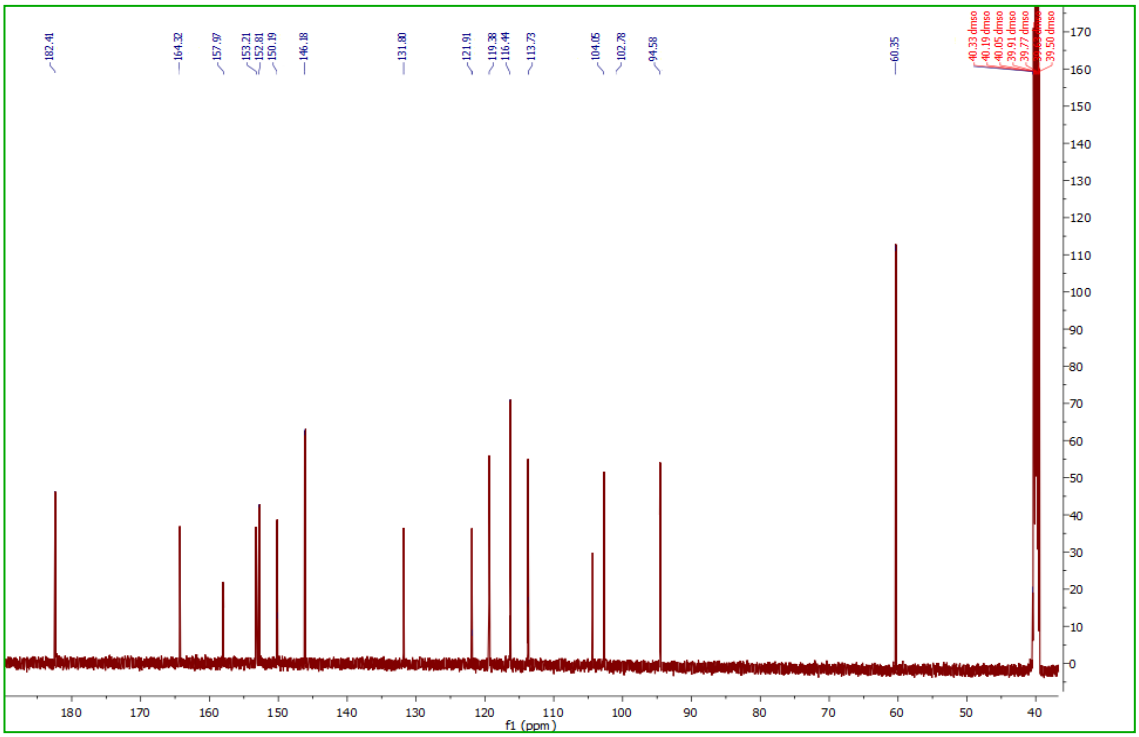
Şekil 1.16 Vanilik asit **(**CCGY-6) molekülü HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



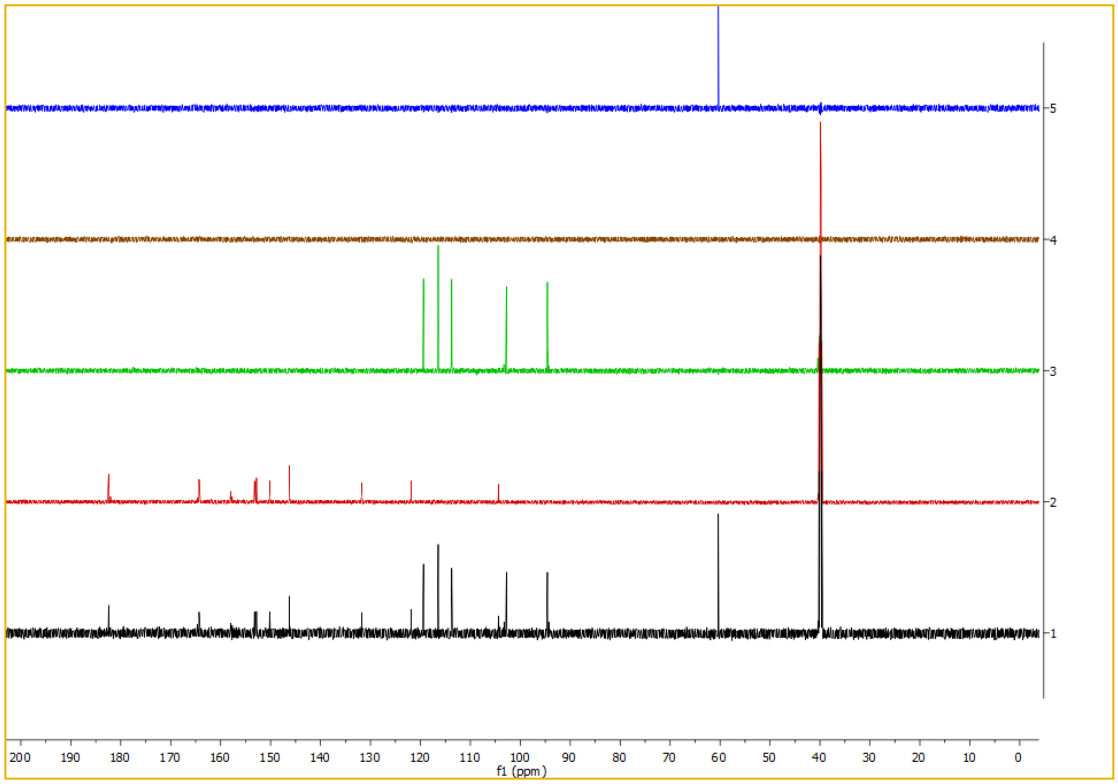
Nepetin (CCGY-7) bileşiğinin kimyasal yapısı



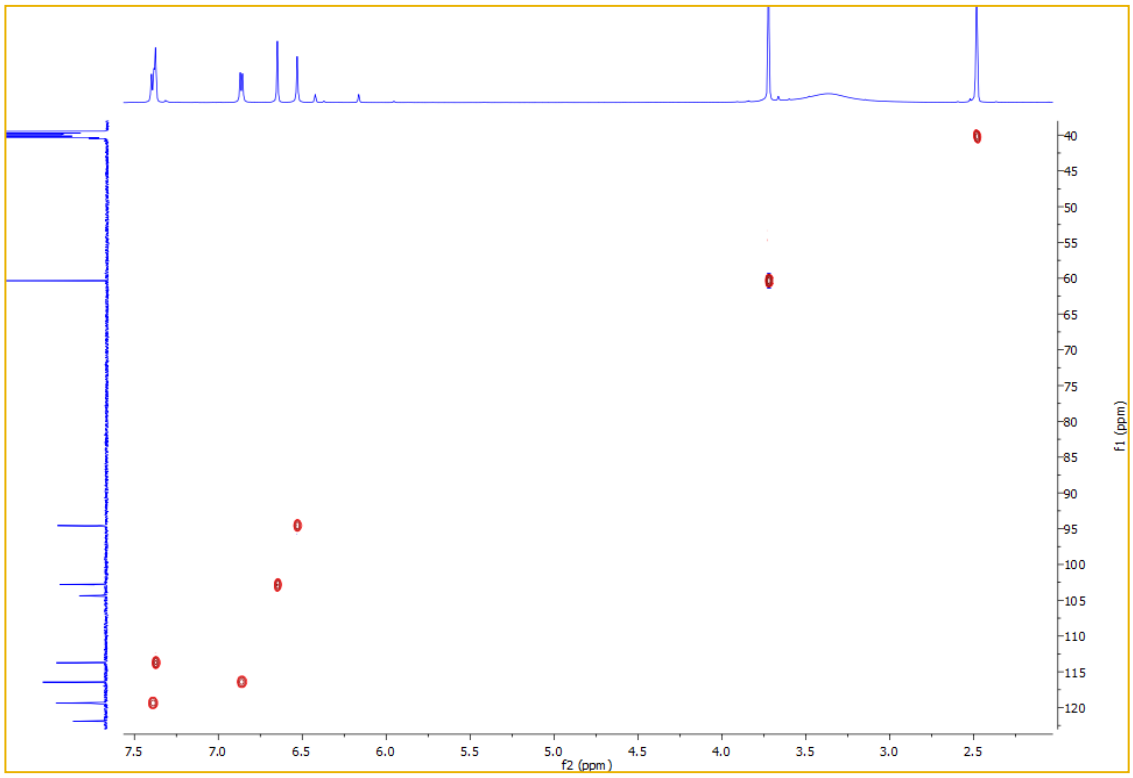
Şekil 1.17 Nepetin (CCGY-7) molekülüne ait ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 1.18 Nepetin (CCGY-7) molekülüne ait ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)

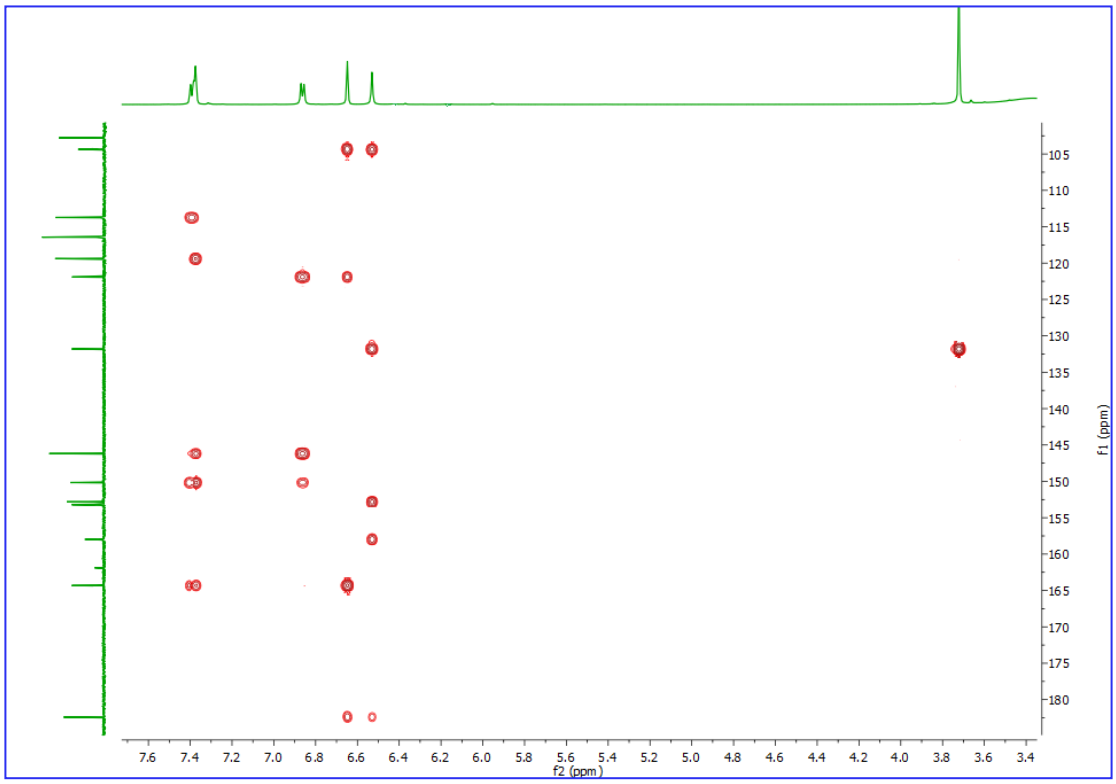


Şekil 1.19 Nepetin (CCGY-7) molekülüne ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)

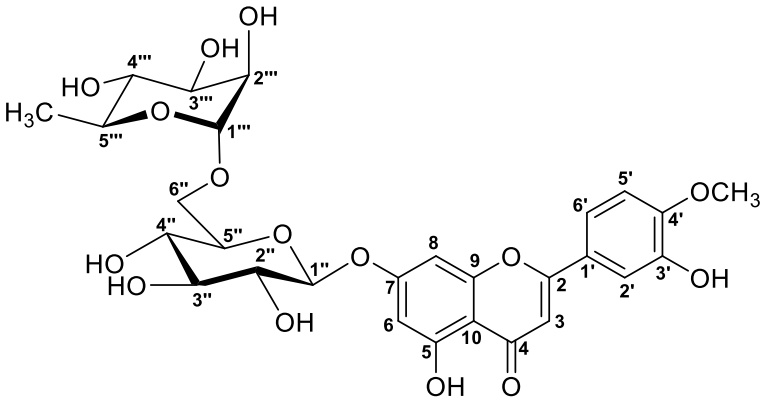


,

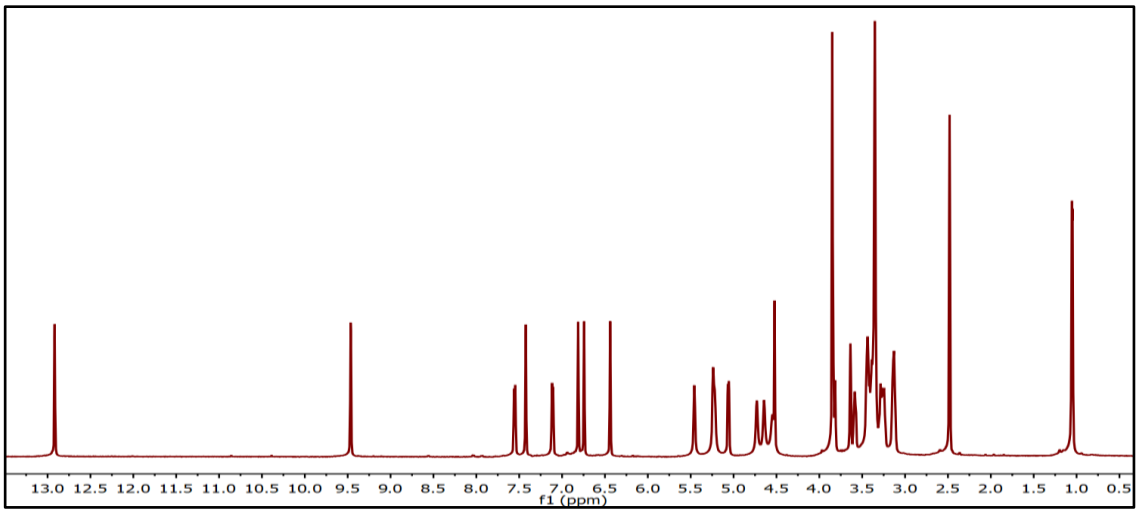
Şekil 1.20 Nepetin (CCGY-7) molekülüne ait HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



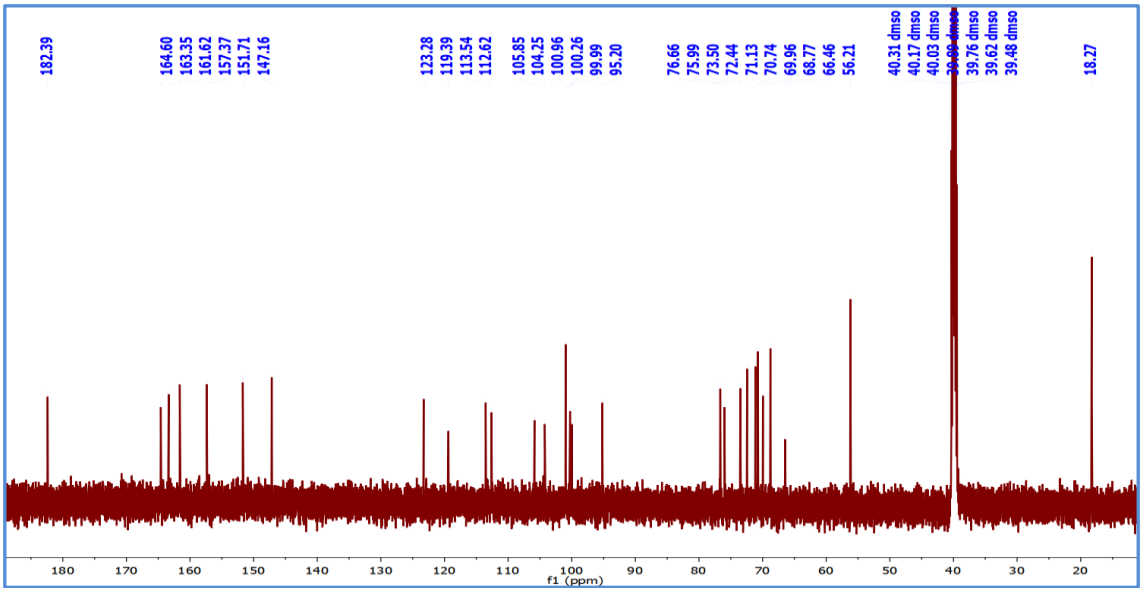
Şekil 1.21 Nepetin (CCGY-7) molekülüne ait HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



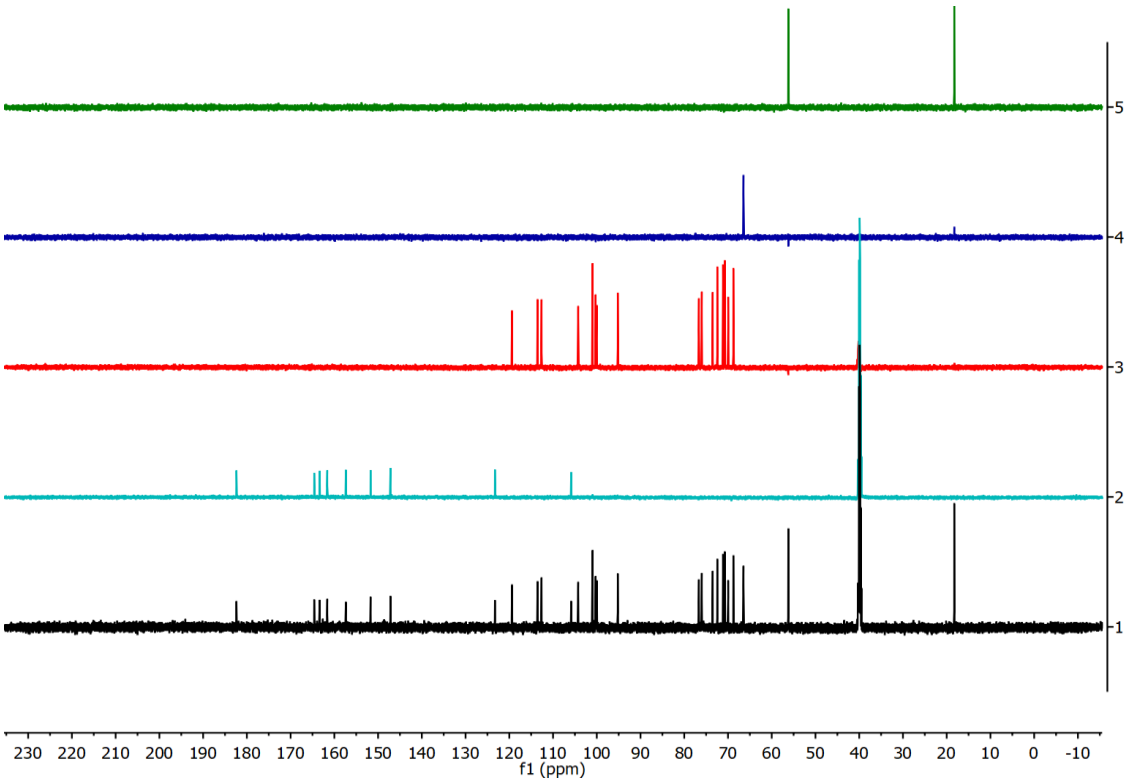
Diosmin **(**CCGY-8) bileşiğinin kimyasal yapısı



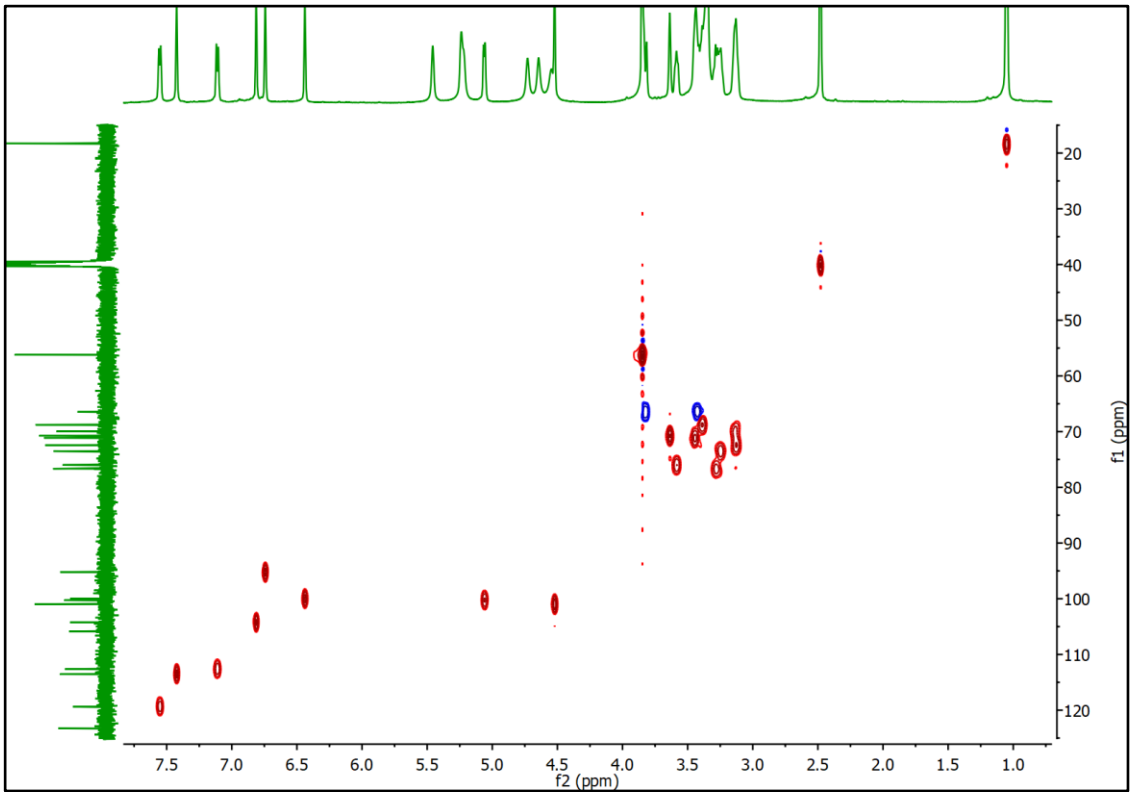
Şekil 1.22 Diosmin **(**CCGY-8) molekülüne ait ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



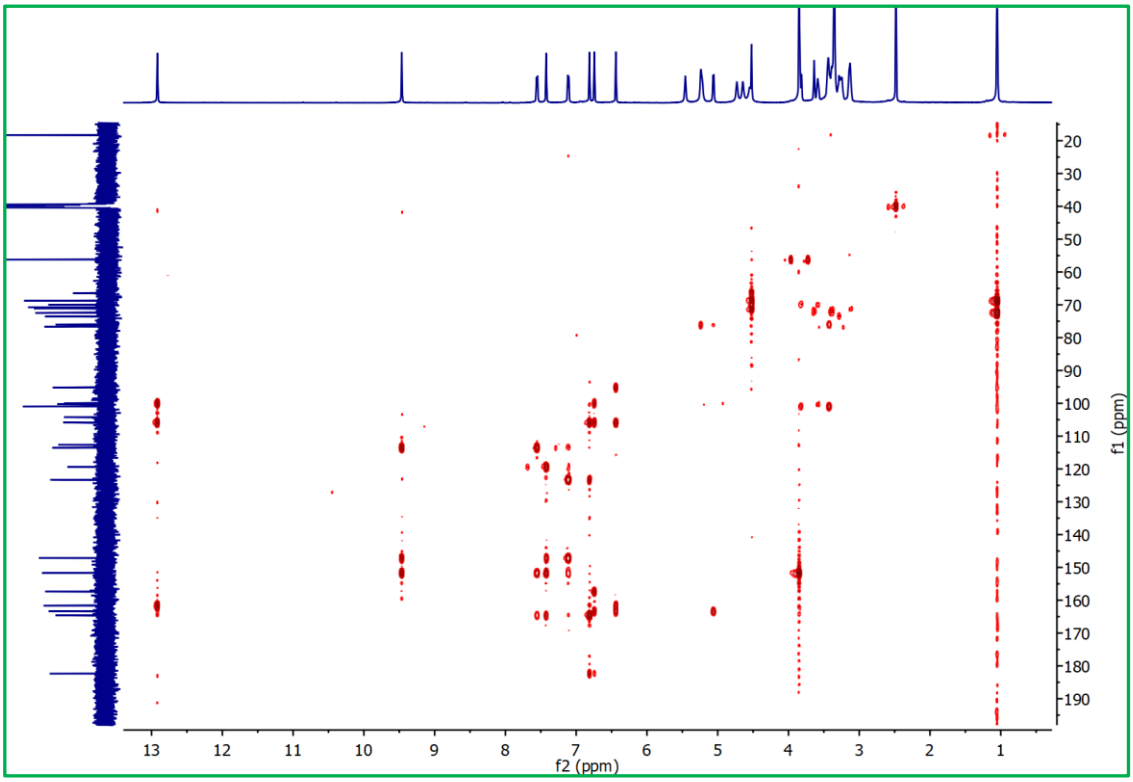
Şekil 1.23 Diosmin **(**CCGY-8) molekülüne ait ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



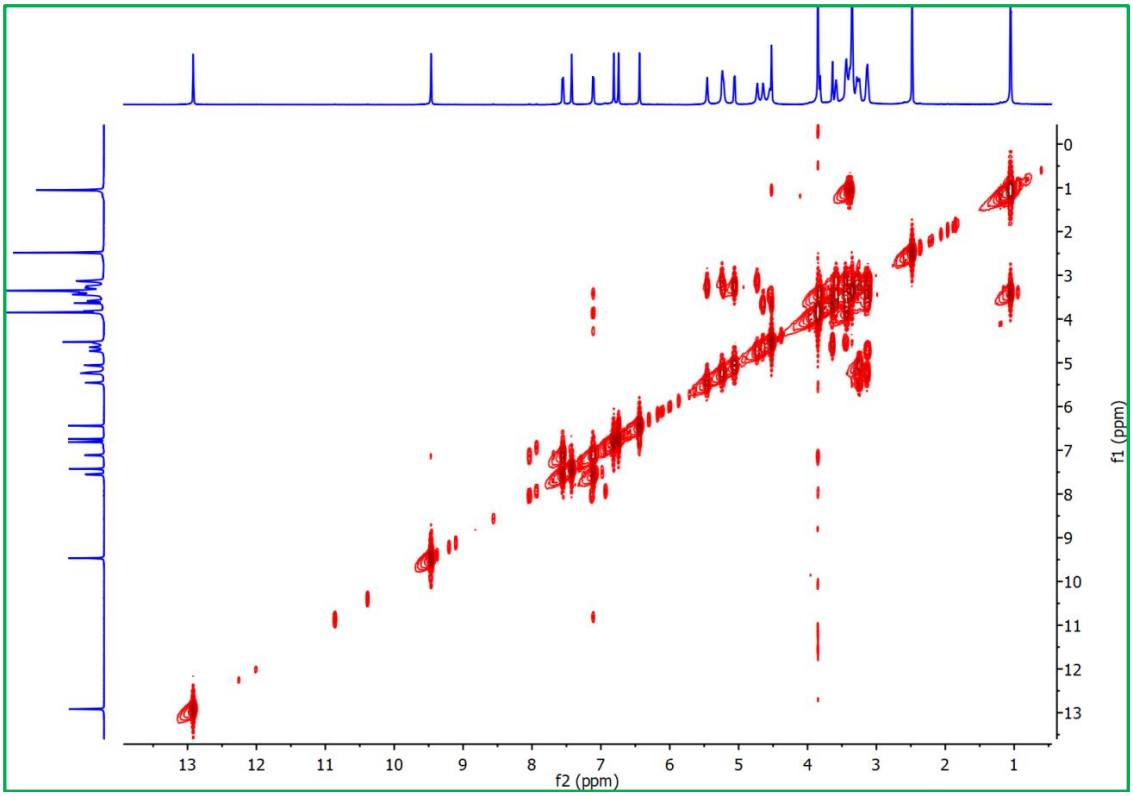
Şekil 1.24 Diosmin **(**CCGY-8) molekülüne ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 1.25 Diosmin **(**CCGY-8) molekülüne ait HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)

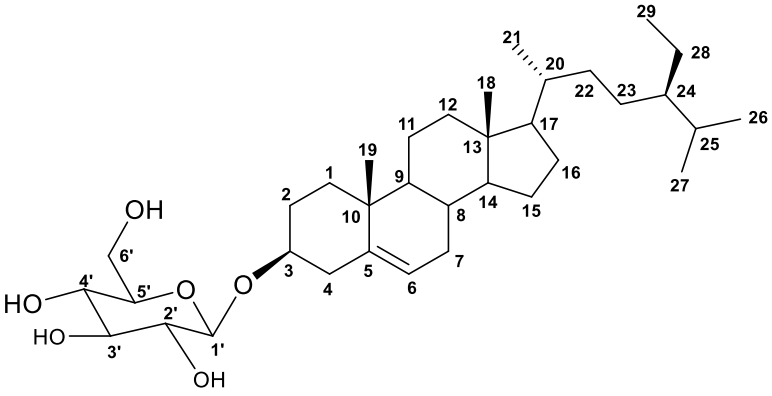


Şekil 1.26 Diosmin **(**CCGY-8) molekülüne ait HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)

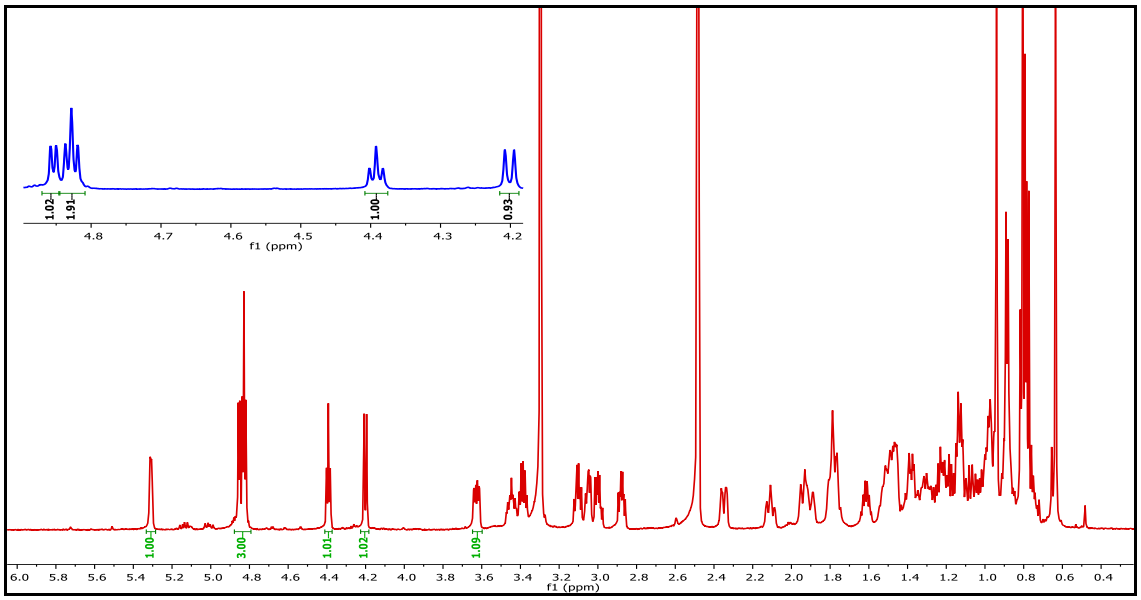


Şekil 1.29 Diosmin **(**CCGY-8) molekülüne ait COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)

