



***Centaurea virgata* LAM. BİTKİSİNİN SEKONDER
METABOLİTLERİNİN
AKTİVİTE YÖNLENDİRMELİ İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU**

SEMRA ŞANAL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. Adem ÖNAL
2016
Her hakkı saklıdır**

T.C.
GAZIOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Centaurea virgata LAM. BİTKİSİNİN SEKONDER
METOBOLİTLERİNİN AKTİVİTE YÖNLENDİRMELİ İZOLASYONU
VE KARAKTERİZASYONU

SEMRA ŞANAL

TOKAT
2016

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

TÜBİTAK tarafından 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Burs Programı ile desteklenmiştir.

Semra ŞANAL tarafından hazırlanan “*Centaurea virgata* LAM. Bitkisinin Sekonder Metabolitlerinin Aktivite Yönlendirmeli İzolasyonu ve Karakterizasyonu ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19 NİSAN 2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu İle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA ANA BİLİM DALI nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Adem ÖNAL



İkinci Danışman
Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU
Çankırı Karatekin Üniversitesi



Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ
Çankırı Karatekin Üniversitesi



Prof. Dr. Mustafa CEYLAN
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Prof. Dr. Ramazan ERENLER
Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ONAY



Prof. Dr. Mehmet Ali ŞAKIN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

26-/04/2016

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

SEMRA ŞANAL

Nisan 2016

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Centaurea virgata* LAM. BİTKİSİNİN SEKONDER METABOLİTLERİNİN AKTİVİTE YÖNLENDİRMELİ İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

SEMRA ŞANAL

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ADEM ÖNAL)
(İKİNCİ DANIŞMAN: DOÇ. DR. AYŞE ŞAHİN YAĞLIOĞLU)

Bu tez çalışması kapsamında *Centaurea virgata* LAM. bitkisinin antikanser aktivite yönlendirmeli sekonder metabolitlerinin izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla *C. virgata* bitkisinin farklı polaritedeki çözücüler ile (hekzan, diklorometan, etilasetat ve metanol) ekstraksiyon işlemi yapıldı. Elde edilen ekstraktların C6 ve HeLa kanser hücrelerine karşı dört farklı dozda (100, 50, 25, 5 µg/mL) antikanser aktiviteleri incelendi. Yapılan testler neticesinde her iki hücre türü için en etkili ekstrenin diklorometan ekstresi olduğu gözlemlendi ve izolasyon çalışmaları için ilgili ekstre kullanıldı. Diklorometan ekstresinin izolasyon çalışmaları için ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi gibi saflaştırma teknikleri kullanıldı. Spektroskopik yöntemlerle (1D, 2D, NMR) izole edilen bileşikler cnicin (1) ve daucosterin (2) olduğu belirlendi. HeLa hücresi için Daucosterin molekülünün, C6 hücresi için ise Cnicin molekülünün daha etkili olduğu görüldü. *C. virgata* Hekzan ve diklorometan ekstraktlarının GC-MS analizi gerçekleştirildi. Diklorometan ekstresinin sonucunda ana bileşen olarak Nonacosane ve Palmitic acid belirlendi. Hekzan ekstresinde ise ana bileşen olarak taraxasterol belirlendi. *C. virgata* EtOAc ve MeOH ekstraktlarının HPLC/TOF-MS analizleri gerçekleştirildi. EtOAc ekstresinde ana bileşenler olarak 4-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, diosmin ve apigenin belirlendi. MeOH ekstresinde ise ana bileşenler olarak klorojenik asit, fumarik asit, quercetin-3-β-D-glucoside ve diosmin olduğu ortaya konuldu.

2016, 53 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Antikanser, HeLa, C6, Daucosterin, Cnicin, NMR, HPLC-TOF-MS, GC-MS

ABSTRACT

MASTER THESIS

BIOACTIVITY GUIDED ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITES FROM *Centaurea virgata* LAM. PLANT

SEMRA ŞANAL

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. ADEM ÖNAL)

(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. AYŞE ŞAHİN YAĞLIOĞLU)

In this work, activity- guided isolation of secondary metabolites were carried out from *Centaurea virgata* LAM. *Centaurea virgata* was extracted with (hexane, dichloromethane, ethylacetate and methanol) anticancer activities of these extracts were executed on C6 and HeLa cell lines at various concentration (100, 50, 25, 5 µg/mL). The dichloromethane extract exhibiting the most anticancer activities was subjected to chromatographic techniques (column chromatography, preparative-TLC) to isolate the active compounds the structures isolated compounds daucosterin and cnicin were identified by spectroscopic method (1D, 2D, NMR). Cnicin (**1**) and daucosterin (**2**) were exhibited excellent anticancer activities on C6 and HeLa cell lines respectively. GC- MS analysis were performed for hexane extract and dichloromethane extract Nonacosane and Palmitic acid were determined as main compounds for dichloromethane extract. Taraxasterol was the main constituent of hexane extract. HPLC-TOF/MS analysis were executed of ethylacetate extract and methanol extract, 4-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, diosmin and apigenin were determined as main components in ethylacetate extract. Chlorogenic acid, fumaric acid, quercetin-3-β-D- glucoside and diosmin were the a main constituents of methanol extract.

2016, 53 PAGE

KEYWORDS: Isolation, anticancer, HeLa, C6, Daucosterin, Cnicin, NMR, HPLC-TOF-MS, GC-MS

ÖNSÖZ

Çalışmalarında ilgisi ve desteklerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Adem ÖNAL' a,

Yüksek Lisans eğitim süresince, yönlendirilmeli ve özgün kişiliği ile kendimi geliştirmemi sağlayan, tez çalışmam boyunca büyük emek ve sabır gösteren, yardımlarıyla her zaman yanımda olan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Ferda ESER' e, Çalışmalarında fikir veren, yol gösteren, hücre kültürü çalışmaları, gerek analiz, gerek yorumlama aşamasında, bitkinin temini noktasında yardımlarından dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU' na,

NMR Spektrumların yorumlanması ve molekül yapılarının aydınlatılmasında bana değerli vaktini ayıran sevgili hocalarım Uzm. Özkan ŞEN ve Uzm. Hüseyin AKŞİT' e,

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, moral desteğini gördüğüm sevgili çalışma arkadaşlarım Ebru AKTAŞ ve Özlem YUMUŞAK' a,

Çalışma sırasında ilgi ve yardımlarından dolayı İlyas YILDIZ' a,

Yüksek Lisans öğrenimim süresince maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK' a Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana güvenlerini ve inançlarını hiç kaybetmeyen, sürekli arkamda olan, yaşam kaynaklarım babam Duran ŞANAL, annem Sati ŞANAL, ağabeylerim Murat ŞANAL ve Suat ŞANAL, canım yeğenim Masal Eylül'e,

Çalışma dönemimde verdiği destek ve gösterdiği sonsuz anlayışla her zaman yanımda olan sevgili nişanlım Yücel DOĞAN' a,

Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan sevgili ev arkadaşlarım Özlem ÖZDEMİR ve Yasemin BÜYÜKDURNA' ya,

Sonsuz Teşekkürler...

SEMRA ŞANAL

Nisan, 2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-----|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| ÖNSÖZ..... | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | vi |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | vii |
| ÇİZELGE LİSTESİ..... | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Taksonomik Genel Bilgiler | 3 |
| 2.1.1. Asteraceae (Compositae) Familyası | 3 |
| 2.1.2. <i>Centaurea</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri | 4 |
| 2.1.3. <i>Centaurea virgata</i> LAM. Bitkisinin Genel Özellikleri..... | 5 |
| 2.1.2. <i>Centaurea</i> L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri..... | 7 |
| 2.1.3. <i>Centaurea</i> LAM. Taksonlarının Halk Arasındaki Tıbbi Amaçla Kullanımları | 8 |
| 2.1.4. <i>Centaurea</i> LAM. Türleri ile Yapılan İzolasyon Çalışmaları..... | 10 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM | 13 |
| 3.1. Materyal | 13 |
| 3.1.1. Kullanılan Araç ve Malzemeler..... | 13 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler | 13 |
| 3.1.2.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler | 13 |
| 3.1.2.2. Biyolojik Aktivite Testleri için Kullanılan Kimyasallar ve Hücreler | 13 |
| 3.1.3. Cihazlar | 14 |
| 3.1.4. Bitkisel Materyal..... | 15 |
| 3.1.4.1. Bitkilerin Toplanması, Kurutulması ve Koordinatları | 15 |
| 3.1.5. Biyolojik Materyaller | 15 |
| 3.1.5.1. HeLa ve C6 Hücrelerinin Hücre Kültürü | 15 |
| 3.1.5.2. Hücrelerin Sayılması İşlemi | 16 |
| 3.1.5.3. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Çözeltisinin Hazırlanması..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 3.1.6. Biyolojik Aktive Testleri..... | 18 |
| 3.1.6.1. Ekstre ve İzole Edilen Bileşiklerin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması | 18 |
| 3.1.6.2. BrdU ELISA Testi | 18 |
| 3.1.7. Kullanılan Saflaştırma Metotları | 18 |
| 3.1.7.1. İzolasyon İşlemleri için Ekstraksiyon Yöntemi..... | 18 |
| 3.1.7.2. Kolon Kromatografisi | 19 |
| 3.1.7.3. İnce Tabaka Kromatografisi | 20 |
| 4. BULGULAR | 21 |
| 4.1. Antiproliferatif Aktive Test Sonuçları | 21 |
| 4.1.1. HeLa Hücresi Test Sonuçları..... | 21 |
| 4.1.2. C6 Hücresi Test Sonuçları..... | 22 |
| 4.2. İzolasyon İşlemleri..... | 25 |
| 4.3. <i>Centaurea virgata</i> LAM. bitkisinden İzole Edilen Bileşikler | 25 |
| 4.3.1. Cnicin Bileşiğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri | 25 |
| 4.3.2. Daucosterin Bileşiğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri | 33 |
| 4.4. <i>Centaurea virgata</i> LAM. Bitkisinin EtOAc ve MeOH Ekstrelerinin HPLC/TOF-MS Sonuçları | 41 |
| 4.5. <i>Centaurea virgata</i> LAM. Bitkisinin Hekzan ve CH ₂ Cl ₂ ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları | 44 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 47 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 50 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ | 53 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| Simgeler | Açıklama |
|--------------------|---|
| % | Yüzde |
| δ | Kimyasal Kayma |
| J | Etkileşme Sabiti |
| α | Alfa |
| μ | Mikron |
| °C | Santigrat derece |
| d | Dublet |
| s | Singlet |
| m | Multiplet |
| Hz | Hertz |
| Kısaltmalar | Açıklama |
| μ L | Mikrolitre |
| ppm | Milyonda bir kısım |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| EDTA | Etilendiamin Tetra Asetik Asit |
| COSY | Correlation Spectroscopy |
| HECTOR | Heteronuclear Correlation |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Band Correlation |
| APT | Attached Proton Test |
| DEPT | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| UV | Ultraviyole |
| UV- VIS | Ultraviyole- Görünür Bölge |
| GC- MS | Gaz- Kütle Kromatografisi |
| NaHCO ₃ | Sodyum Bikarbonat |

ŞEKİL LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 2. 1. <i>Centaurea virgata</i> LAM. | 6 |
| Şekil 2. 2. Taksonun yayılış gösterdiği iller | 7 |
| Şekil 2. 3. <i>Centaurea deustaten</i> . bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen bileşikler | 10 |
| Şekil 2. 4. Centabracein ve Bracteoside | 11 |
| Şekil 2. 5. <i>C. helenioides</i> Boiss. bitkisinin çiçeklerinden izole edilen seskiterpenler | 12 |
| Şekil 2. 6. Hispidulin-7-O- methylglucuronide | 12 |
| Şekil 3. 1. C6 ve HeLa kanser hücreleri | 14 |
| Şekil 3. 2. Hücrelerin çöktürülmesi..... | 15 |
| Şekil 3. 3. İnkübatör | 16 |
| Şekil 3. 4. Thoma lamı | 17 |
| Şekil 3. 5. DMEM besi yeri | 17 |
| Şekil 3. 6. <i>C. virgata</i> LAM. bitkisinin ekstraksiyon şeması..... | 19 |
| Şekil 4. 1. <i>C. virgata</i> LAM. bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstrelerinin HeLa hücresine karşı antikanser etkileri..... | 21 |
| Şekil 4. 2. <i>C. virgata</i> LAM. bitkisinin CH ₂ Cl ₂ ekstresi ve bu ekstreden izole edilen bileşiklerin HeLa hücresine karşı antikanser etkileri | 22 |
| Şekil 4. 3. <i>C. virgata</i> LAM. bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstrelerinin C6 hücresine karşı antikanser etkileri..... | 23 |
| Şekil 4. 4. <i>C. virgata</i> LAM. bitkisinin CH ₂ Cl ₂ ekstresi ve bu ekstreden izole edilen bileşiklerin C6 hücresine karşı antikanser etkileri | 24 |
| Şekil 4. 5. Cnicin bileşiğinin yapısı..... | 25 |
| Şekil 4. 6. Cnicin bileşiğinin ¹ H- NMR spektrumu (400 MHz DMSO- d ₆)..... | 27 |
| Şekil 4. 7. Cnicin bileşiğinin ¹³ C- NMR spektrumu (100 MHz DMSO- d ₆)..... | 28 |
| Şekil 4. 8. Cnicin bileşiğinin COSY spektrumu | 29 |
| Şekil 4. 9. Cnicin bileşiğinin HMBC spektrumu | 30 |
| Şekil 4. 10. Cnicin bileşiğinin HETCOR spektrumu | 31 |
| Şekil 4. 11. Cnicin bileşiğinin APT, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumu | 32 |
| Şekil 4. 12. Daucosterin bileşiğinin yapısı | 33 |
| Şekil 4. 13. Daucosterin bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (400 MHz DMSO- d ₆)..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4. 14. Daucosterin bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (100 MHz DMSO-d ₆) | 36 |
| Şekil 4. 15. Daucosterin bileşiğinin COSY spektrumu | 37 |
| Şekil 4. 16. Daucosterin bileşiğinin HETCOR spektrumu | 38 |
| Şekil 4. 17. Daucosterin bileşiğinin HMBC spektrumu | 39 |
| Şekil 4. 18. Daucosterin bileşiğinin APT, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumu | 40 |
| Şekil 4.19. <i>Centaurea virgata</i> LAM. EtOAc (A) ve MeOH (B) ekstralarının HPLC-TOF/MS kromatogramları..... | 42 |
| Şekil 4. 20. <i>Centaurea virgata</i> LAM. EtOAc ekstresindeki ana bileşenler | 43 |
| Şekil 4. 21. <i>Centaurea virgata</i> LAM. MeOH ekstresindeki ana bileşenler | 43 |
| Şekil 4. 22. <i>Centaurea virgata</i> LAM. hekzan (A) ve CH ₂ Cl ₂ (B) ekstralarının GC-MS kromatogramları | 46 |

ÇİZELGE LİSTESİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|---------------------|
| Çizelge 2. 1. <i>Centaurea virgata</i> LAM. bitkisinin sistematik hiyerarşi | 6 |
| Çizelge 2. 2. <i>Centaurea virgata</i> LAM. bitkisinin genel takson özellikleri | 7 |
| Çizelge 4. 1. <i>C. virgata</i> dan elde edilen ekstreler ve izole edilen moleküllerin IC ₅₀ ve IC ₇₅ değerleri (*< 5 µg/mL)..... | 24 |
| Çizelge 4. 2. <i>C. virgata</i> LAM. bitkisinin kolon kromatografisi için çözücü sistemi..... | 25 |
| Çizelge 4. 3. Cnicin bileşiğinin ¹ H-NMR, ¹³ C- NMR kimyasal kayma değerleri ve HMBC kolerasyonları..... | 26 |
| Çizelge 4. 4. Daucosterin bileşiğinin ¹³ C- NMR ve ¹ H- NMR kimyasal kayma değerleri (400 MHz, DMSO- d ₆)..... | 34 |
| Çizelge 4. 5. <i>Centaurea virgata</i> LAM. ekstrelerinin fenolik bileşenleri (10 ³ X mg fenolik/1 kg kuru bitki)..... | 41 |
| Çizelge 4. 6. <i>Centaurea virgata</i> LAM. bitkisinin hekzan ve CH ₂ Cl ₂ ekstrelerinin GC-MS analiz sonuçları..... | 45 |

1. GİRİŞ

Kanser, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalık türüdür (Klug ve Cummings, 2002). Yüzyılım başlarında ölüme neden olan hastalıklardan 7 ve 8. sıralarda yer alırken bugün ise birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almıştır (Haydaroglu, 2007). Dünya Sağlık Örgüt'ü, Dünya'da 2000 yılında 10 milyon yeni vakada kanser hastalığı tespit etmiştir. Bu rakam giderek artmakta olup, 2020 yılında 15 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise her yıl yaklaşık 100 binin üzerinde kanser hastalığına rastlanmaktadır. Kanser hastalıkları sebebiyle meydana gelen ölümlerde 2020 yılında % 75 ile %100 oranında bir artış göstermesi beklenmektedir (Anonim, 2004).

Kanser, hastalıklarının büyük bir çoğunluğu çevresel ve davranış faktörlerinden meydana gelmekte ve aynı zamanda kalıtım yoluyla da oluşma olasılığı vardır. Kanser belli bir hastalık türü olmayıp vücudumuzun her yerinde gerçekleşebilen habis bir hastalık türüdür.

Mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların tedavisi için insanlar birçok yol denemişlerdir. Bunlardan bir tanesi de doğal olarak yetiştirilmiş olan şifalı bitkilerdir. Bu şifalı bitkiler çeşitli hastalıklara karşı eskiden bu yana günümüzde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ertürk ve Demirbağ, 2003). Bu şifalı bitkilerdeki etken maddeler yardımıyla normal hücreler için toksik olmayan, fakat kanserli hücreleri öldürebilen ilaçlar üretilmektedir (Murray ve ark., 2004)

Günümüzde, yaklaşık olarak ilaçların %25' i bitkiler üzerinden geliştirilmiştir (Liu ve Wang, 2007). Doğal olarak yetişen şifalı bitkilere karşı ilginin fazla olmasının sebebi, sentetik kökenli ilaçlar insan vücudunda beklenmedik yan etkiler oluştururken bunun yanında genellikle tek bir etkiye sahiptirler. Bitkisel droglar ise birden fazla etki göstermektedir (Baytop, 1984; Hakim, 1982). Bitkisel ilaçlar, hastalığın tanınmasında, tedavisinde, etkisinin azaltılmasında ya da hastalık oluşumunun engellenmesinde kullanılabilir (Goldman, 2001).