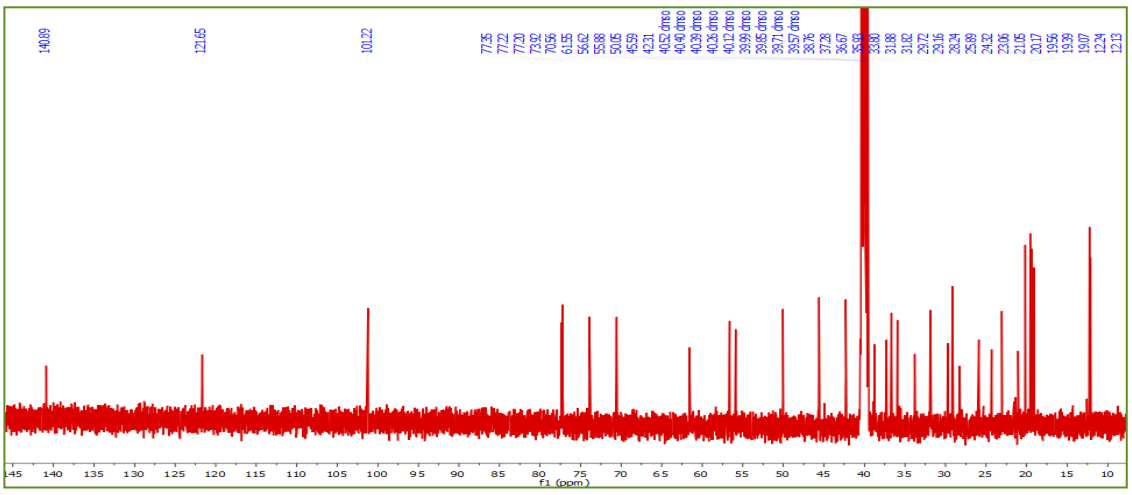
EK 2 CPÇ bitkisinden izole edilen bileşiklere ait spektral veriler



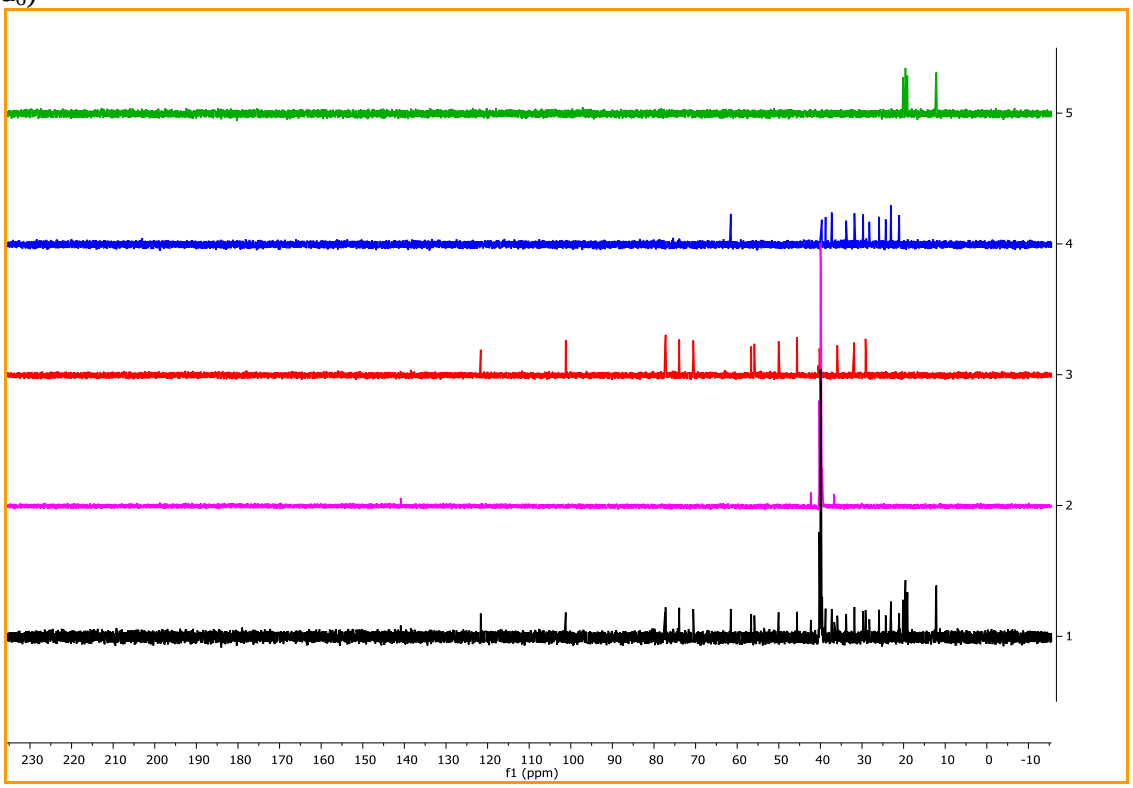
Daucosterin (CPÇ-11) bileşiğinin yapısı



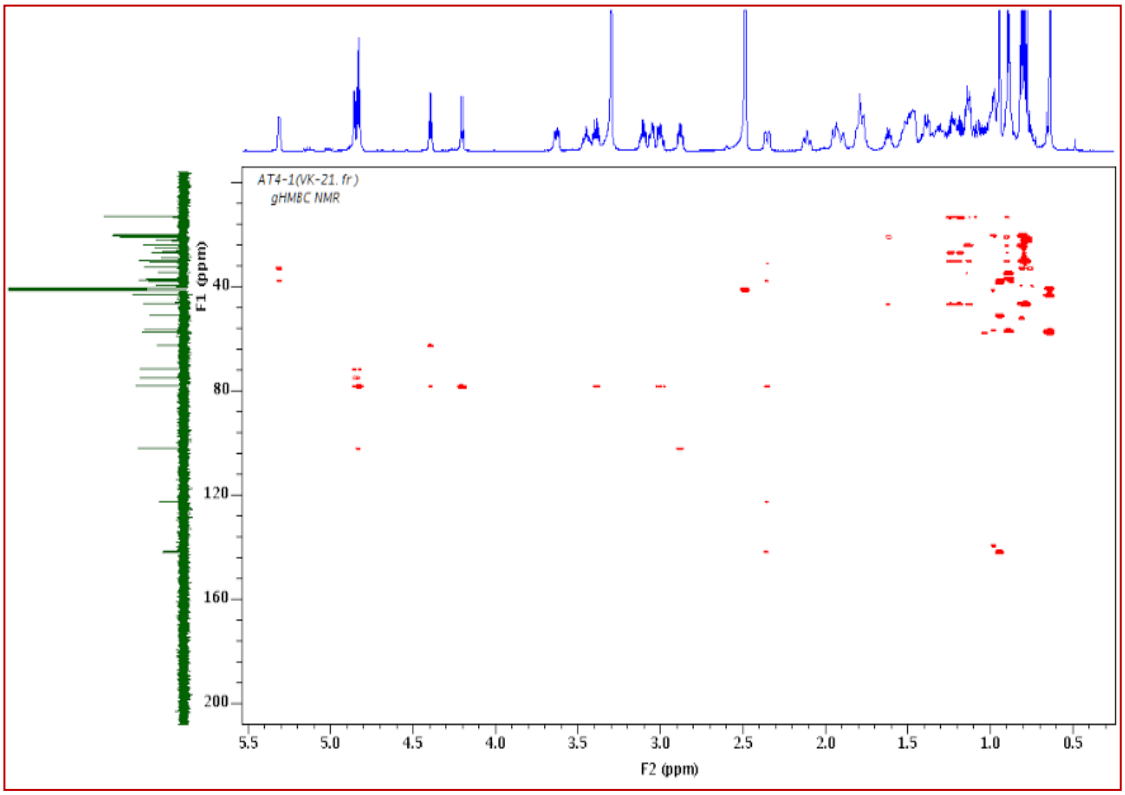
Şekil 2.1 Daucosterin (CPÇ-11) molekülüne ait ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



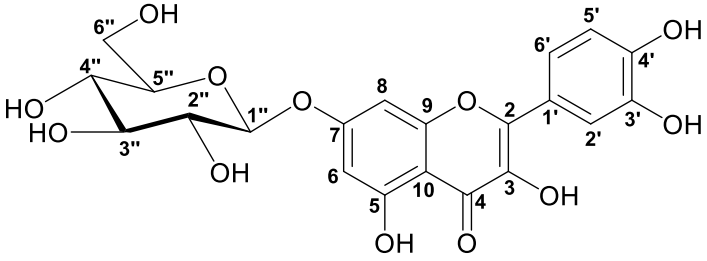
Şekil 2.2 Daucosterin (CPÇ-11) molekülüne ait ^{13}C karbon NMR spektrumu (DMSO-d_6)



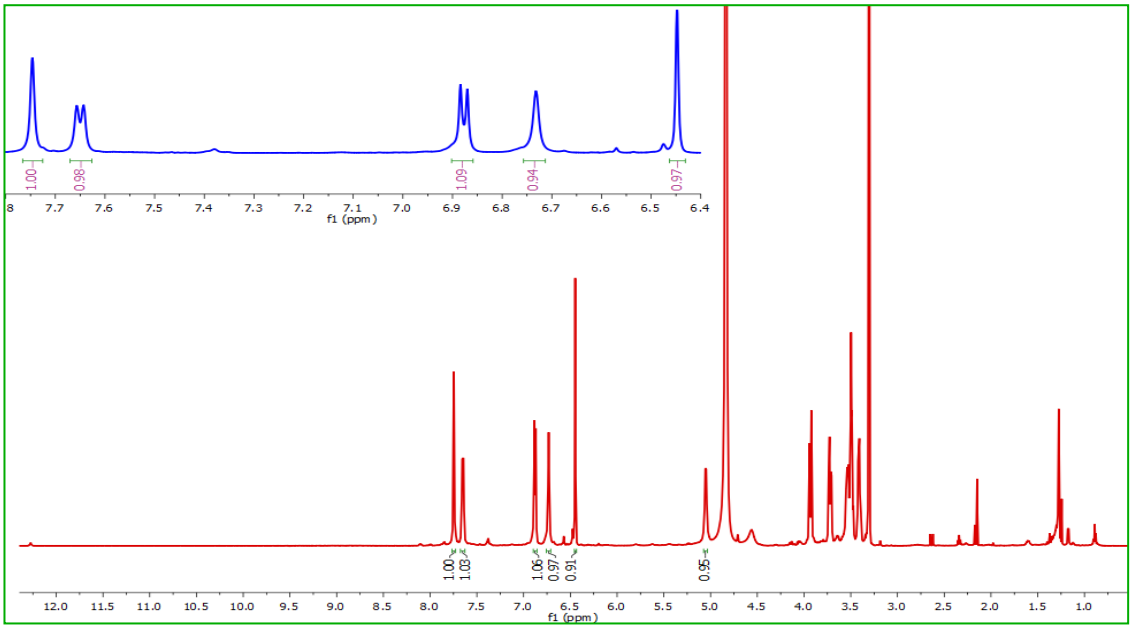
Şekil 2.3 Daucosterin (CPÇ-11) molekülüne ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



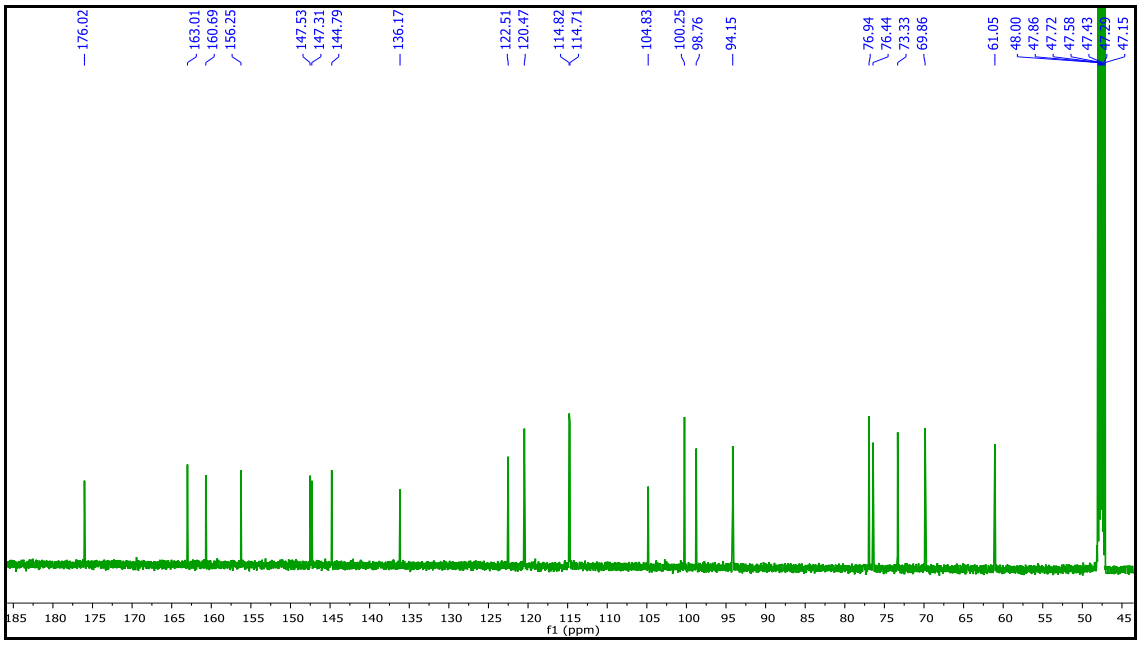
Şekil 2.4 Daucosterin (CPÇ-11) molekülüne ait HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



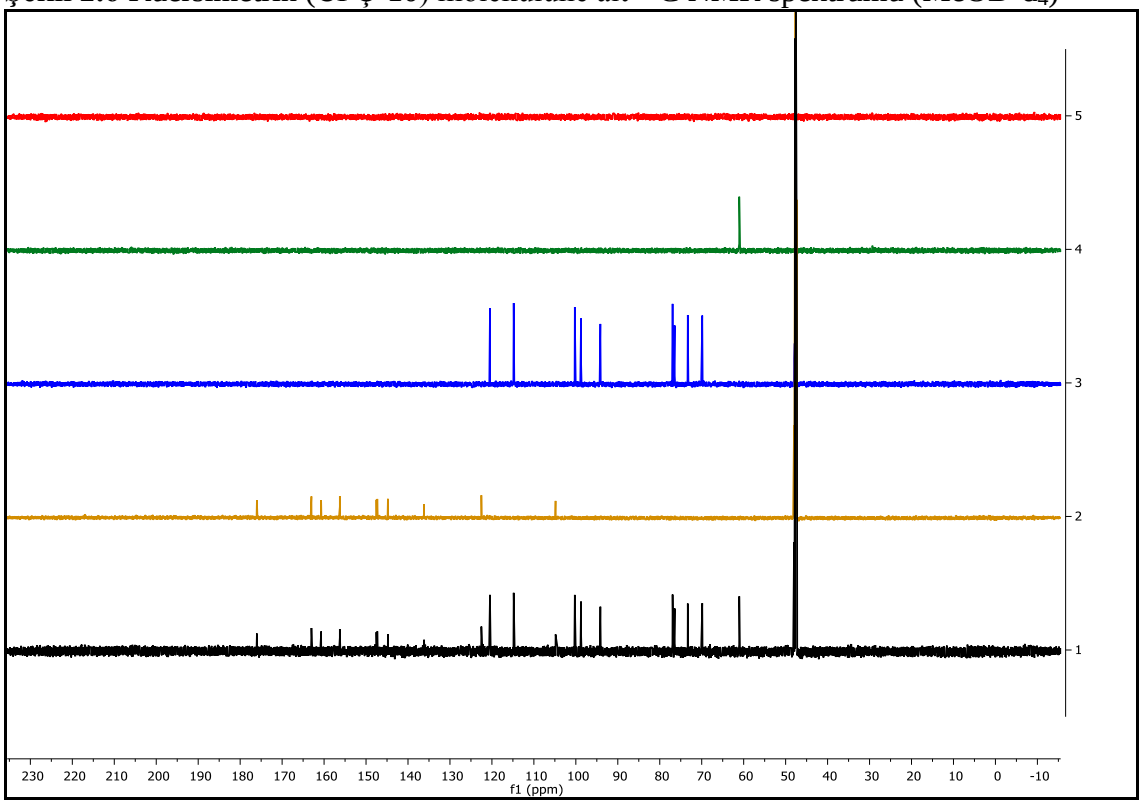
Kuersimetrin (CPÇ-10) bileşiğinin kimyasal yapısı



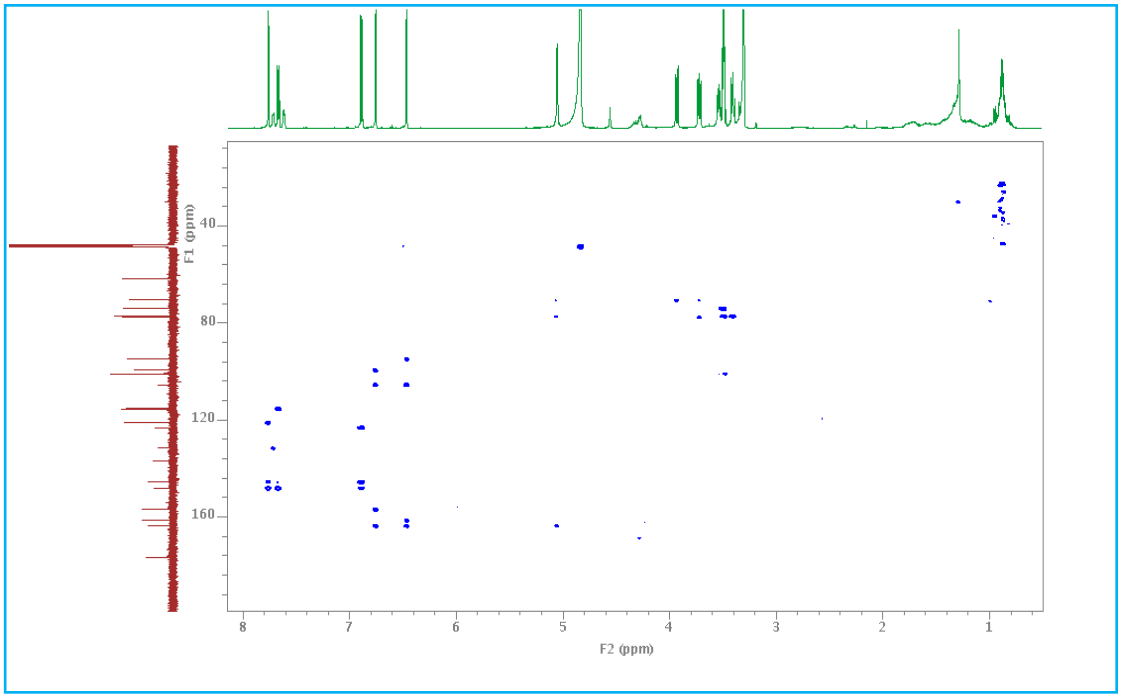
Şekil 2.5 Kuersimetrin (CPÇ-10) molekülüne ait ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)



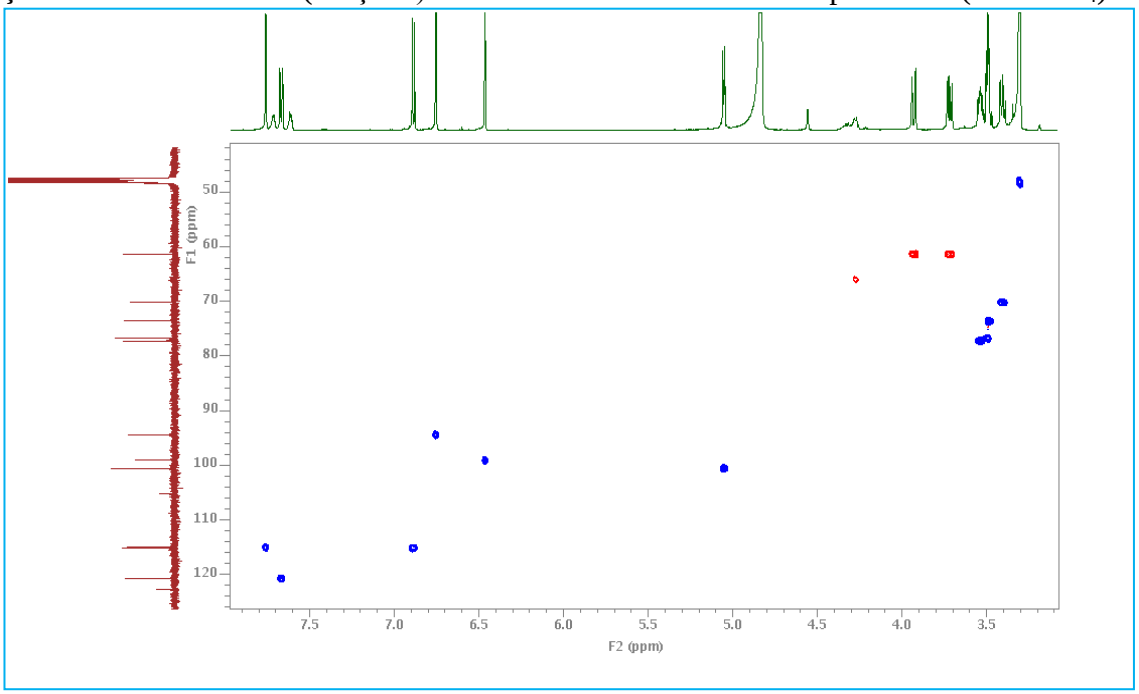
Şekil 2.6 Kuersimetrin (CPÇ-10) molekülüne ait ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)



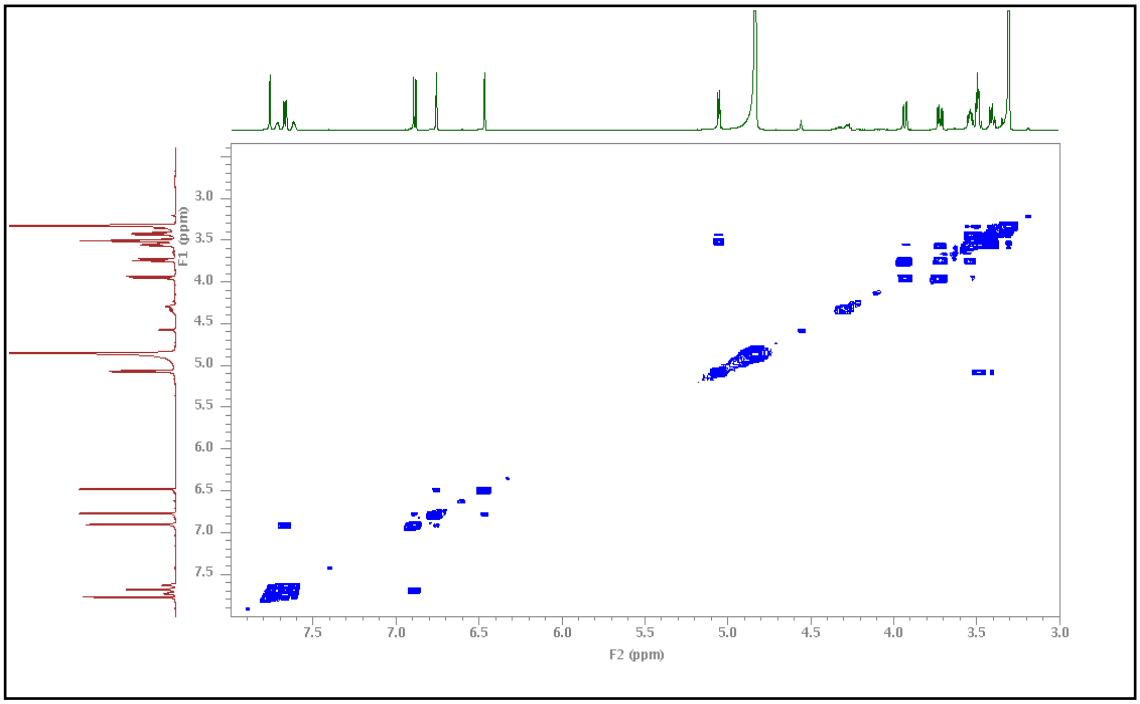
Şekil 2.7 Kuersimetrin (CPÇ-10) molekülüne ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu (MeOD-d_4)



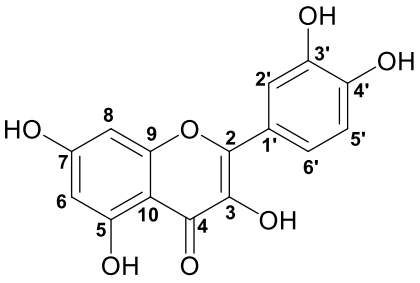
Şekil 2.8 Kuersimetrin (CPÇ-10) molekülüne ait HMBC NMR spektrumu (MeOD-d_4)



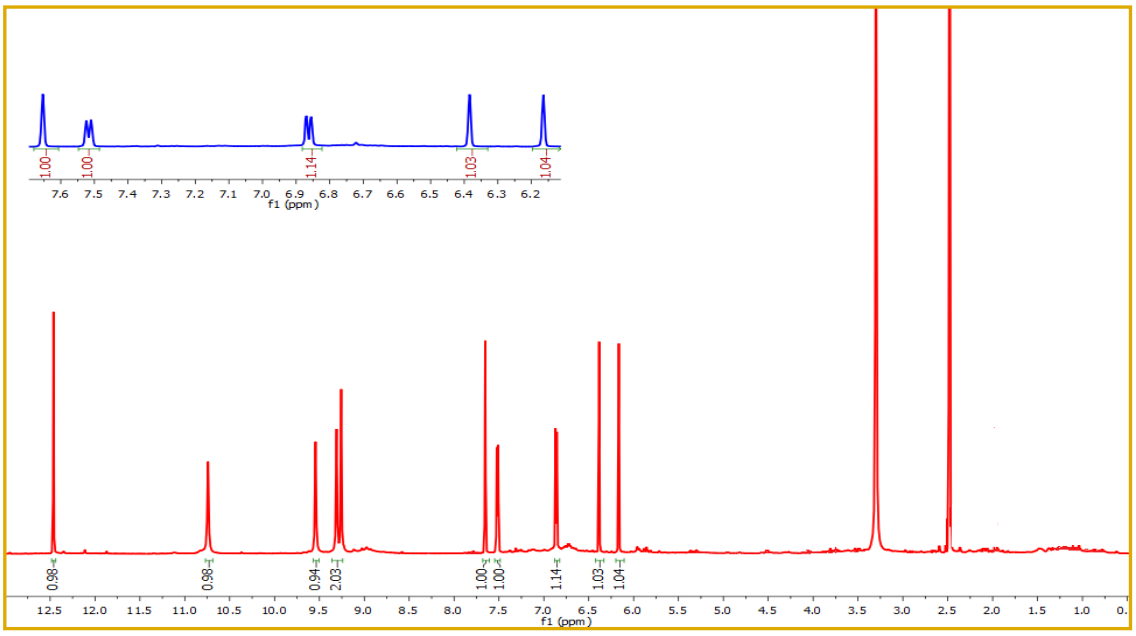
Şekil 2.9 Kuersimetrin (CPÇ-10) molekülüne ait HSQC NMR spektrumu (MeOD-d_4)



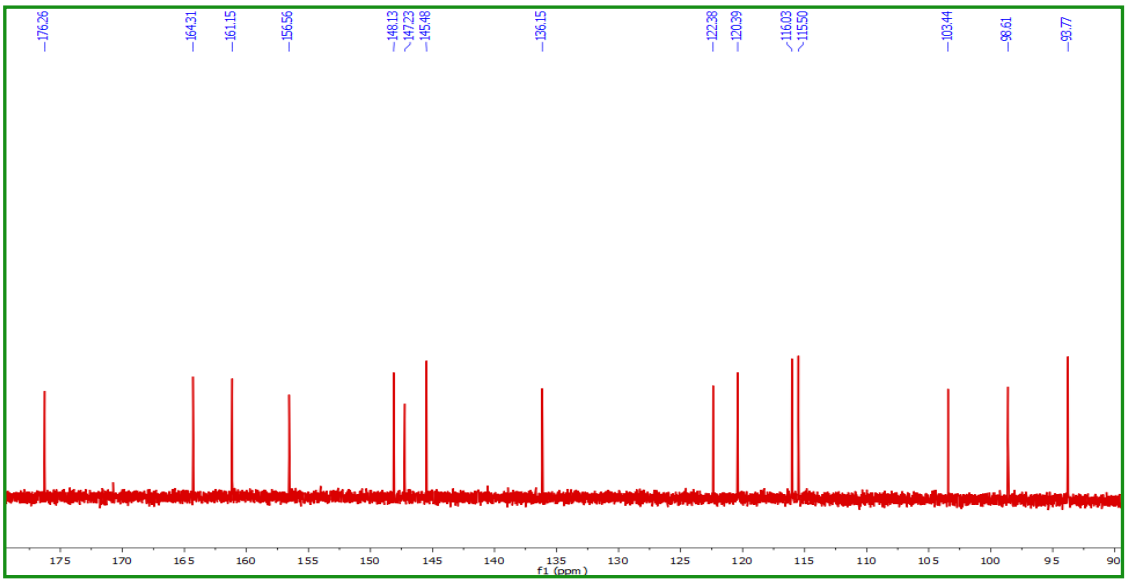
Şekil 2.10 Kuersimetrin (CPÇ-10) molekülüne ait COSY NMR spektrumu (MeOD-d_4)



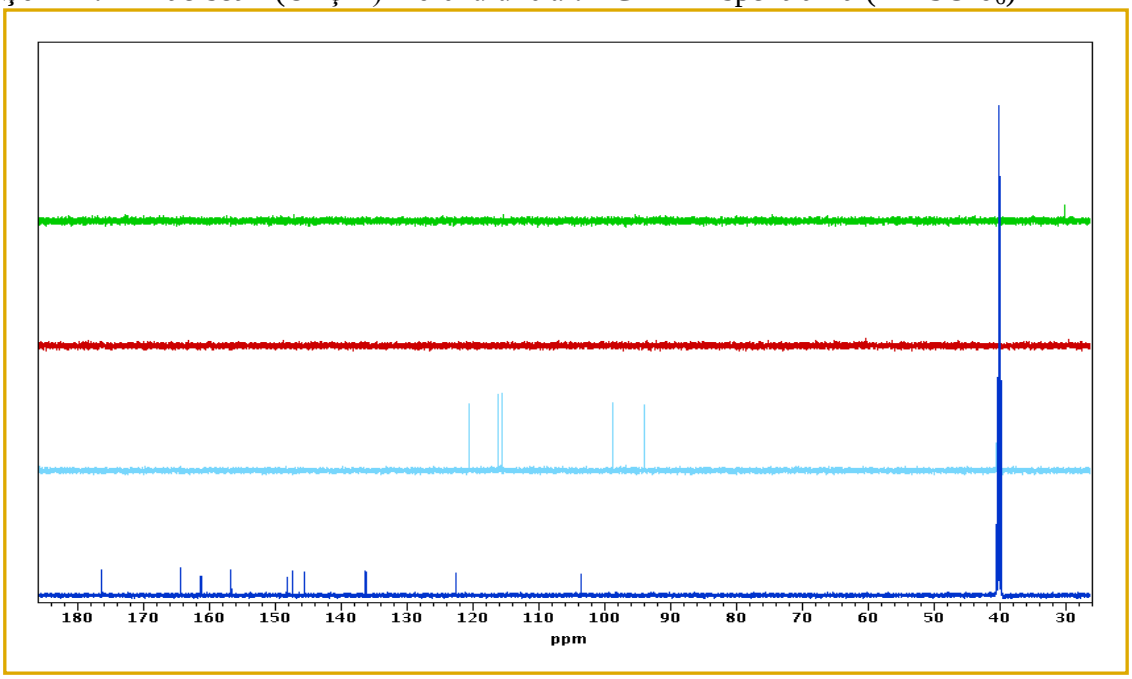
Kuersetin (CPÇ-7) bileşiğinin kimyasal yapısı