Bu nedenle, biyolojik çeşitliliğe sahip olan bitki kaynaklarının değerlendirilmesi için etkin yolların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu yollardan bir tanesi, bitki ekstralarının kimyasal ve biyolojik taramalarının bir arada yapılmasıdır. Son zamanlarda, topoizomeraz inhibitörleri olarak tanınan naftokinon türevleri antiparazitik ve antikanser aktiviteleri açısından bilinmekte olup, farmakolojik olarak aktif antitümör bileşikler için öncelikli hedef haline gelmektedir.

Anadolu’da şifa kaynağı olarak bilinen bitki türlerinden bazıları *Centaurea* familyasına aittir. *Centaurea* türleri özellikle kanser, migren ve romatizmaya karşı etkili olabilmektedir. *Centaurea* türleri seskiterpen laktonlar, asetilenler, lignanlar, triterpenler ve flavonoid bileşikler de içermektedir. Halk arasında ateş düşürücü, adet söktürücü, iştah açıcı, kuvvet verici ve mide yatıştırıcı olarak kullanılmaktadır (Karagöz ve ark., 2002). *Centaurea* türleri tek olarak veya diğer bitki türleri ile birlikte antidiyabetik, antiromatizmal, koleretik, dijestif, stomaşik, diüretik, adet söktürücü, astrenjan, hipotansif, antipiretik, sitotoksik, antibakteriyal olarak kullanılmaktadır. *Centaurea* türleri taksonomik, kimyasal ve biyolojik aktivite açısından oldukça fazla araştırmaya kaynak olup, literatürde *Centaurea* türleri ile ilgili izolasyon ve biyolojik aktivite çalışmaları bulunmasına rağmen *Centaurea virgata* türünün antiproliferatif aktivite ve sekonder metabolit içeriği ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bağlamda, yapılacak çalışma fitokimyasal ve farmakolojik önem arz etmektedir.

Bu çalışmada; *Centaurea virgata* LAM. bitkisi farklı polaritelere sahip çözücüler ile ekstre edildikten sonra sıçan beyin tümörü (C6) ve insan rahim kanseri (HeLa) hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testlerine tabi tutulacaktır. Test sonuçlarına göre etkili çıkan ekstralarda kolon, perf- HPLC, perf- TLC gibi aktif bileşiklerin izolasyonu gerçekleştirilecektir. Saf bileşiklerin yapı tayininde 1D ve 2D NMR, IR, HPLC- TOF/ MS gibi spektroskopik yöntemlerden yararlanılacaktır. Antiproliferatif aktivite testleri gerçekleştirilerek saf bileşiklerin C6 ve HeLa hücreleri üzerindeki etkisi incelenecektir. Ayrıca yüksek antiproliferatif aktivite gösteren bileşiklerin sitotoksik aktivite testleri gerçekleştirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomik Genel Bilgiler

2.1.1. Asteraceae (Compositae) Familyası

Asteraceae familyası karakteristik özelliklere sahip, kolaylıkla ayırt edilebilen, Dünya’da hemen hemen her yerde rastlanabilen, yaklaşık olarak 1100 cins ve 2500 kadar türe sahip olan geniş bir familyadır (Seçmen ve ark., 1995). Türkiye’ de ise 133 cins ve 1156 türü bulunmakla beraber, bunların yaklaşık olarak % 38’i endemiktir (Ma ve ark., 2008).

Geniş ölçüde yayılmış olan Asteraceae familyası büyük oranda otsu bitkilerden oluşmuş olup, odunsu ve ağaçsı tipleri de içine alır. Yapraklar almaşık veya karşılıklı rozet şeklinde ve stipulasız çiçekler küçük (florete), hermafrodit, erkek, dişi veya sterildir.

Familya üyelerinin büyük bir bölümü, ılıman bölgelerde yayılış gösterirken, bunlar otsu formları oluşturur. Antarktika dışındaki her yerde yayılış gösteren familya üyeleri, özellikle Akdeniz Havzası, Meksika ve Güney Afrika gibi tropik ve subtropik bölgelerin yarı kurak kesimlerinde bulunmaktadır. Compositae üyeleri ağaç, çalı ve otsu formasyonlarında, Avusturya ve Güney Amerika’ da yayılış göstermekle beraber, sadece tropikal yağmur ormanlarında daha az yayılış göstermektedir (Heywood, 1978) Asteraceae familyası, Asteraceae (Tubuliflorae) ve Cichoriaceae (Liguliflorae) olmak üzere iki alt familyaya ve 11 tribusa ayrılmaktadır (Davis, 1975).

Bu tribuslar;

- | | | |
|----------------|----------------|---------------|
| 1. Heliantheae | 6. Eupatorieae | 11. Lactuceae |
| 2. Inulae | 7. Anthemideae | |
| 3. Astereae | 8. Arctoteae | |
| 4. Senecioneae | 9. Cardueae | |
| 5. Calenduleae | 10. Mutisieae | |

2.1.2. *Centaurea L.* Cinsinin Genel Özellikleri

Asteraceae familyasının *Cardueae* tribusunda bulunan *Centaurea L.* cinsi, Türkiye' de % 61,1'i endemik olmak üzere 192 taksonla temsil edilmektedir. En çok yayılış gösterdiği yerler Batı, Güneybatı ve Orta Anadolu'dur (Bona ve Aras, 2008; Wagenitz ve Davis, 1975; Davis,1998).

Yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık otsular, nadiren dikenli dallı küçük çalılar veya yapraklarını dökmeyen büyük çalılardır. Genellikle çalı gibi tüylü, nadiren tüysüz, sapsız gudedlere (salgı organı) sık rastlanır.

Yaprakları almaşık dizilişli olup bazen tümü tabanda bulunur. Türkiye' deki türler dikensizdir. *C. odyssei*' deki spinulose hariç. Çoğunlukla lopları ayanın yarısının ortasına kadar (pinnatifit) veya ayanın yarısının 2/3'sine kadar (pinnatipartit) derin olup aşağı doğru kayıcıdır.

Kapituladaki çiçekler eşeyce farklı (heterogam), tabla şeklinde (diskoit), merkezinde tüpsü ya da tüm çiçekler tüpsü ancak kenardakiler daha büyük ve yayıktır (radyant). Brakte topluluğu (involukrum) yumurtamsı, yarıküremsi, silindir, dikdörtgensel veya iğ şeklinde olup, involukrum braktereleri; çok serili, kiremitsi, çok az sert, çoğu zaman zarımsı, saman yapılı veya çeşitli formlarda derimsi ek yapı (appendage) gösterirler. Ek yapılar, tam veya kirpiksiye benzeyen saçaklı, dairemsi, mızraksı veya üçgen, küçük sivri sert bir uç ile biten kısa ya da sert dikenli, bazen sadece sivri sert bir uçdan ibaret bazen de kısa dikencikli, çiçekleri; pembe, mor, mavi, sarı veya beyaz renklidir. Kenardaki çiçekleri eşeysiz/nötr olup, merkezdeki çiçekler ise erdişidir (hermafrodit).

Centaurea L. cinsinin sistematik durumu aşağıda belirtilmiştir:

Bölüm : Spermatophyta

Altbölüm : Angiospermae

Sınıf : Dicotyledonae

Altsınıf : Asteridae

Takım : Asterales

Aile : Asteraceae (Compositae)

Tribus : Cardueae

Genus : *Centaurea L.*

Tür sayısının fazla olması, sınıflandırılmasındaki zorluklar, yaygın kullanımı ve zengin kimyasal içeriği nedeniyle *Centaurea* cinsi önem kazanmış olup, son zamanlarda taksonomik, kimyasal ve biyolojik aktivite açısından büyük önem arz etmektedir.

2.1.3. *Centaurea virgata* LAM. Bitkisinin Genel Özellikleri

Çok yıllık taban kısmı odunsu ve birkaç gövdeli (20-30-70 cm), çok dallanmış, sert yayılıcı dallıdır. Yapraklar ince yumuşak tüyden oluşmuş, örümcek ağına benzemektedir.

Kapitulum (başcık, tepecik) tek ya da çoğu zaman dalların sonunda ikisi beraberdir, çiçeklenmeden sonra çoğunlukla düşer. İnvolutrum 7-9x 3-4 mm, ortası şişkin olup iki uca doğru daralıp sivrilmiş şekildedir. Ek yapılar küçük (fillarilerin taban kısmı görünür şekilde), rengi genellikle saman renginde olup az çok morumsu kırmızı, kahverengi lekeli, çoğunlukla geriye kıvrak, her bir kenarı 5-10 kirpikli (1-2 mm), 0.5- 2 mm sivri sert bir uç ile son bulmaktadır. Çiçekler gül pembesi renginde olup, mor kenarları hemen hemen ışınal olarak yayılım gösterir. Çiçeklenme Haziran- Eylül ayları arasında meydana gelip, kuru tepeler, step, kuru ekilmemiş boş alanlarda 100-2000 m yüksekliklerde yayılış gösterir.



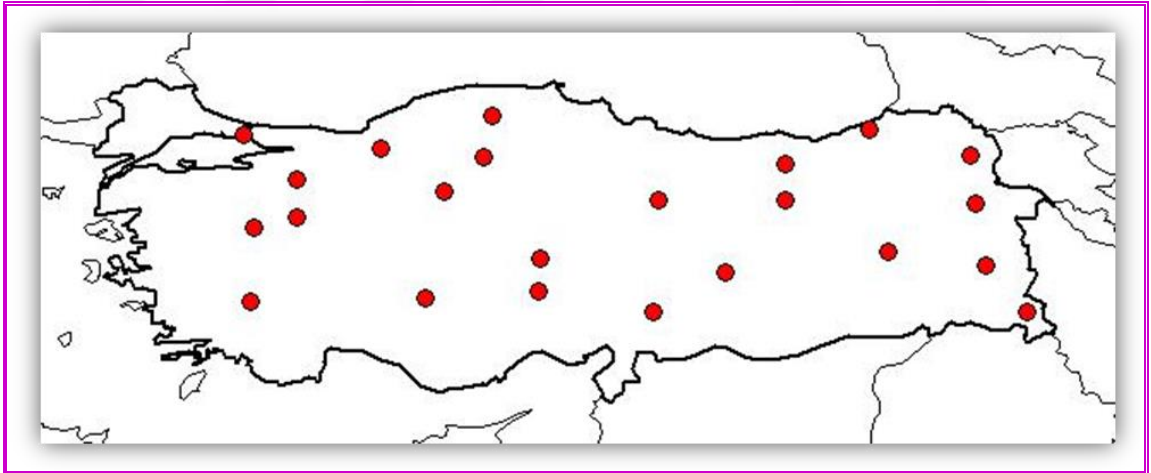
Şekil 2. 1. *Centaurea virgata* LAM.

Çizelge 2. 1. *Centaurea virgata* LAM. bitkisinin sistematik hiyerarşi

| Alem | Plant |
|-----------|-------------------------------|
| Alt alem | Tracheobionta |
| Bölüm | Magnoliophyta |
| Sınıf | Magnoliposida |
| Alt sınıf | Asteridae |
| Takım | Asterales |
| Familya | Asteraceae |
| Cins | <i>Centaurea</i> L. |
| Tür | <i>Centaurea virgata</i> LAM. |

Çizelge 2. 2. *Centaurea virgata* LAM. bitkisinin genel takson özellikleri

| Ömür | Çok yıllık |
|-----------------------------------|---|
| Yapı | Otsu |
| Çiçeklenme | 6-9. Aylar |
| Habitat | Kurak tepeler, step, kurak boş alanlar |
| Yükseklik | 100-2000 m |
| Endemik | Endemik değil |
| Element | İran-Turan |
| Türkiye dağılımı | Karasal Anadolu, Kuzey Batı Anadolu, Doğu Anadolu |
| Genel dağılımı | Bulgaristan, Lübnan, Anti- Lübnan, Transkafkasya, Kuzey Irak, Afganistan, Türkistan |
| Taksonun Yayılış Gösterdiği İller | Bolu, İstanbul, Kars, Hakkari, Kayseri, Çankırı, Kastamonu, Ağrı, Ankara, Bilecik, Denizli, Erzincan, Gümüşhane, Konya, Kütahya, Malatya, Kahramanmaraş, Muş, Nevşehir, Niğde, Tokat, Sivas, Van, Bayburt illerinde yayılış göstermektedir (Şekil 2.2). |



Şekil 2. 2. Taksonun yayılış gösterdiği iller

2.1.3. *Centaurea* L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri

Yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda, *Centaurea* türlerinden farklı türlerde seskiterpenler (Bruno ve ark., 2001), lignan bileşikler (Middleton ve ark., 2003),

flavanoitler (Gonnet, 1993), indol alkoloitleri (Sarker ve ark., 1998), monoterpener (Esmaeili ve ark., 2005), triterpenler (Öksüz ve Serin, 1997), steroidal glikozitler (Santos ve ark., 2006) izole edilmiştir.

Flavonoitler, *Centaurea* Lam. türlerinden izole edilen sekonder bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturmakta olup, 80'in üzerinde *Centaurea* Lam. türü flavonoitleri bakımından incelenerek, yaprak ve çiçeklerinden, bazı çalışmalarda köklerinden, flavon ve flavonoller ile bunların metil sübstitute türevleri ile O ve C- glikozitleri elde edilmiştir (Akkal ve ark., 2003).

İran' da yaygın olarak bulunan *C. depressa' nun* toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi ile 26 bileşik tanımlanmıştır. Ana bileşenlerin; piperiton (%35.2), elemol (%14,1), P- ödesmol (%6.9), spatulenol (%5), karyofillen oksit (%4) ve hegzdekanoik asit (%4) olduğu saptanmıştır (Esmaeili ve ark., 2005).

Türkiye' de, Denizli, Honaz Dağı' ndan toplanan *C. depressa' nun* toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC ve GC/ MS analizinde toplam 93 bileşik tanımlanmış olup, ana bileşenlerin, hegzdekanoik asit (%21.3), karvakrol (%14.2), tetradekanoik asit (%8.8) ve dodekanoik asit (%4.7) olduğu belirlenmiştir (Karamenderes ve ark., 2008).

2.1.4. *Centaurea* LAM. Taksonlarının Halk Arasındaki Tıbbi Amaçla Kullanımları

Ülkemizde yayılış gösteren *Centaurea* cinsine ait birçok taksonun, genel olarak çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Batı ve Güneybatı Anadolu'da yaygın olarak bulunan *C. cyanus* türünün kurutulmuş çiçekleri, halk arasında % 5'lik infüzyonu halinde kuvvet verici, ishal kesici, iştah açıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak, ayrıca oküler enflamasyonlarda göz banyosu olarak kullanılmaktadır. Doğu Anadolu'da yetişen *C. behen* türünün çiçekleri mideyi ve adet getirici olarak kullanılmaktadır. Kuzeybatı Anadolu'da yetişen "Çobankaldıran" ve "Timürdiken" olarak bilinen *C. calcitrapa'* nin ve Anadolu' da yaygın olarak yetişen *C. iberica' nun* % 2-6'lık infüzyonları dahilen ateş düşürücü olarak, Kuzeydoğu Anadolu'da yetişmekte olup "Çayır peygamberi"

olarak bilinen *C. jacea* ateş düşürücü, adet getirici, kabız yapıcı ve iştah açıcı olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999).

Hindistan’ da halk arasında *C. depressa*’nın toprak üstü kısımları; soğuk algınlığı, ateş ve öksürük tedavisinde kullanılmaktadır (Ballabh ve Chaurasia, 2007).

Eğirdir (Isparta) yöresinde halk ilacı olarak kullanılan *C.iberica*’nın mide ağrularına, böcek ve yılan sokmalarına karşı kullanılmaktadır.

Çin’ de *C. uniflora* ateş tedavisinde ve zehirlenmelere karşı kullanılmakta olup ayrıca *C. uniflora*’nın etil asetat ekstresinin membran lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve antiaterosklerotik (damar sertliğine karşı etkili) etkisinin olduğu bilinmektedir.

Kars yöresinde “Kılıç otu” olarak bilinen *C. halsamita*’nın yaprakları abse tedavisinde, Erzurum ve Erzincan yörelerinde “ Çayır dikenini olarak bilinen *C. iberica* ve “ Çoruşbozan olarak bilinen *C. pterocaula*’nın yaprakları havanda dövülerek haricen yara tedavisinde kullanıldığı saptanmıştır (Sezik ve ark., 1997).

Niğde’ de Boğadikenini olarak bilinen *C. pulchella* abse tedavisinde kullanılmaktadır (Sezik ve ark., 2001).

C. chilensis bitkisinin sulu ekstresi halk arasında antipiretik ve antiromatizmal olarak kullanılmaktadır.

İspanya’ da *C. aspera*, *C. seridis* var. *maritima*, *C. melitensis* gibi *Centaurea* türleri halk arasında infüzyon halinde hipoglisemiyen (şeker düşürücü) olarak kullanılmaktadır.

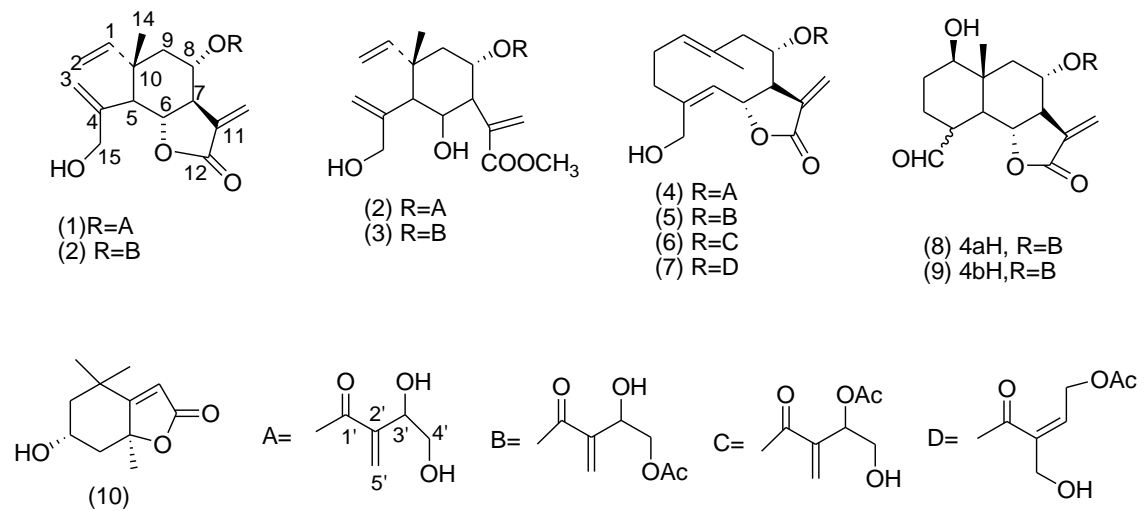
C. melitensis acı lezzetinden dolayı dijestif (hazmı kolay) ve tonik olarak kullanılmaktadır (Küpeli ve ark., 2004).