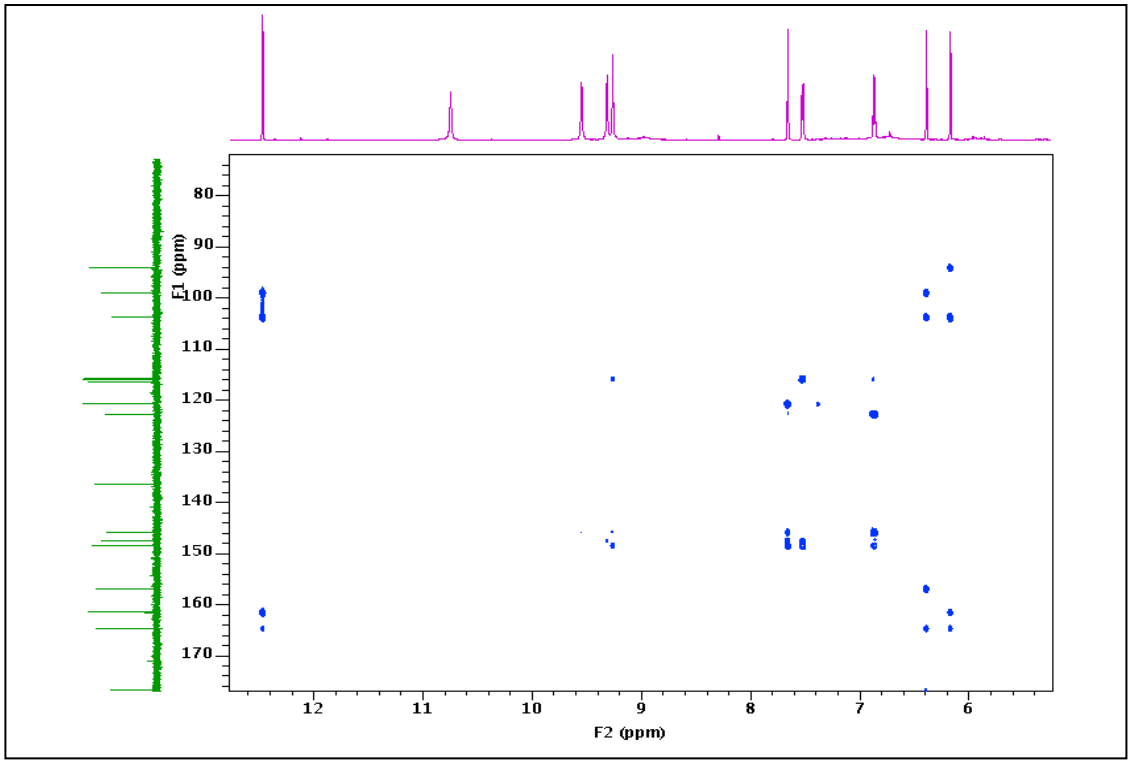
Şekil 2.11 Kuersetin (CPÇ-7) molekülüne ait ^{1}H NMR spektrumu



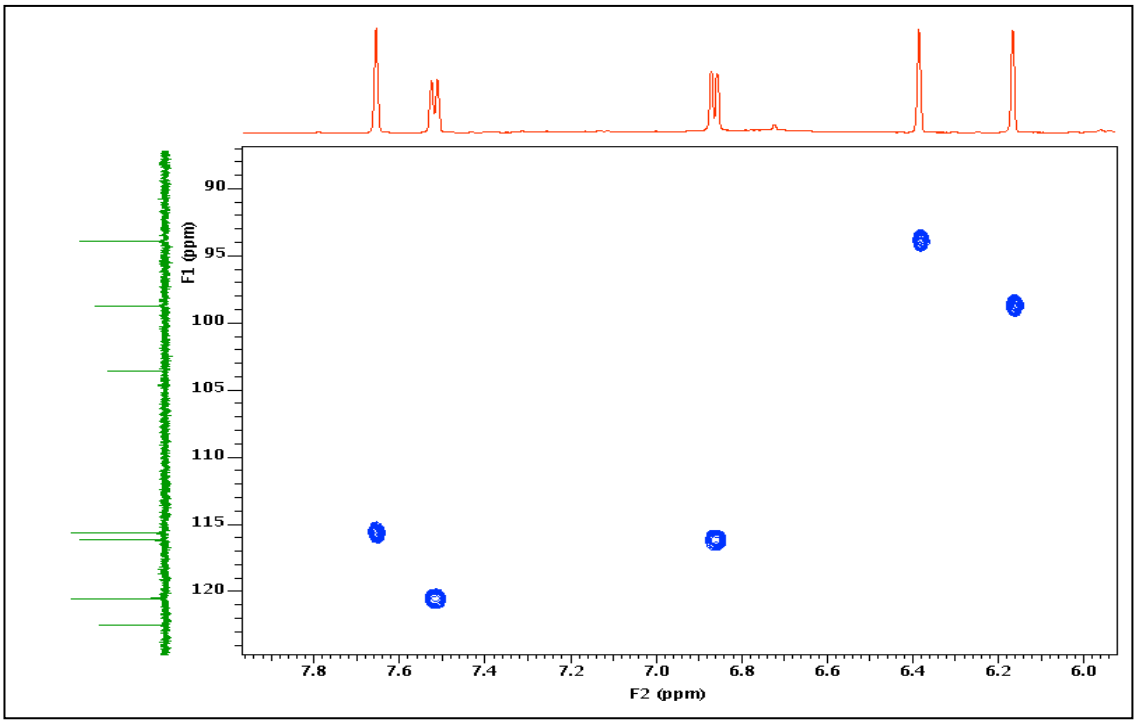
Şekil 2.12 Kuersetin (CPÇ-7) molekülüne ait ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



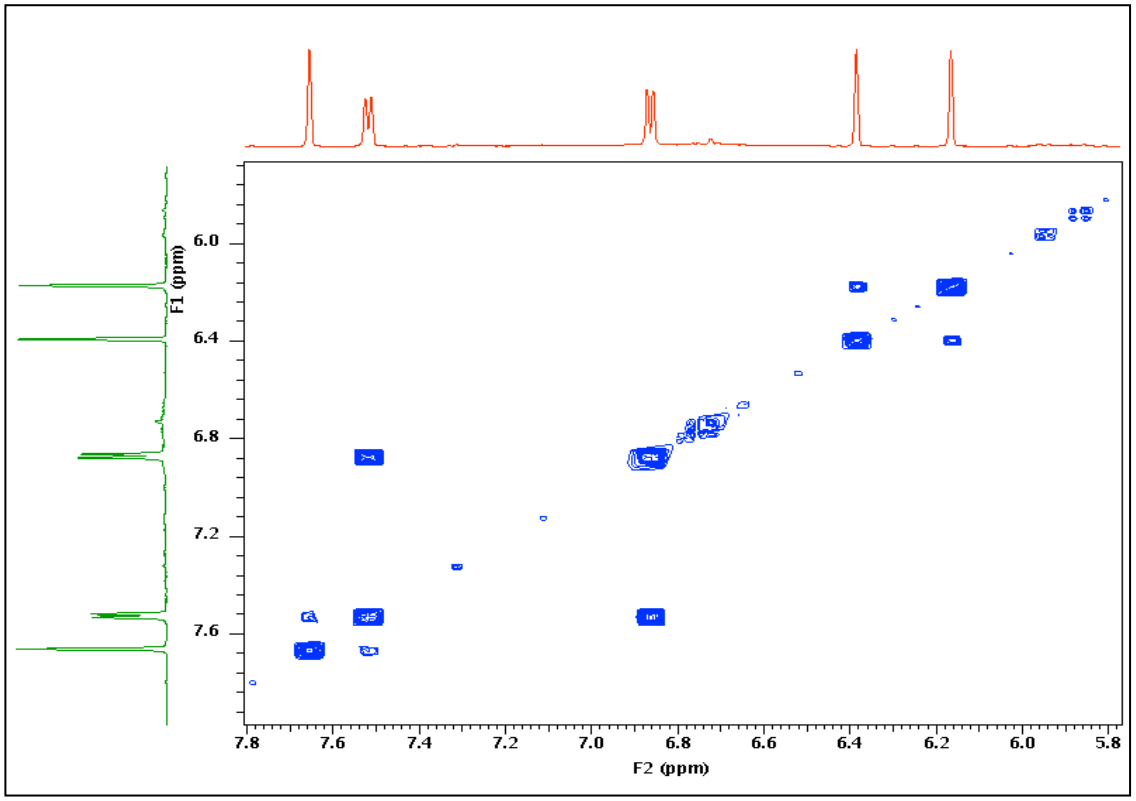
Şekil 2.13 Kuersetin (CPÇ-7) molekülüne ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



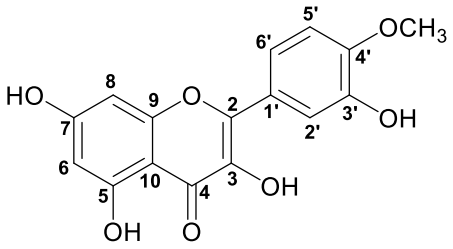
Şekil 2.14 Kuersetin (CPÇ-7) molekülüne ait HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



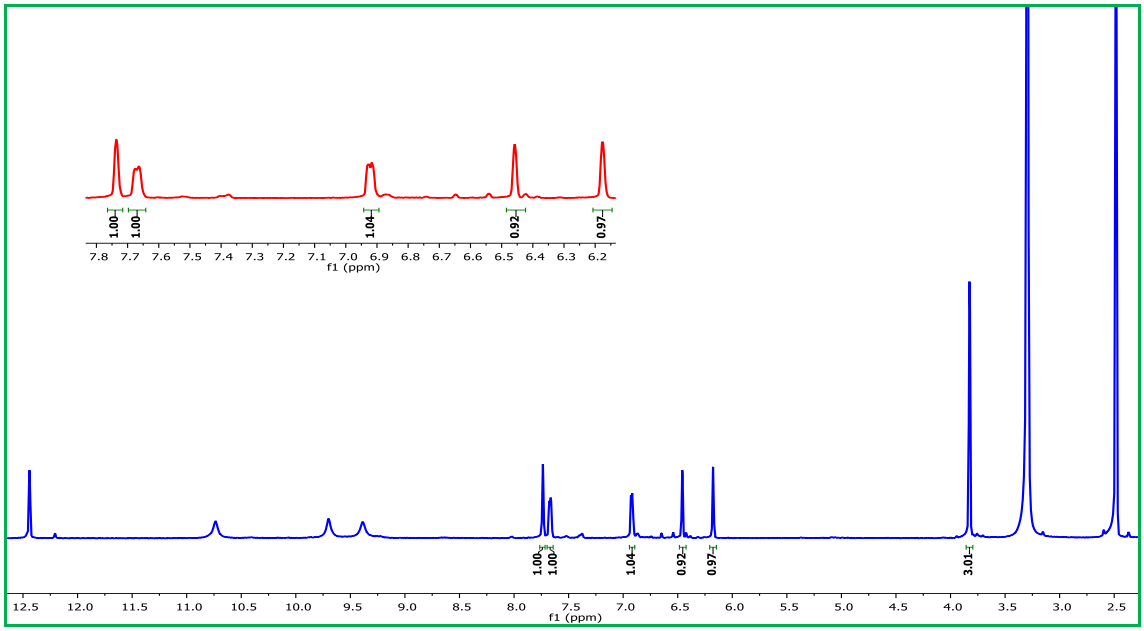
Şekil 2.15 Kuersetin (CPÇ-7) molekülüne ait HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



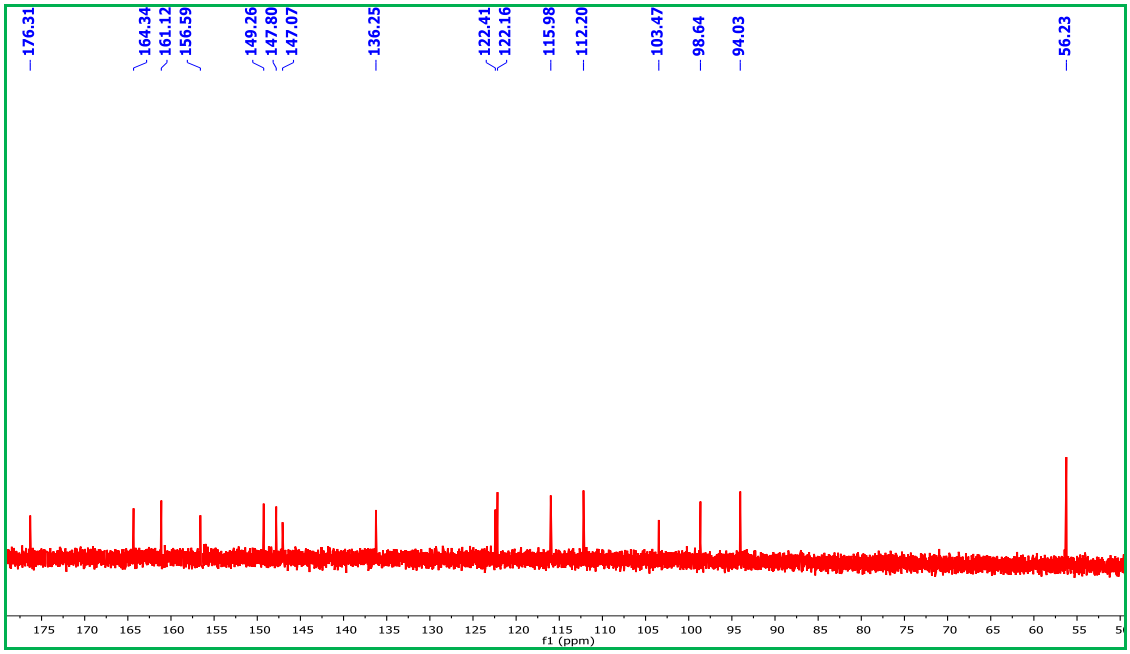
Şekil 2.16 Kuersetin (CPÇ-7) molekülüne ait COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



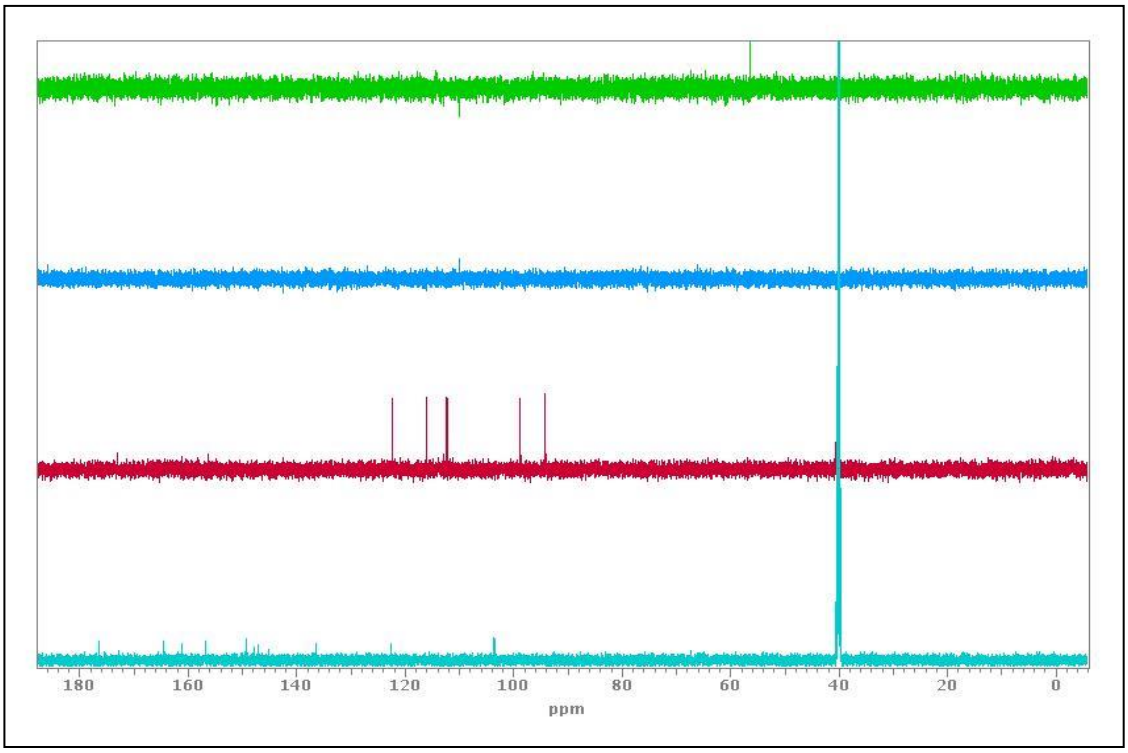
Tamariksetin (CPÇ-5) bileşiğinin kimyasal yapısı



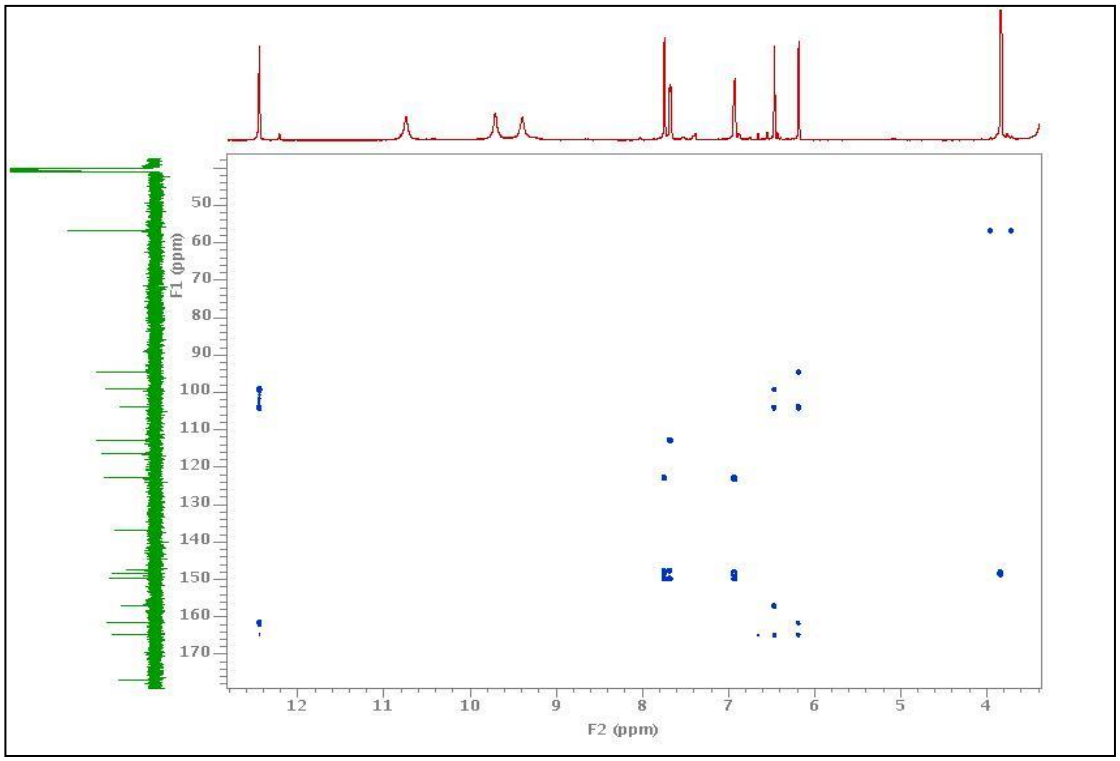
Şekil 2.17 Tamariksetin (CPÇ-5) molekülüne ait ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



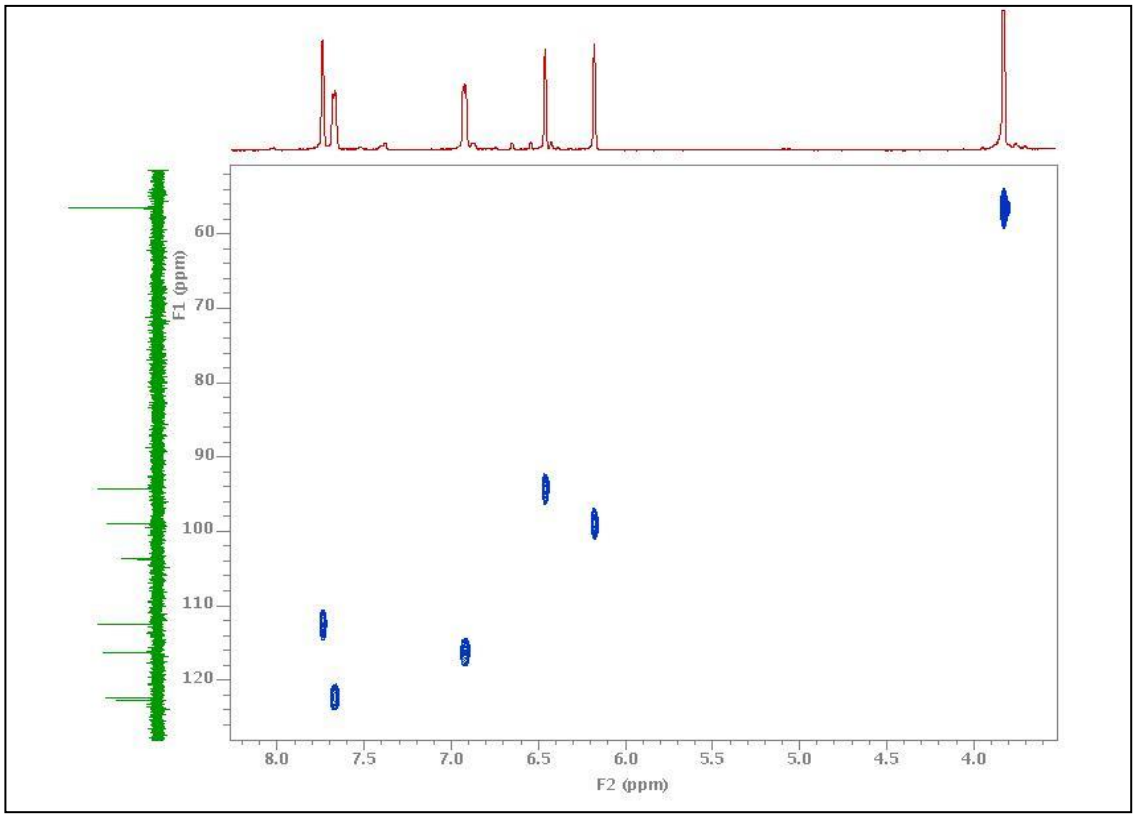
Şekil 2.18 Tamariksetin (CPÇ-5) molekülüne ait ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



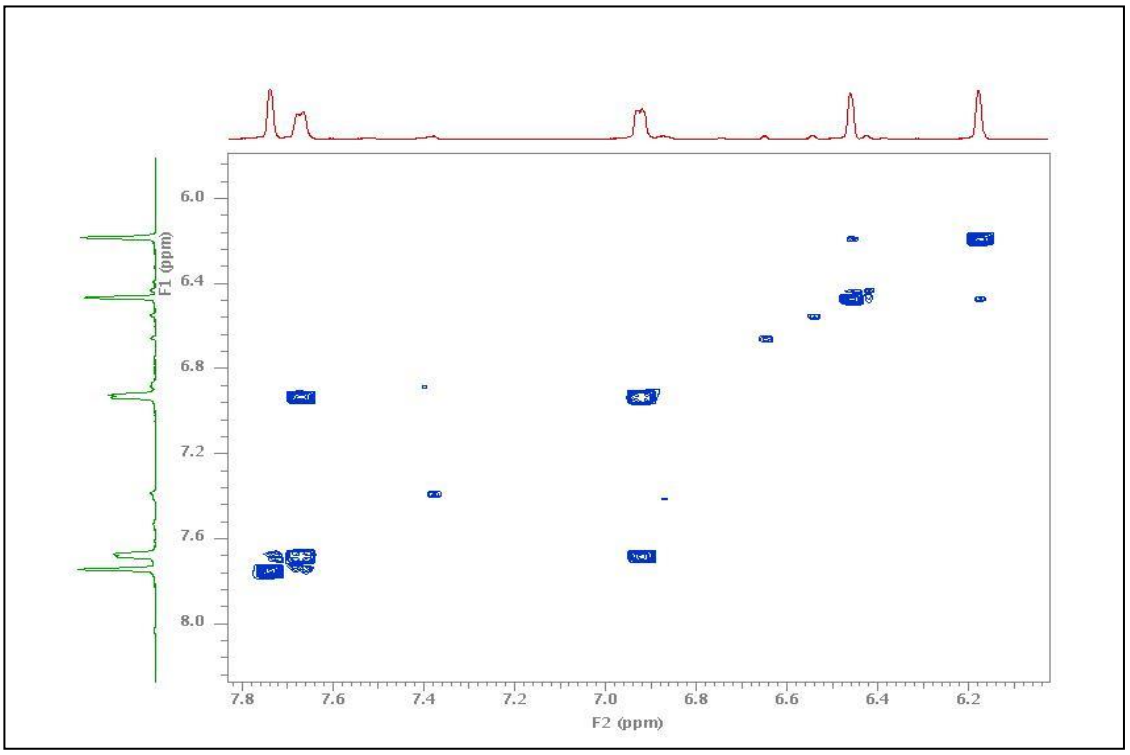
Şekil 2.19 Tamariksetin (CPÇ-5) molekülüne ait ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



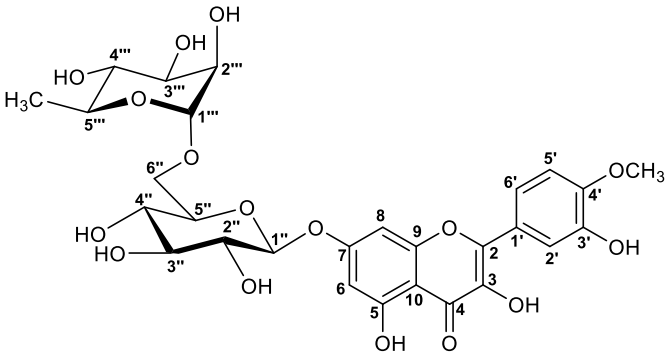
Şekil 2.20 Tamariksetin (CPÇ-5) molekülüne ait HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



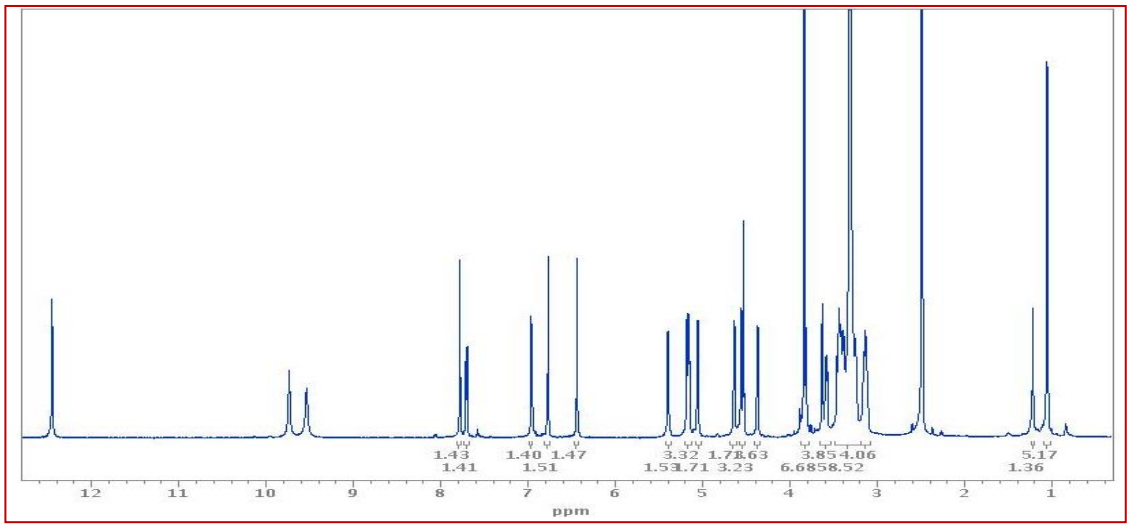
Şekil 2.21 Tamariksetin (CPÇ-5) molekülüne ait HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



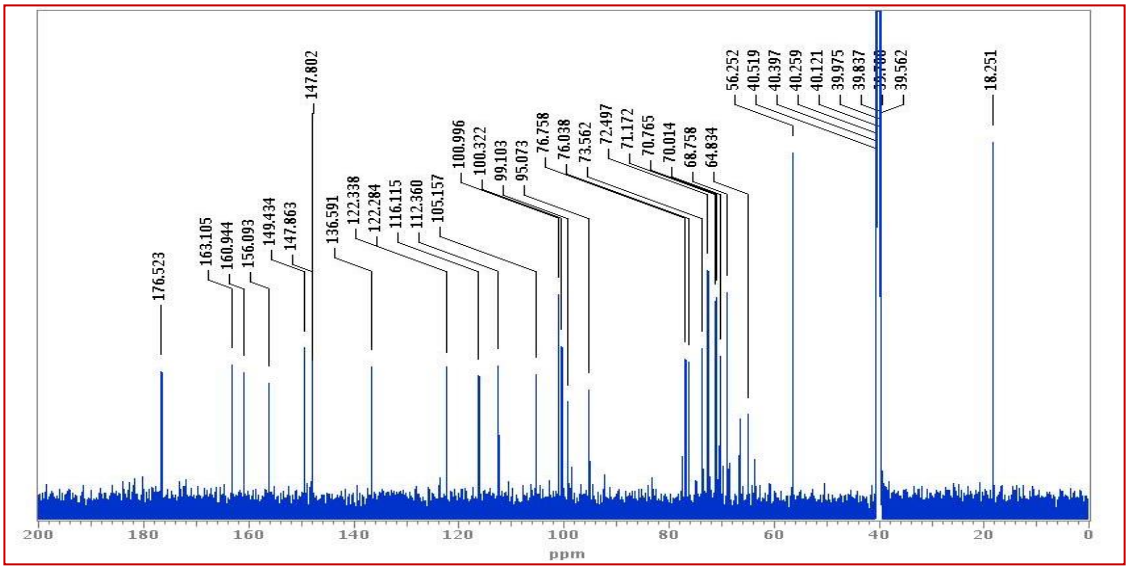
Şekil 2.22 Tamariksetin (CPÇ-5) molekülüne ait COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



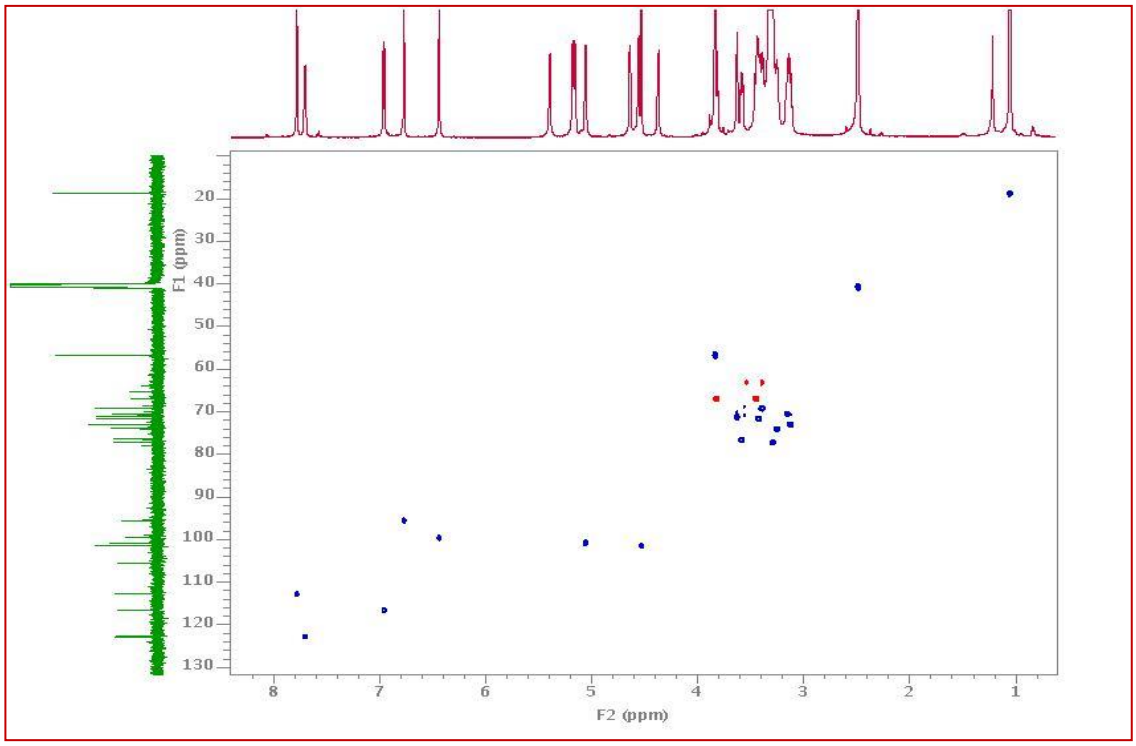
Tamariksetin 7-*O*-β rutinozit (CPÇ-13) bileşiğinin kimyasal yapısı