İspanya’ nın Barros bölgesinde *C. ornata* halk arasında depüratif, kolagog ve antiromatizmal amaçla kullanılmakta olup, bitkinin toprak üstü kısımları Portekiz’ de hipoglisemiyen, toprak altı kısımlarının ekstresi ise antispazmotik amaçla kullanılmaktadır (Küpeli ve ark ., 2004).

Centaurea türleri halk arasında tek başına veya diğer bitkilerle birlikte kullanılması halinde antidiyabetik, antidiyareik, antiromatizmal, antienflamatuvar, kolagog (safra söktürücü), dijestif, stomaşik (mideyi kuvvetlendirici), diüretik (idrar arttırıcı), adet söktürücü, hipotansif, ateş düşürücü, antibakteriyel amaçla kullanılmaktadır.

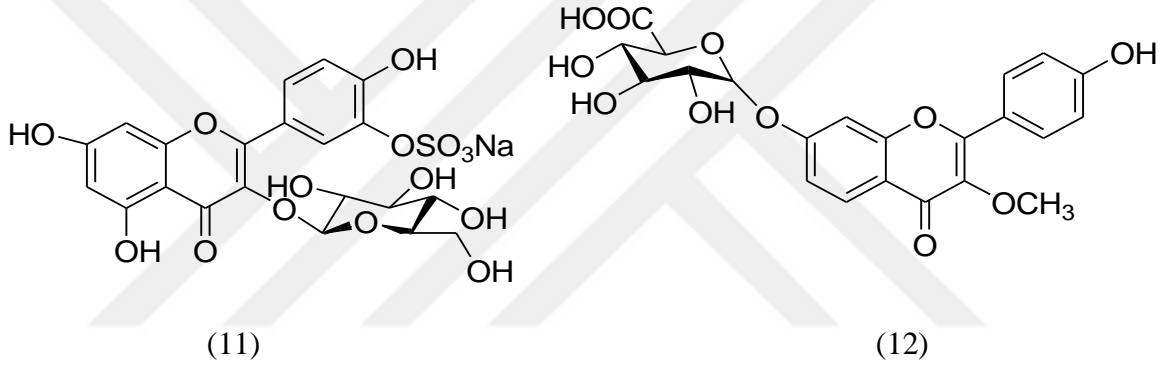
2.1.5. *Centaurea* LAM. Türleri ile Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Karioti ve arkadaşları (2002). *Centaurea deusta* Ten. Bitkisinin toprak üstü kısımlarıyla çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda bilinen yedi seskiterpen lakton, bir yeni odesmanolid ve yeni bir eleman türevi izole etmişlerdir (Şekil 1). İzole edilen bileşiklerin [8 α -(3,4-dihydroxy-2-methylenebutanoyloxy) dehydromelitensine (1), 8 α -(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylene-butanoxy) dehydromelitensine (2), methyl 8 α -(3,4-dihydroxy-2-methylene-butanoxy)-6 α , 15-dihydroxyelema- 1,3,11 (13)- trien- 12-oate (3), methyl 8 α -(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylene-butanoxy)-6 α , 15-dihydroxyelema-1,3,11(13)-trien- 12- oate (4), cnicin (5) 4'-acetylcnicin (6), 3'-acetylcnicin (7), 8 α -(4-acetyl-2-hydroxymethyl-buten-2-oyloxy)-salonitenolide (11), 8 α -(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-4-epi-sonchucarpolide (8), 8 α -(4-acetoxy-3-hydroxy-2-methylenebutanoyloxy)-sonchucarpolide (9), 3S, 5R-loliolide (14)] antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri mikro dilüsyon metodu kullanılarak test edilmiştir. Tüm bileşiklerin yüksek antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



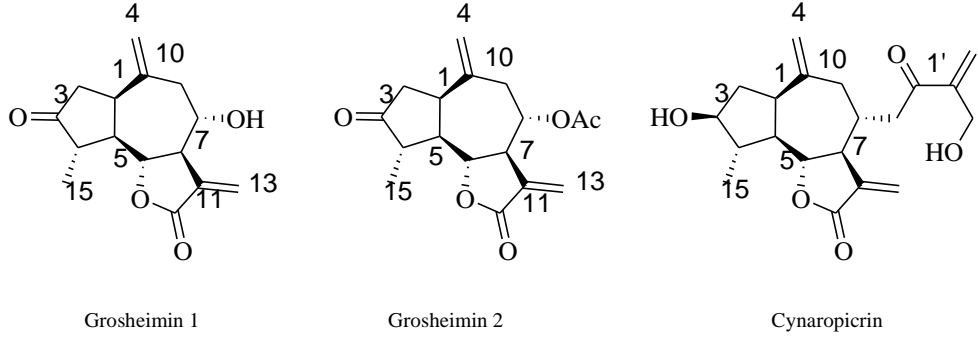
Şekil 2. 3. *Centaurea deustata*ten. bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen bileşikler

Centaurea bracteata Scop. bitkisinin toprak üstü kısımları ilk kez Flamini ve grubu tarafından incelenmiştir. Yapılan çalışmada bir tane sterol glukozit, iki adet fenolik asit, üç adet quinic asit türevleri ve iki tanesi yeni olan on üç tane flavonoid olmak üzere toplam 19 bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin yapıları FABMS, 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Yeni bileşikler: Centabractein, Bracteoside bilenen bileşikler : β -Sitosterol-3-glucoside, Protocatechuic acid, Axillarin 7-glucoside, Axillarin, Nepetin, Centaureidin, Isokaempferide, Hispidulin, Caffeic acid, 6-Hydroxyluteolin-6,40-dimethylether, Jacein, Jaceidin, Luteolin , 5-Caffeoylquinic asittir (Şekil 2.3). Apigenin 7-glucuronide, 3,4- Dicaffeoylquinic acid, 3- Caffeoylquinic acid methyl ester (Flamini ve ark., 2001).



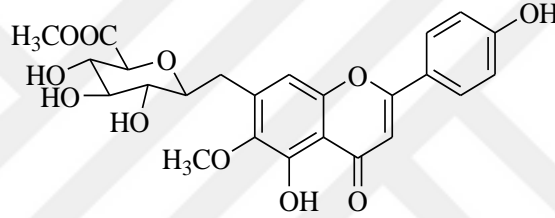
Şekil 2. 4. Centabractein ve Bracteoside

Yaylı ve arkadaşları Türkiye' ye endemik olan *C. helenioides* Boiss. Bitkisinin çiçekleri üzerine yapmış oldukları bir çalışmada Grosheimin (1) and Cynaropicrin (3) seskiterpenlerini izole etmişlerdir (Şekil 2.5). Bu bileşikler daha önce başka türlerde tanımlanmış olmakla beraber *C. helenioides* Boiss. bitkisinden ilk kez izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Grosheimin (1)' nin spektral datalarıyla bağlantı kurmak amacıyla asetil türevini 8a- acetyl grosheimin (2)' sentezlemişlerdir (Yaylı ve ark., 2004)



Şekil 2. 5. *C. helenioides* Boiss. bitkisinin çiçeklerinden izole edilen seskiterpenler

Akkal ve grubu *Centaurea furfuracea*'nın toprak üstü kısımlarından yeni bir flavon glikozit (hispidulin-7-O- methylglucuronide, 16) izole etmişlerdir (Akal ve ark., 1999).



Hispidulin-7-O-metilglukuronit

Şekil 2. 6. Hispidulin-7-O- methylglucuronide

Barreore ve ark, 1995 *Centaurea* türlerinin halk tarafından kullanımına bakarak Güney İspanya' da yetişen *C. malacitana*, *C. melitensis*, *C. aspera* subsp. *aspera*, *C. aspera* subsp. *scorpiurifolia*, *C. aspera* subsp. *stenophylla* türlerinden izole ettikleri snisin, onopordopikrin, tulipalin B, monoasetil snisin, salonitenolit, stenofillolit ve elemanolit yapısındaki 3 seskiterpen laktonu antimikrobiyal etkileri yönünden incelenmiş olup ketanazol ve gentamisin' in referans olarak kullanıldığı ve 9 ayrı mikroorganizmaya karşı yapılan deneyler sonucunda, snisin dışındaki bileşiklerin belirgin antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını göstermiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

- *Centaurea virgata* LAM.

3.1.1. Kullanılan Araç ve Malzemeler

- Bitki değirmi
- Desikatör (Bitki özütleme işleminde)
- Etüv
- Değişik cam malzemeler
- Hazır İTK plakaları (Silica gel 60 F₂₅₄)

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

3.1.2.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Serik Sülfat Belirteci:

12 gram amonyum seryum sülfat (NH₄)₄Ce(SO₄)₄2H₂O (Sigma- Aldrich) 50 mL derişik sülfirik asit (H₂SO₄) ile çözüldü, hacmi saf su ile 500 mL' ye tamamlandı.

Kolon Dolgu Maddeleri:

Silika jel 60 (0.063- 0.200 mm, Merck)

Silika jel GF₂₅₄ (Merck)

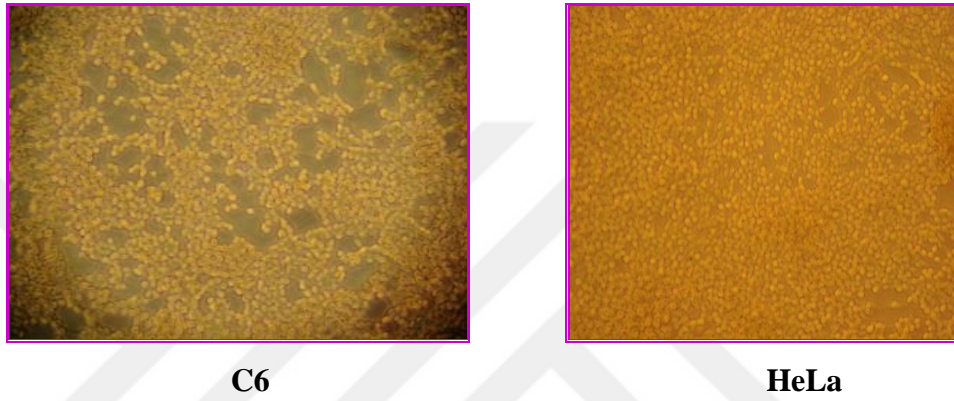
Hekzan, Metilen Klorür, Etil asetat, Kloroform, Metanol gibi çözücüler ile destilasyon yapıldı.

3.1.2.2. Biyolojik Aktivite Testleri için Kullanılan Kimyasallar ve Hücreler

- Tripsin EDTA (Sigma)
- Penicilin streptomycin (Sigma)

- Fetal Bovine Serum (Sigma)
- Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (Sigma)
- Cell proliferation ELISA, BrdU kit (Roche)

Ekstre ve izole edilen moleküllerin sıçan beyin tümörü (C6) ve insan rahim kanseri (HeLa) hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelenecektir.



Şekil 3. 1 C6 ve HeLa kanser hücreleri

3.1.3. Cihazlar

¹H- NMR (Bruker Avance III 400 MHz Spektrometre)

¹³C- NMR (Bruker 100 MHz Spektrometre)

UV lambası (Camag)

Etüv

ELISA (Awareness Chromate, USA microplate reader)

Döner buharlaştırıcı (IKA)

İnkubatör CO₂ Water- jacketed (Nuair US Autoflow)

Steril kabin (Esco class II type A2)

Santrifüj (Hettich EBA20)

Mikroskop (Olympus CX21)

GS- MS: Agilent 7890A gas chromatography and 5975 inert MSD, with Triple- Axis detector (Agilent Technology)

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

3.1.4. Bitkisel Materyal

Centaurea virgata LAM.

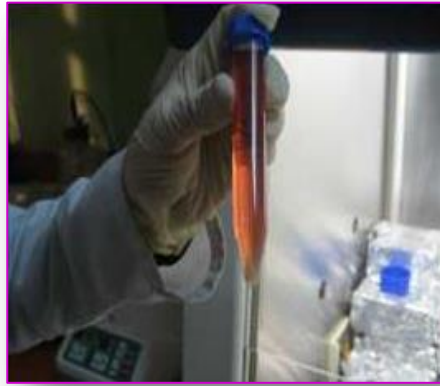
3.1.4.2. Bitkilerin Toplanması, Kurutulması ve Koordinatları

Araştırmada 2014 yılı vejetasyon dönemi içerisinde Çankırı ili, Eldivan ilçesi 55 13 69 (N) ve 45 06 20 (E) koordinatlarından toplandı. Bitkide bulunan safsızlıklar temizlendi ve gölgede kuruldu. Bitkiler Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda depolanmaktadır (Herbaryum No: ANK60534).

3.1.5. Biyolojik Materyaller

3.1.5.2. HeLa ve C6 Hücrelerinin Hücre Kültürü

Steril flasklarda bulunun HeLa ve C6 hücrelerinin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler trypsin- EDTA (10 mL) ile 5 dakika CO₂ inkübatöründe (%5.37 °C) inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan flasklar içerisine besi yeri (10 mL) eklenerek ortam nötralize edildi ve hücre süspansiyonu 600 RPM, 5 dk. santrifüj edildi.



Şekil 3. 2. Hücrelerin çöktürülmesi



Şekil 3. 3. İnkübatör

Besiyeri steril olarak boşaltıldıktan sonra, besi yeri (3 mL) ile süspansiyon edilen hücreler içinde besi yeri bulunan (20 mL) yeni bir flaska konuldu. Bu yeni flasklar kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirildi. Pasajlama dört günde bir tekrarlandı.

3.1.5.3. Hücrelerin Sayılması İşlemi

Besi yeri ile süspansiyon edilen karışımdan 20 µL alınarak üzerine aynı oranda trypan blue boyası damlatıldı. Oluşan karışımdan 20 µL Thoma Lamına damlatıldı. Rastgele beş kuyucukta bulunan hücreler mikroskop altında sayıldı. Hücre sayısı aşağıda belirtilen formüle göre yapıldı. Bu üç tekrarlı olarak yapıldı ve ortalama alınarak hücre sayısı belirlendi.

Hücre sayısı = 5 kuyucuktan sayılan hücre sayısı x 50.000 x seyreltme faktörü



Şekil 3. 4. Thoma lamı

3.1.5.4. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Çözeltisinin Hazırlanması

800 mL deiyonize su bulunan bir behere DMEM (1 L için ambalajlanmış şişe) boşaltıldı. Oluşan çözelti 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. Elde edilen besi yeri steril kabinde 0.22 mikronluk steril filtrelerden otoklavlanmış şişelere süzüldü. Bu besi yerine Fetal Bovine Serum (FBS, % 10), Penisilin streptomisin (%5) eklendi.



Şekil 3. 5. DMEM besi yeri

3.1.6. Biyolojik Aktive Testleri

3.1.6.2. Ekstre ve İzole Edilen Bileşiklerin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Örnekler dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözüldü ve 1:3 oranında DMEM ile seyreltildi. Oluşan karışım 0.22 mikronluk steril filtreler kullanılarak steril tüplere süzüldü ve - 20 ° C' de muhafaza edildi.

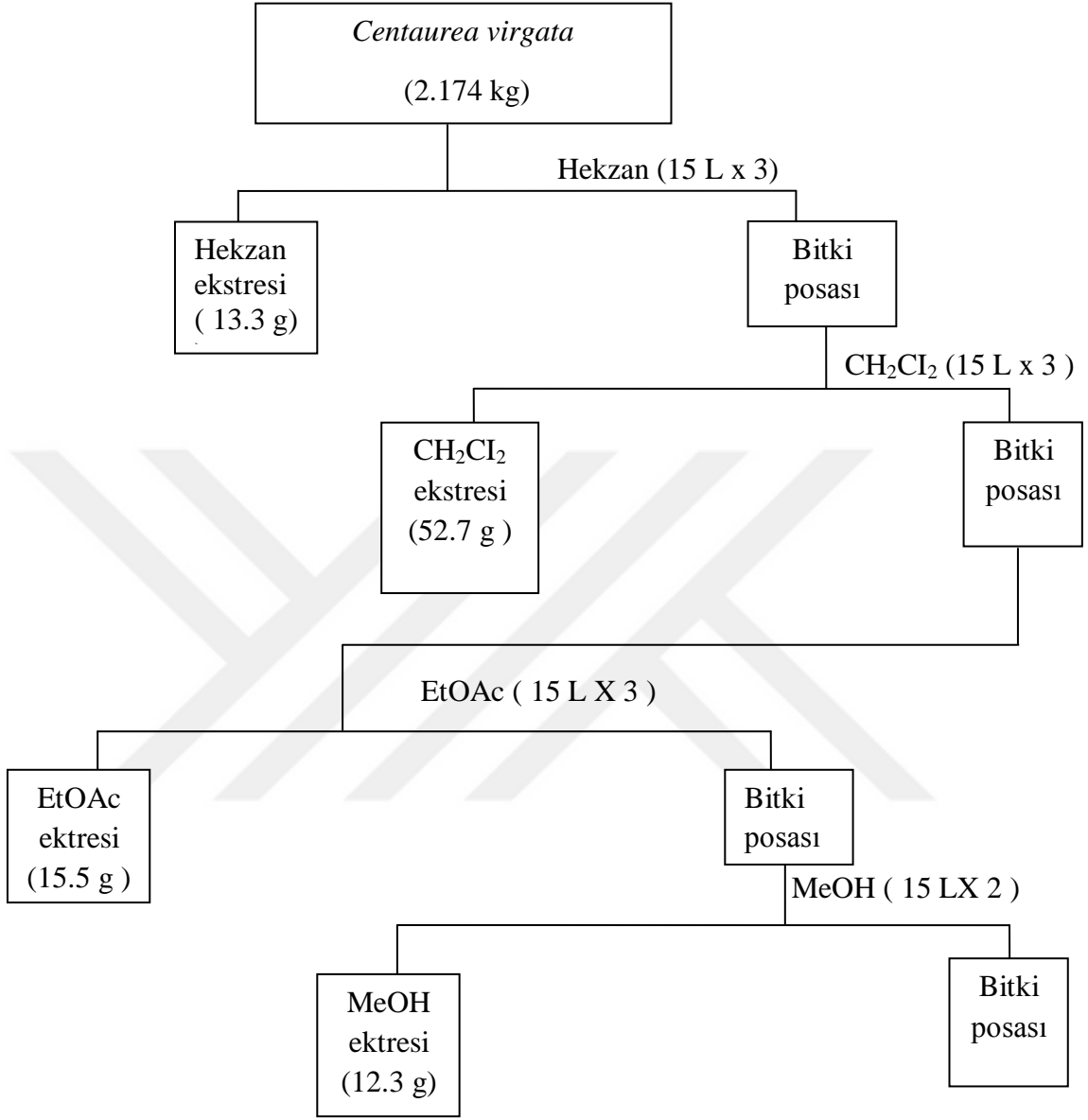
3.1.6.3. BrdU ELISA Testi

Antikanser testleri için kullanılan 96 kuyucuklu mikrolateler 30000 adet hücre (100 µL) eklendi. Üzerine kontrol haricindeki tüm kuyucuklara bitki ekstraktları ve izole edilen moleküllerin steril stok çözeltilerinden 4 farklı derişim (100, 50, 25, 5 µg/ mL) oluşturacak şekilde kuyucuklara eklenerek, toplam kuyucuk hacmi 200 µL' ye tamamlandı. Hazırlanan 96 kuyucuklu mikrolateler bir gece CO₂ inkübatöründe (%5, 37 °C) inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra, hücre antikanser aktivite testleri üretici firmanın protokolüne göre BrdU cell ELISA yöntemiyle tespit edildi. Tüm testler üç tekrarlı ve üç kez yapıldı.

3.1.7. Kullanılan Saflaştırma Metotları

3.1.7.2. İzolasyon İşlemleri için Ekstraksiyon Yöntemi

Hedef fraksiyonun belirlenmesi için bitkinin gövde kısmı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Büyük cam şişelere alınan bitki ekstraktları apolardan polara doğru artan çözücü sistemi kullanılarak fraksiyonlandırıldı (sırasıyla; hekzan, metilen klorür, etil asetat, metanol) her biri için fraksiyon ayrı ayrı toplandı ve çözücülerini döner buharlaştırıcı da uzaklaştırıldı.



Şekil 3. 6. *C. virgata* LAM. bitkisinin ekstraksiyon şeması

Ekstraksiyon işlemleri Şekil 3.6 de verilmiş olup, ekstre miktarları belirlenmiştir.

3.1.7.3. Kolon Kromatografisi

Ekstredeki bileşenleri ayırmak için kolon kromatografisi uygulandı. Ekstre uygun çözücü ile çözüldükten sonra bir miktar silika jel ilave edildi. Çözücü döner buharlaştırıcı ile uçurulduktan sonra ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlandı. Silika jel hekzan ile karıştırıldıktan sonra kolona az miktarda pamuk yerleştirilerek

silika jelin bir hortum yardımıyla kolon çeperlerine yavaş yavaş vurularak yerleşmesi sağlandı. CH₂Cl₂ ekstresi kolonun üst kısmına yerleştirildi. Kolon kromatografisinde ayrımı yapılacak karışımlar önce ince tabaka kromatografisi ile incelendi.

3.1.7.4. İnce Tabaka Kromatografisi

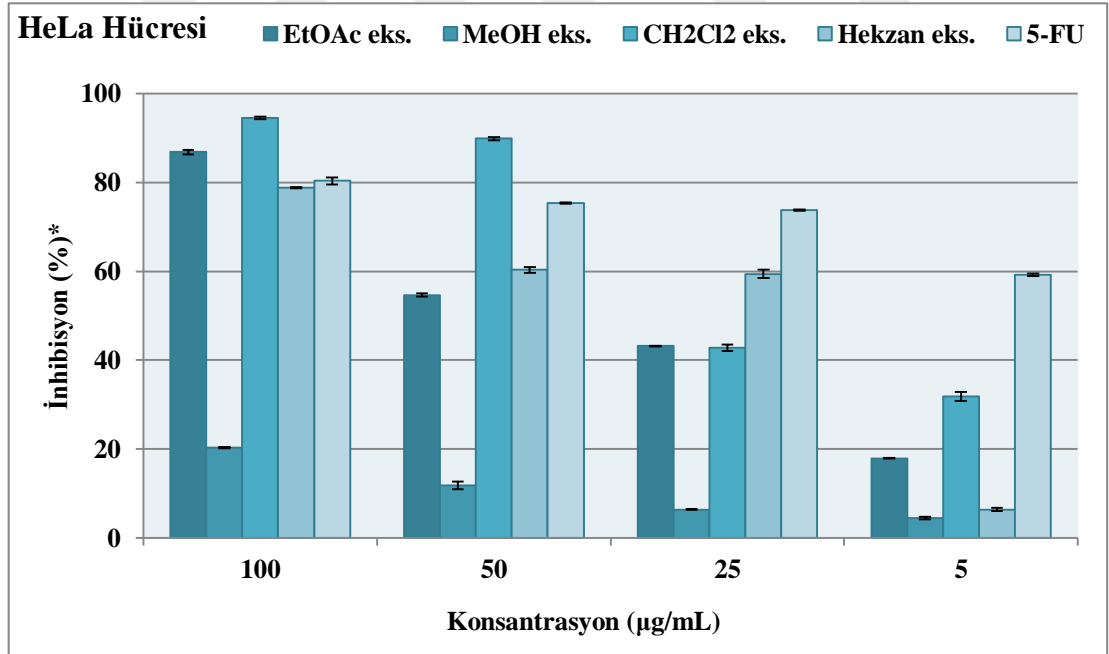
Ekstredeki bileşenlerin ayrılması için uygulanan kolon kromatografisinin ardından elde edilen benzer fraksiyonları belirlenmesi amacıyla ince tabaka kromatografisi uygulandı. Maddelere ait spotlar UV (254 ve 366 nm) ışık altında incelendi. Spot renklerinin daha net görülmesi için silikajel plaklarının üzerine seriksülfat belirteci püskürtülüp ısıtıcıda 110° C' de oluşan spot renkleri incelendi. Oluşan spot renklerine göre benzer olan fraksiyonlar birleştirildi. Kolon kromatografisinden alınan fraksiyonların her birine bu işlem uygulanarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirme sonrasında silikajel kaplı hazır alüminyum plakalara (TLC silicagel 60 GF254 Merck) birleştirilen fraksiyonlar tatbik edilerek uygun çözücü sistemleri ile yürütüldü ve oluşan spot renkleri yukarıda anlatıldığı gibi tekrar incelendi.

4. BULGULAR

4.1. Antiproliferatif Aktive Test Sonuçları

4.1.2. HeLa Hücresi Test Sonuçları

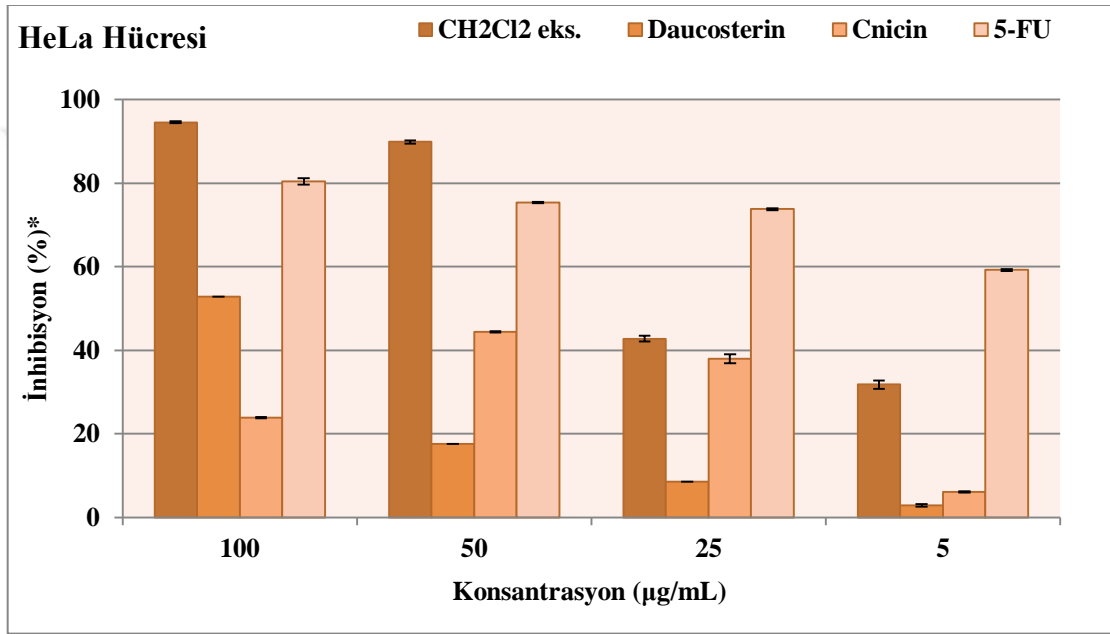
Centaurea virgata LAM. bitkisinden elde edilen hekzan, metilen klorür (CH_2Cl_2) etil asetat (EtOAc) ve metanol (MeOH) ekstreleri ve standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) nin HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.1). Elde edilen ekstrelerin HeLa hücrelerine karşı IC_{50} ve IC_{75} değerleri Çizelge 4.1 de verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.1). En yüksek dozda (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5-FU ile mukayese edildiğinde HeLa hücrelerine karşı en yüksek aktivite CH_2Cl_2 ve EtOAc ekstrelerinde gözlemlendi. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda aktivite sırası ile: CH_2Cl_2 ekstresi > EtOAc ekstresi > 5-FU > Hekzan ekstresi > MeOH ekstresi şeklindedir.



Şekil 4. 1. *C. virgata* LAM. bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstrelerinin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkileri

Centaurea virgata LAM. bitkisinden elde edilen CH_2Cl_2 ekstresi, Daucosterin, Cnicin ve standart olarak kullanılan 5-FU nin HeLa hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.2). Elde edilen ekstrelerin HeLa hücrelerine karşı IC_{50} ve IC_{75} değerleri

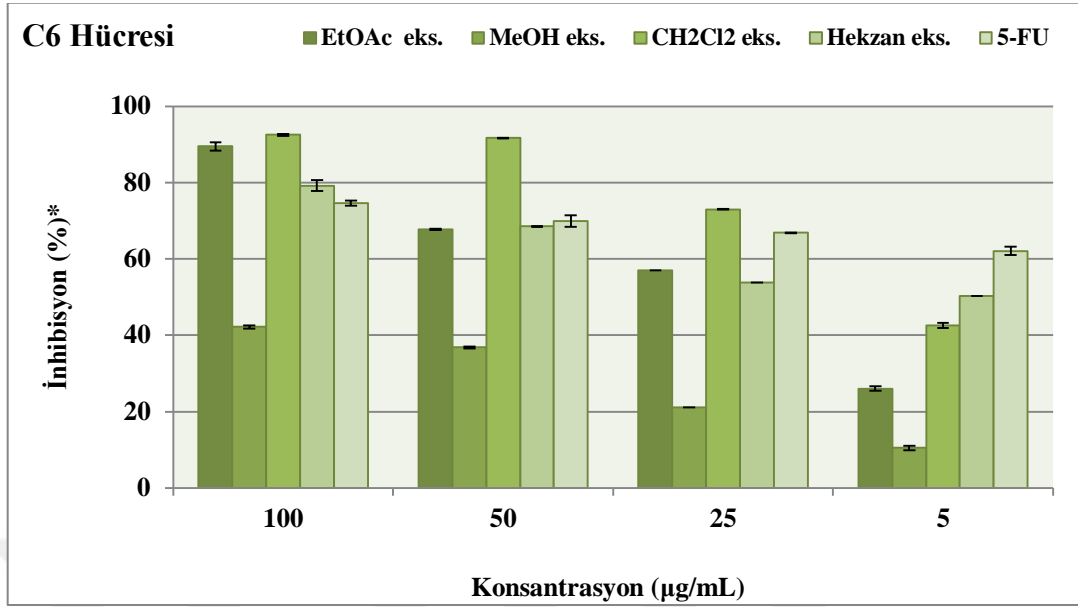
Çizelge 4.1. de verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.1). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde HeLa hücrelerine karşı en yüksek aktivite CH₂Cl₂ ekstresinde gözlemlendi. Ayrıca izole edilen moleküller arasında yapılan karşılaştırmada ise Daucosterin molekülünün Cnicin molekülüne göre daha güçlü aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: CH₂Cl₂ ekstresi > 5-FU > Daucosterin molekülü > Cnicin molekülü şeklindedir.



Şekil 4. 2. *C. virgata* LAM. bitkisinin CH₂Cl₂ ekstresi ve bu ekstreten izole edilen bileşiklerin HeLa hücrelerine karşı antikanser etkileri

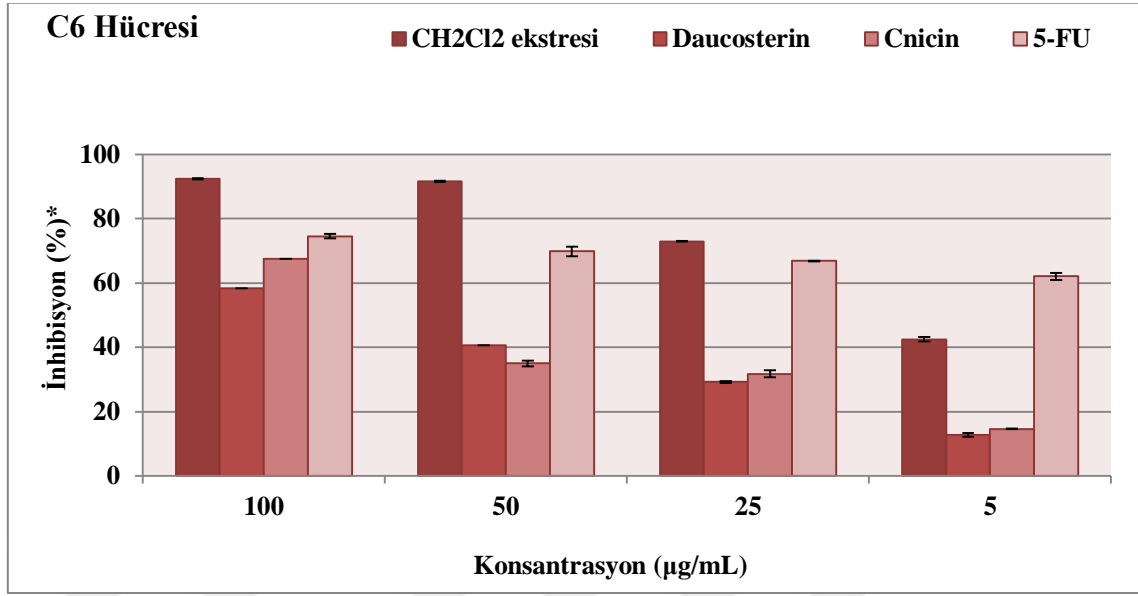
4.1.3. C6 Hücresi Test Sonuçları

Centaurea virgata LAM. bitkisinden elde edilen hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc ve MeOH ekstraları ve standart olarak kullanılan 5-FU nin C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.3). Elde edilen ekstraların C6 hücrelerine karşı IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri Çizelge 4.1 de verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstraların doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.1). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücrelerine karşı en yüksek aktivite CH₂Cl₂, EtOAc ve hekzan ekstralarında gözlemlendi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: CH₂Cl₂ ekstresi > EtOAc ekstresi > Hekzan ekstresi > 5-FU > MeOH ekstresi şeklindedir.



Şekil 4. 3. *C. virgata* LAM. bitkisinin farklı çözücülerdeki ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antikanser etkileri

Centaurea virgata LAM. bitkisinden elde edilen CH₂Cl₂ ekstresi, Daucosterin, Cnicin ve standart olarak kullanılan 5-FU nin C6 hücrelerine karşı antikanser aktiviteleri incelendi (Şekil 4.4). Elde edilen ekstrelerin HeLa hücrelerine karşı IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri Çizelge 4.1 de verildi. Yapılan testler neticesinde, tüm ekstrelerin doz artışına bağlı olarak aktivitelerinde artış gözlemlendi (Şekil 4.1). En yüksek dozda (100 µg/mL) 5-FU ile mukayese edildiğinde C6 hücrelerine karşı en yüksek aktivite CH₂Cl₂ ekstresinde gözlemlendi. Ayrıca izole edilen moleküller arasında yapılan karşılaştırmada ise Cnicin molekülünün Daucosterin molekülüne göre daha güçlü aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. 100 µg/mL konsantrasyonda aktivite sırası ile: CH₂Cl₂ ekstresi > 5-FU > Cnicin molekülü > Daucosterin molekülü şeklindedir.



Şekil 4. 4. *C. virgata* LAM. bitkisinin CH₂Cl₂ ekstresi ve bu ekstreten izole edilen bileşiklerin C6 hücresine karşı antikanser etkileri

Çizelge 4. 1. *C. virgata* dan elde edilen ekstreler ve izole edilen moleküllerin IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri (* < 5 µg/mL)

| | HeLa Hücresi | | C6 Hücresi | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | IC ₅₀ | IC ₇₅ | IC ₅₀ | IC ₇₅ |
| EtOAc eks | 34.50 | 66.10 | 19.90 | 56.56 |
| MeOH eks. | 41.51 | 71.03 | 25.02 | 57.07 |
| CH ₂ Cl ₂ ekstresi | 19.95 | 53.84 | * | 33.27 |
| Hekzan eks. | 26.33 | 57.48 | * | 33.92 |
| Daucosterin | 56.12 | 80.75 | 31.90 | 63.65 |
| Cnicin | * | 95.08 | 38.40 | 70.36 |

Şekil 4.1. ve Şekil 4.3. görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarla yapılan test sonuçlarına göre, 5- FU ile karşılaştırıldığında CH₂Cl₂ ekstresinin C6 ve HeLa hücrelerine karşı etkili olduğu görülmektedir. HeLa hücresinde CH₂Cl₂ ekstresi yüksek konsantrasyonlarda, C6 hücresinde ise CH₂Cl₂ ekstresi düşük konsantrasyonlarda dahi 5- FU' den daha yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle; yukarıdaki grafik sonuçlarına göre C6 ve HeLa hücrelerinde CH₂Cl₂' nin etkili olduğu gözlemlendi, izolasyon işlemlerine CH₂Cl₂ ekstresi ile devam edildi.

4.2. İzolasyon İşlemleri

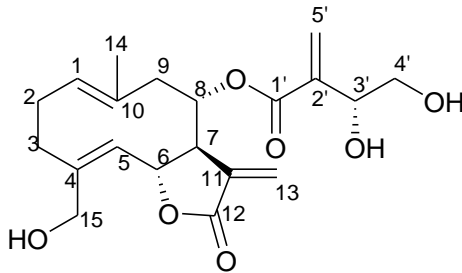
52.7 g CH₂Cl₂ ekstresi metanol'de çözüldü. 52.7 g silika jel ilave edildikten sonra evaporatörde çektirilerek, 40° C' de kurularak toz haline getirildi. 100 cm uzunluğunda 5 cm çapındaki kolonda aşağıdaki çözücü sistemi kullanılarak elüe edildi.