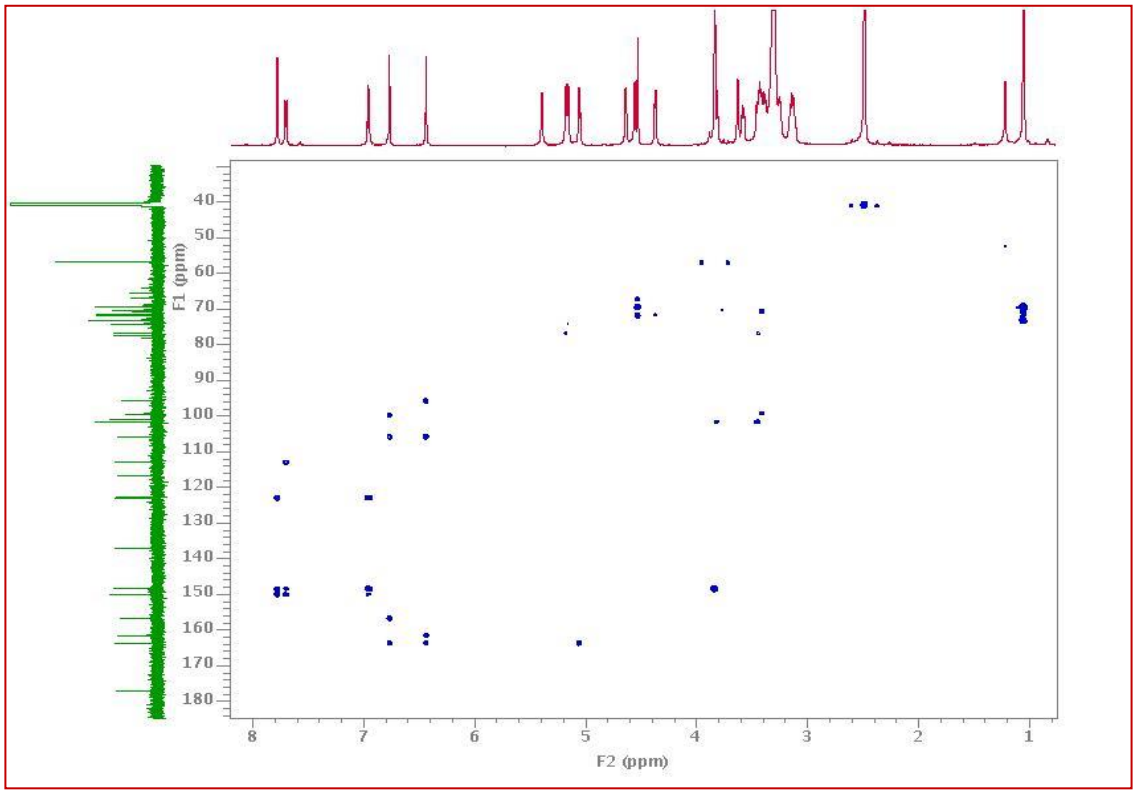
Şekil 2.23 Tamariksetin 7-*O*-β rutinozit (CPÇ-13) molekülünün ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



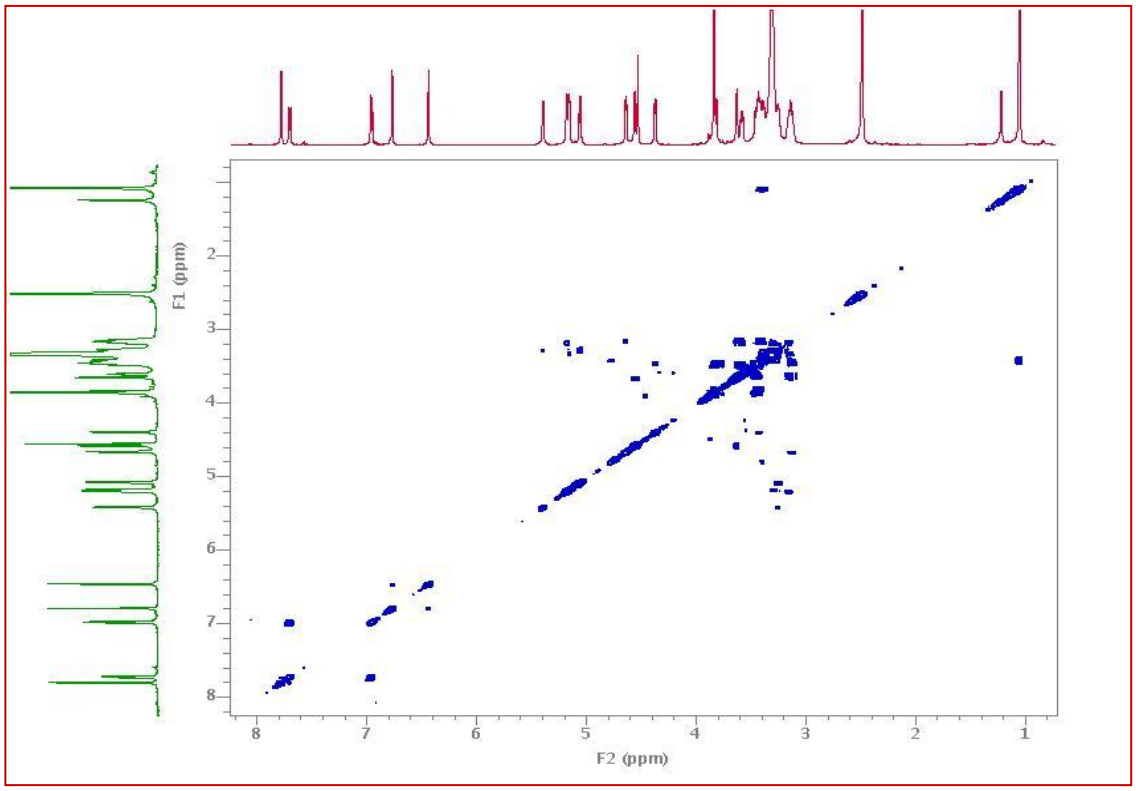
Şekil 2.24 Tamariksetin 7-*O*-β rutinozit (CPÇ-13) molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



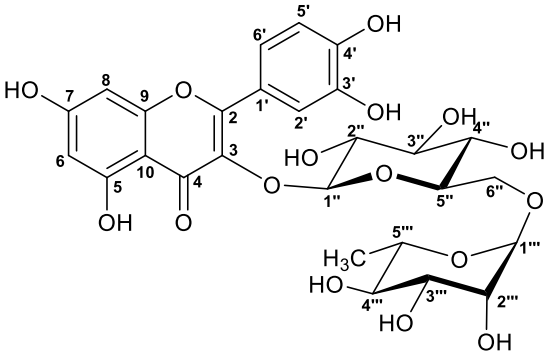
Şekil 2.25 Tamariksetin 7-*O*-β rutinozit (CPÇ-13) molekülünün HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



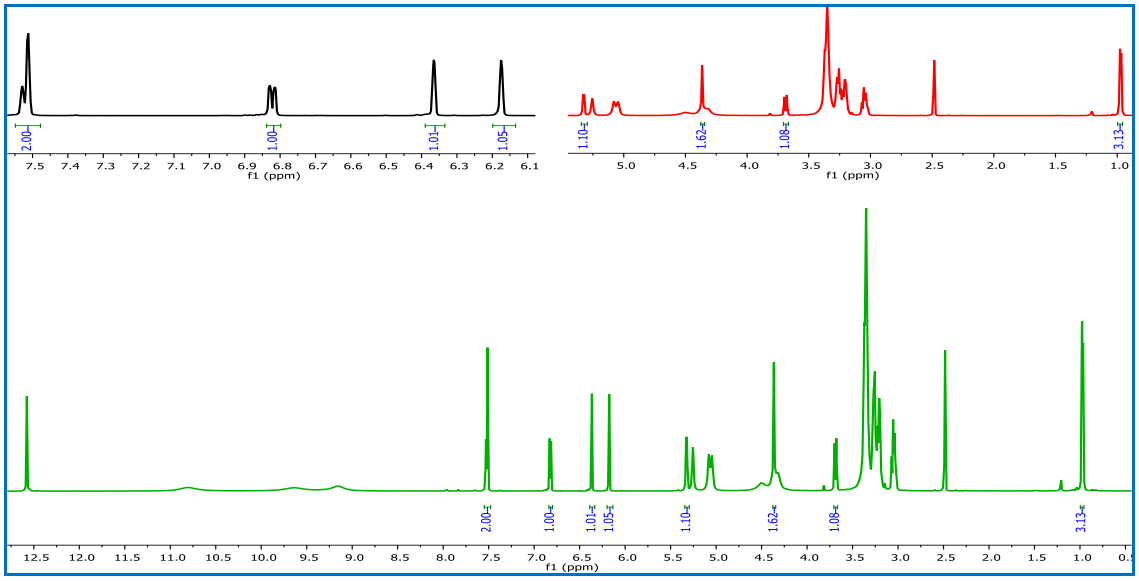
Şekil 2.26 Tamariksetin 7-*O*-β rutinozit (CPÇ-13) molekülünün HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



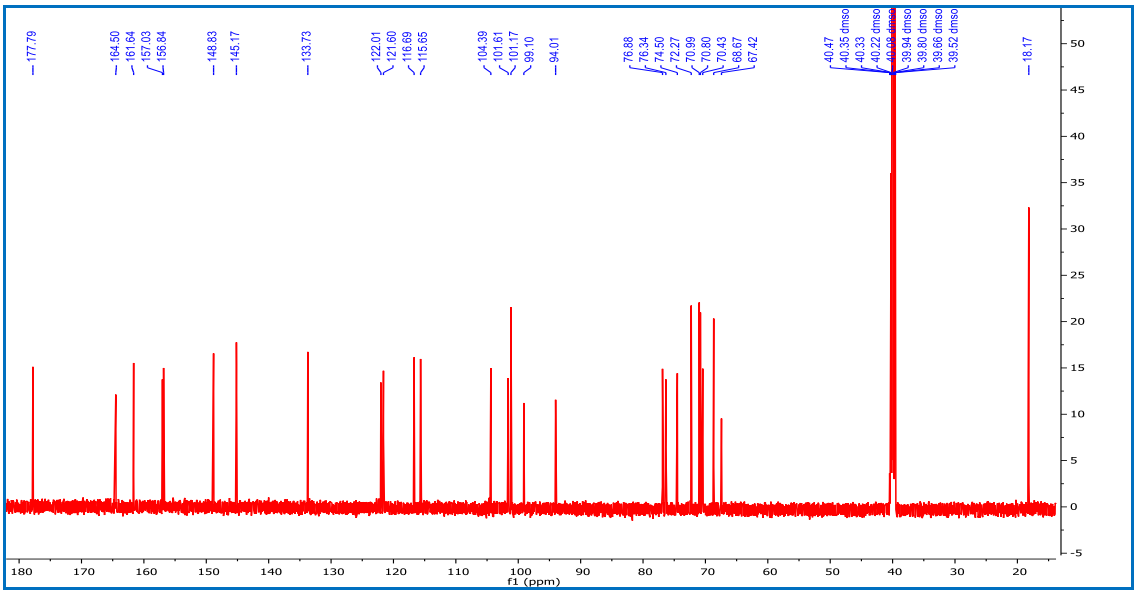
Şekil 2.27 Tamariksetin 7-*O*-β rutinozit (CPÇ-13) molekülünün COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



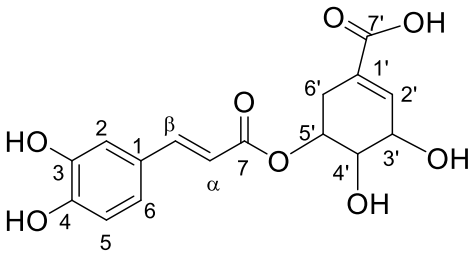
Rutin (CPÇ-14) bileşiğinin kimyasal yapısı



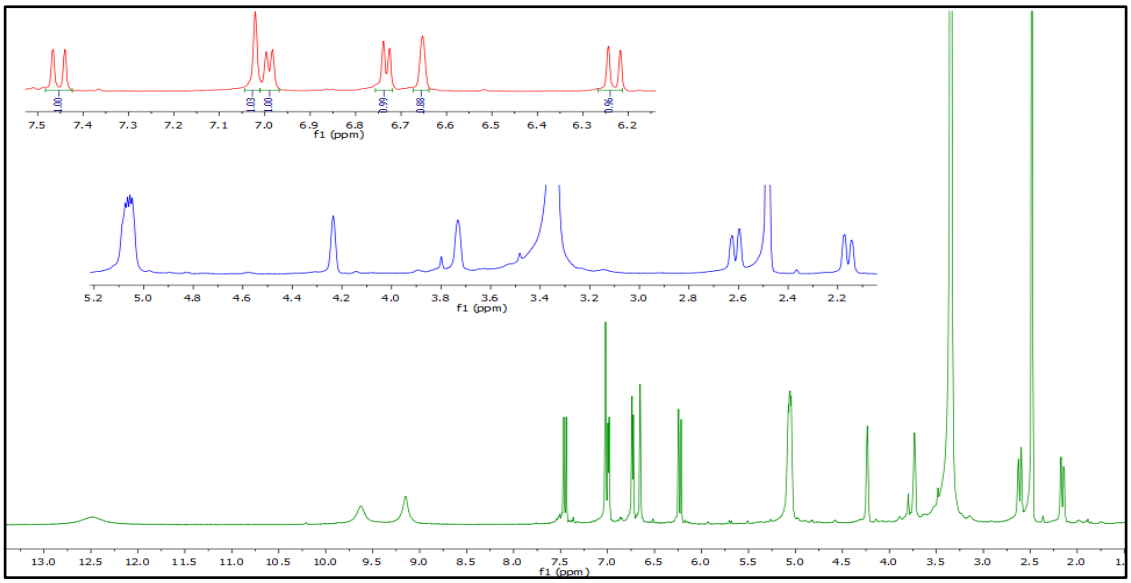
Şekil 2.28 Rutin (CPÇ-14) molekülünün ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



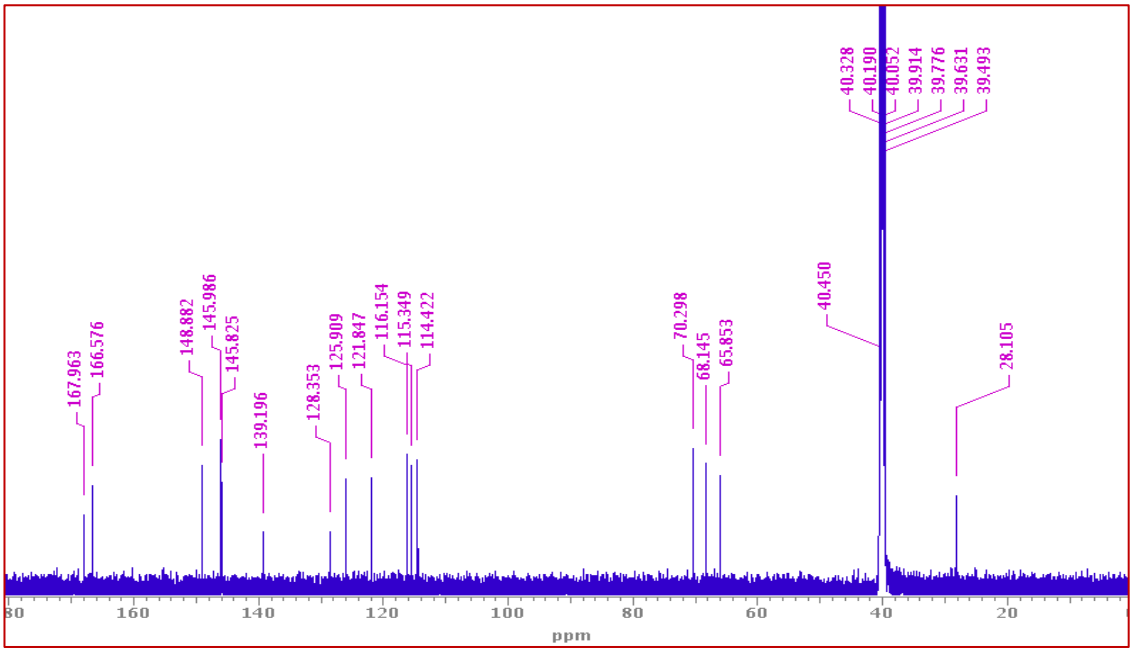
Şekil 2.29 Rutin (CPÇ-14) molekülünün ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



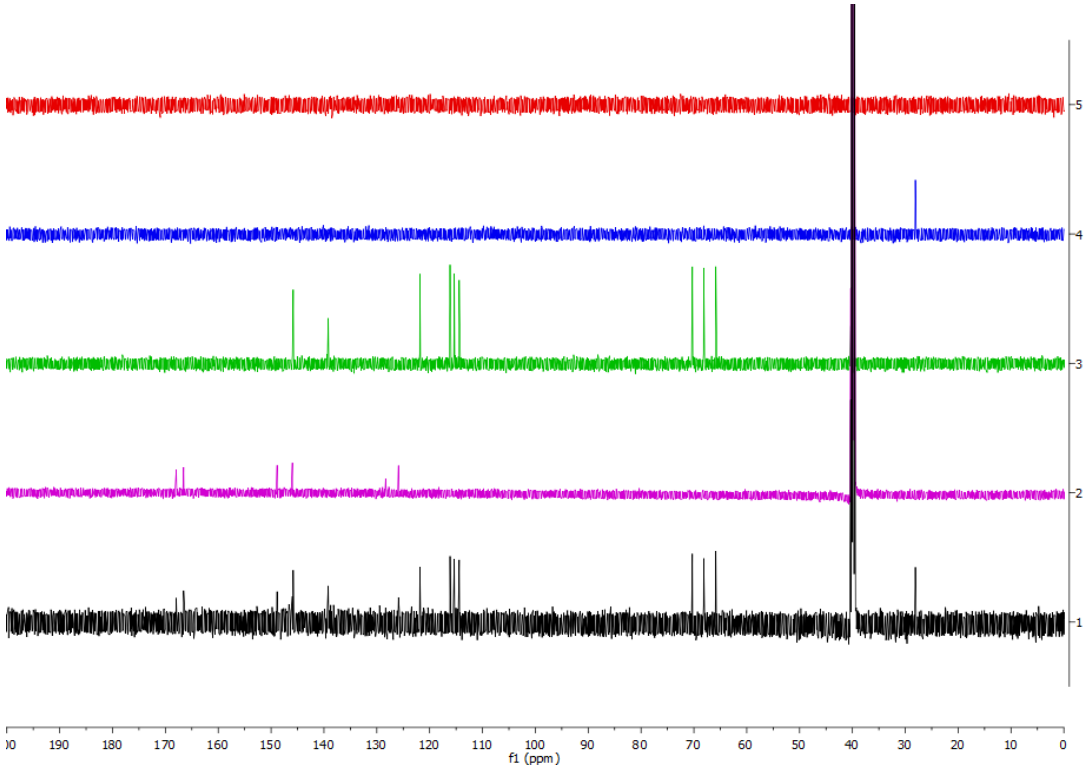
5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin kimyasal yapısı



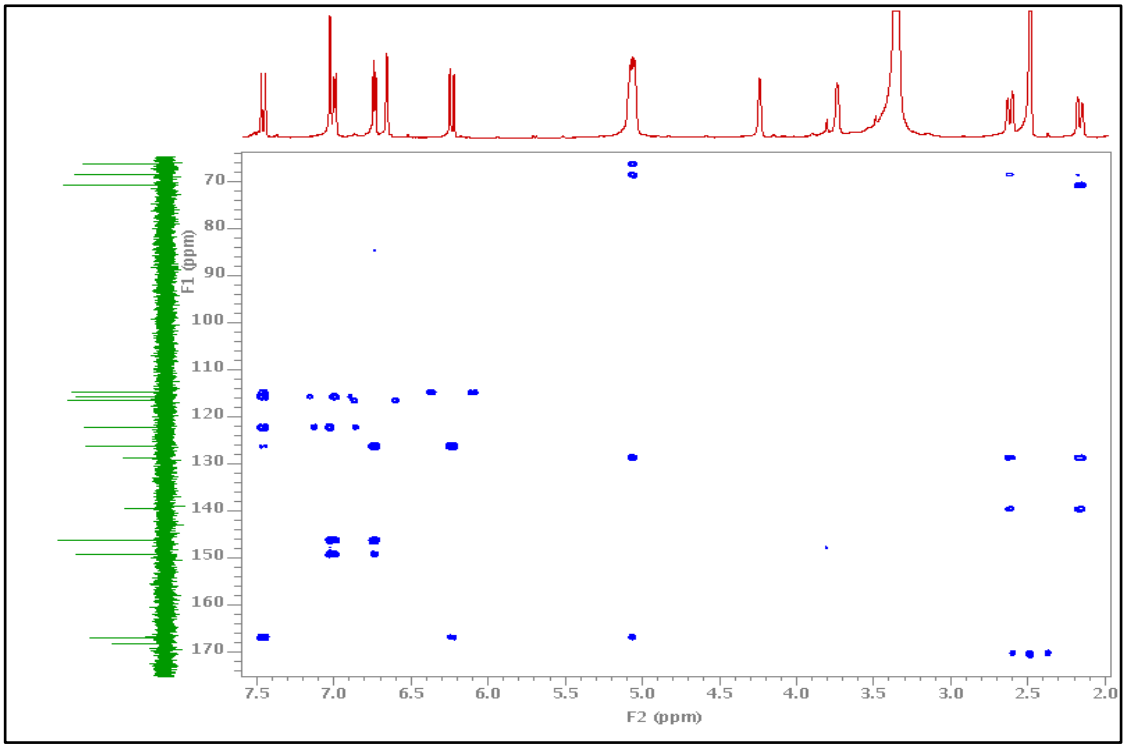
Şekil 2.30 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



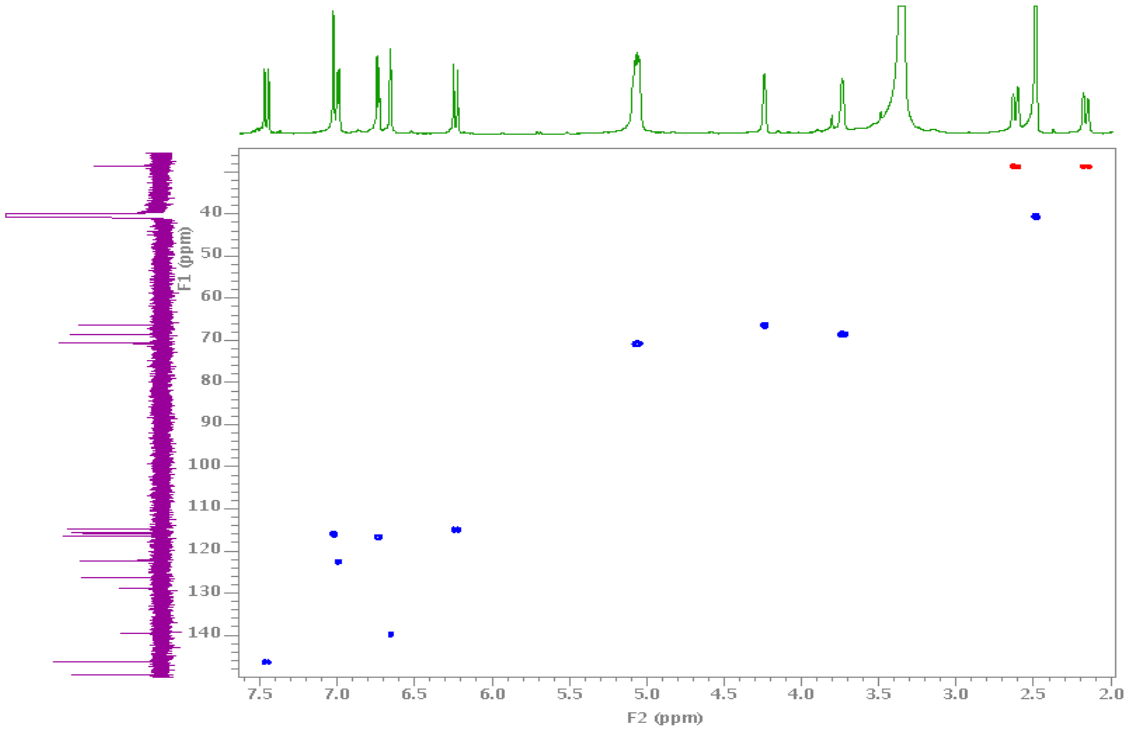
Şekil 2.31 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



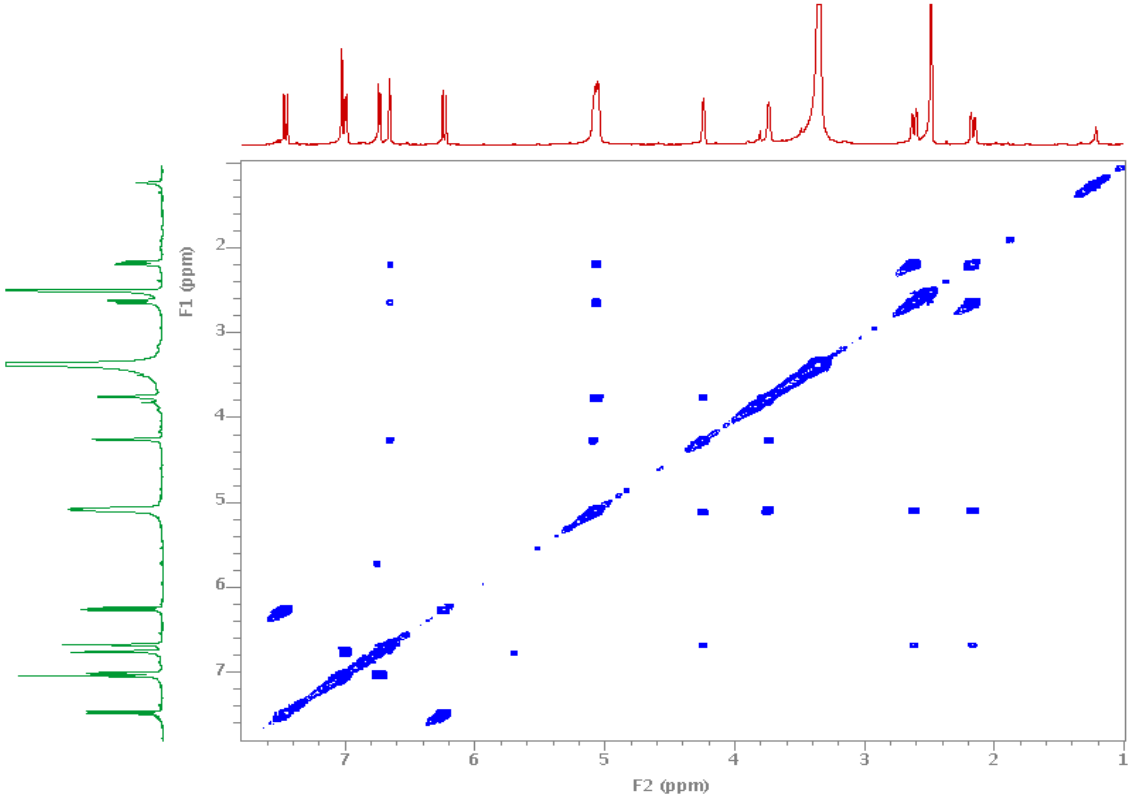
Şekil 2.32 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



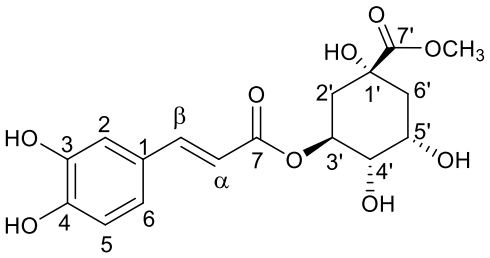
Şekil 2.33 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



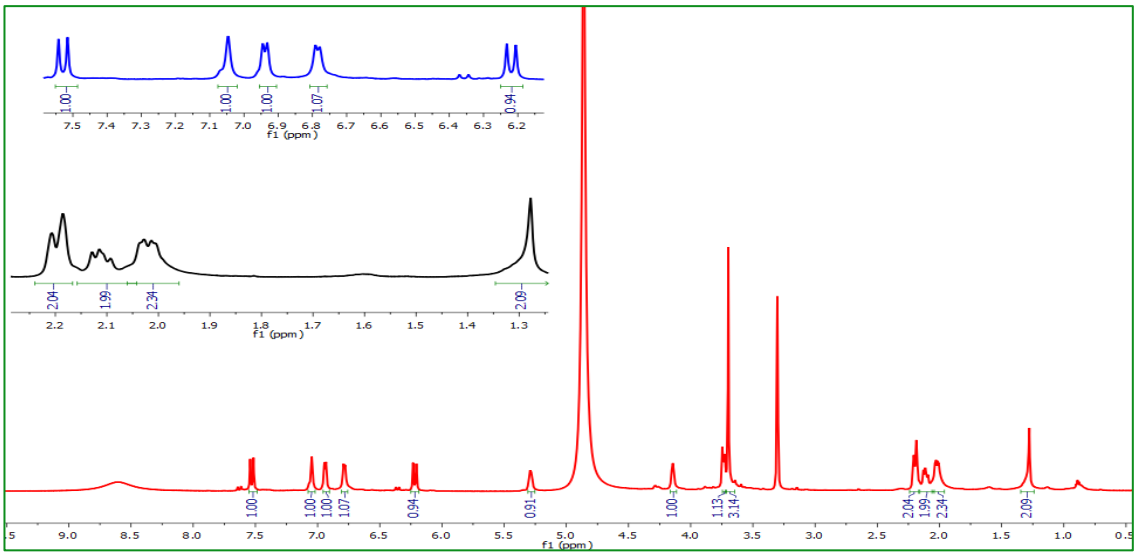
Şekil 2.34 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



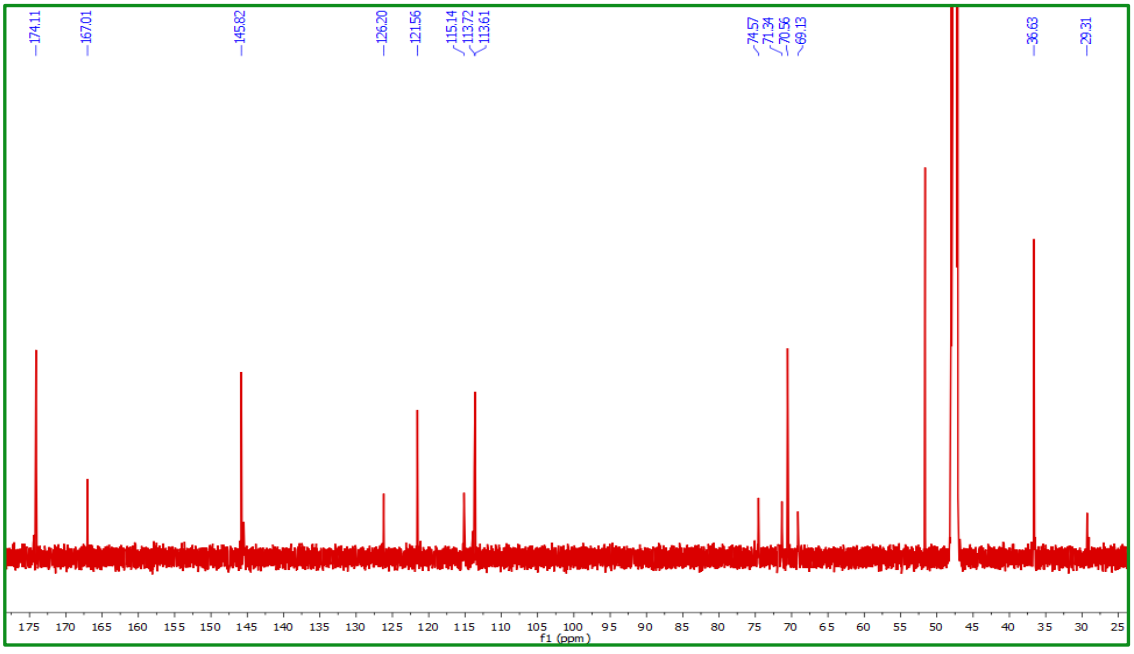
Şekil 2.35 5-*O*-kafeoil şikimik asit **(**CPÇ-4) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



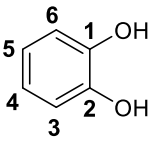
Klorojenik asit metil ester (CPÇ-6) bileşiğinin kimyasal yapısı