Çizelge 4. 2. *C. virgata* LAM. bitkisinin kolon kromatografisi için çözücü sistemi

| Çözücü sistemi | Harcanan Çözücü Miktarı | Toplanan Tüpler |
|------------------------|-------------------------|-----------------|
| Hekzan- EtOAc (% 20) | 2 L | 1-33 |
| Hekzan- EtOAc (% 30) | 2 L | 34-112 |
| Hekzan- EtOAc (% 40) | 1,5 L | 113-173 |
| Hekzan- EtOAc (% 60) | 1,5 L | 174-239 |
| Hekzan- EtOAc (% 80) | 1,5 L | 240- 297 |
| EtOAc | 1,5 L | 298-340 |
| EtOAc- Metanol (% 20) | 1,5 L | 341- 405 |
| EtOAc- Metanol (% 40) | 1 L | 405- 448 |
| EtOAc- Metanol (% 60) | 1,5 L | 449- 510 |
| EtOAc- Metanol (% 80) | 1 L | 511- 539 |
| Metanol | 0,5 L | 540-560 |

4.3. *Centaurea virgata* LAM. bitkisinden İzole Edilen Bileşikler

4.3.2. Cncin Bileşiğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri



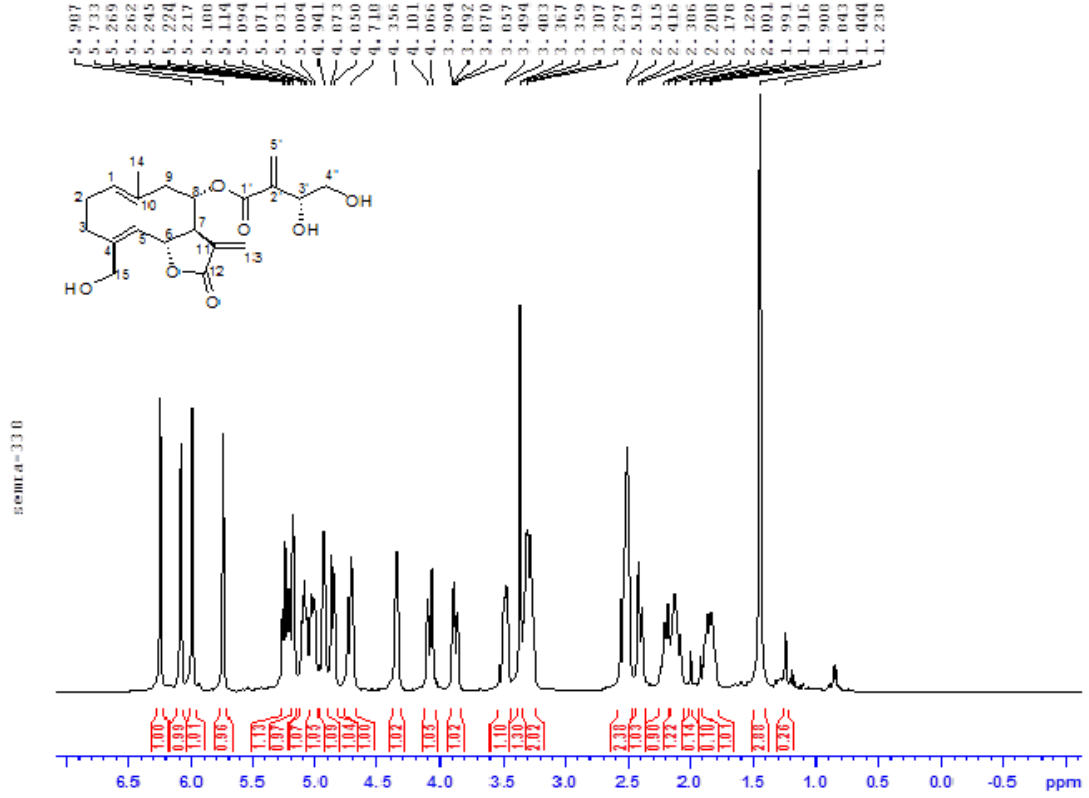
Şekil 4. 5. Cncin bileşiğinin yapısı

Cncin bileşiği kolon kromatografisinden % 100 EtOAc Çözücü sisteminde toplanan 334 ve 338 numaralı fraksiyonlar ile EtOAc:MeOH (%20) çözücü sisteminden toplanan

341 numaralı fraksiyon birleştirilerek, 86,2 mg olarak izole edilmiştir. Cnicin bileşiği beyaz kristal yapıdadır. Kapalı formülü $C_{20}H_{26}O_7$, molekül ağırlığı 378,4 g/ mol' dür. Cnicin molekülü bilenen bir bileşik olup elde edilen değerler literatür (Arslan ve Öksüz, 1999) ile uyum içindedir.

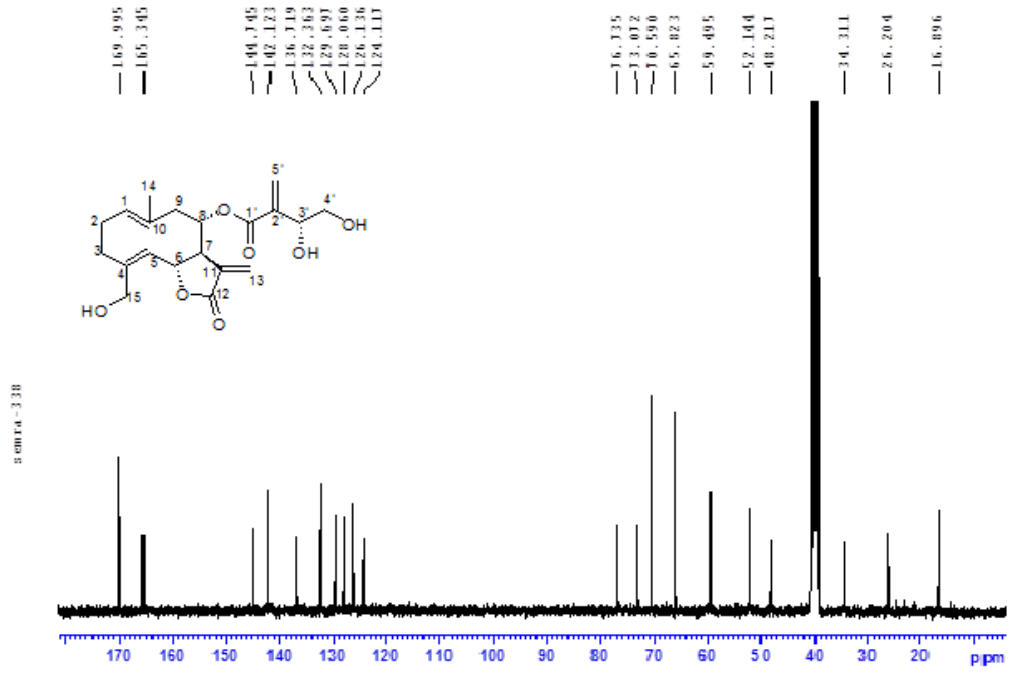
Çizelge 4. 3. Cnicin bileşiğinin 1H -NMR, ^{13}C - NMR kimyasal kayma değerleri ve HMBC kolerasyonları

| C/ CH | DEPT | δ_C ppm | δ_H ppm(Hz) | HMBC |
|-------|-----------------|----------------|---|----------------|
| 1 | CH | 128.06 | 4.85 | |
| 2 | CH ₂ | 26.20 | 2.17/ 2.06, m | |
| 3 | CH ₂ | 34.31 | 1.83/ 2.52, m | |
| 4 | C | 142.12 | - | H ₆ |
| 5 | CH | 129.70 | 5.01 (d,J=8.16) | |
| 6 | CH | 76.73 | 5.21 | |
| 7 | CH | 52.14 | 3.30, m | H ₉ |
| 8 | CH | 73.07 | 5.09, m | H ₆ |
| 9 | CH ₂ | 48.22 | 2.36 brd s, H-9a 2.55 m, H- 9b | |
| 10 | C | 136.72 | - | |
| 11 | C | 142.12 | - | |
| 12 | C | 170.0 | - | |
| 13 | CH ₂ | 124.12 | 5.74 (d,J=2.2) H-13a 6.06 (d,J=2.8) H- 13b | |
| 14 | CH ₃ | 16.90 | 1.43, s | |
| 15 | CH ₂ | 59.50 | 3.89 (d,J=13.7) H-15a 3.85 (d,J=13,7) H-15b | |
| 1' | C | 165.35 | - | |
| 2' | C | 144.74 | - | |
| 3' | CH | 70.59 | 4.33, m | |
| 4' | CH ₂ | 65.82 | 3.28/ 3.47 | |
| 5' | CH ₂ | 126.14 | 5.98 s, H- 5' a 6.23 s, H-5' b | |



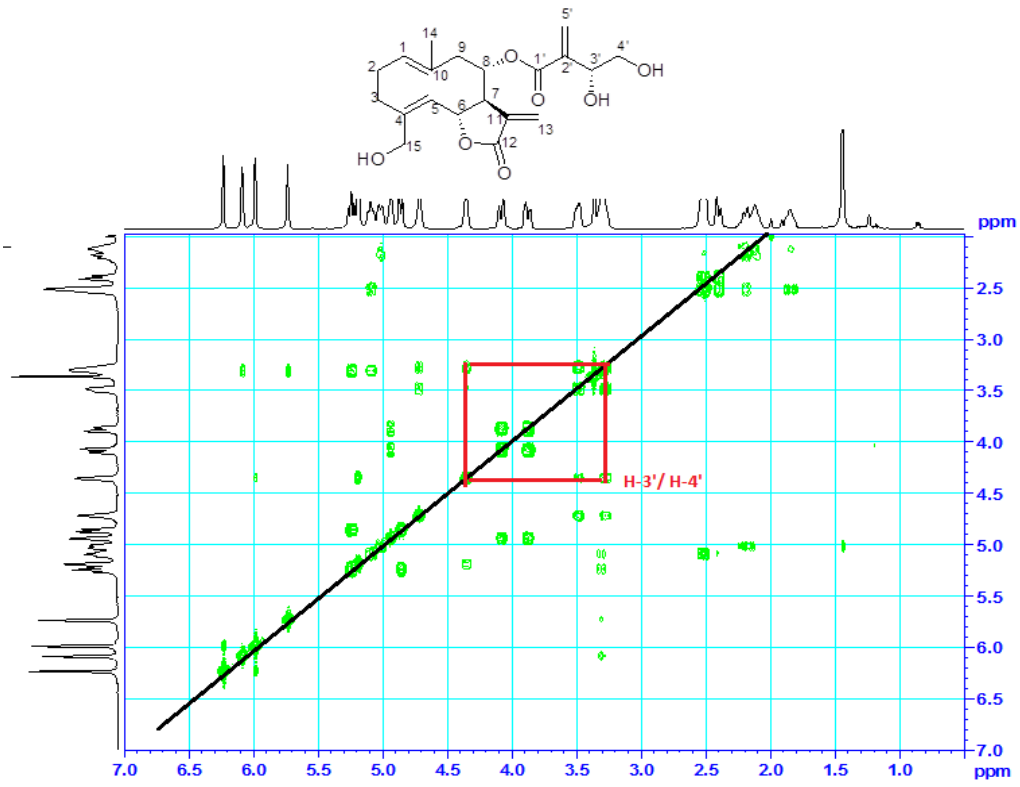
Şekil 4. 6. Cnicin bileşiğinin ^1H - NMR spektrumu (400 MHz DMSO- d_6)

H-8 protonu 5.09 ppm' de multiplet rezonans oluştururken, H-5 protonu 5.01 ppm' de dublet ($J= 8.16$ Hz) olarak rezonans oluşturdu (Şekil 4.6)



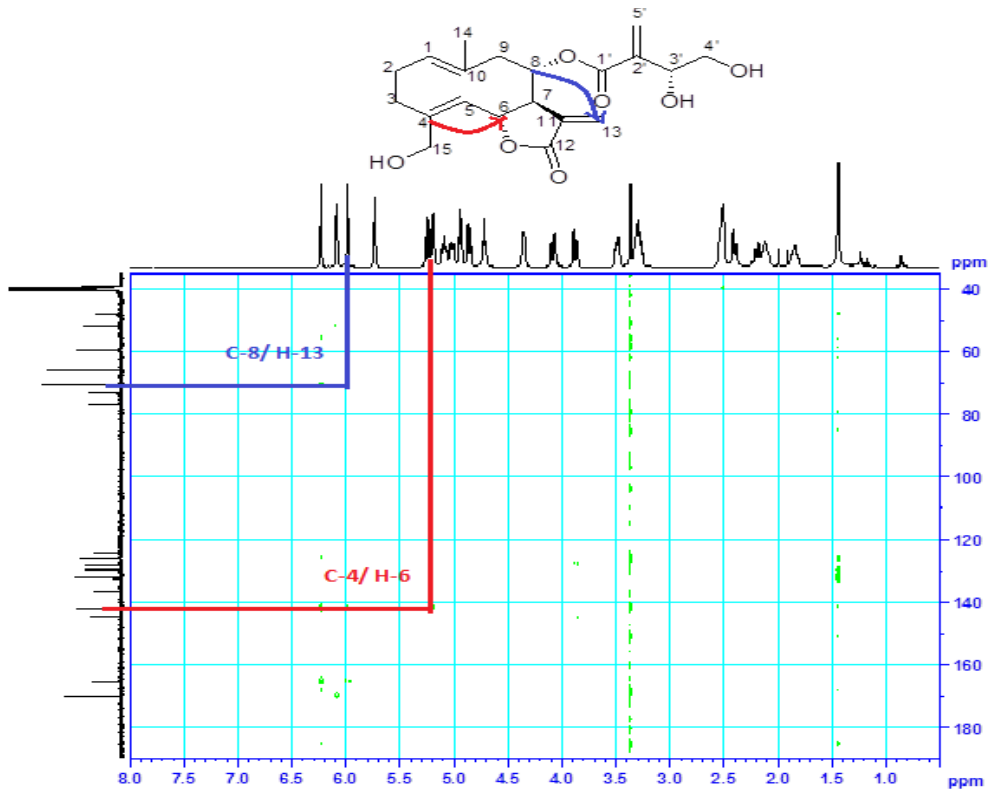
Şekil 4. 7. Cnicin bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz DMSO- d_6)

Cnicin (**1**) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumundan yapıda 20 tane karbon atomu olduğu görüldü (Şekil 4.7.). Bu karbonlardan 1 tanesi metil, 7 tanesi metilen, 6 tanesi metin ve 6 tanesi kuarterner karbon atomuna aittir.



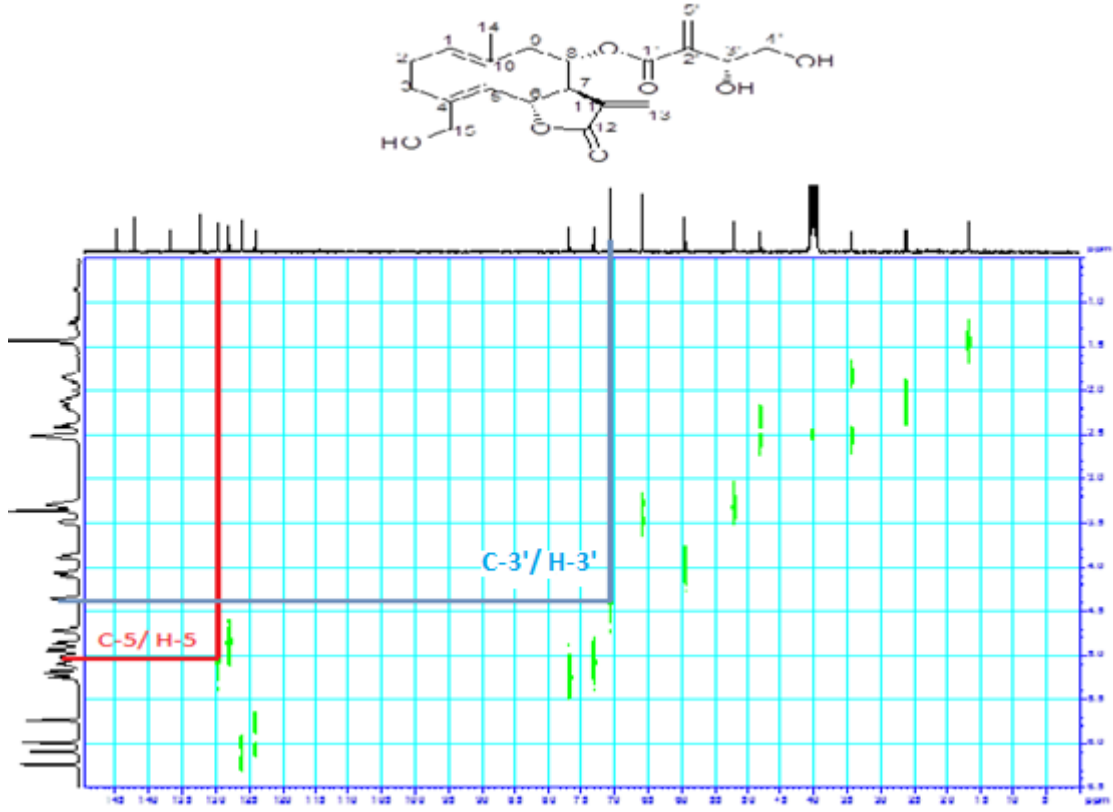
Şekil 4. 8. Cnicin bileşiğinin COSY spektrumu

Bileşiğin COSY spektrumunda 2.17/ 2.06 ppm'deki protonu (H-2), 1.83/ 2.52 ppm'deki protonla (H-3). 4.33 ppm'deki protonu (H-3), 3.28/ 3.47 ppm'deki protonla (H-4). 5.21 ppm'deki protonu (H-6), 3.30 ppm'deki protonla (H-7) etkileştiği görüldü.