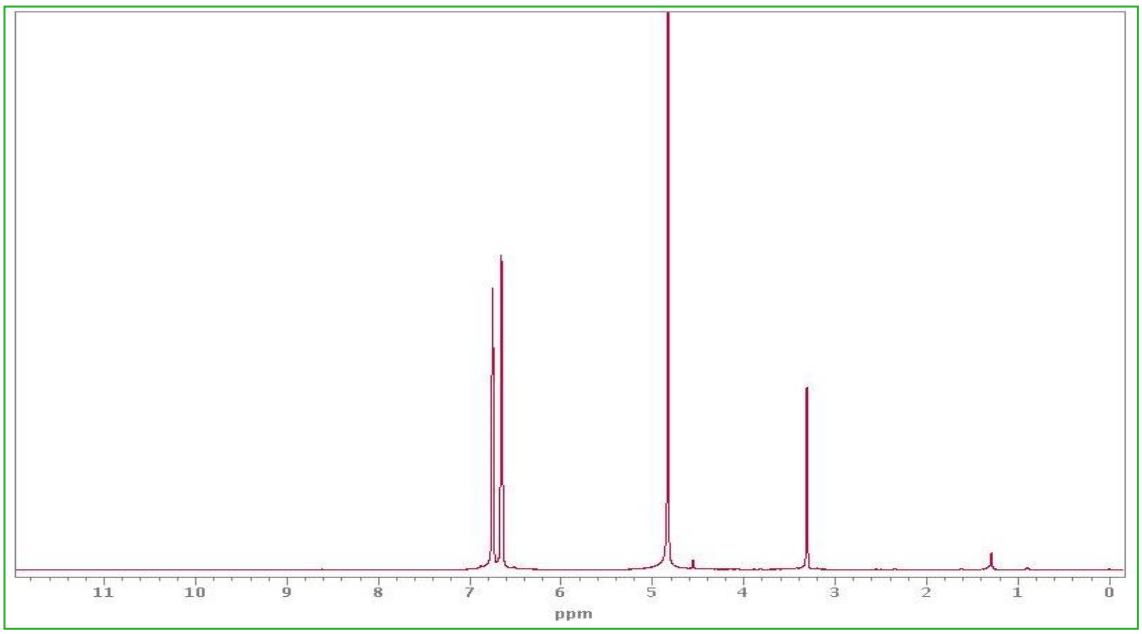
Şekil 2.36 Klorojenik asit metil ester (CPÇ-6) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)



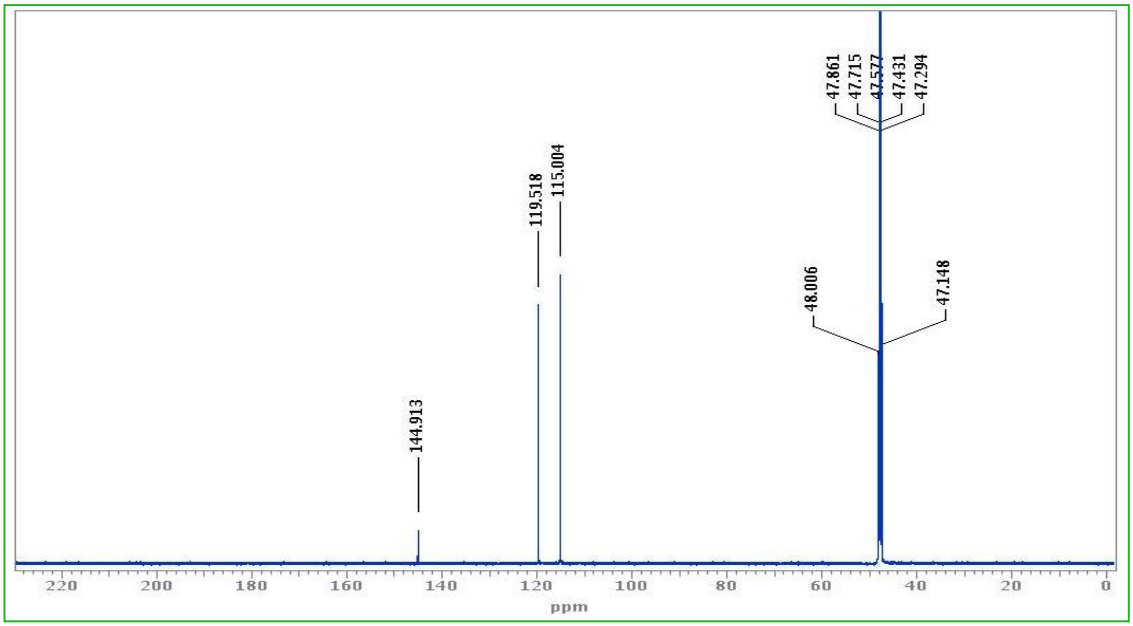
Şekil 2.37 Klorojenik asit metil ester (CPÇ-6) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)



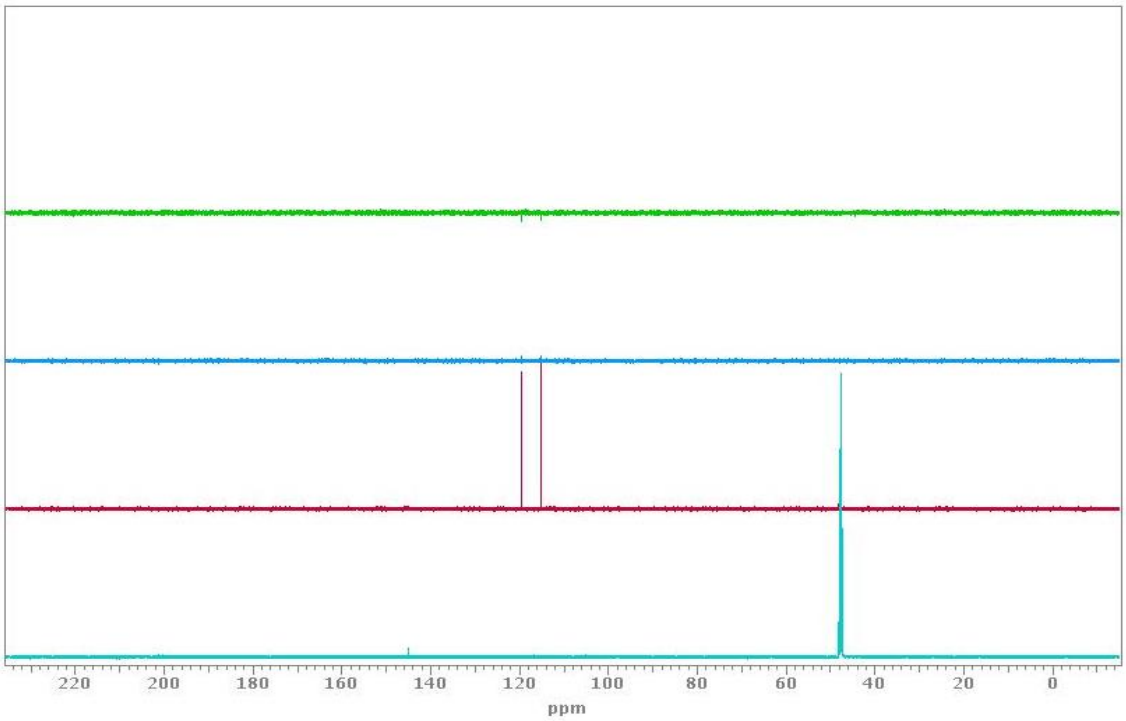
Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin kimyasal yapısı



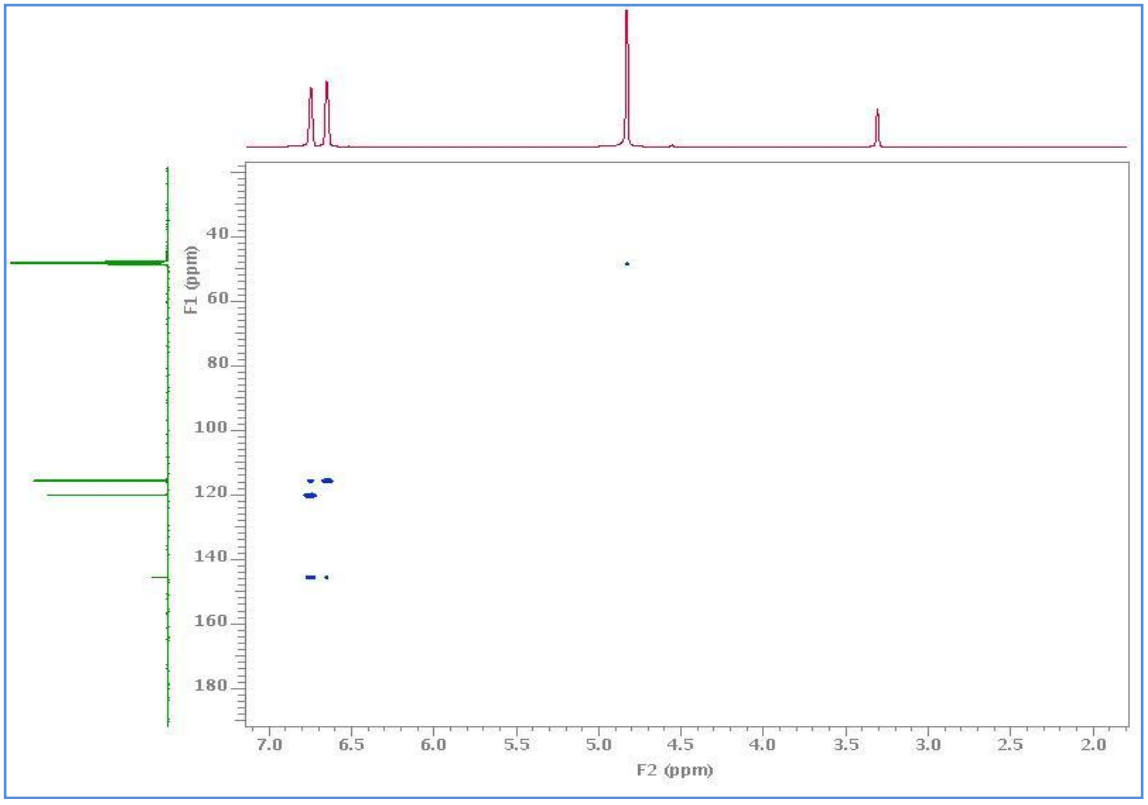
Şekil 2.38 Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (MeOD-d_4)



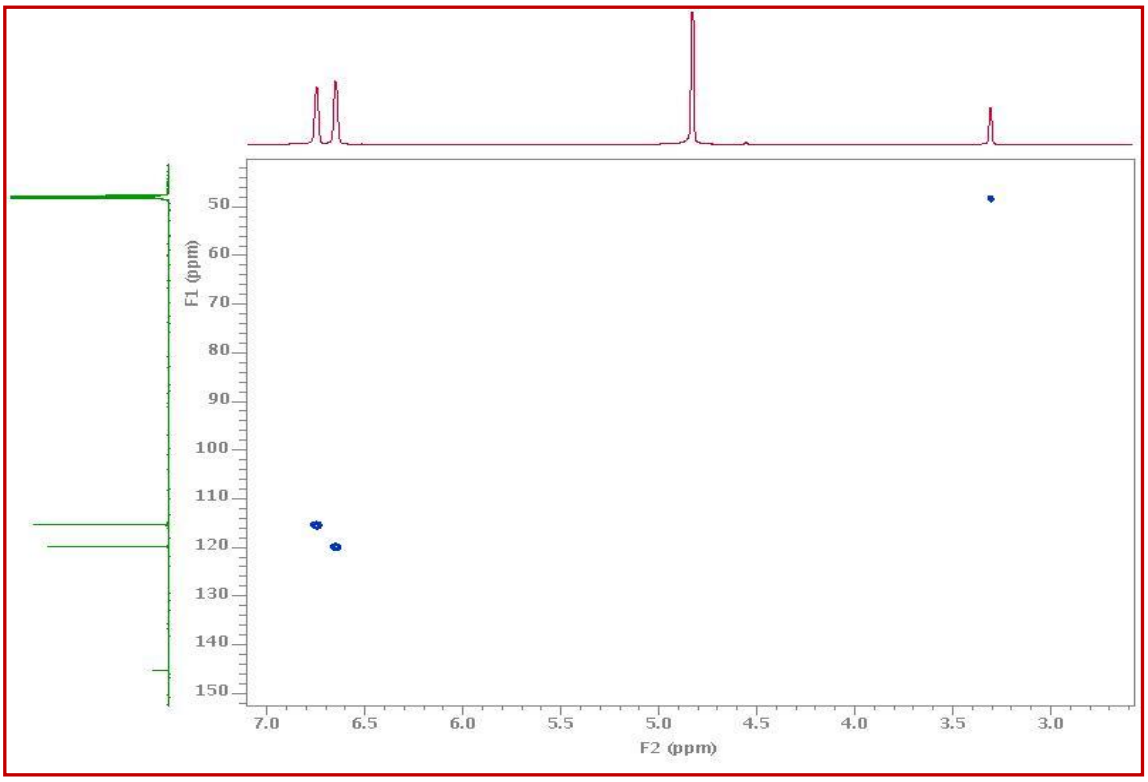
Şekil 2.39 Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (MeOD-d_4)



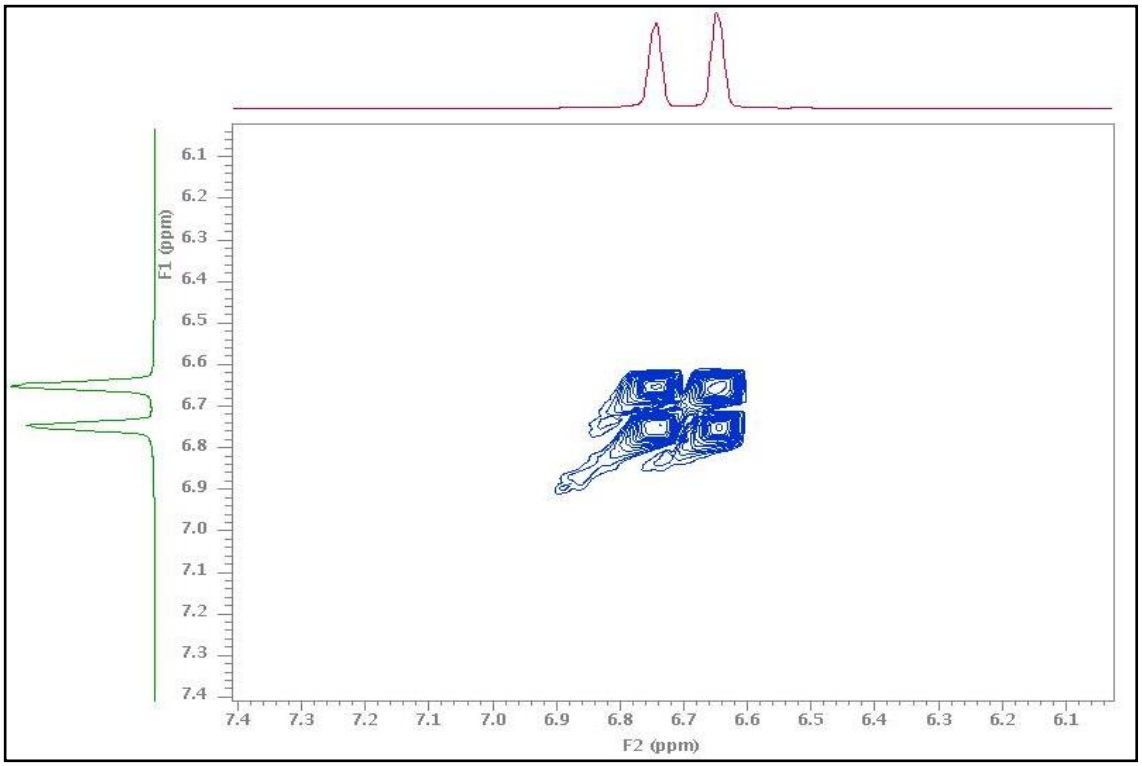
Şekil 2.40 Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (MeOD-d_4)



Şekil 2.41 Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (MeOD-d_4)

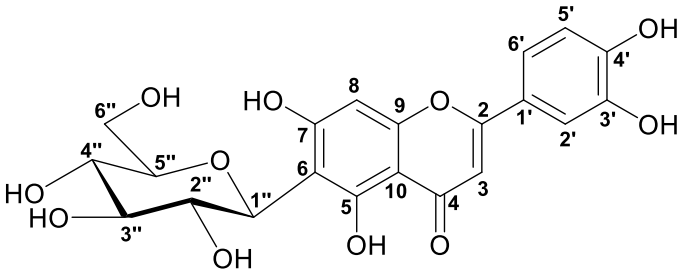


Şekil 2.42 Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (MeOD-d_4)

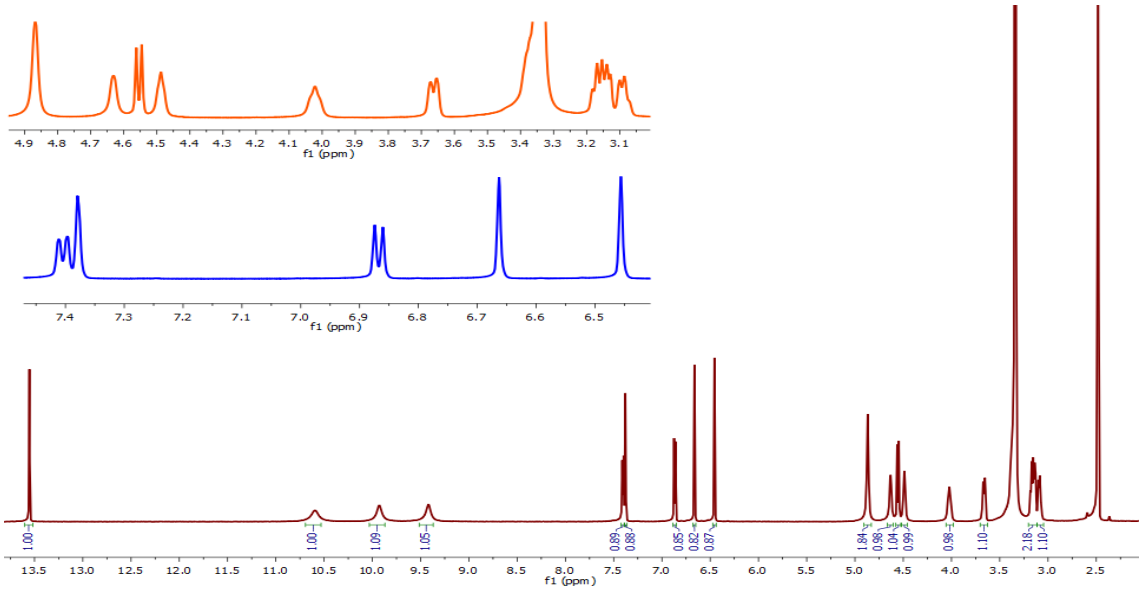


Şekil 2.43 Pirokateşol (CPÇ-1) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (MeOD-d_4)

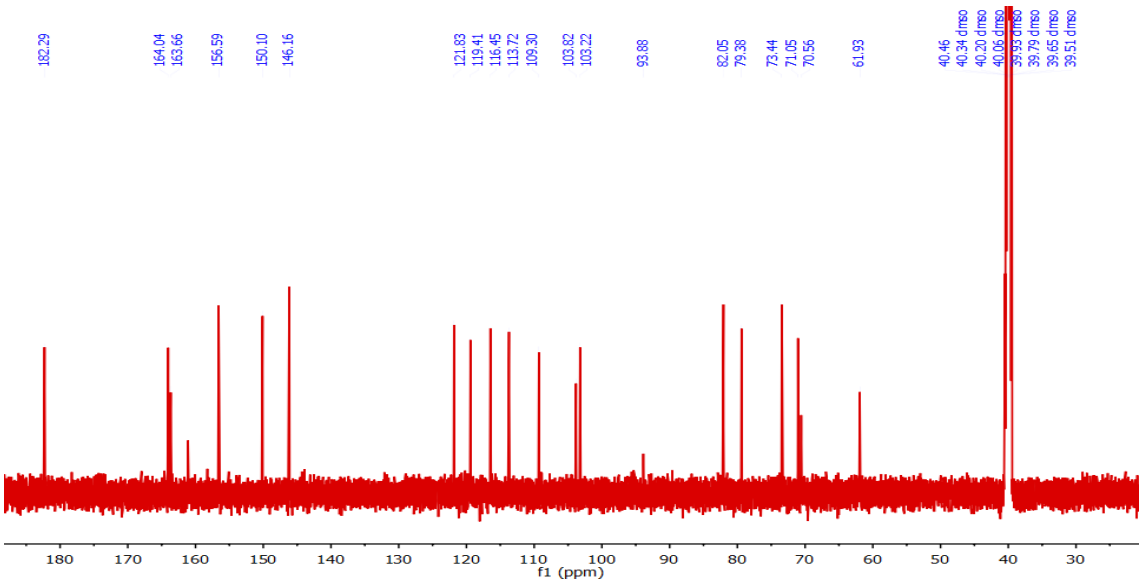
EK 3 CPGY bitkisinden izole edilen bileşiklere ait spektral veriler



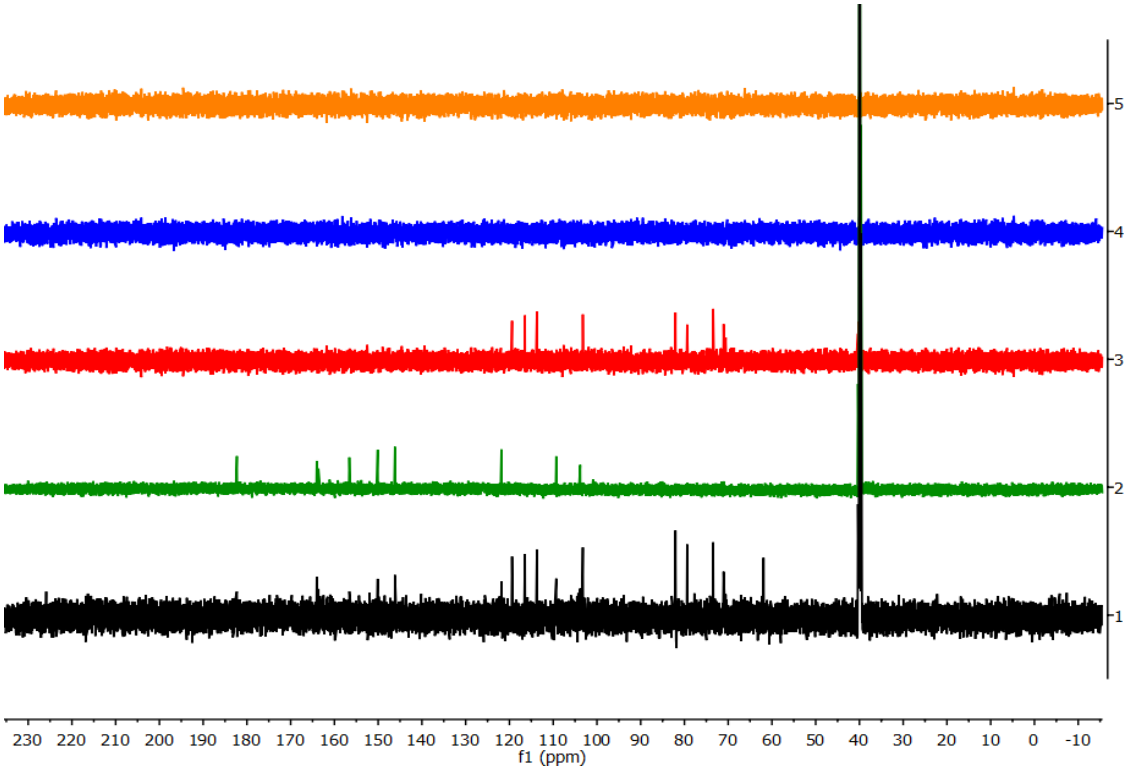
İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin kimyasal yapısı



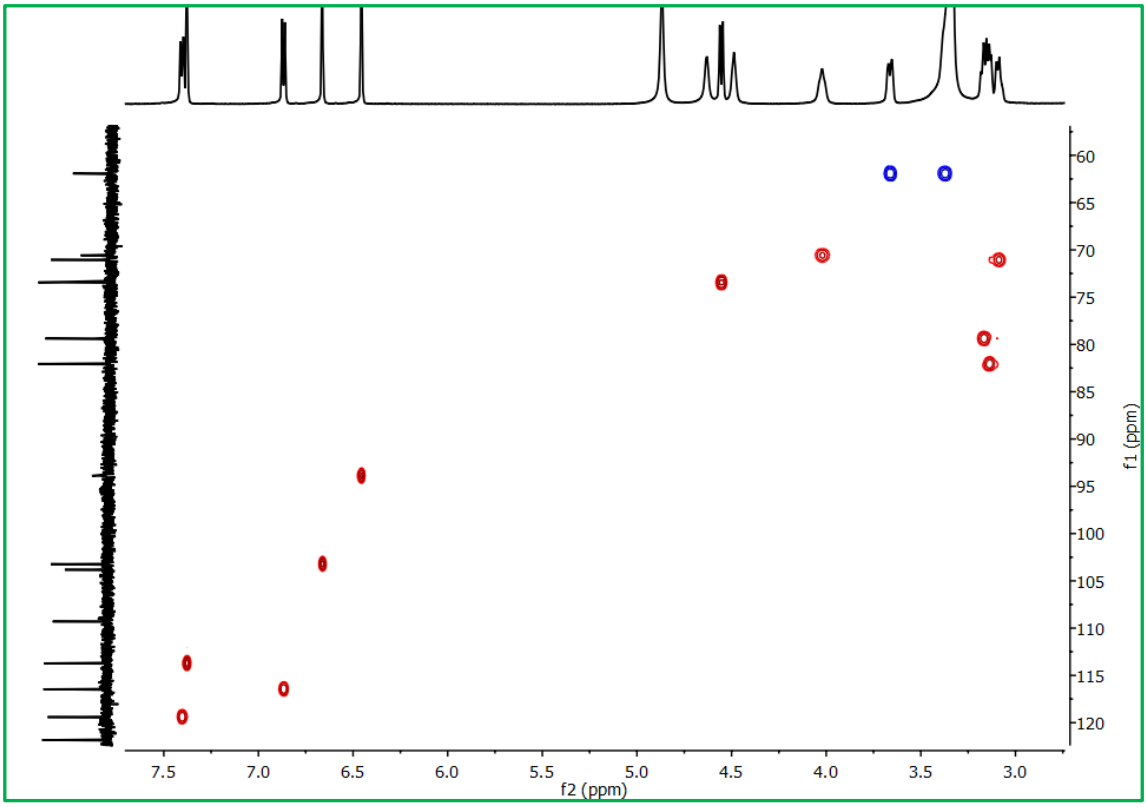
Şekil 3.1 İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d$_6$)



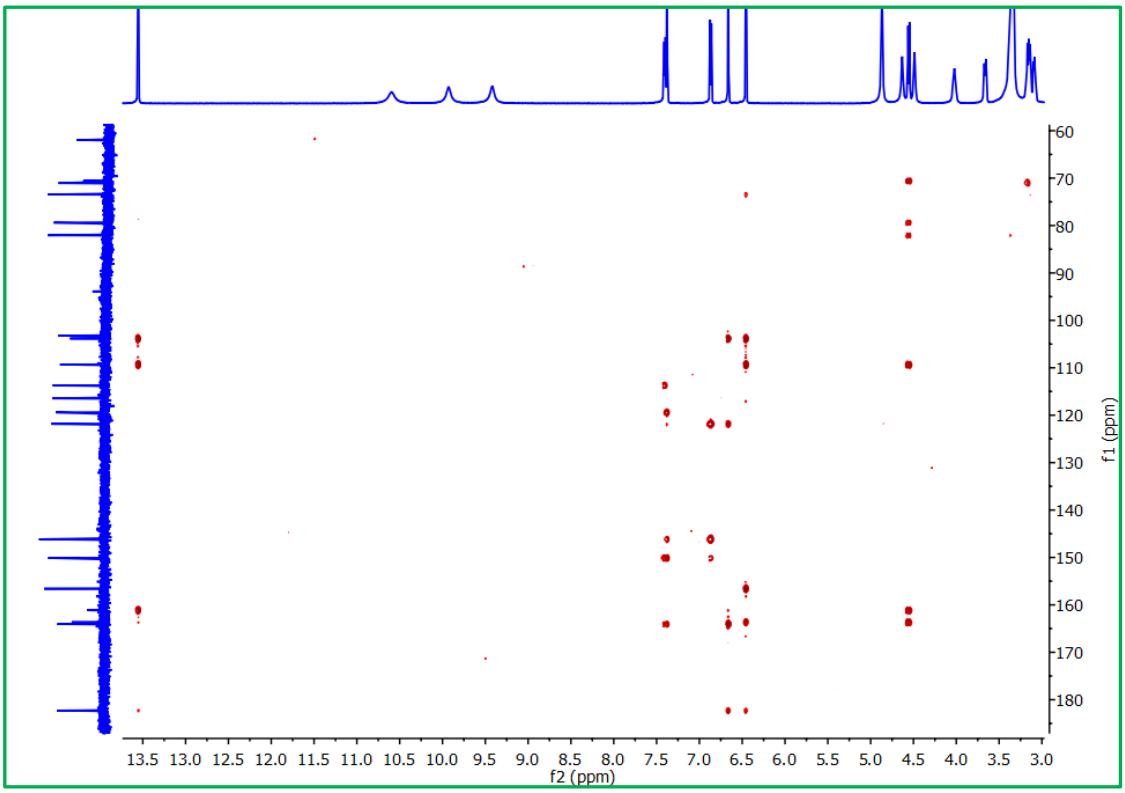
Şekil 3.2 İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d$_6$)



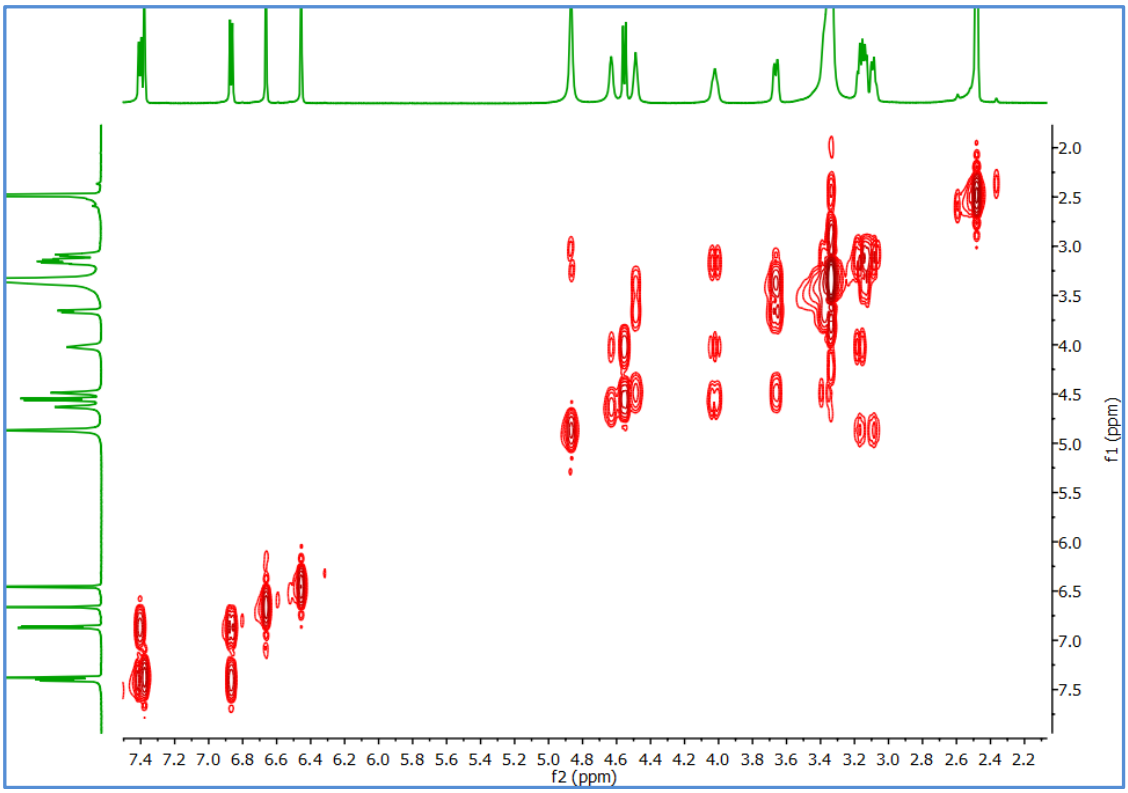
Şekil 3.3 İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



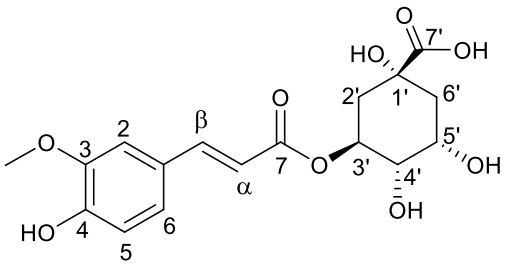
Şekil 3.4 İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



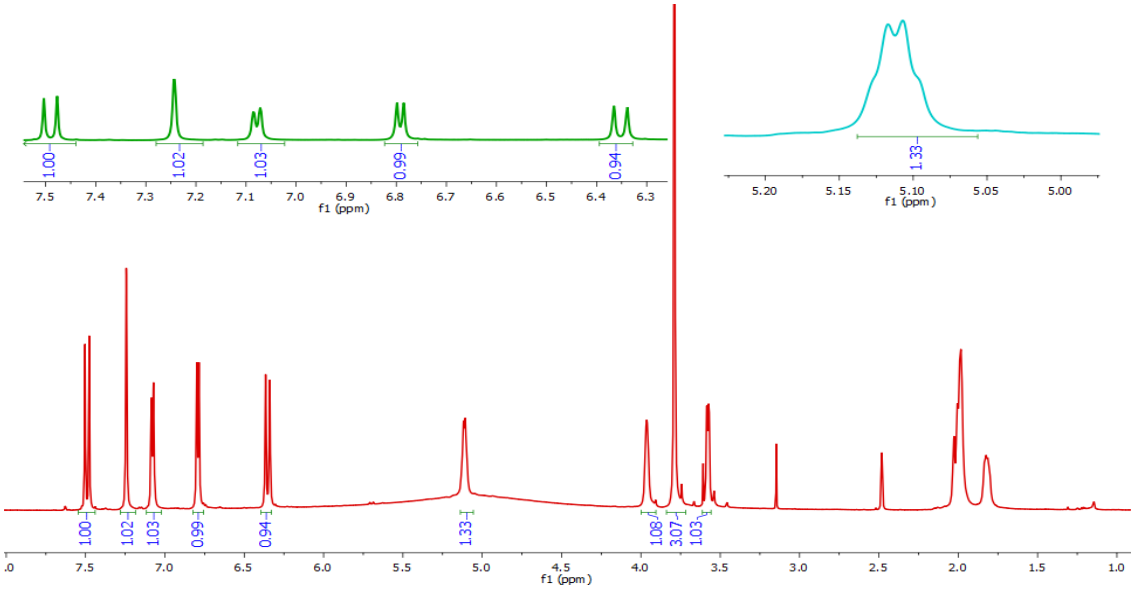
Şekil 3.5 İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



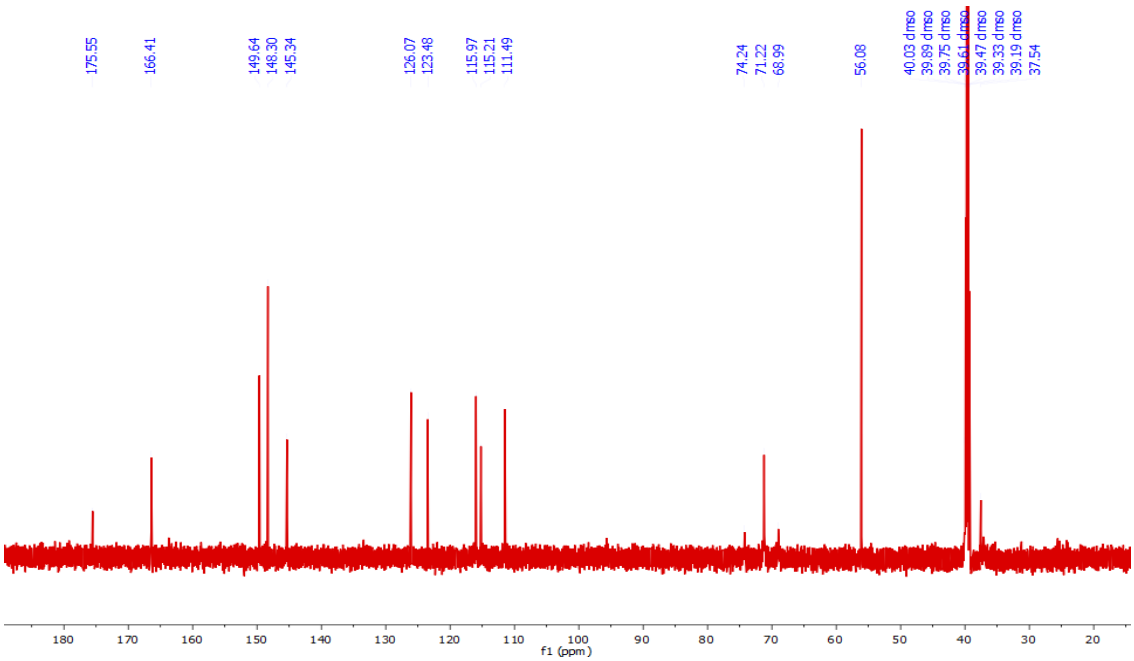
Şekil 3.6 İsoorientin (CPGY-2) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



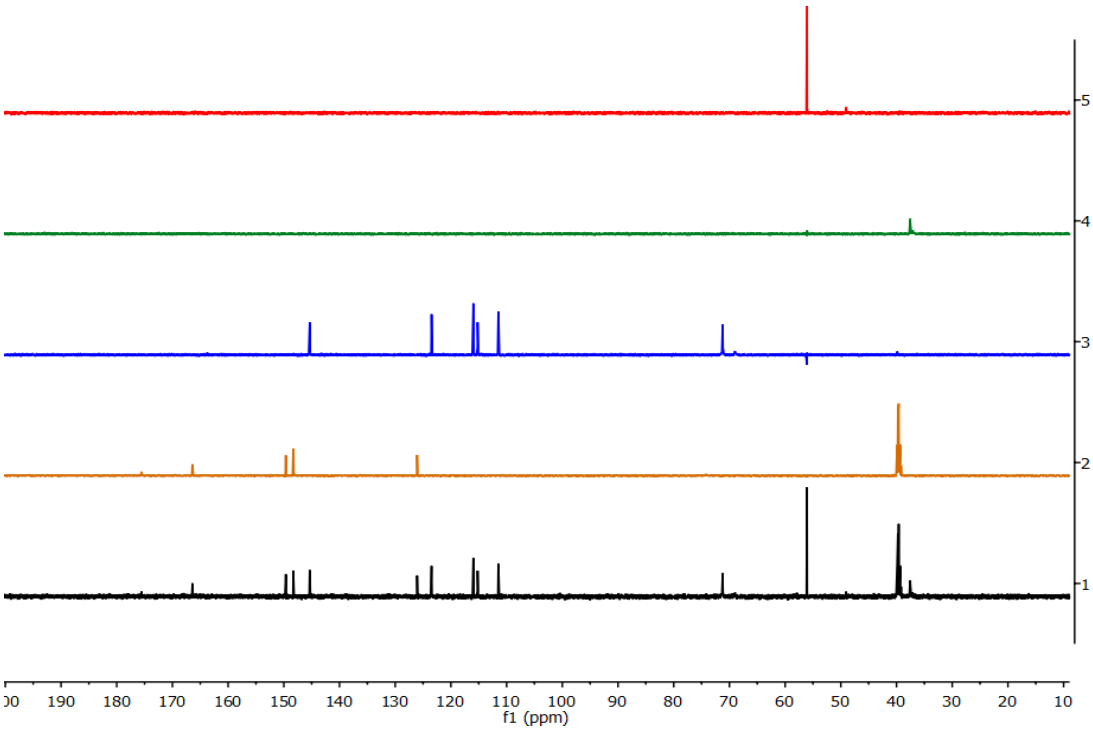
3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin kimyasal yapısı



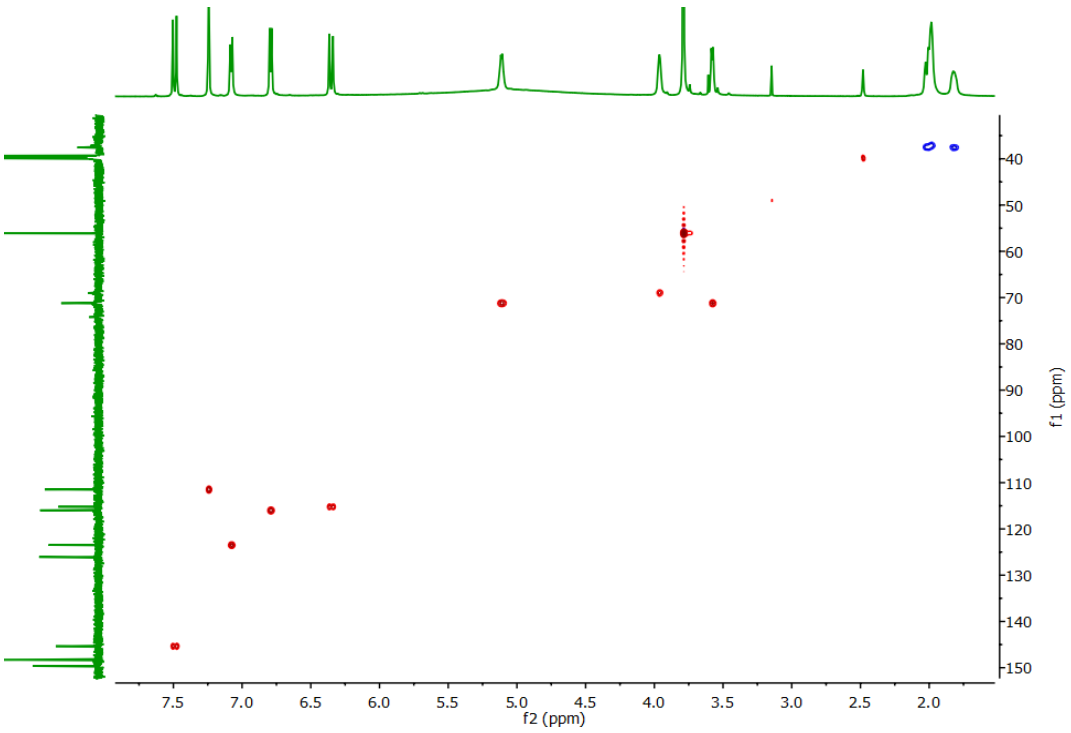
Şekil 3.7 3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



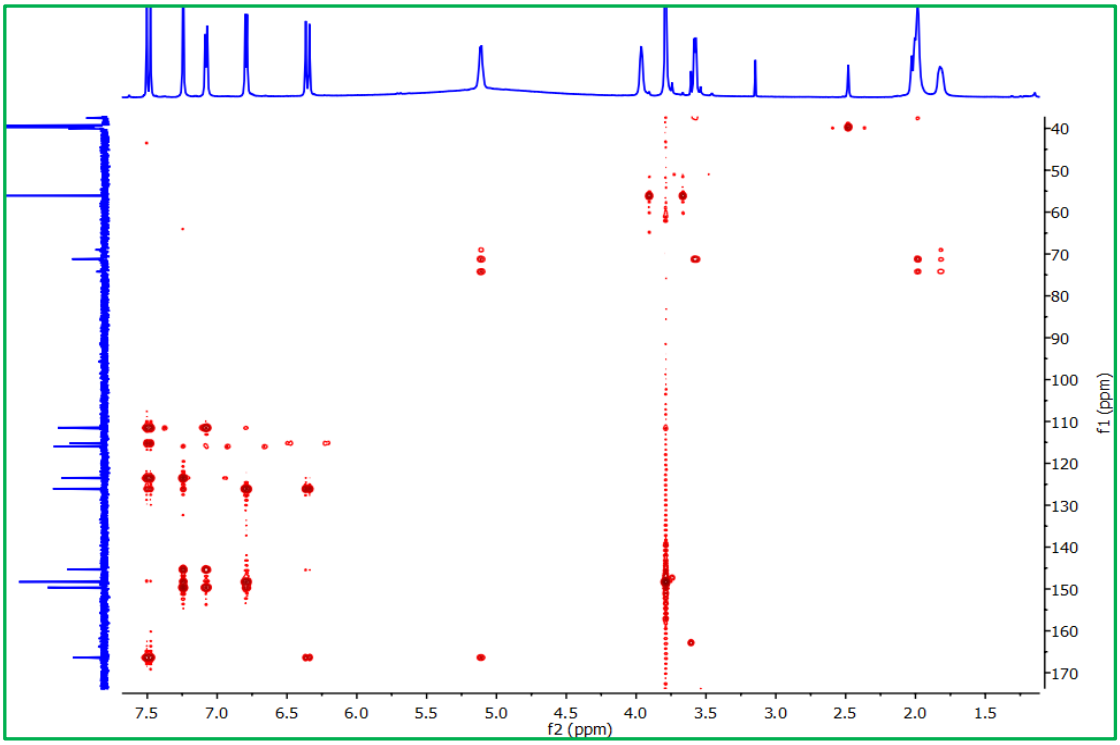
Şekil 3.8 3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



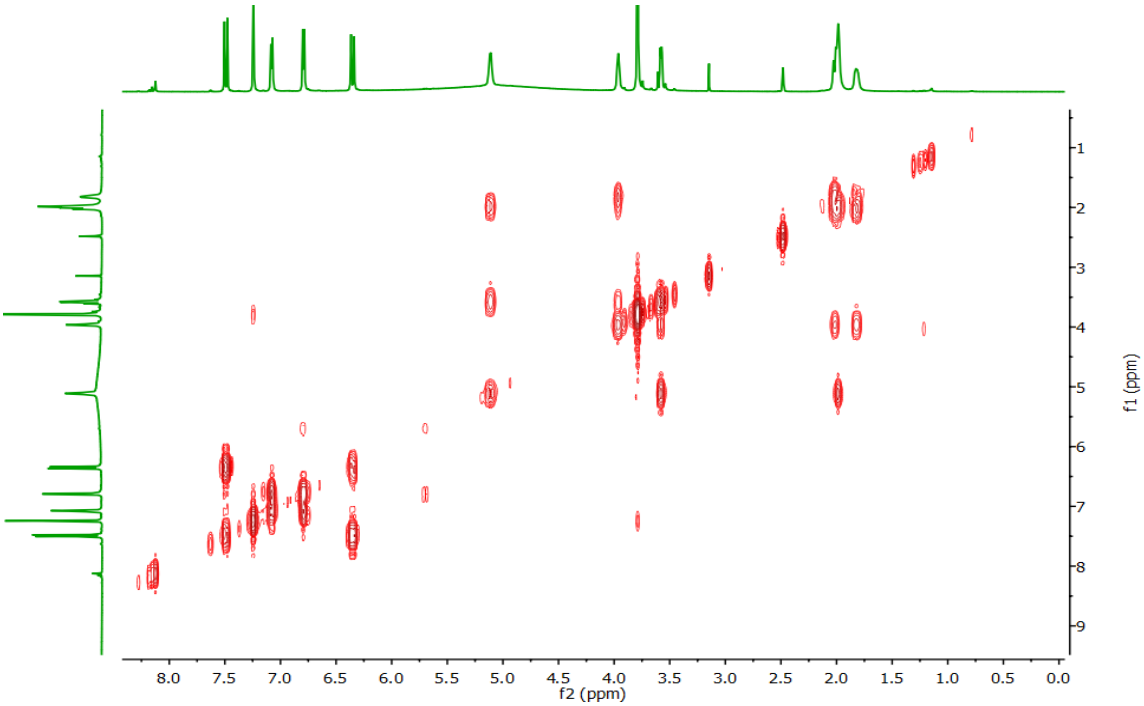
Şekil 3.9 3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



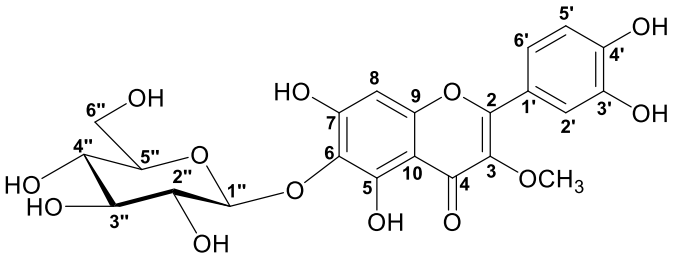
Şekil 3.10 3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



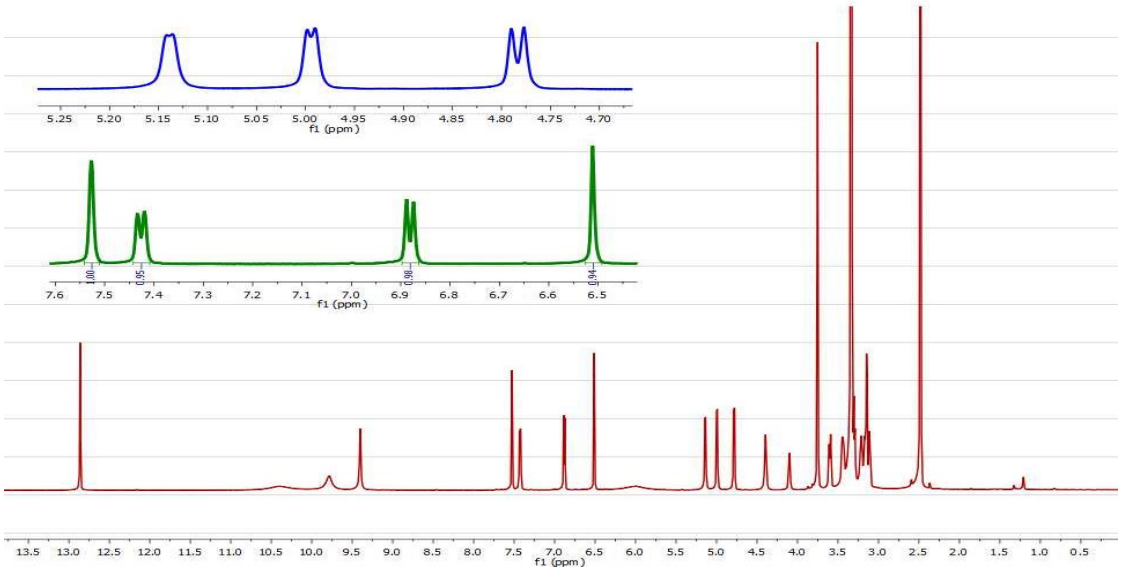
Şekil 3.11 3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



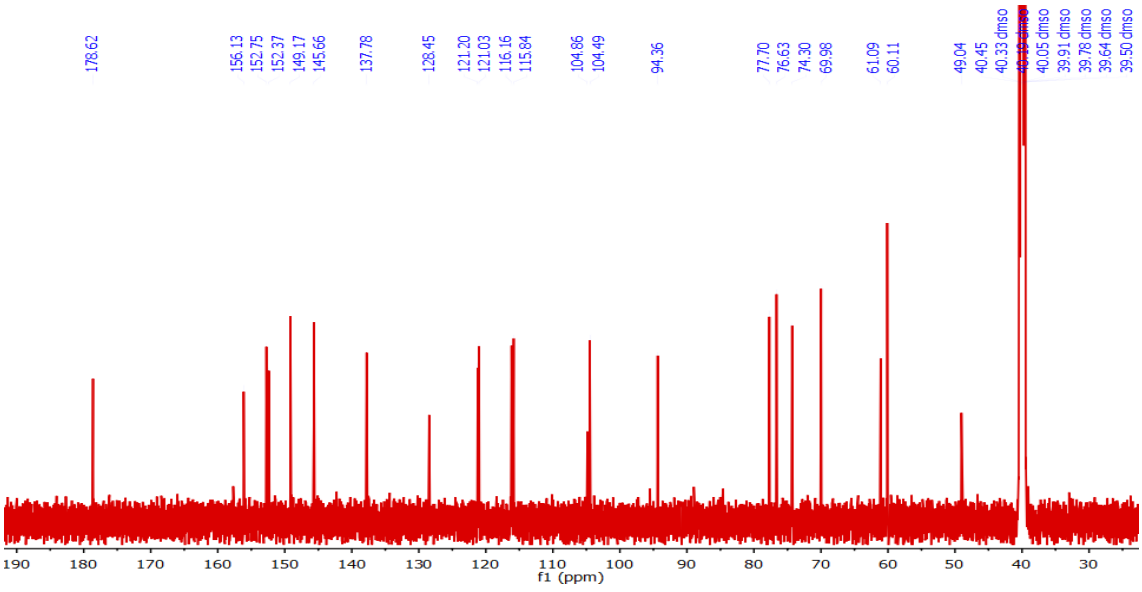
Şekil 3.12 3-O-feruloilkuinik asit (CPGY-4) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



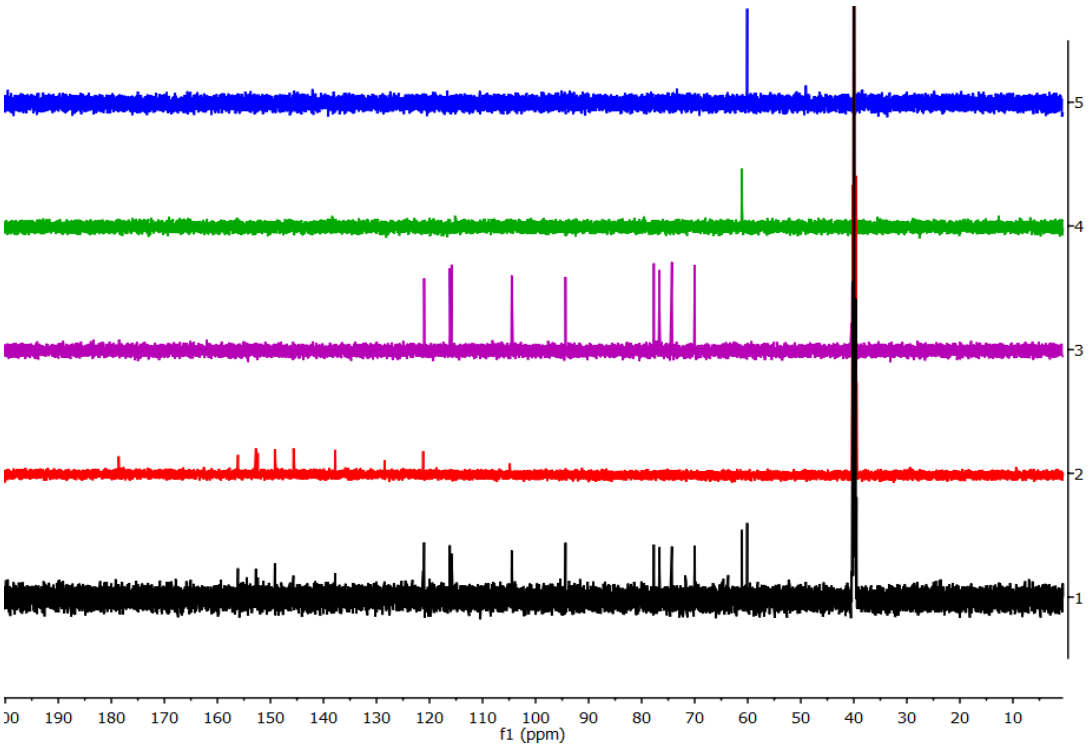
Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin kimyasal yapısı



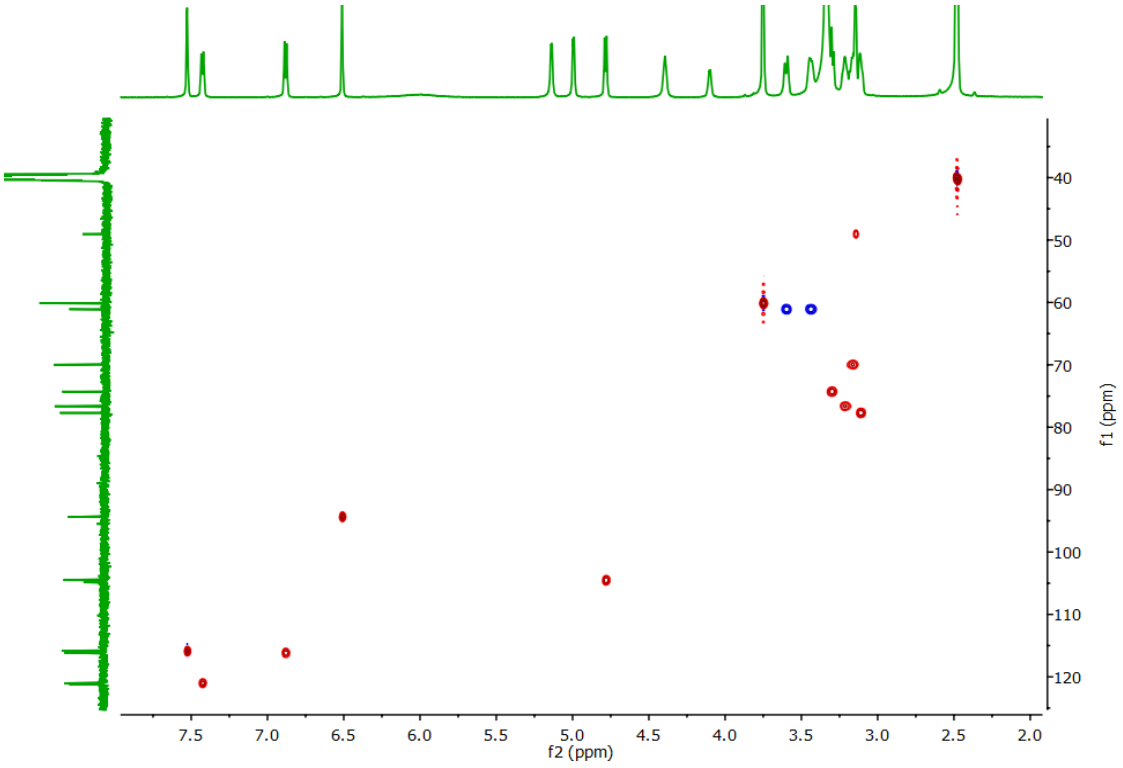
Şekil 3.13 Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



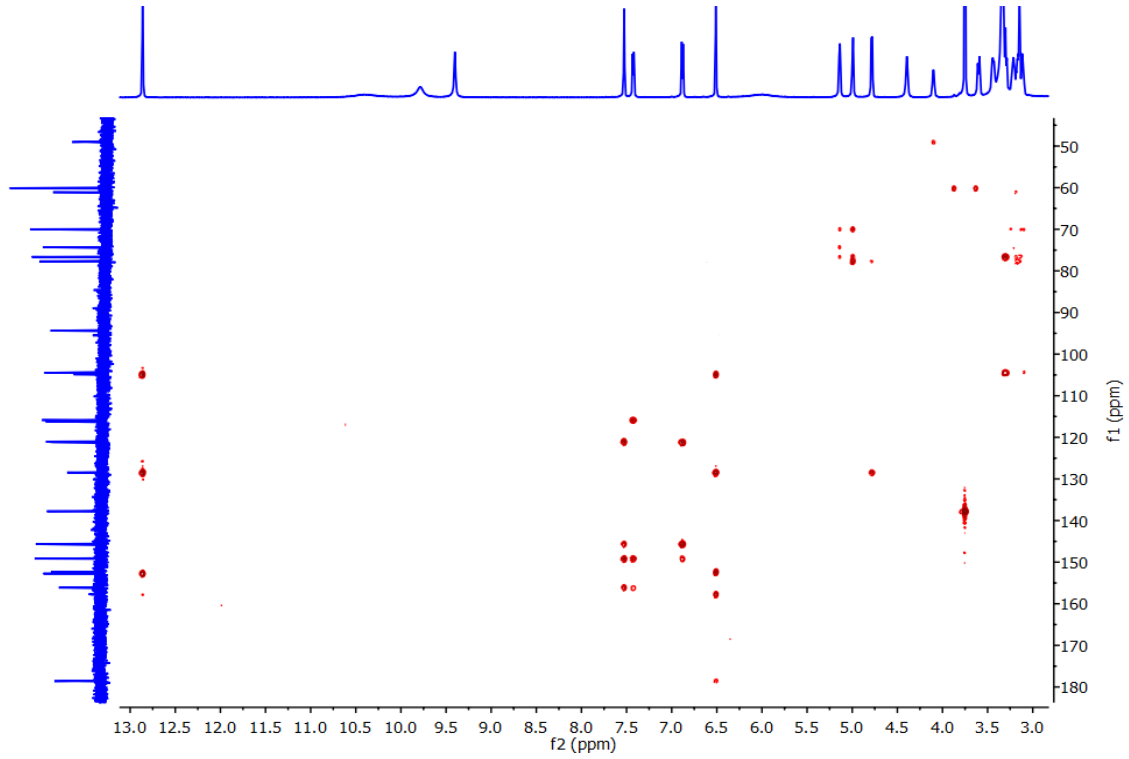
Şekil 3.14 Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



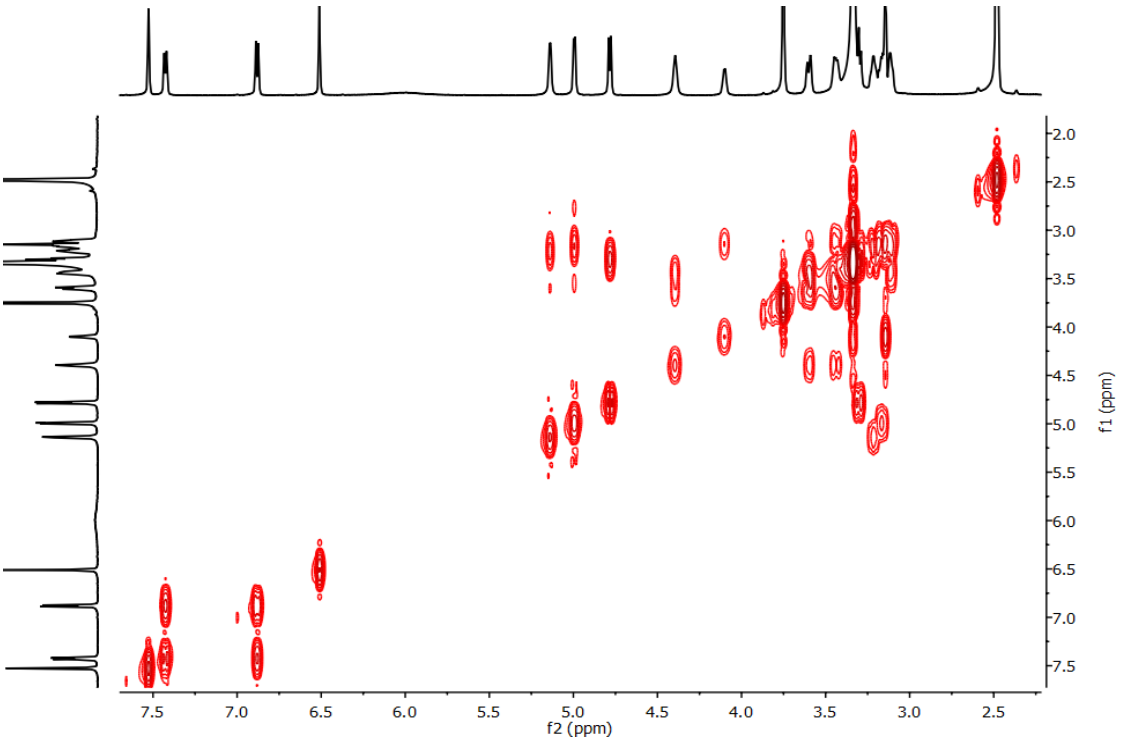
Şekil 3.15 Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