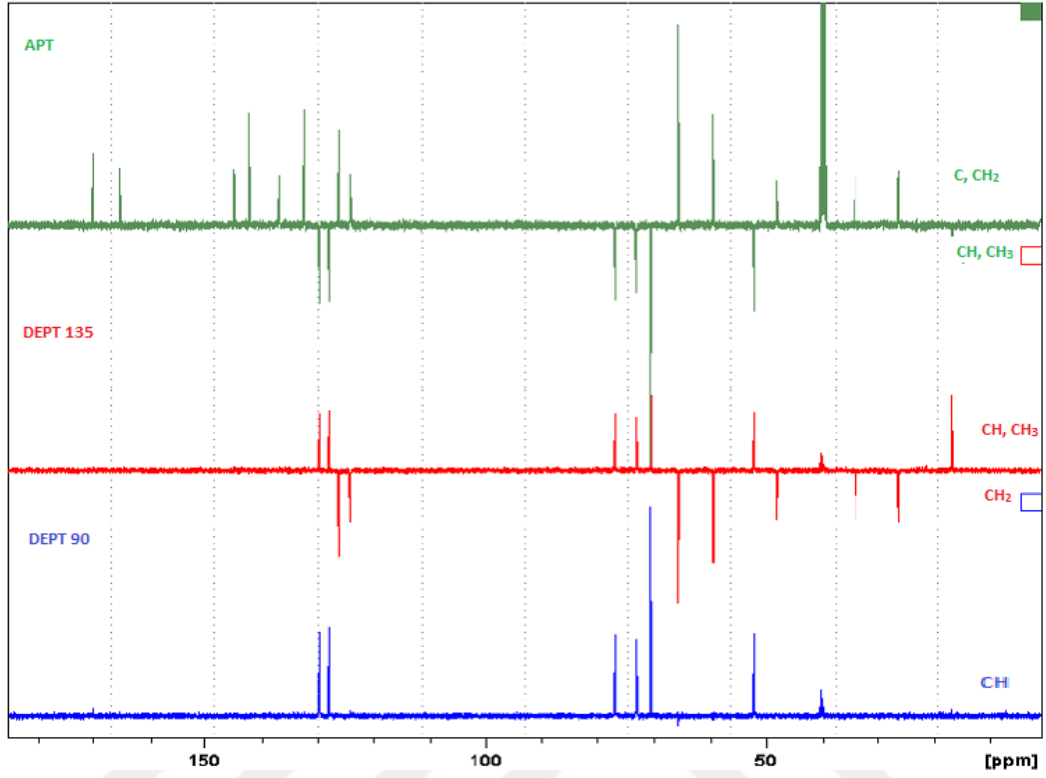
Şekil 4. 9. Cnicin bileşiğinin HMBC spektrumu

Cnicin (**1**) bileşiğinin HMBC spektrumu incelendiğinde 142.12 ppm' deki (C-4), 73.07 ppm'deki (C-8) karbonları 5.21' deki proton (H-6) ile etkileşime girdiği, 73.07 ppm'deki (C-8) karbonu ise 5.74/ 6.06 ppm'deki protonla (H-13) etkileştiği görüldü.



Şekil 4. 10. Cnicin bileşiminin HETCOR spektrumu

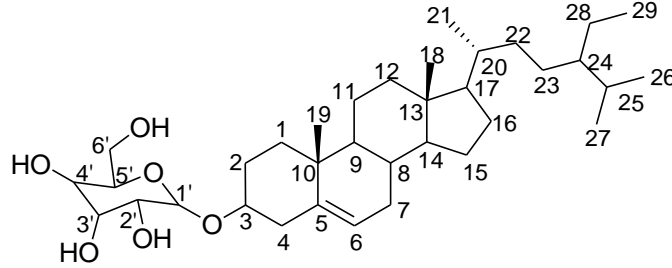
Bileşimin HECTOR spektrumundan(Şekil 4.10) elde edilen karbon- proton etkileşimleri çizelge 4.3. de verildi. Buna göre 129.70' deki karbon (C-5) 5.01 ppm' deki (H-5) ile, 70.59' daki karbon (C-3') 4.33 ppm' deki proton (H-3') ile etkileştiği görüldü.



Şekil 4. 11. Cnicin bileşiğinin APT, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumu

Şekil 4.11' den Cnicin (**1**) bileşiğinin DEPT-90 spektrumunda 6 tane metin karbonu olduğu belirlendi. DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyaller metil ve metin karbonlarını gösterirken, negatif sinyaller metilen karbonlarını göstermektedir. Böylece yapıda 1 tane metil, 7 tane metilen karbonu olduğu belirlendi. ^{13}C - NMR spektrumundan da yararlanılarak bileşiğin 6 kuaterner karbon atomuna sahip olduğu tespit edildi.

4.3.3. Daucosterin Bileşğinin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

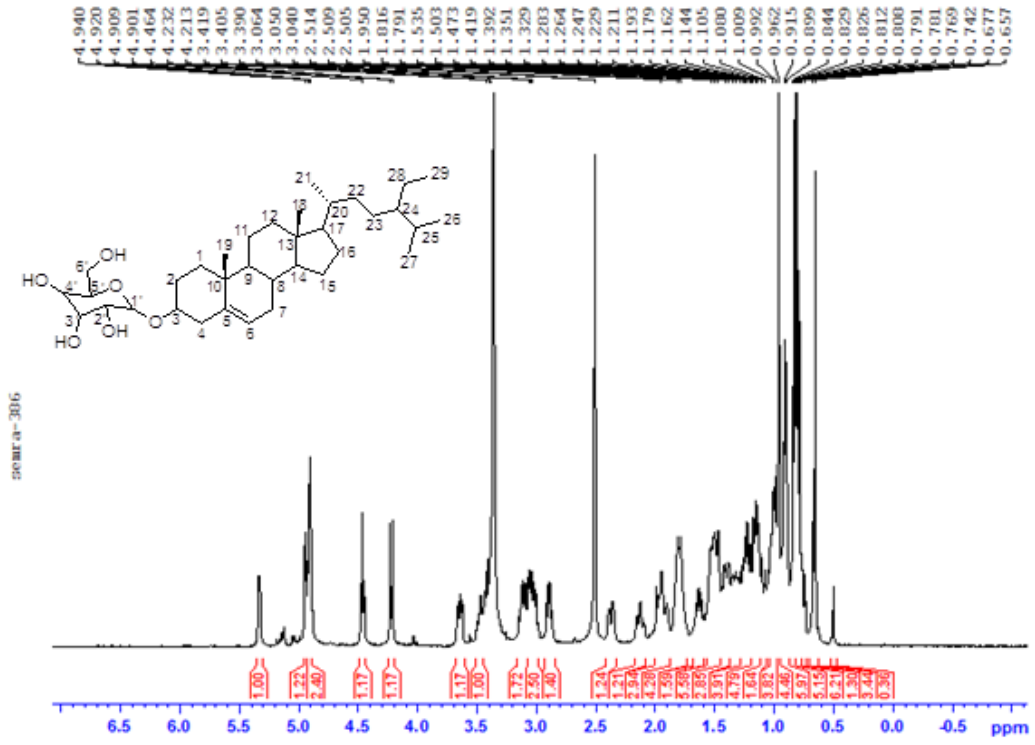


Şekil 4. 12. Daucosterin bileşğinin yapısı

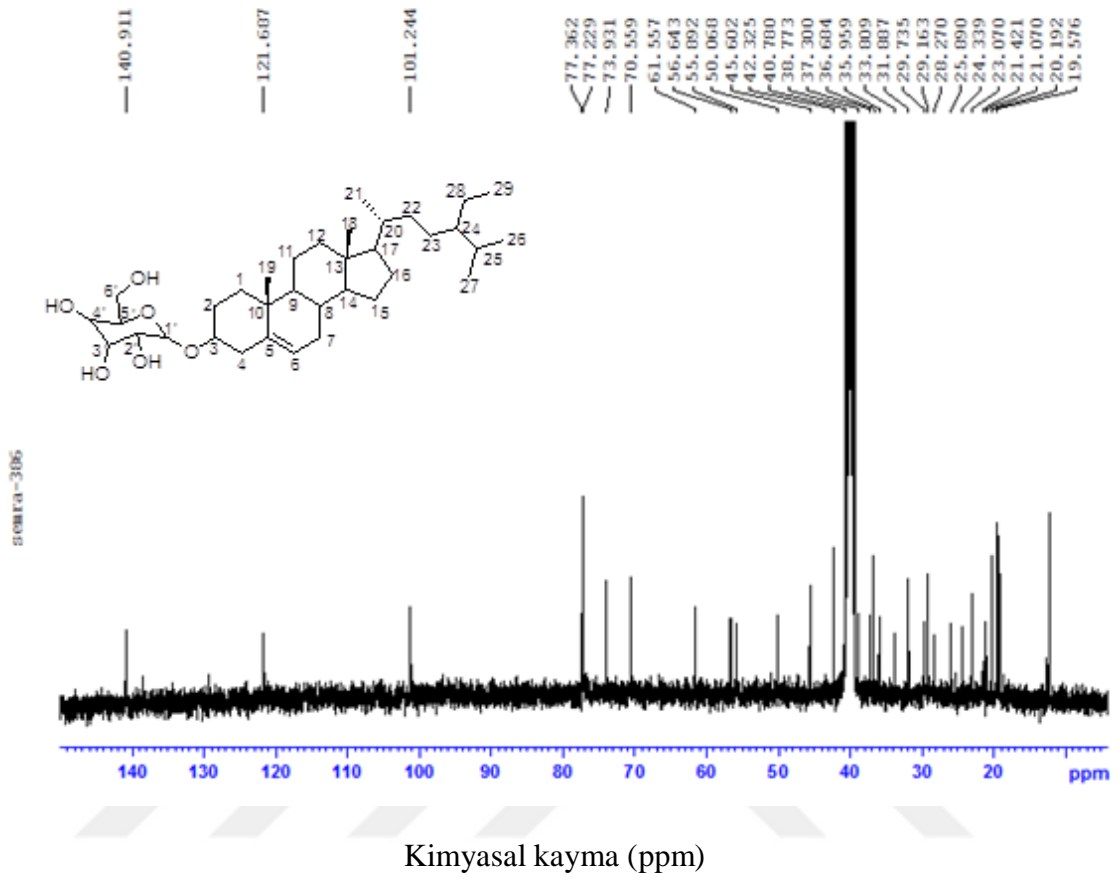
Daucosterin bileşğı kolon kromatografisinden EtOAc:MeOH (%20) çözücü sisteminden 136,8 mg olarak izole edildi (382-394 fraksiyon). Bileşğın erime noktası 273- 275° C olarak belirlendi. Daucosterin bileşğinin erime noktası literatürde 280-283° C (Matsuda ve ark., 2006), 288- 289° C (Wang ve ark., 2007), 275- 277° C (Moghaddam ve ark., 2007) olarak bulundu. Daucosterin bileşğı beyaz kristal yapıda olup, kapalı formülü C₃₅H₆₀O₆ moleköl ağırlığı 576 g/mol' dür. Daucosterin molekölü bilinen bir bileşik olup elde edilen değerler literatür (Catalan ve ark., 1983; Moghaddam ve ark., 2007; Wang ve ark., 2007) ile uyum içindedir.

Çizelge 4. 4. Daucosterin bileşğinin ¹³C- NMR ve ¹H- NMR kimyasal kayma değeri (400 MHz, DMSO- d₆)

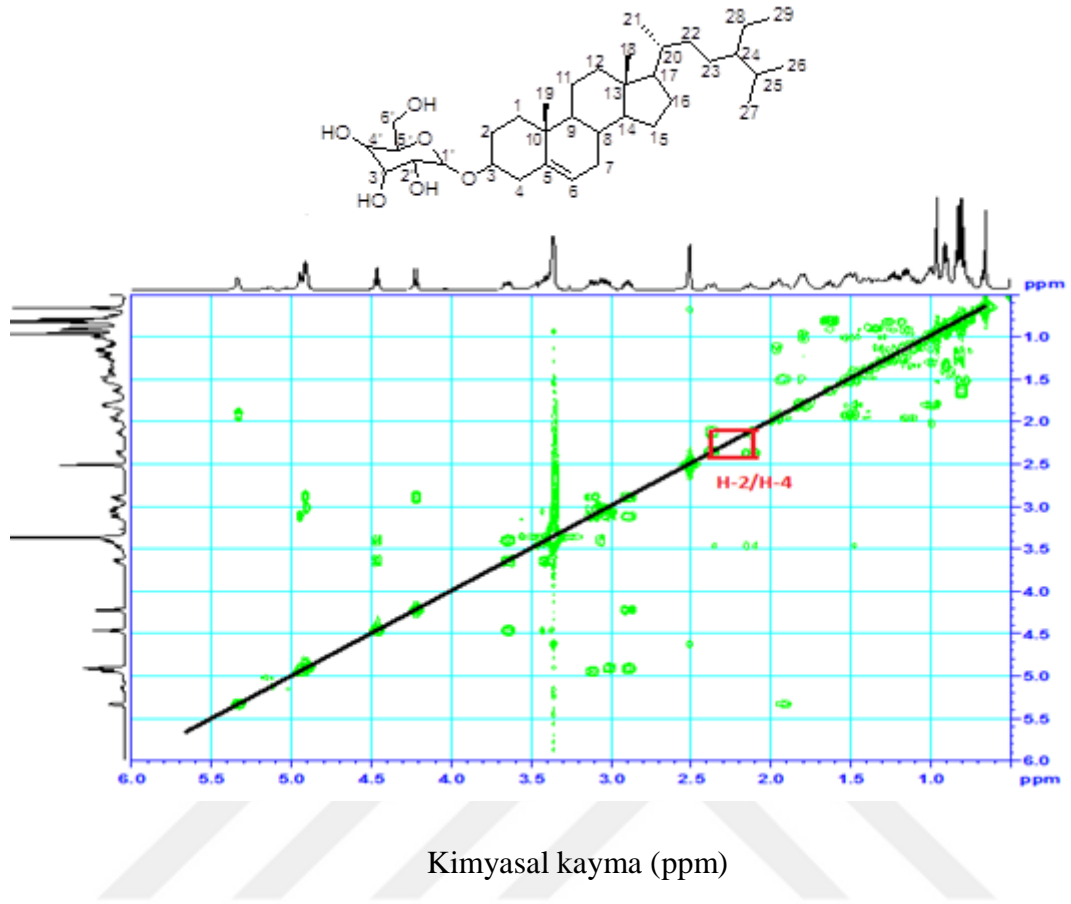
| C/H | DEPT, APT | δ _C (ppm) | δ _H (ppm) |
|-----|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | CH ₂ | 37.30 | 1.81 |
| 2 | CH ₂ | 31.84 | 1.94 |
| 3 | CH | 77.22 | 3.10 |
| 4 | CH ₂ | 38.77 | 2.37 |
| 5 | C | 140.91 | - |
| 6 | CH | 121.68 | 5.33 |
| 7 | CH ₂ | 28.88 | 1.15 |
| 8 | CH | 31.88 | 1.37 |
| 9 | CH | 50.06 | 0.88 |
| 10 | C | 36.68 | - |
| 11 | CH ₂ | 21.06 | 1.49 |
| 12 | CH ₂ | 40.78 | 2.50 |
| 13 | C | 42.32 | - |
| 14 | CH | 56.64 | 0.95 |
| 15 | CH ₂ | 24.33 | 0.99 |
| 16 | CH ₂ | 29.73 | 1.46 |
| 17 | CH | 55.89 | 1.07 |
| 18 | CH ₃ | 12.25 | 0.82 |
| 19 | CH ₃ | 19.57 | 0.95 |
| 20 | CH | 35.95 | 1.34 |
| 21 | CH ₃ | 19.40 | 0.80 |
| 22 | CH ₂ | 33.80 | 1.02 |
| 23 | CH ₂ | 28.26 | 1.24 |
| 24 | CH | 45.60 | 0.90 |
| 25 | CH | 29.16 | 1.58 |
| 26 | CH ₃ | 20.19 | 0.94 |
| 27 | CH ₃ | 19.08 | 0.91 |
| 28 | CH ₂ | 23.06 | 1.20 |
| 29 | CH ₃ | 12.14 | 0.65 |
| 1' | CH | 101.24 | 4.21 |
| 2' | CH | 73.93 | 2.89 |
| 3' | CH | 77.22 | 3.46 |
| 4' | CH | 70.55 | 3.03 |
| 5' | CH | 77.36 | 3.45 |
| 6' | CH ₂ | 61.55 | 3.68 |



Şekil 4. 13. Daucosterin bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (400 MHz DMSO- d₆)
H-3' protonu 3.46 ppm' de multipler olarak rezonans olurken, H-1' protonu 4.21 ppm' de dublet ($J= 7.76$ Hz) olarak rezonans olmuştur. Spektrumun 1.0- 2.5 ppm aralığında geniş metilen bantlar görüldü (Şekil 4.13.)

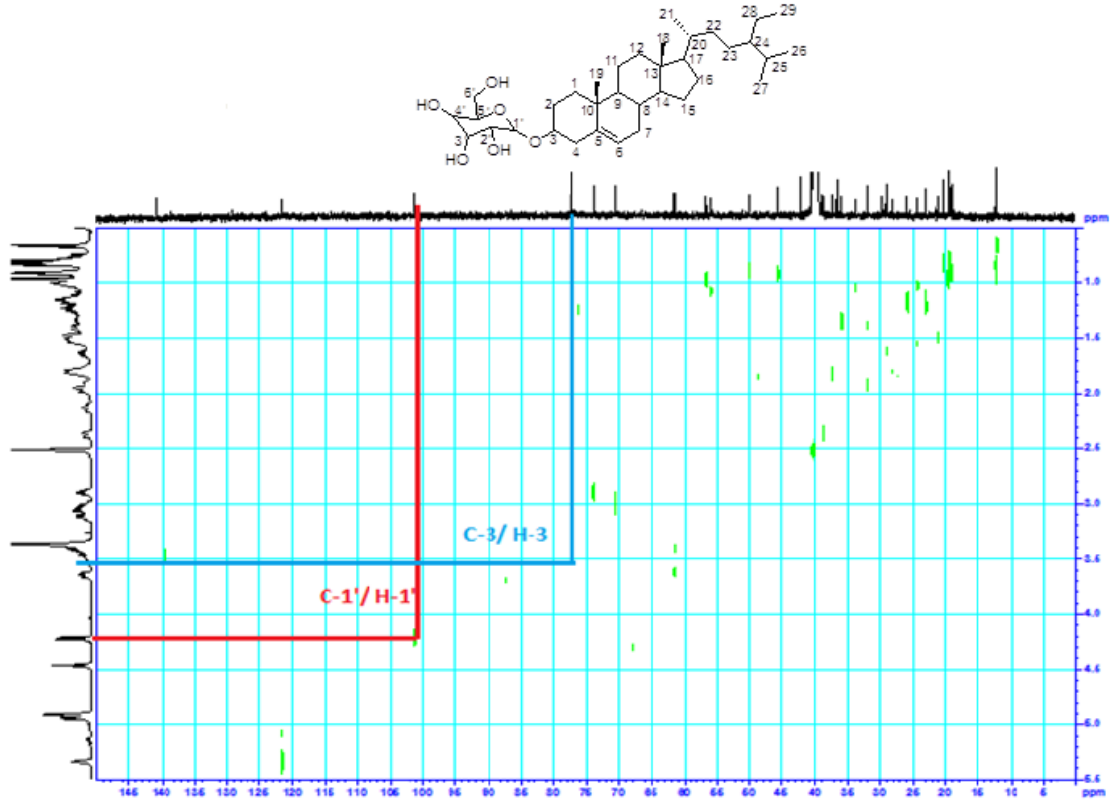


Şekil 4. 14. Daucosterin bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (100 MHz DMSO- d_6)
 Daucosterin bileşiğine ait ^{13}C - NMR spektrumundan yapıda 35 karbon atomu olduğu belirlendi (Şekil 4.14). Bu karbonlardan 12 tanesi metilen, 14 tanesi metin, 6 tanesi metil ve 3 tanesi kuaterner karbon atomuna aittir.