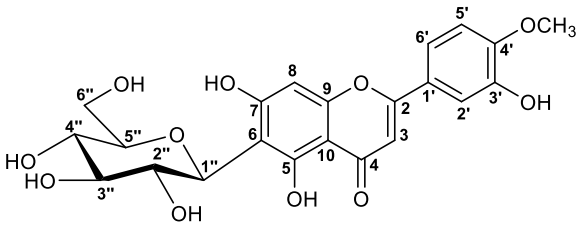
Şekil 3.16 Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



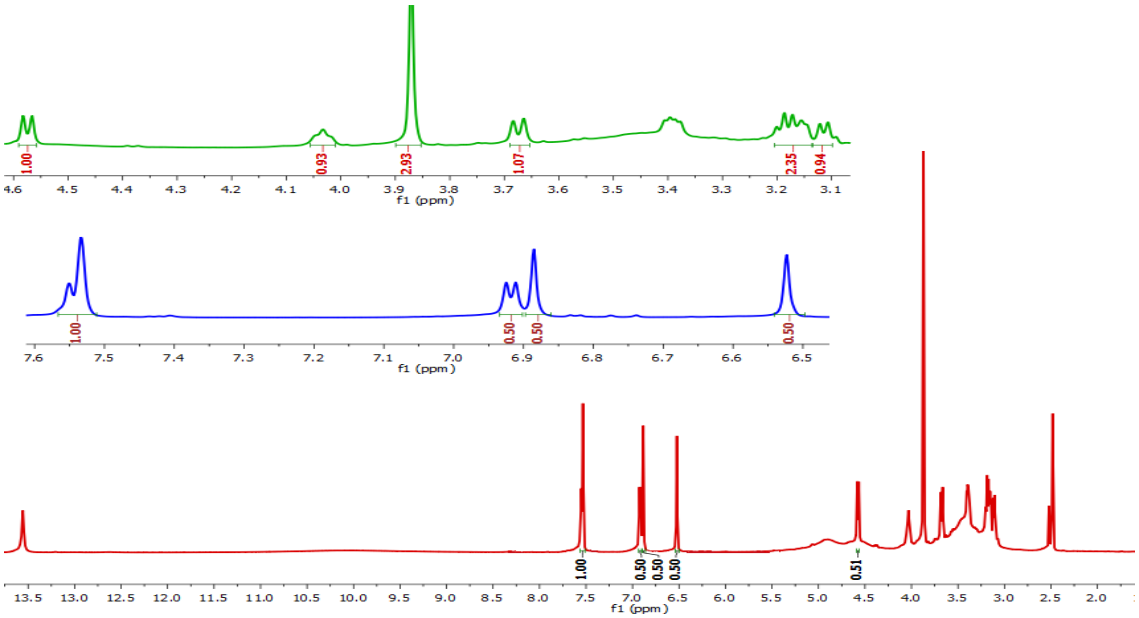
Şekil 3.17 Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



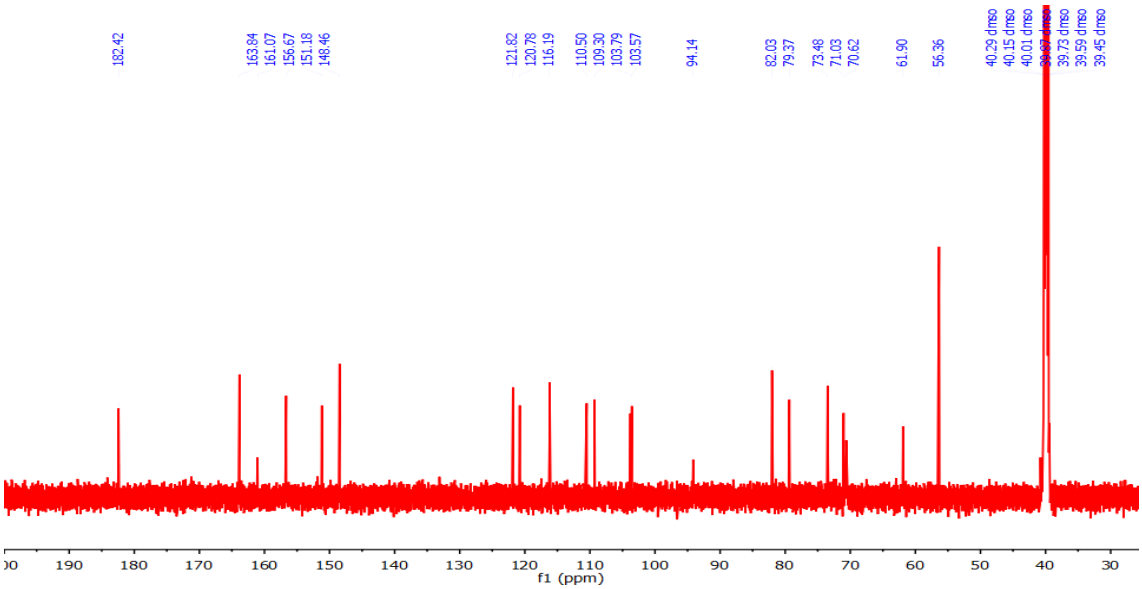
Şekil 3.18 Kuersetagetin-3-metileter-6-*O*-β-glikopiranozit (CPGY-5) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



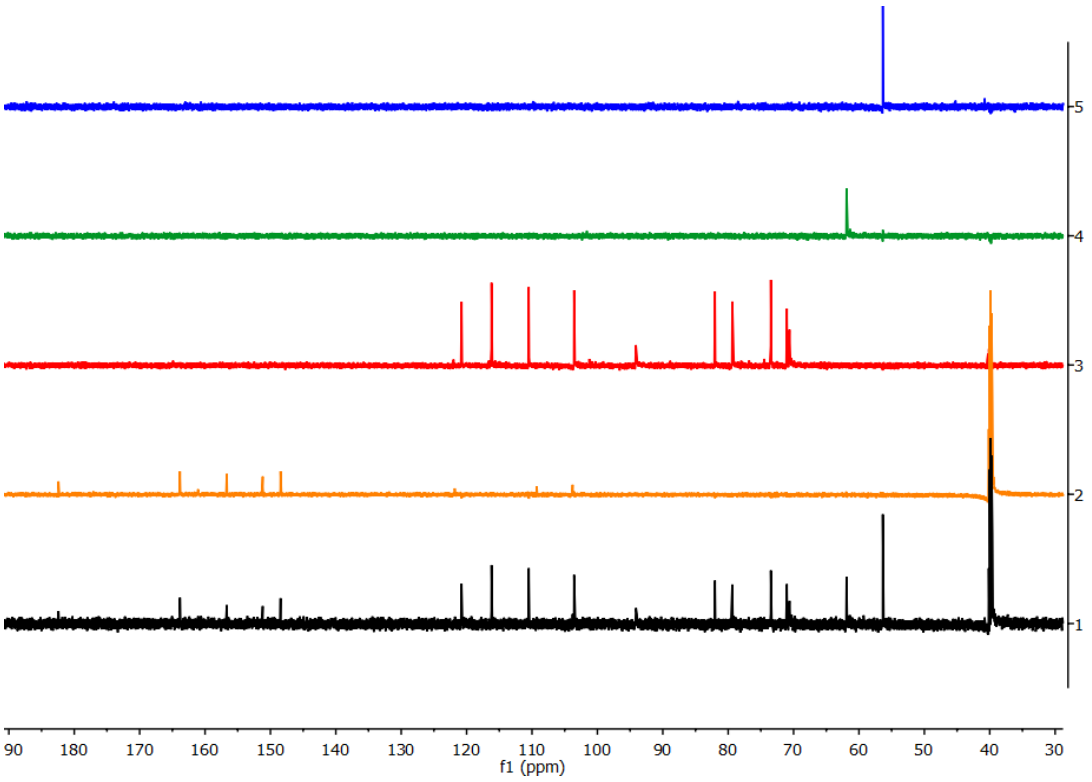
Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin kimyasal yapısı



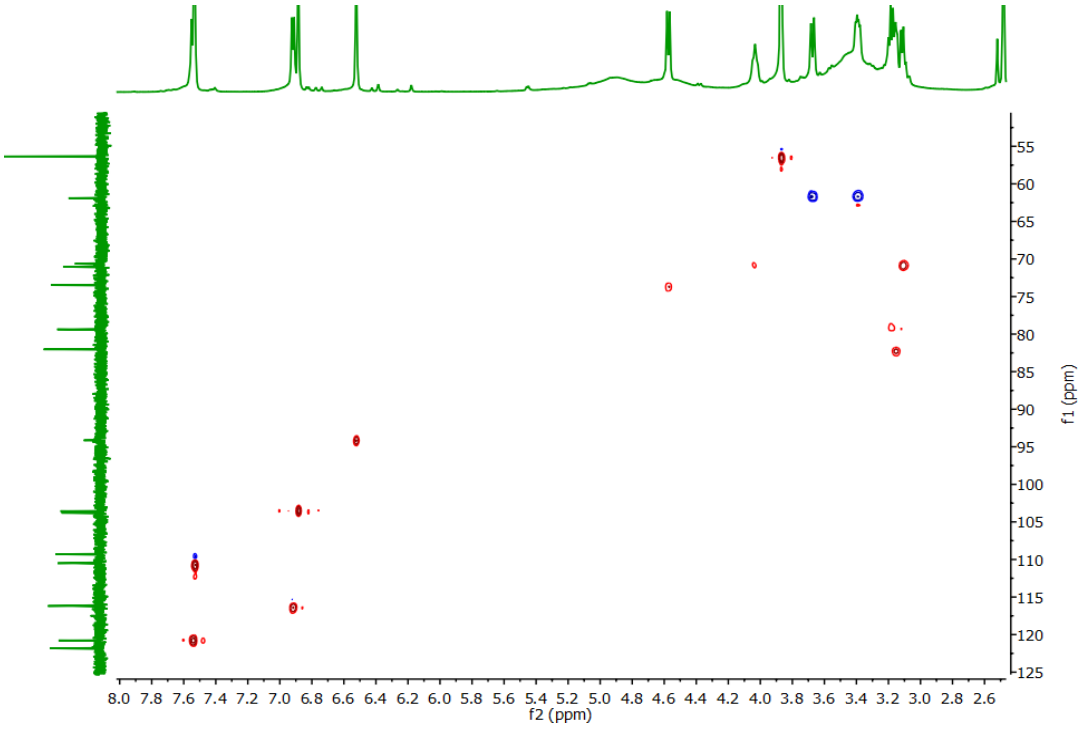
Şekil 3.19 Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



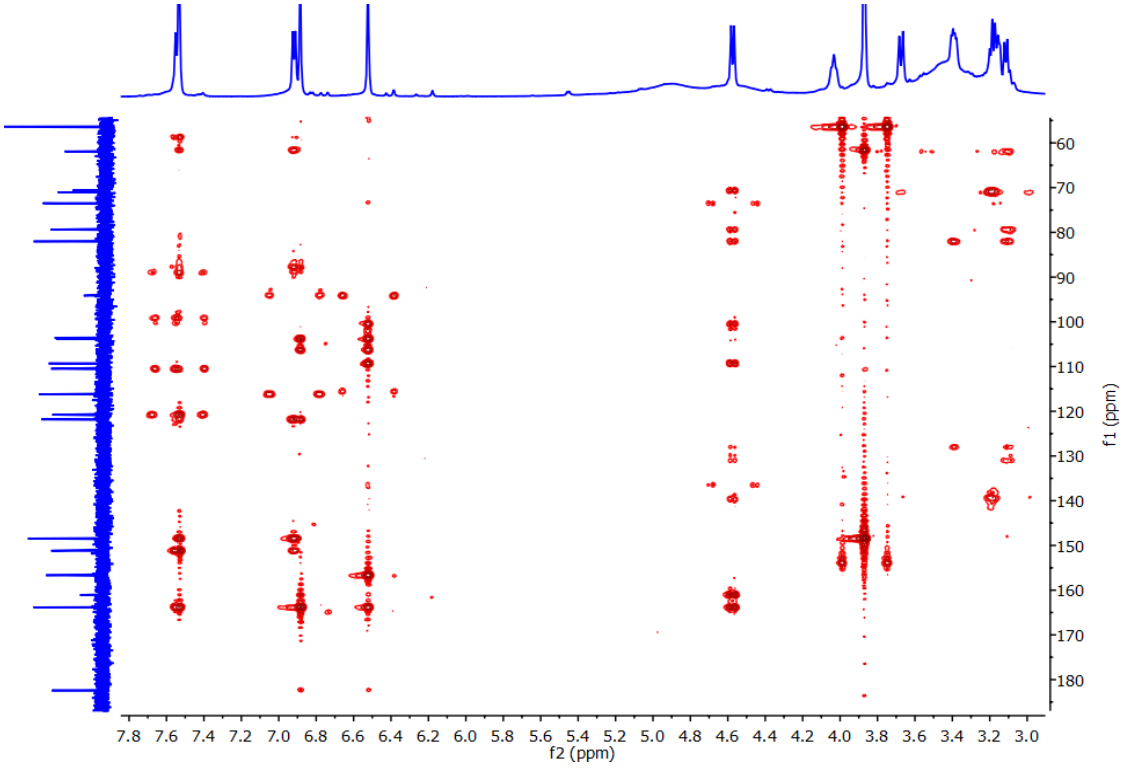
Şekil 3.20 Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



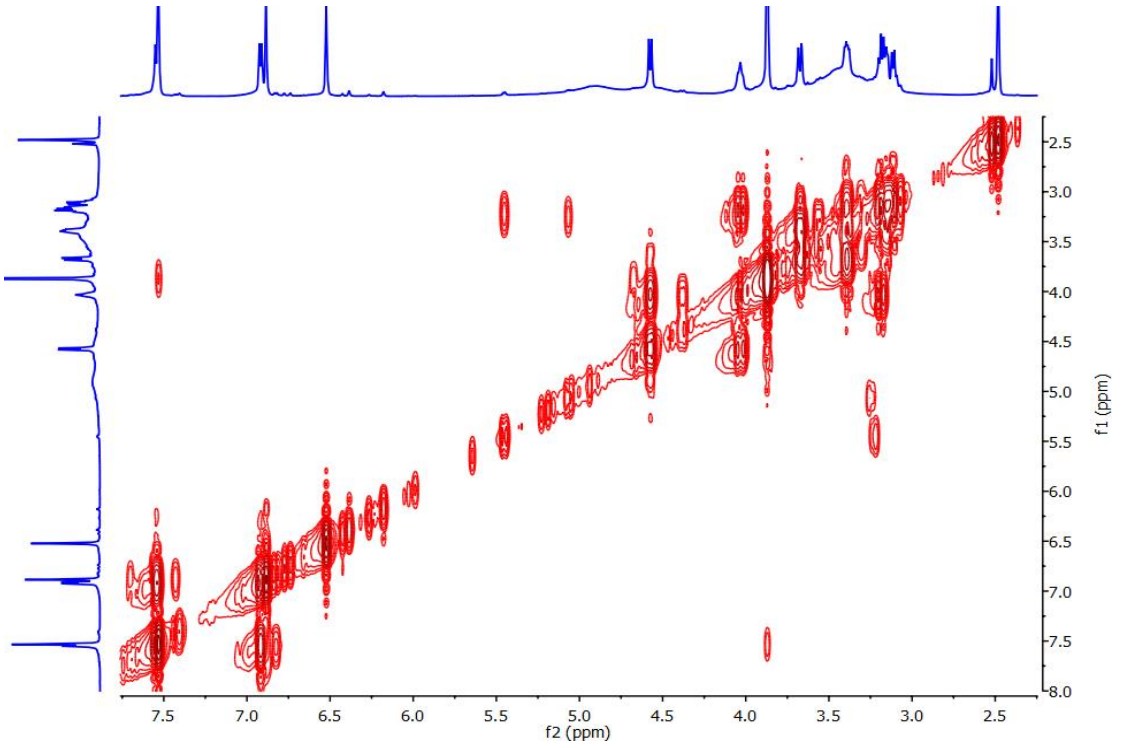
Şekil 3.21 Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



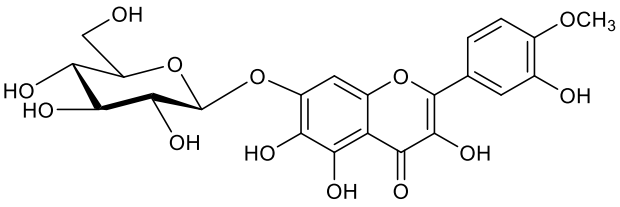
Şekil 3.22 Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



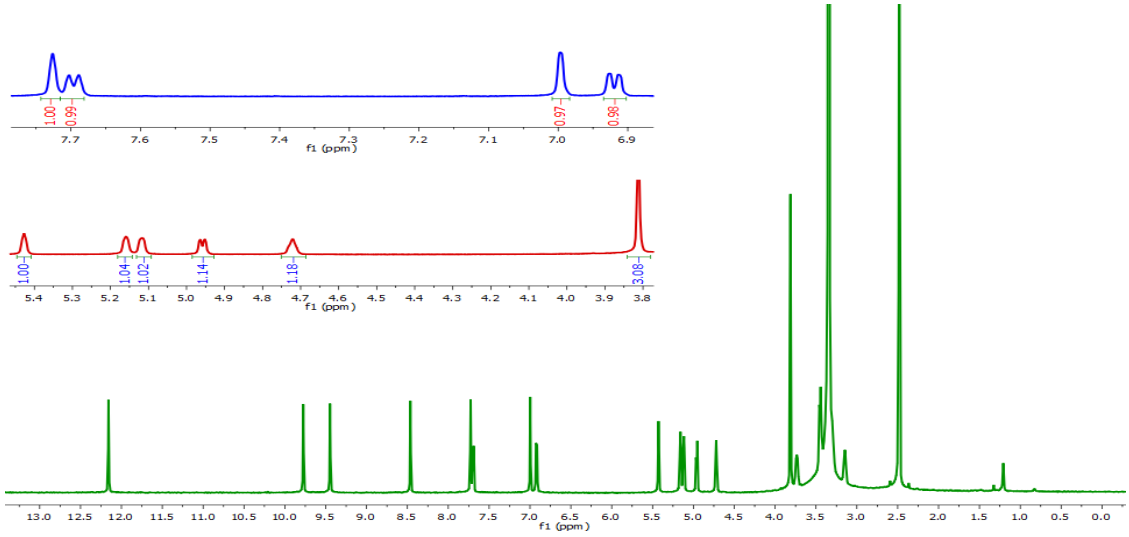
Şekil 3.23 Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



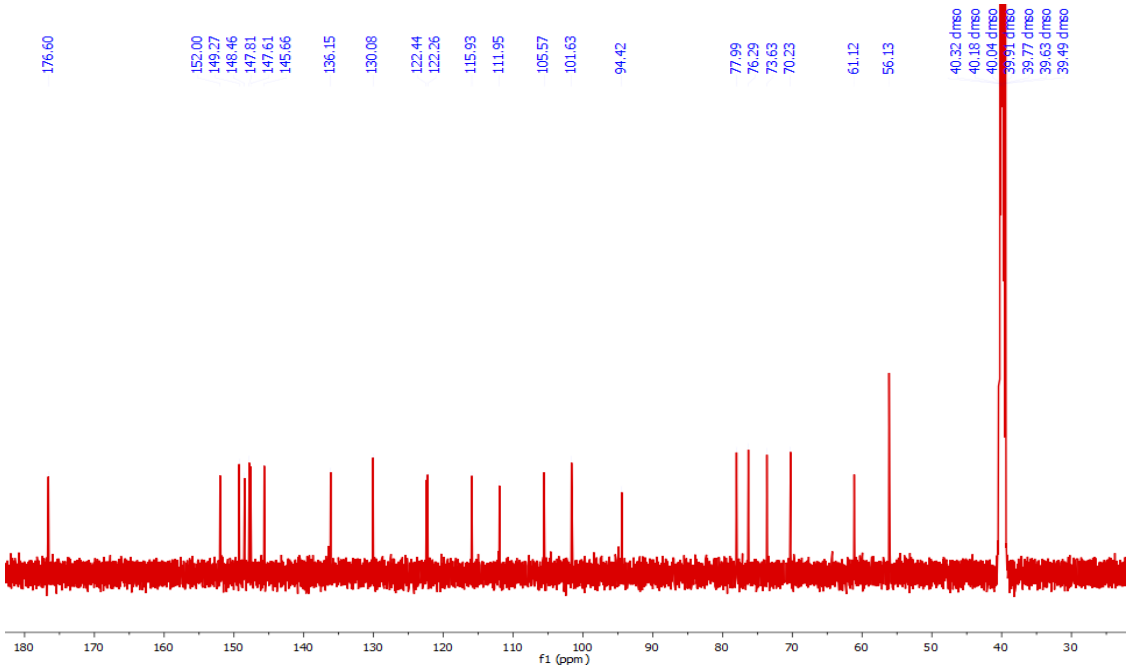
Şekil 3.24 Diosmetin 6-*C*-β glikozit (CPGY-6) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)



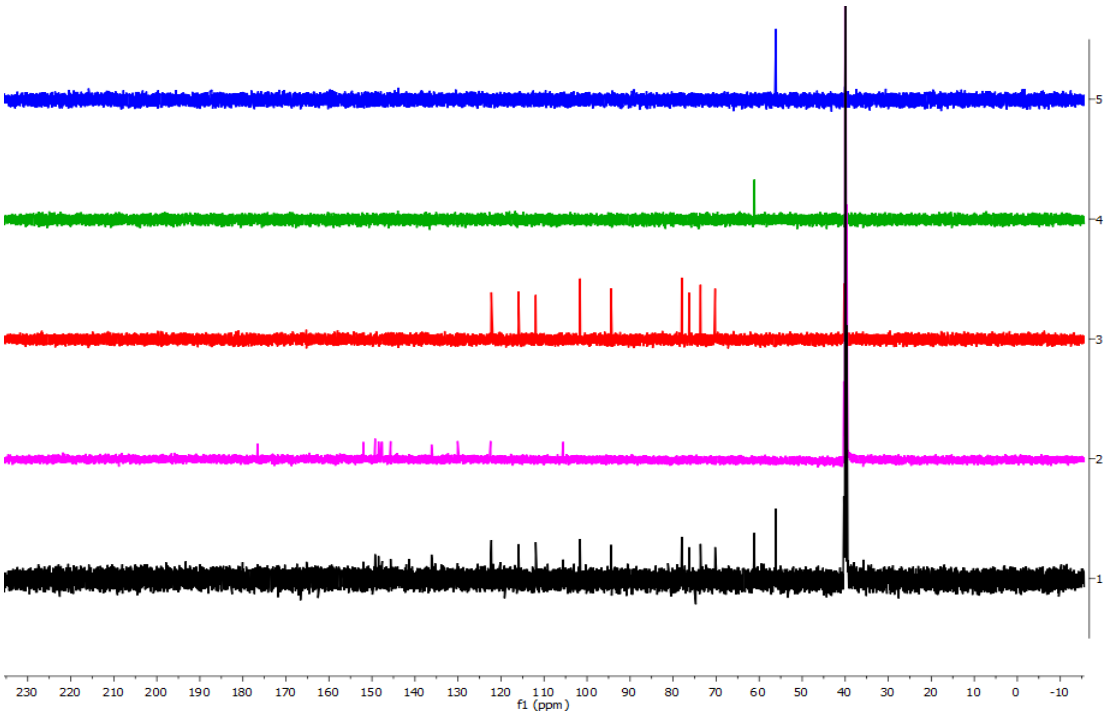
Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (CPGY-7) bileşiğinin kimyasal yapısı



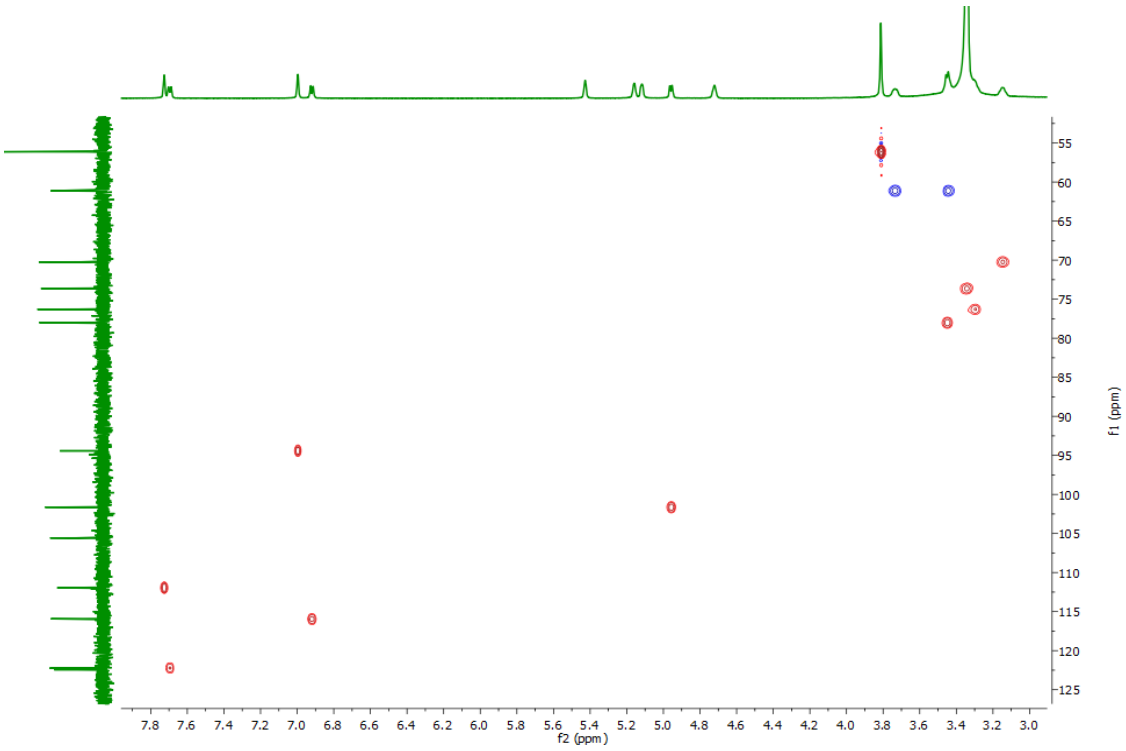
Şekil 3.25 Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (CPGY-7) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



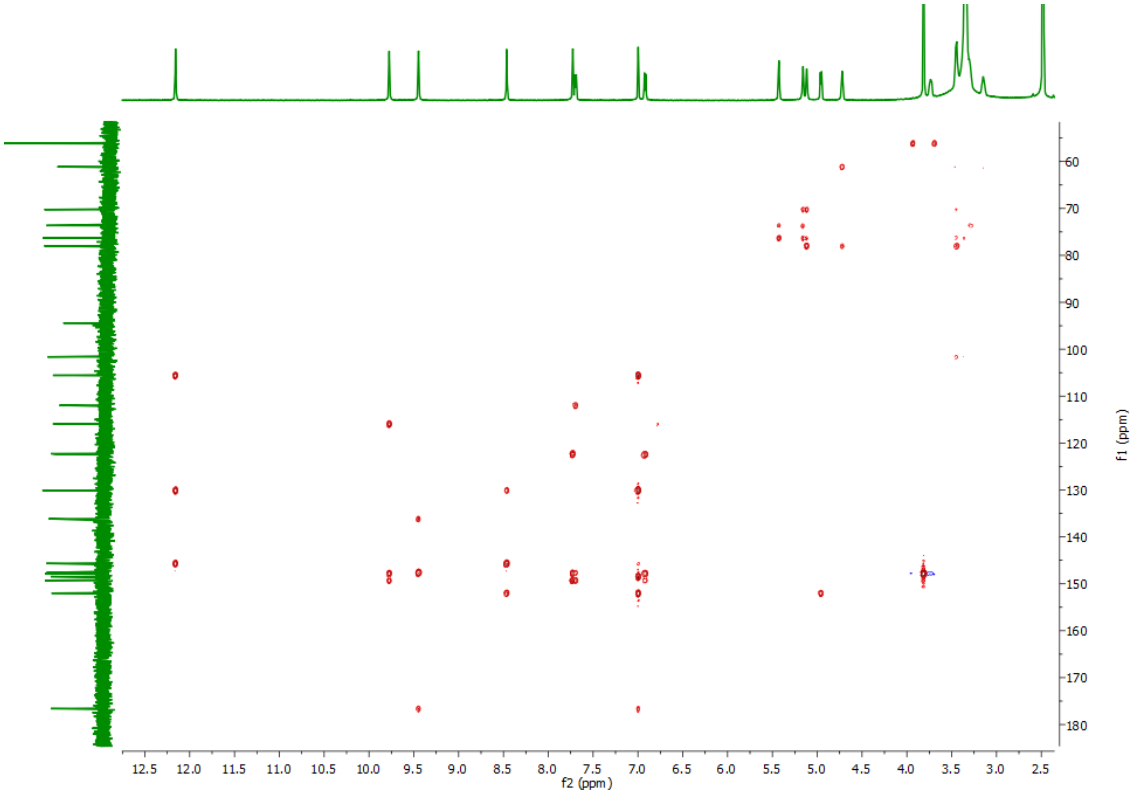
Şekil 3.26 Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (CPGY-7) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



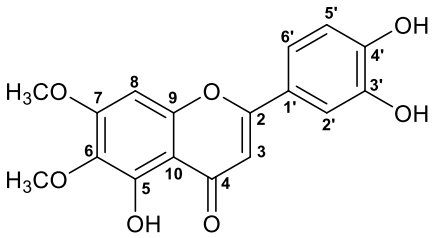
Şekil 3.27 Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (CPGY-7) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



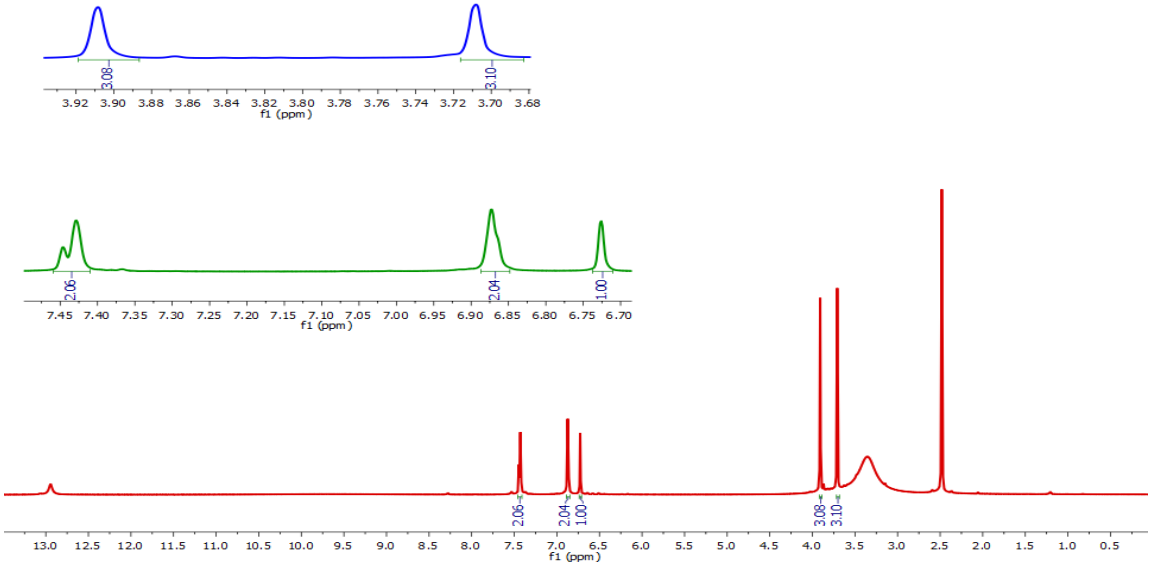
Şekil 3.28 Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (CPGY-7) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