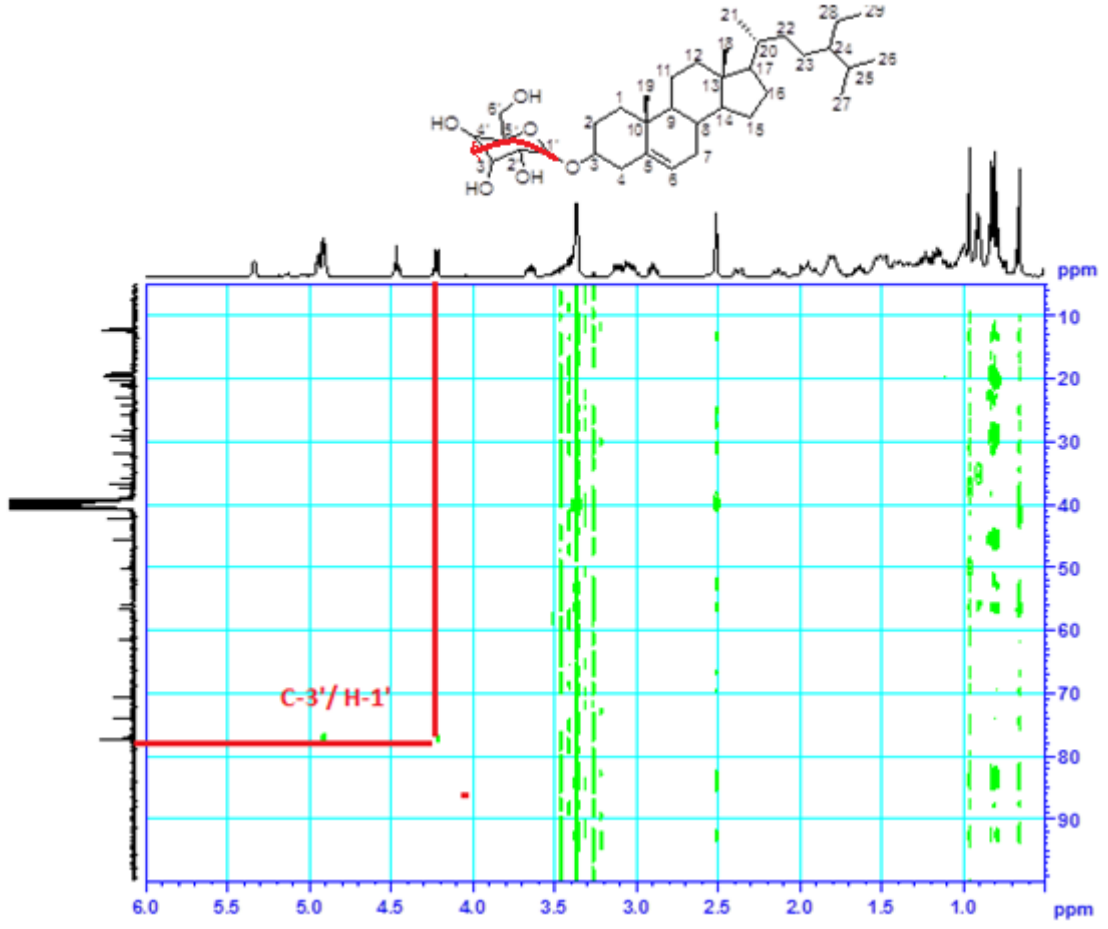
Şekil 4. 15. Daucosterin bileşiğinin COSY spektrumu

Bileşiğin COSY spektrumunda 1.94 ppm'deki protonu (H-2), 2.37 ppm' deki protonla (H-4) etkileştiği görüldü.



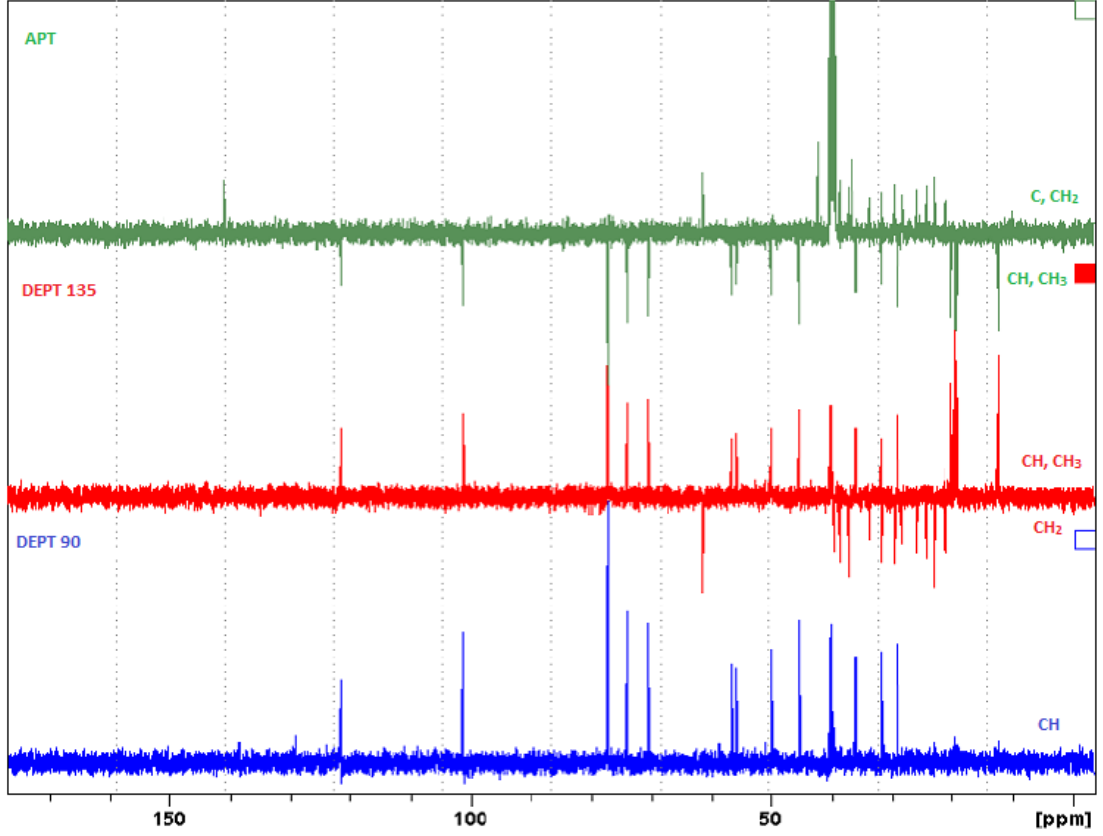
Şekil 4. 16. Daucosterin bileşiğinin HETCOR spektrumu

Bileşiğinin HECTOR spektrumu (Şekil 4.16) elde edilen karbon proton etkileşimleri (Çizelge 4.4) de verildi. Buna göre 121.68' deki çift bağ karbonu (C- 6) 5.33 ppm' deki protonla (H-6) ile etkileşirken, 101.24' deki anomerik karbon (C- 1) 4.21 pmm' deki protonla (H-1'), 77.22' deki karbon (C-3) 3.10 pmm' deki protonla (H-3) doğrudan etkileştiği görüldü.



Şekil 4. 17. Daucosterin bileşiğinin HMBC spektrumu

Daucosterin (2) bileşiğinin HMBC spektrumu incelendiğinde 77.22 ppm' deki (C-3), 4.21' deki proton (H-1') etkileştiği görüldü.



Kimyasal kayma (ppm)

Şekil 4. 18. Daucosterin bileşiğinin APT, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumu

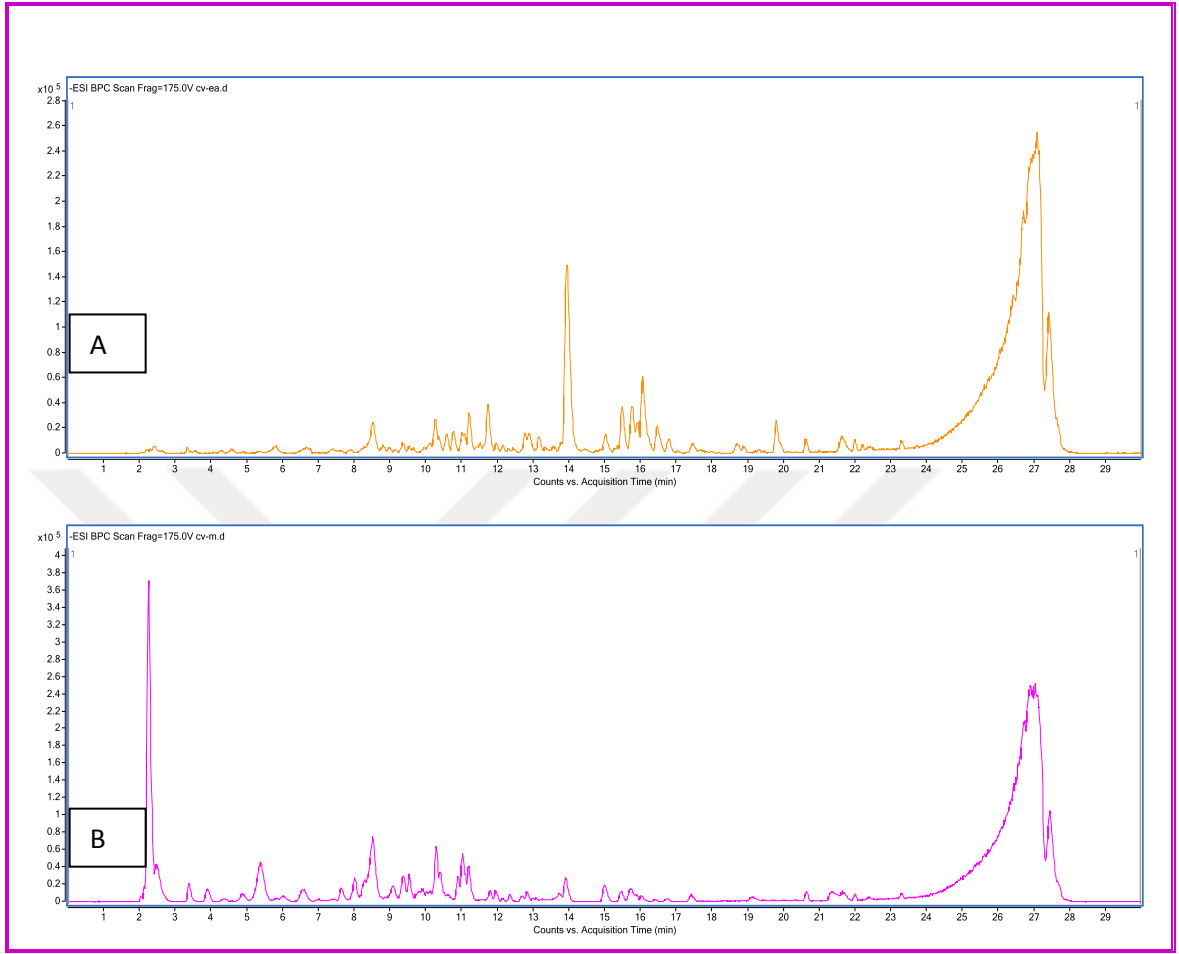
Şekil 4.18'da Daucosterin (2) bileşiğinin DEPT-90 spektrumunda 14 tane metin karbonu olduğu belirlenmiş bu da Daucosterin molekülünün yapısı ile uyum içindedir. DEPT-135 spektrumunda (Şekil 4.18) pozitif sinyaller metin ve metil karbonlarını gösterirken, negatif sinyaller metilen karbonlarını göstermektedir. Böylece yapıda 6 metil, 12 metilen karbonu olduğu belirlenmiştir. ^{13}C -NMR spektrumundan yararlanılarak bileşiğin 3 kuarterner karbon atomuna sahip olduğu belirlendi.

4.4. *Centaurea virgata* LAM. Bitkisinin EtOAc ve MeOH Ekstrelerinin HPLC/TOF-MS Sonuçları

Centaurea virgata LAM. EtOAc ve MeOH ekstrelerinin Çizelge 4.5 de belirtilen 37 fenolik bileşenin (klorojenik asit, 4- hidroksibenzaldehit, hesperidin, apigenin-7-glikozit, rosmanirik asit, protokateşik asit etil esteri, kateşin, gallik asit, vanilik asit, gentisik asit, kaftarik asit, 4- hidroksibenzoik asit, kersetin, kafeik asit, rutin, p- kumarik asit, kamferol, ferulik asit, protokateşik asit, naringenin salisilik asit, sisorik asit, ellagic asit, resveratrol, wogonin, biochanin, eupatorin, sinnamik asit, fumarik asit, quercetin-3- β -D- glucoside, sinapic asit, diosmin, morin, siringik asit, apigenin, scutellarin, neohesperidin) kantitatif tayini gerçekleştirildi (Şekil 4.19).

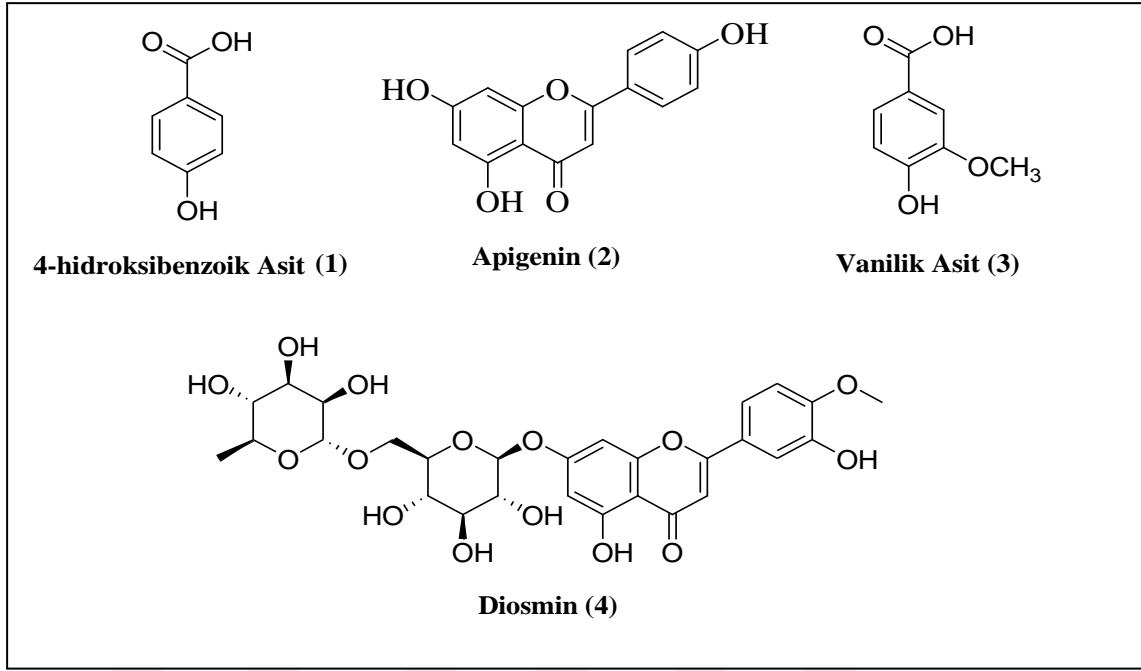
Çizelge 4. 5. *Centaurea virgata* LAM. ekstrelerinin fenolik bileşenleri ($10^3 \times$ mg fenolik/1kgkuru bitki)

| Molekül adı | EtOAc ekstresi | MeOH ekstresi |
|-----------------------------------|----------------|---------------|
| Klorojenik asit | 1504,50 | 21015,36 |
| Hesperidin | 6,68 | 392,72 |
| Vanilik asit | 2682,32 | 368,06 |
| Gentisik asit | 1784,03 | 782,24 |
| 4-hidroksibenzoik asit | 4289,40 | 530,53 |
| Kafeik asit | 467,05 | 97,22 |
| Rutin | | 483,87 |
| Protokateşik asit | 880,10 | |
| Naringenin | 574,53 | 365,95 |
| Salisilik asit | 420,87 | 472,33 |
| Eupatorin | 240,73 | |
| Sinnamik asit | 1936,61 | |
| Fumarik asit | 515,53 | 20905,50 |
| Quercetin-3- β -D-glucoside | | 1058,52 |
| Diosmin | 2267,31 | 16066,81 |
| Morin | 758,63 | 506,83 |
| siringik asit | 1030,13 | 815,01 |
| Apigenin | 3047,49 | 693,75 |
| Scutellarin | 659,54 | 523,38 |
| Neohesperidin | 332,32 | 263,71 |



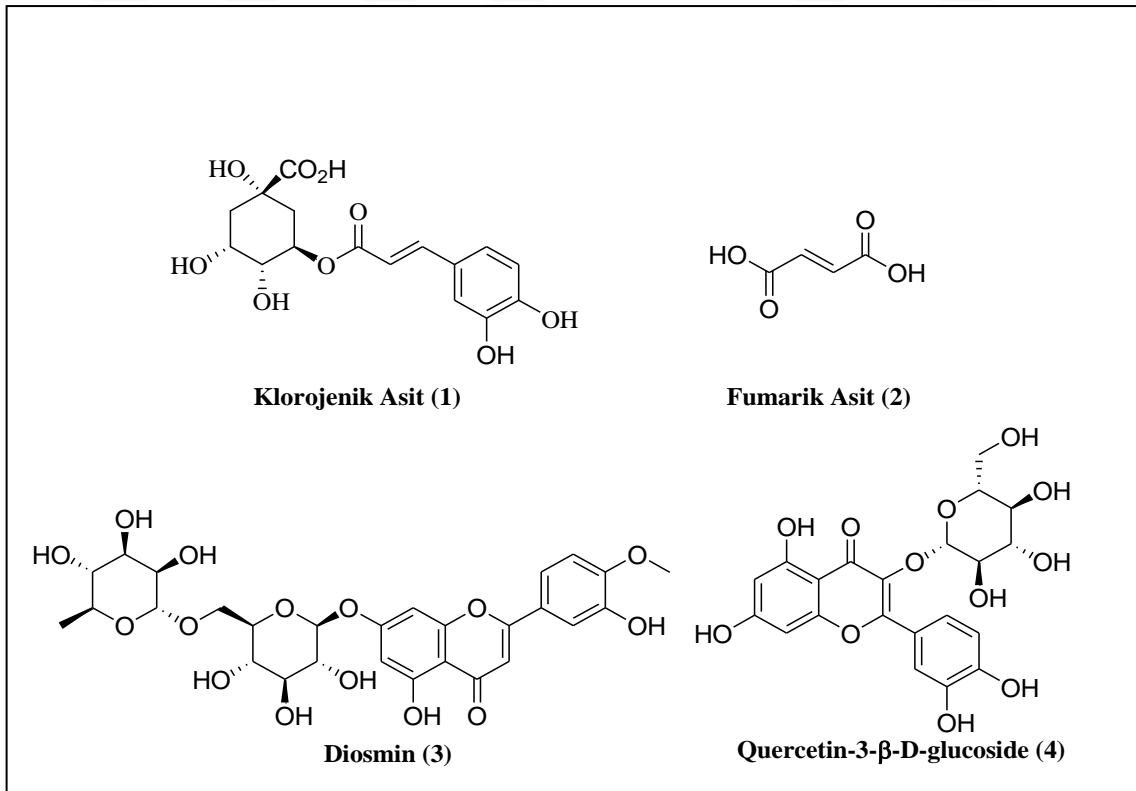
Şekil 4. 19. *Centaurea virgata* LAM. EtOAc (A) ve MeOH (B) ekstralarının HPLC-TOF/MS kromatogramları

Centaurea virgata LAM. EtOAc ekstresinde 18 bileşen tespit edildi. Ana bileşenler olarak 4-hidroksi benzoik asit, apigenin, vanilik asit ve diosmin belirlendi (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20).