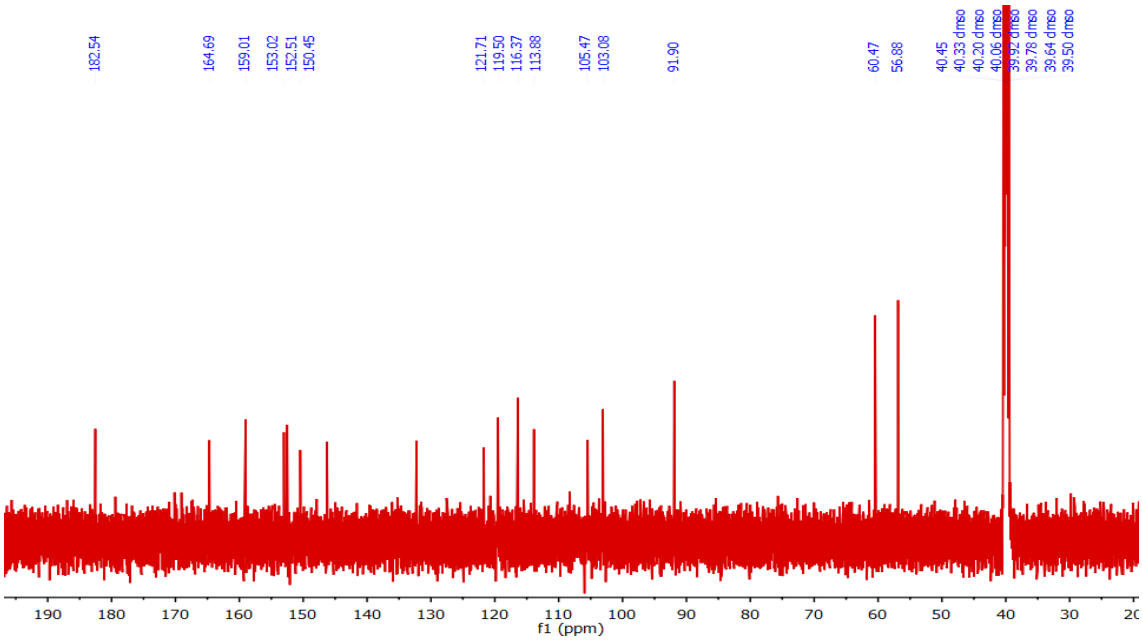
Şekil 3.29 Kuersetagetin-4'-metileter-7-*O*-β glikozit (CPGY-7) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



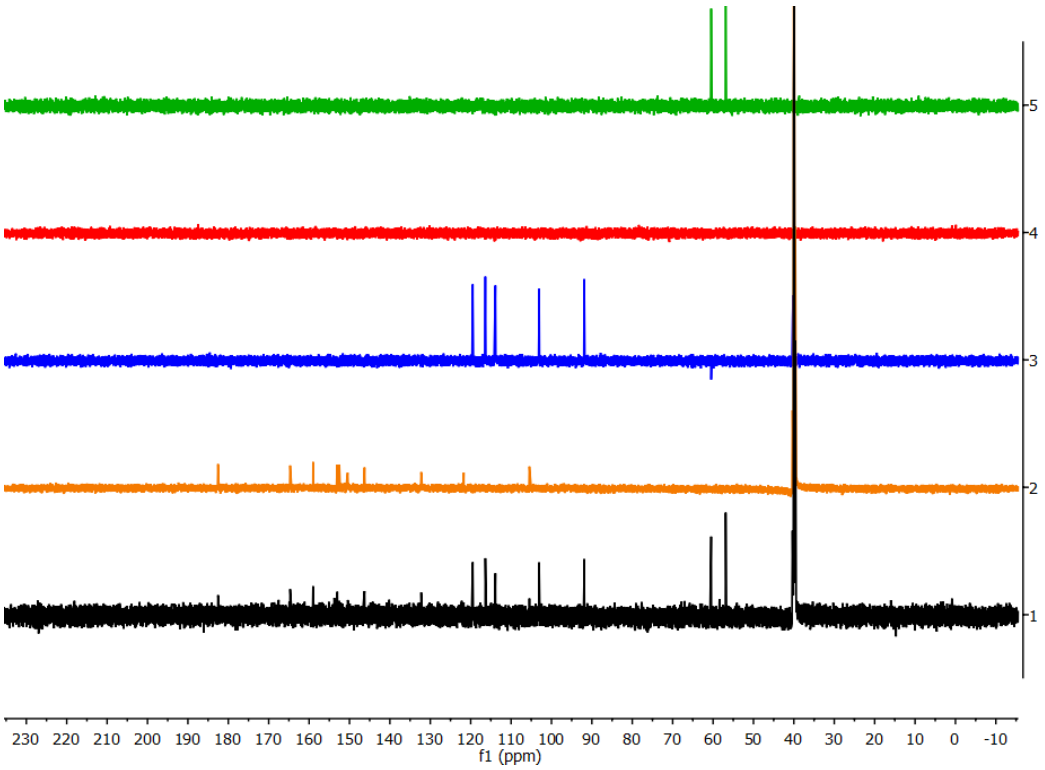
Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin kimyasal yapısı



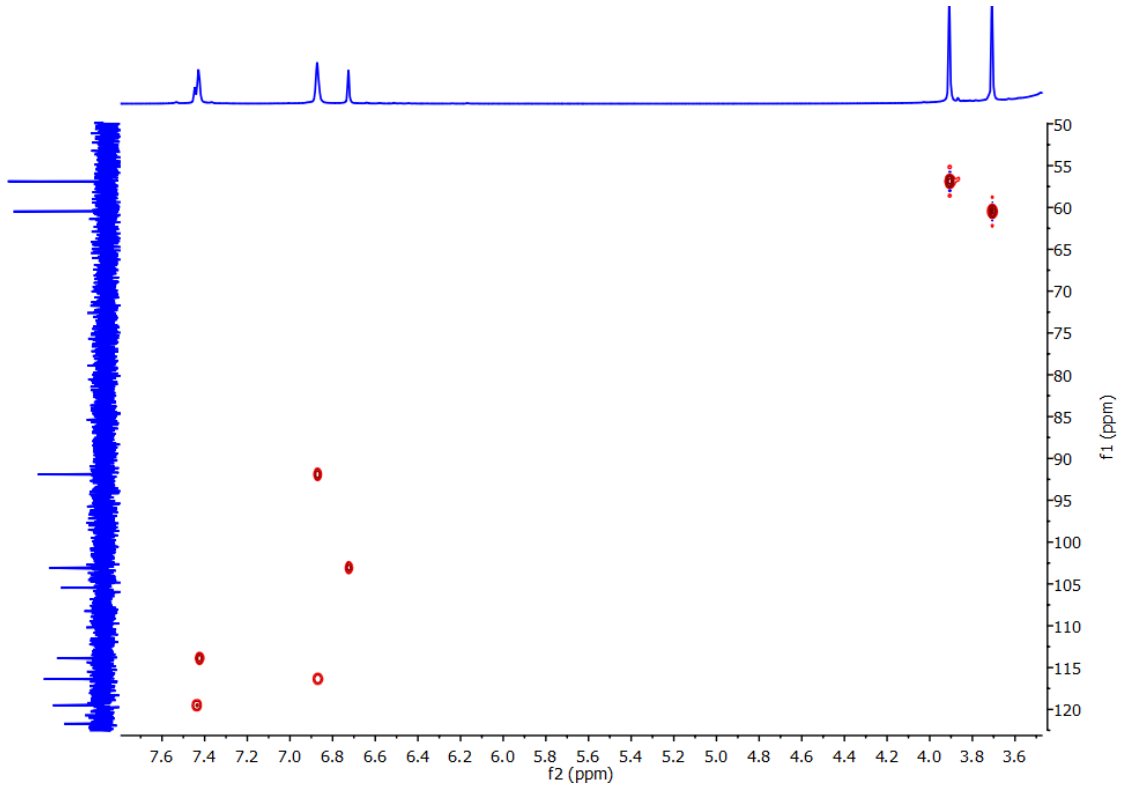
Şekil 3.30 Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (DMSO-d_6)



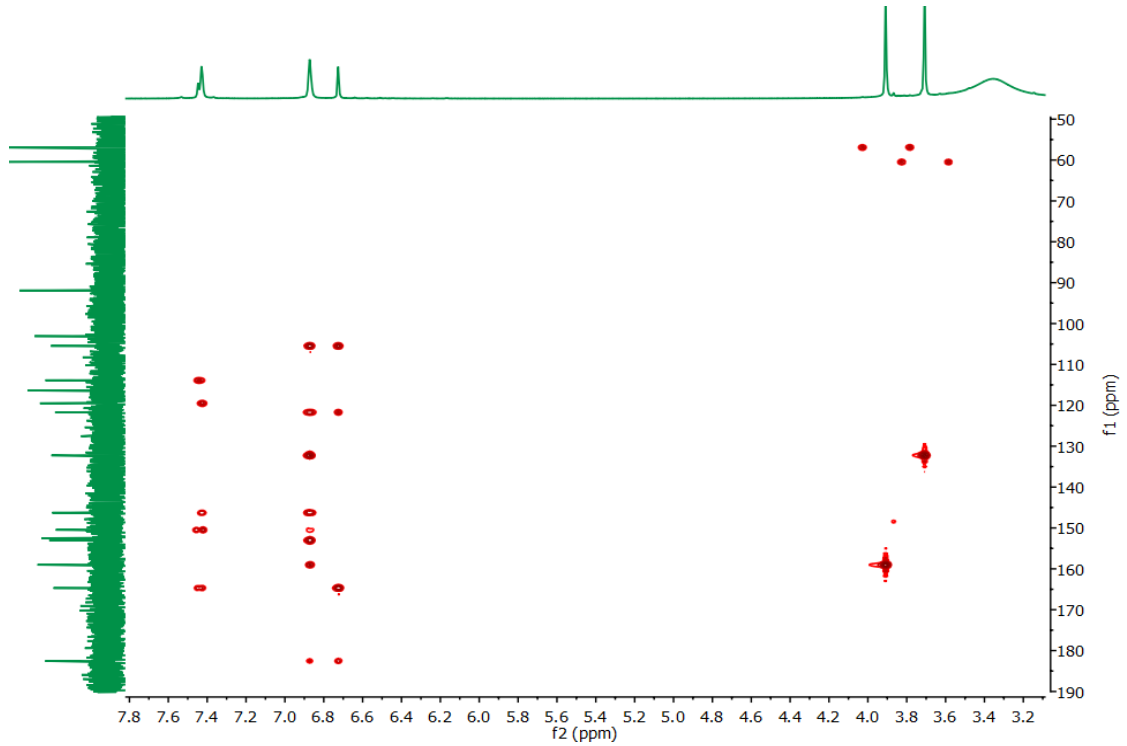
Şekil 3.31 Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (DMSO-d_6)



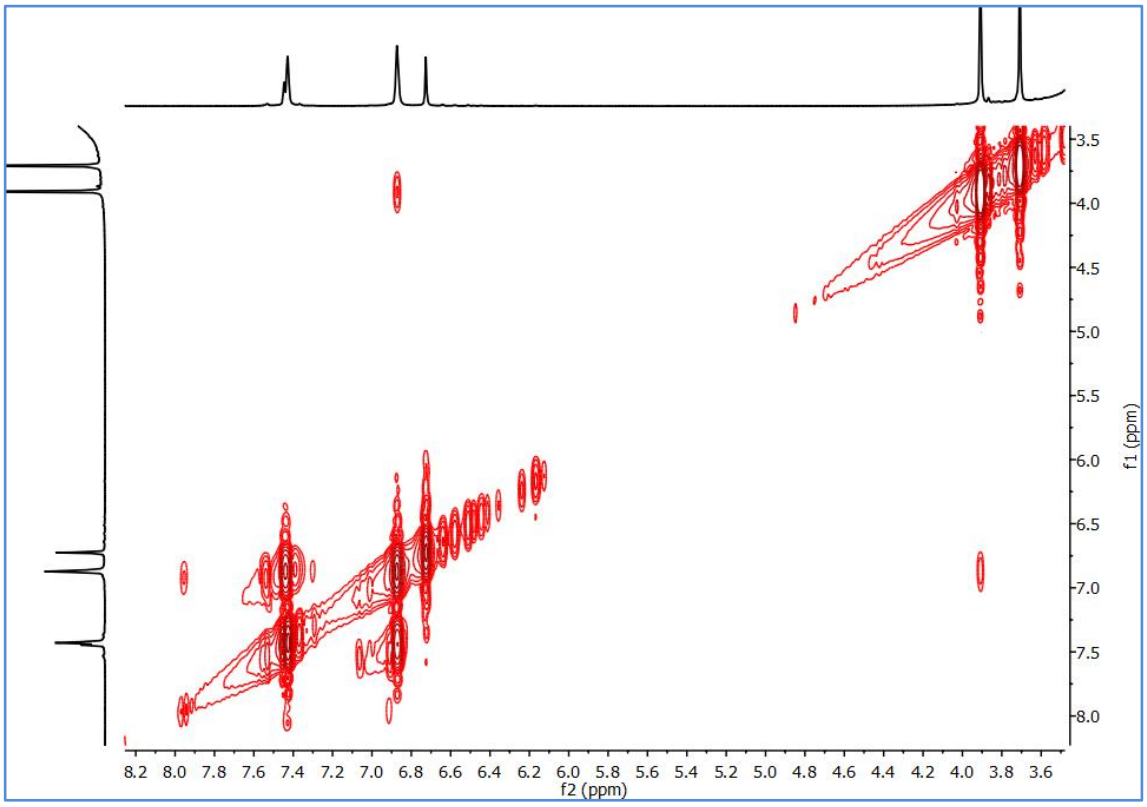
Şekil 3.32 Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin ^{13}C DEPT NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 3.33 Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 3.34 Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (DMSO-d_6)



Şekil 3.35 Cirsiliol (CPGY-10) bileşiğinin COSY NMR spektrumu (DMSO-d_6)

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Ali Rıza TÜFEKÇİ

Doğum Yeri: Kızılcahamam/ANKARA

Doğum Tarihi: 01/06/1983

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dil: İngilizce

Adres: Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

E-posta: alirizatufekci@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Eryaman Lisesi (2000)

Lisans : GOP Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2005)

Yüksek Lisans : GOP Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (2010)

Doktora : ÇAKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü (2010-2020)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen-Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Görevlisi (2013-devam ediyor)

Ulusal ve uluslararası Yayınlar

1) Erenler, R., Telci, İ., Elmastaş, M., Aksit, H., Gül, F., **Tüfekçi, A.R**., Demirtaş, İ., & Kayır, Ö. (2018). Quantification of flavonoids isolated from Mentha spicata in selected clones of Turkish mint landraces. *Turkish Journal of Chemistry, 42*(6), 1695-1705.

2) Esen Sezen Karaoğlan, G. G., Mücahit Seçme, Onur Senol, Fatma Demirkaya Miloğlu, Yavuz Dodurga, **Ali Rıza Tüfekçi**. (2018). Eremurus spectabilis, Rich Source of Isoorientin: Isolation, Quantification and Anti-Cancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Current Pharmaceutical Analysis, 13*(6).

3) Akman, F., Geçibesler, I., Sayyed, M., Tijani, S., **Tufekci, A**., & Demirtas, I. (2018). Determination of some useful radiation interaction parameters for waste foods. *Nuclear Engineering and Technology, 50*(6), 944-949.

4) Kulabas, S., Ipek, H., **Tufekci, A**., Arslan, S., Demirtas, I., Ekren, R., Sezerman, U., & Tumer, T. (2018). Ameliorative potential of *Lavandula stoechas* in metabolic syndrome via multitarget interactions. *Journal of Ethnopharmacology, 223*, 88-98.

5) Tüfekçi, A. R., Küçük, S., Gül, F., & Demirtaş, İ. (2018). Determination of Phytochemical Contents of Some Medicinal Aromatic Plants (Echinacea pallida, Melissa officinalis, Hypericum perforatum and Sideritis syriaca) Belonging to Antalya Region. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences, 1*(1), 29-32.

6) Tüfekçi A.R., Akşit, H., Gül, F., Demirtaş, I. (2018). Determination of Phenolic Profile of Cirsium arvense (L.) Scop. Subsp. vestitum (Wimmer et Grab.) Petrak Plant. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences, 1*(2), 33-36.

7) Gecibesler, H.İ, Demirtaş, İ., Behçet, L., **Tüfekci, A.R**., (2017). Two new flavonoids and other phytochemicals from endemic *phryna ortegioides* (Fish. C.A.mey.) paxk. hoffm and their antioxidant potentials. *Records of Natural Products.* Vol. 11(3): 290-298.

8) Abay G, Altun, M., Koldas, S., **Tufekci, A.R**., Demirtas, I (2015). Determination of Antiproliferative Activities of Volatile Contents and HPLC Profiles of *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. Vol. 18(5): 453-463.

9) Demirtas, I., **Tufekci, A.R**., Yaglioglu, A.S., Elmastas, M (2017). Studies on the Antioxidant and Antiproliferative Potentials of *Cirsium arvense* subsp. *vestitum. Journal of Food Biochemistry, 41(1), 1-10.*

10) Feyza Oke-Altuntas, Ibrahim Demirtas, **Ali Riza Tufekci**, Serkan Koldas, Fatih Gul, Lutfi Behcet, Halil Ibrahim Gecibesler (2016). Inhibitory Effects of The Active Components Isolated from *Satureja boissieri* Hausskn. Ex Boıss. On Human Cervical Cancer Cell Line. *Journal of Food Biochemistry, Vol. 40(4): 499-506.*

11) Adem, S., Akkemik, E., Aksit, H., Guller, P., Tufekci, A. R., Demirtas, € _ I., & Ciftci, M. (2019). Activation and inhibition effects of some natural products on human cytosolic CAI and CAII. Medicinal Chemistry Research, 349, 132.

12) Demirtaş İbrahim, Tüfekçi Ali Rıza, Karakoç Ömer Cem, Altun Muhammed, Koldaş Serkan, Gül Fatih, Erenler Ramazan, Telci İsa, İnah Nuri Kaan (2013). Değerlendiremediğimiz Tarım Ürünleri Potansiyelimiz. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi (TABAD), 168-173.

13) Karakoç Ömer Cem, Tüfekçi Ali Rıza, Demirtaş İbrahim, İpek Arif (2013). *Salvia tchihatcheffii* ve Salvia cryptantha Uçucu Yağlarının ve Ekstraktlarının İki Önemli Depo Zararlısı Üzerindeki İnsektisidal Aktiviteleri. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi (TABAD), 155-158.

14) Gökhan Abay, Ömer Cem Karakoç, **Ali Rıza Tüfekçi**, Serkan Koldaş, İbrahim Demirtas (2012). Insecticidal activity of *Hypnum cupressiforme* (Bryophyta) against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research. Oct 2012, Vol. 51: 6-10.

Ulusal kongrelerde sunulan sözlü ve poster bildirileri

1) Gökhan İpek, Arif İpek, Fatih Gül, Belgin Coşge Şenkal, **Ali Rıza Tüfekçi**, Ebru Derelli Tüfekçi, M. Ümit Bingöl. Ülkemiz Florasında Endemik Olan *Salvia freyniana*'nın Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi. 11. Tarla Bitkileri Kongresi, **Poster**,7-10 Eylül 2015, Çanakkale.

2) Arif İpek, Merve Demirci, Belgin Coşge Şenkal, **Ali Rıza Tüfekçi**, Ebru Derelli, Gökhan İpek, M. Ümit Bingöl. Türkiye'ye Endemik *Origanum minutiflorum*'un Uçucu Yağ Bileşenlerinin Farklı Yöntemler İle Belirlenmesi. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, **Poster**, 23-25 Eylül 2014, Yalova.

3) Özdemir Reyhan, **Tüfekçi Ali Rıza**, Adem Şevki, Bingöl Mesrur Ümid. *Digitalis Lamarckii* Ivanina Bitkisinin Çeşitli Kısımlarının Sulu Ektrelerinin Pankreatik Lipaz Enzimi Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması. *Iğdır International Conference on Multidisciplinary Studies,* **Sözlü sunum,** 06-08 Kasım 2018, Iğdır, TURKEY.

4) Derelli Tüfekçi Ebru, İnal Behcet, **Tüfekçi Ali Rıza** (2018). Kuru ve Sulu Koşullarda Yetiştirilen Nohut Çeşitlerinde Moleküler ve Biyokimyasal Değişimler. *International Eurasian Conference on Science, Engineering And Technology,* **Sözlü sunum**, 22-23 Kasım 2018, Ankara, TURKEY.

5) Derelli Tüfekçi Ebru, **Tüfekçi Ali Rıza** (2018). Salt Stress Responsive Transcription Factors and EST-SSR Marker Identification in *Raphanus sativus* L. *International Eurasian Conference on Science, Engineering And Technology,* **Sözlü sunum**, 22-23 Kasım 2018, Ankara, TURKEY.

6) Derelli Tüfekçi Ebru, İnal Behcet, **Tüfekçi Ali Rıza** (2018). EST-SSR Marker Identification in *Cirsium arvense* L. EST Databases. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018),* **Oral presentation**, 26-27 April 2018 Ankara, TURKEY.

7) **Tüfekçi Ali Rıza**, Akşit Hüseyin, Gül Fatih, Demirtaş İbrahim (2018). Determination of phenolic profile of *Cirsium arvense* (L.) Scop. *subsp. vestitum* (Wimmer et Grab.) Petrak plant. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018),* **Poster**, 26-27 April 2018 Ankara, TURKEY.

8) Küçük S, **Tüfekçi A.R**, Gül F, Demirtaş İ. Determination of phytochemical contents of some medicinal aromatic plants (Echinacea pallida, Melissa officinalis, Hypericum perforatum and Sideritis syriaca) belonging to Antalya region. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences(EurasianBioChem 2018),***Poster**, 26-27 April 2018 Ankara, TURKEY.

9) Altun Muhammed, **Tüfekçi Ali Rıza**, Demirtaş İbrahim, Behçet Lütfi. Determination of antiproliferative Activities of Isolated Molecules from *Satureja boissieri* Against

PC3 Cells. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018),* **Poster**, 26-27 April 2018 Ankara, TURKEY.
10) Altun Muhammed, **Tüfekçi Ali Rıza**, Demirtaş İbrahim, Behçet Lütfi. Investigation of Antiproliferative Properties of Molecules Isolated From *Satureja boissieri* Plant Against Hela Cells. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018),* **Poster**, 26-27 April 2018 Ankara, TURKEY.

11) Muhammed ALTUN, İbrahim DEMİRTAŞ, **Ali Rıza TÜFEKÇİ,** Lütfi BEHÇET (2017). *Satureja boissieri* bitki ekstraktlarının HeLa ve C6 Hücrelerine Karsı Antiproliferatif Özelliklerinin İncelenmesi. *İVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi*, **Poster**, 26-29 Nisan 2017, Istanbul, TURKEY

12) ŞİMŞEK Samet, KÖKSAL Ekrem, ÇATIR Mustafa, **TÜFEKÇİ Ali Rıza**, DEMİRTAŞ İbrahim (2017).Isolation of Axillarin from *Tanacetum alyssifolium* and determination of anticanserogen and antioxidant properties. *I. International Congress on Medicinal and Aromatic plants "Natural And Healthy Life",* **Poster**, 09-11 May 2017, Konya, TURKEY.

13) ALTUN Muhammed, **TÜFEKÇİ Ali Rıza,** DEMİRTAŞ İbrahim, BEHÇET Lütfi (2017). Determination Of Antiproliferative Activities of *Satureja boissieri* Extracts Against PC3 (Humanprostate Cancer) Cells. *I. International Congress on Medicinal and Aromatic plants,* **Poster**, 09-11 May 2017, Konya, TURKEY.

14) TÜFEKÇİ A.R, GÜLER Ç, GÜL F, ADEM Ş, DEMİRTAŞ İ., (2017). Bazı *Centaurea* bitki ekstrelerin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine etkilerinin incelenmesi. İVEK 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, **Poster**, 26-29 Nisan 2017, İstanbul, TURKEY

15) DEMİRTAŞ İbrahim, ALTUN Muhammed, **TÜFEKÇİ Ali Rıza,** BEHÇET Lütfi (2017). Isolation of Seconder Metabolites and Their invitro Anticancer Studies from *Satureja boissieri*. *IVEK 3rd International Convention ofPharmaceuticals and Pharmacies,* **Oral presentation,** 26-29 April 2017, İstanbul, TURKEY.

16) ARSLAN Şevki, KABALAY Buket, TERZİOĞLU Gülsüm, **TÜFEKÇi Ali Rıza**, ŞEN Alaattin, DEMİRTAŞ İbrahim. An in vitro Evaluation of Human DNA Topoisomerase I Inhibition by Small Nettle' (*Urtica urens*) leaves Extracts. *The 3 rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*, **Poster,** 05-08 Jun 2017, Minsk, BELARUS.

17) ARSLAN Şevki, KABALAY Buket, TERZİOĞLU Gülsüm, **TÜFEKÇi Ali Rıza**, ŞEN Alaattin, DEMİRTAŞ İbrahim. Assesment of Cytotoxic Effect of Small Nettle' (*Urtica urens*) Seeds on Human Lung Cancer. *The 3 rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*, **Poster,** 05-08 Jun 2017, Minsk, BELARUS.

18) TÜFEKÇİ Ali Rıza, DEMİRTAŞ İbrahim, DERELLİ TÜFEKÇİ Ebru, ALTUN Muhammed. GC-MS Analysis of Essential Oil And Fatty Acid Components Of *Centaurea paphlagonica* Plant. *I. International Congress On Medicinal And Aromatic Plants "Natural And Healthy Life"*, **Poster**, 09-11 May 2017, Konya, TURKEY.

19) GÜL Fatih, **TÜFEKÇİ Ali Rıza,** ALTUN Muhammed, DEMİRTAŞ İbrahim. Kickxia lanigera bitkisi üzerine biyoaktf yönlendirmeli izolasyon çalışmaları. *İVEK 3. Uluslararası Ilaç ve Eczacılık Kongresi,* **Poster**, 26-29 Nisan 2017, Istanbul, TURKEY.

20) KULABAS Seda S, İPEK Hande, ARSLAN Şevki, **TÜFEKÇİ Ali Rıza**, DEMİRTAŞ İbrahim, TÜMER Tuğba. Ethyl acetate extract of Lavandula stoechas increased glucose uptake, phosphorylation of AKT and expression of lipoprotein lipase in insulin resistant C2C12 muscle cells. *3rd International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf,* **Poster**, 18-21 October 2017, Bansko, BULGARIA.

21) KULABAS Seda S, İPEK Hande, **TÜFEKÇİ Ali Rıza**, GÜL Fatih, DEMİRTAŞ İbrahim, TÜMER Tuğba. Subfraction Obtained From Ethylacetate Extract of Lavandula stoechas Effectively Restrains Gluconeogenic Glucose Production in Hepatic Cells and Improves Signaling in Insulin Resistant Myotubes. *PSE International Symposium "New Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary Welfare,* **Poster**, 17-19 September 2017, Chieti, ITALY.

22) TÜMER Tuğba, KULABAS Seda S, İPEK Hande, **TÜFEKÇİ Ali Rıza**, ARSLAN Şevki, DEMİRTAŞ İbrahim (2017). Lavandula stoechas: Its differential medicinal use in Anatolia and ameliorative potential for metabolic syndrome. *PSE International Symposium "New Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary Welfare,* **Oral Presentation**, 17-19 September 2017, Chieti, ITALY.

23) DEMİRTAŞ İbrahim, **TÜFEKÇİ Ali Rıza,** ALTUN Muhammed, BEHÇET Lütfi (2017). Satureja boissieri Bitkisinden Aktivite Yönlendirmeli İzolasyon Çalışmaları. *Uluslararası Katılımlı 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi,* **Poster**, 30 Mart-02 Nisan 2017, Antalya, TURKİYE.

24) ALTUN Muhammed, **TÜFEKÇİ Ali Rıza,** DEMİRTAŞ İbrahim, BEHÇET Lütfi (2017). *Satureja boissieri* Bitkisinden İzole Edilen Fenol, Flavonoid ve Steroid Moleküllerinin İnvazif Özelliklerinin İncelenmesi. *Uluslararası Katılımlı 5. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi,* **Poster**, 30 Mart-02 Nisan 2017, Antalya, TURKİYE.

25) Ömer Cem KARAKOÇ, **Ali Rıza TÜFEKÇİ**, Fatih GÜL, Serkan KOLDAŞ (2016). *Satureja boissieri*'den Elde Edilen Uçucu Yağın *Sitophilus granarius* ve *Spodoptera littoralis*'e Karşı İnsektisidal Aktiviteleri. *Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi,* **Sözlü sunum**, 5-8 Eylül 2016, Konya, TURKEY.

26) Muhammed ALTUN, İbrahim DEMİRTAŞ, **Ali Rıza TÜFEKÇİ,** Lütfi BEHÇET (2016). The Antiproliferative Activities of Satureja boissieri Extracts Against C6 (Rat Glioma) Cells. *International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16)***, Sözlü sunum,** March 19-20, 2016, Kilis, TURKEY.

27) Muhammed ALTUN, Gökhan ABAY, Serkan KOLDAŞ, **Ali Rıza TÜFEKÇİ**, İbrahim DEMİRTAŞ. *Dicranum scoparium* (Dicranaceae, Bryophyta) Bitkisindeki

Uçucu Bileşenlerinin Antiproliferatif Etkileri ve HPLC Profilleri. *3.İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi,* **(Poster)**, 20-22 Mart 2015, Antalya, TURKEY.

28) Demirtaş I., Bulut F., Yağlıoğlu A.Ş., **Tüfekci A.R**., Gül F., Koldaş S., Altun M., Şen Ö., Erenler R., **Behçet L.** Phyto-activity Studies on Turkish *Centaurea* Species, from Past to Future. *11. International Symposium on Pharmaceutical Sciences* (*ISOPS*) **(Sözlü Sunum),** June 9-12**,** 2015**,** Ankara University, Faculty of Pharmacy, Ankara, TURKEY.

29) Seda SAVRANOĞLU, Hande İPEK, Şevki ARSLAN, **Ali Rıza TÜFEKÇİ**, İbrahim DEMİRTAŞ, Tuğba BOYUNEĞMEZ TÜMER (2015). *L. stoechas* Bitkisinin İnsülin Direncine Karşı İyileştirici Aktivitesi ve Moleküler Mekanizmaları. *XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi* **(Sözlü Sunum)**, 3-6 Kasım 2015, Antalya, TURKEY.

30) Tugba B. TUMER, Seda SAVRANOGLU, Hande IPEK, **Ali Rıza TUFEKCİ**, Fatih GUL, Ibrahim DEMİRTAS (2016). Subfraction obtained from ethyl acetate extract of *Lavandula stoechas* restrains gluconeogenesis in hepatic cells and improves signaling in insulin resistant myotubes. *9th Joint Natural Products Conference* , **(Poster)**, July, 24-27, Copenhagen, DENMARK.

31) Türkiye'ye endemik *Origanum minutiflorum*'un uçucu yağ bileşenlerinin farklı yöntemler ile belirlenmesi (II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 23-25 Eylül 2014, Yalova).

32) *Sideritis sipylea* türünün uçucu yağ bileşenlerinin farklı yöntemler ile belirlenmesi (II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, *Sözlü sunum*, 23-25 Eylül 2014, Yalova.

Ulusal Kuruluşlarca Desteklenen Projede Görevleri

1) *Asterecea* Familyasına Ait Bazı Bitki Türlerinin Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi (Çankırı Karatekin Üniversitesi-BAP Projesi-Devam Ediyor-Araştırmacı, 2014-2020).

2) *Carthamus tinctorius* L. Bitkisinin Kimyasal İçeriğinin Belirlenmesi ve Antikanser Özelliklerinin İncelenmesi (Çankırı Karatekin Üniversitesi-BAP Projesi-Proje Tamamlandı-Araştırmacı, 2017-2018).

3) Amasya ve Çevresinde Yayılış Gösteren *Juniperus foetidissima*'nın Sekonder Metabolitlerinin İzolasyonu Antikanser ve Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi (Çankırı Karatekin Üniversitesi-BAP Projesi-Proje Tamamlandı-Araştırmacı, 2012-2018).

4) *Centaurea polypodiifolia* Boiss *var polypodiifolia* bitki ekstresinin HPLC TOF analizi ve antiproliferatif ve sitotosik aktivitelerinin incelenmesi (Çankırı Karatekin Üniversitesi-BAP Projesi-Proje Tamamlandı-Araştırmacı, 2014-2015).

5) *Cirsium arvense* bitkisinin gövde yaprak ve çiçek ekstrelerinin antiproliferatif ve fitokimyasal potansiyelinin belirlenmesi (Çankırı Karatekin Üniversitesi-BAP Projesi-Proje Tamamlandı-Araştırmacı, 2015-2017).

6) Bitkilerden izole edilmiş bazı doğal bileşiklerin karbonik anhidraz I ve II, dihidroflat redüktaz enzimlerinin üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması (TUBİTAK Projesi-Tamamlandı-Araştırmacı, 2014-2015).