Şekil 4. 20. *Centaurea virgata* LAM. EtOAc ekstresindeki ana bileşenler

Centaurea virgata LAM. MeOH ekstresinde 17 bileşen tespit edildi. Ana bileşenler olarak klorojenik asit, fumarik asit, diosmin ve quercetin-3-β-D-glucoside belirlendi (Şekil 4.19 ve Şekil 4.21).



Şekil 4. 21. *Centaurea virgata* LAM. MeOH ekstresindeki ana bileşenler

4.5. *Centaurea virgata* LAM. Bitkisinin Hekzan ve CH₂Cl₂ ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

Centaurea virgata LAM. bitkisinin hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 9 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi, 1 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 21 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 32 bileşen belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

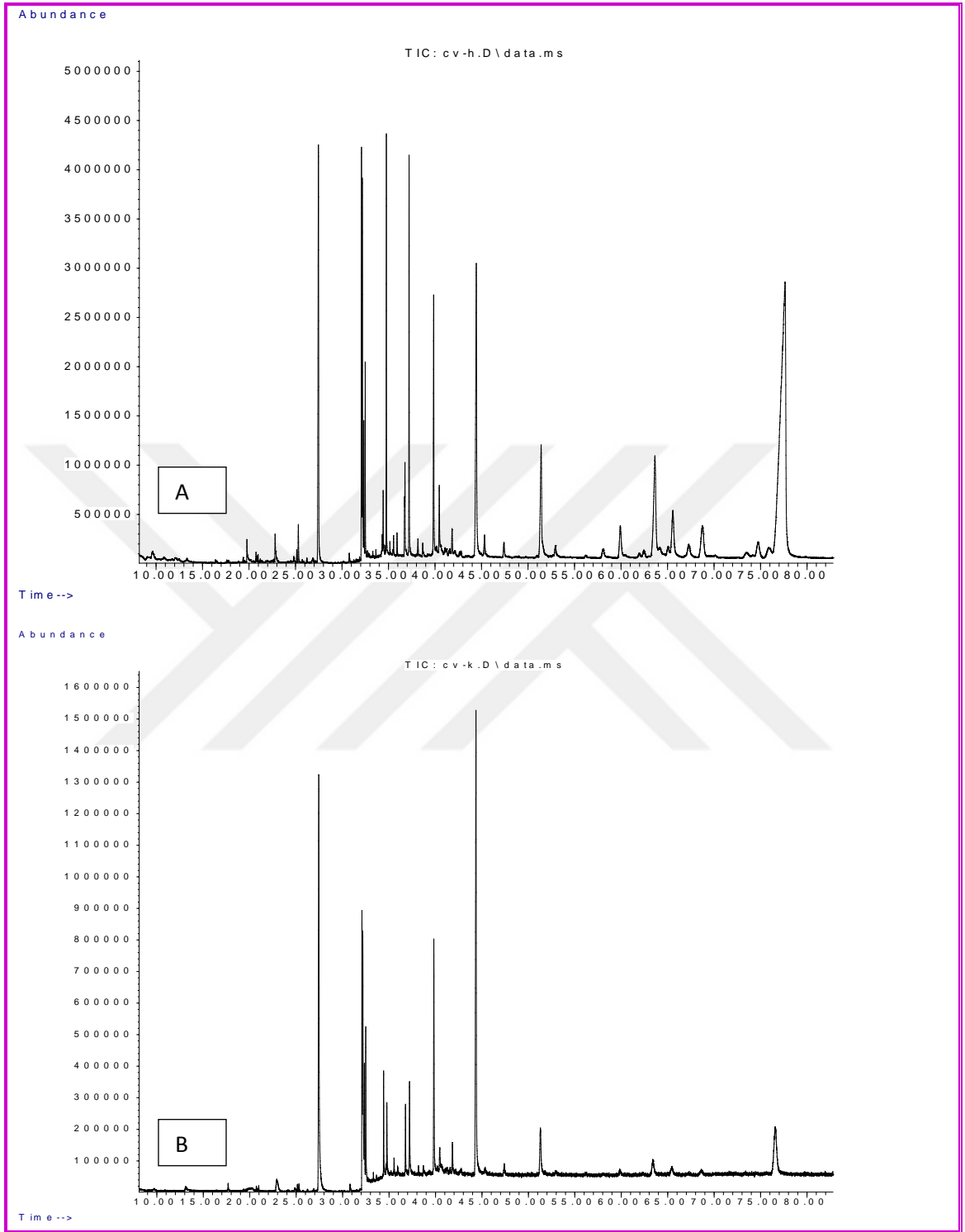
Centaurea virgata LAM. bitkisinin hekzan ekstresinde ana bileşen olarak taraxasterol (%37.55) belirlendi (Şekil 4.22).

Centaurea virgata LAM. bitkisinin CH₂Cl₂ ekstresinin GC-MS analizi sonucunda 4 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi, 1 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 7 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 13 bileşen belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Centaurea virgata LAM. bitkisinin hekzan ekstresinde ana bileşen olarak nonacosane (%24.62) ve palmitic acid (%20.52) belirlendi (Şekil 4.22).

Çizelge 4. 6. *Centaurea virgata* LAM. bitkisinin hekzan ve CH₂Cl₂ ekstralarının GC-MS analiz sonuçları

| No | RT | İzomer | Bileşik Adı | %miktar | |
|---------------------------------|--------|--------------------|---|--------------|--------------------------------------|
| | | | | Hekzan eks. | CH ₂ Cl ₂ eks. |
| Doymuş Yağ Asitleri | | | | | |
| 1 | 19,777 | C ₁₂ :0 | Lauric acid | 0,28 | |
| 2 | 22,810 | C ₁₄ :0 | Myristic acid | 0,52 | |
| 3 | 27,433 | C ₁₆ :0 | Palmitic acid | 7,39 | 20,52 |
| 4 | 32,491 | C ₁₈ :0 | Stearic acid | 1,59 | 3,94 |
| 5 | 34,768 | C ₂₀ :0 | Arachidic acid | 3,46 | 2,31 |
| 6 | 37,212 | C ₂₂ :0 | Behenic acid | 4,21 | 3,34 |
| 7 | 38,682 | C ₂₃ :0 | Tricosylic acid | 0,23 | |
| 8 | 40,456 | C ₂₄ :0 | Lignoceric acid | 0,91 | |
| 9 | 45,320 | C ₂₆ :0 | Cerotic acid | 0,54 | |
| Ara Toplam | | | | 19,13 | 30,11 |
| Mono Doymamış Yağ Asidi | | | | | |
| 10 | 32,176 | C ₁₈ :1 | Oleic acid | 4,75 | 11,09 |
| Ara Toplam | | | | 4,75 | 11,09 |
| Çoklu Doymamış Yağ Asidi | | | | | |
| 11 | 32,096 | C ₁₈ :2 | Linoleic acid | 3,48 | 6,37 |
| Ara Toplam | | | | 3,48 | 6,37 |
| Diğer Bileşenler | | | | | |
| 12 | 25,138 | | 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol | 0,13 | |
| 13 | 25,304 | | Hexahydrofarnesyl acetone | 0,47 | |
| 14 | 32,348 | | Phytol | 1,32 | 3,61 |
| 15 | 34,322 | | 2-Hexadecanol | 0,32 | |
| 16 | 34,425 | | Tricosane | 0,64 | 2,31 |
| 17 | 35,152 | | 4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide | 0,13 | |
| 18 | 35,547 | | Tetracosane | 0,25 | |
| 19 | 35,919 | | Methyl 14-methyl-eicosanoate | 0,25 | |
| 20 | 36,771 | | Pentacosane | 1,52 | 1,87 |
| 21 | 38,167 | | Hexacosane | 0,25 | |
| 22 | 39,855 | | Octacosane | 4,06 | 8,13 |
| 23 | 44,447 | | Nonacosane | 7,85 | 24,62 |
| 24 | 47,408 | | Triacotane | 0,35 | |
| 25 | 51,414 | | Tetratriacontane | 4,25 | 3,57 |
| 26 | 59,928 | | Stigmasterol | 1,41 | |
| 27 | 63,647 | | γ-Sitosterol | 5,44 | |
| 28 | 65,576 | | β-Amyrin | 2,43 | |
| 29 | 67,286 | | Dihydrochondrillasterol | 0,67 | |
| 30 | 68,746 | | α-Amyrin | 2,26 | |
| 31 | 74,708 | | Lupenone | 1,07 | |
| 32 | 77,643 | | Taraxasterol | 37,55 | 8,33 |
| Ara Toplam | | | | 72,62 | 52,44 |
| Genel Toplam | | | | 99,98 | 100,01 |



Şekil 4. 22. *Centaurea virgata* LAM. hekzan (A) ve CH₂Cl₂ (B) eksterelerinin GC-MS kromatogramları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında *Centaurea virgata* LAM. bitkisinin antikanser aktivite yönlendirmeli sekonder madde izolasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu amaçla *C. virgata* LAM. bitkisinin farklı polaritedeki çözücülerdeki (hekzan, CH₂Cl₂, EtOAc ve metanol) ekstreleri hazırlandı. Elde edilen ekstrelerin C6 ve HeLa kanser hücrelerine karşı dört farklı dozda (100, 50, 25, 5 µg/mL) konsantrasyonlarda antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan testler neticesinde her iki hücre türü içinde, 5-FU ile mukayese edildiğinde en etkili ekstrenin CH₂Cl₂ ekstresi olduğu gözlemlendi ve izolasyon çalışmalarına bu kısımdan başlandı.

CH₂Cl₂ ekstresinin izolasyon çalışmaları için ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi gibi saflaştırma teknikleri kullanıldı. İzolasyon çalışmaları sonucunda Daucosterin ve Cnicin molekülleri izole edildi. İzole edilen moleküllerin yapı tayinleri 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak aydınlatıldı. Elde edilen veriler literatürdeki veriler ile karşılaştırılarak sonuçlar teyit edildi.

Son olarak izole edilen moleküllerin izole edildikleri CH₂Cl₂ ekstresi ile antikanser aktiviteleri karşılaştırıldı. Testler sonucunda CH₂Cl₂ ekstresinin izole edilen Daucosterin ve Cnicin moleküllerinden her iki hücre türü içinde daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Daucosterin ve Cnicin molekülleri arasında antikanser aktivite noktasında mukayese edildiğinde HeLa hücresi için Daucosterin molekülünün (Şekil 4.2), C6 hücresi için ise Cnicin molekülünün (Şekil 4.4) daha etkili olduğu tespit edildi.

Daucosterin molekülü *Cynanchum paniculatum* birçok bitkiden izole edilmiştir.

Centaurea virgata LAM. bitkisinin Hekzan ve CH₂Cl₂ ekstrelerinin GC-MS analizi gerçekleştirildi. CH₂Cl₂ ekstresinde sonucunda 4 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi, 1 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 7 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 13 bileşen belirlenmiştir (Çizelge 4.6). *Centaurea virgata* LAM. bitkisinin CH₂Cl₂ ekstresinde ana bileşen olarak nonacosane (%24.62) ve palmitic acid (%20.52) belirlendi (Şekil 4.22). Hekzan ekstresinde ise 9 adet doymuş yağ asidi, 1 adet mono doymamış yağ asidi, 1 adet çoklu doymamış yağ asidi ve 21 adet diğer bileşik olmak üzere toplam 32 bileşen belirlenmiştir (Çizelge 4.6). *Centaurea virgata* LAM.

bitkisinin hekzan ekstresinde ana bileşen olarak taraxasterol (%37.55) belirlendi (Şekil 4.22).

Centaurea virgata LAM. EtOAc ve MeOH ekstrelerinin HPLC/TOF-MS analizleri gerçekleştirildi. EtOAc ekstresinde 18 bileşen tespit edildi. Ana bileşenler olarak 4-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, diosmin ve apigenin belirlendi (Şekil 4.19 ve 4.20). MeOH ekstresinde ise 17 bileşen tespit edildi. Ana bileşenler olarak klorojenik asit, fumarik asit, quarcetin-3-β- D-glucoside ve diosmin belirlendi (Şekil 4.19 ve 4.21).

Çalışmada izole edilen moleküllerin literatürdeki yeri ve önemi:

Cnicin (1): Önemli ölçüde antifungal, ılımlı oranda antibakteriyal aktivite göstermektedir (Circic ve ark., 2012). Bir başka çalışmada Cnicin serviks adenokarsinom (HeLa), meme adenokarsinomu (MCF7) ve cilt epidermoid karsinom (A431) hücrelerine karşı ılımlı antiproliferatif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Csapi ve ark., 2010). Diğer bir grup yapmış oldukları incelemelerde Cnicin molekülünün MurA bakteriyel enziminin geri dönüşümsüz inhibitörü olduğunu rapor etmişlerdir (Bachelier ve ark., 2006). Schneider ve grubu yapmış oldukları deneysel bir inceleme de Cnicin molekülünün sıçan pençe ödemi karşı anti-inflamatuar aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Schneider ve Lachner, 1987). TLX- 5 fare lenfoma hücrelerine karşı *in vitro* olarak test edildiğinde Cnicin belirgin bir sitotoksik aktivite göstermiştir (El- Masry ve ark., 1984). Karawya ve grubu yapmış oldukları, ön inceleme sonucunda Cnicin molekülünün hipoglisemik özelliklere sahip olduğunu belirlemişler ve *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı bir antibiyotik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir (Karawya ve ark., 1977). Bir diğer çalışmada, Cnicinin minimum bakteriyel konsantrasyonu, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella abortus*, bakterilerine karşı 125 µg / mL olarak tespit edilmiştir. Aynı grup sitotoksisite çalışmalarında, KB hücre kültürlerinin karşı Cnicinin I ED50 3.4 µg / mL olduğunu tespit etmişlerdir (Vanhaelen- Fastre, 1972). Cnicin birçok yollardan miyeloid hücre ölümüne neden olur ve yeni bir hedef olarak Pim- 2 göstermektedir. Bu bulgular, yeni bir anti-tümör ilaç olarak Cnicin daha ileri değerlendirme için rasyonel sağlamak ve tümör tedavisinde Seskiterpen laktonların potansiyelini altını çizmektedir. Joehrer ve grubu yapmış oldukları bir çalışma da Cnicin molekülünün birçok yollardan miyeloid hücre ölümüne

neden olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, yeni bir anti-tümör ilaç olarak Cnicin daha ileri değerlendirme için ön çalışma olmakta ve tümör tedavisinde Seskiterpen laktonların potansiyelini altını çizmektedir (Joehrer ve ark., 2012).

Daucosterin (2): *In vitro* çalışmalarda daucosterin (β -sitosterol-3-O- β -d-glucopyrannoside) bileşiğinin de içinde bulunduğu 4 bileşik, Epstein- Barr virüsüne (EBV) karşı antitümör aktivite bakımından incelenmiş ve Daucosterin' nin yüksek antitümör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Guevara ve ark., 1999)

Daucosterin ve Arvense-1 moleküllerinin HeLa (insan rahim kanseri), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücresi) ve C6 (sıçan beyin tümörü) hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelenen bir araştırmada, yüksek konsantrasyonda (500 μ g/mL) Daucosterin molekülünün HeLa ve C6 hücrelerine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Tüfekçi, 2010)

6. KAYNAKLAR

- Akal, S., Benayache, F., Benayache, S., Medjroubi, K., Jay, M., Tillequin, F., Seguin, E 1999. A new flavone glycoside from *Centaurea furfuracea*, *Fitoterapia* 70, 368-370
- Akal, S., Benayache, F., Bentamene, A., Medjroubi, K., Seguin, E., Tillequin, F., 2003. Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia*. *Chem Nat Comp*, 39(2), 219- 20.
- Anonim, 2004. <http://www.losev.org.tr> (14. 11. 2004).
- Arslan, Ü., ve Öksüz, S., 1999. Chemical Constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turk J Chem TUBITAK*, 23, 15-20
- Bachelier, A., Mayer, R., Klein, C. D. 2006. Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16:21, 5605-5609.
- Ballabh, B., Chaurasia, O.P.(2007). Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh- Used in treatment of cold, cough and fever, *J Ethnopharmacol*, 112: 341- 349
- Barrero, A. F., Oltra, J.E., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D. G., Ruiz, P., 1995. Lactones from Species of *Centaurea Cytotoxic* and Antimicrobial Activities, *Fitoterapia*, 66(3): 227- 230
- Baytop, T. 1984. Türkiye’ de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Eczacılık Fakültesi, No: 40, İstanbul
- Baytop, T., 1999. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present). Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, İstanbul, Turkey, 316.
- Bona, B., Aras, A., 2008. Numerical Taxonomic study on some *Centaurea* L. species *IUFS J Biol*, 67(1), 55-63
- Bruno, M., Maggio, A., Rosselli, S., Gedris, T.E., Herz, W., 2002 Sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea paniculata* subsp. *Castellana*. *Biochem Sys Ecol*, 30(4), 379-81
- Catalan, C.A.N., Kokke. W.C.M.C., Duque, C., Djerassi. C., 1983. *J. Org. Chem.*, 48, 5207
- Ciric, A., Karioti, A., Koukoulitsa, C., Sokovic, M., Skaltsa, H., 2012. Sesquiterpene Lactones from *Centaurea zucariniiana* and Their Antimicrobial Activity, *Chemistry & Biodiversity*, 9:12, 2843-2853.
- Csapi, B., Hajdu, Z., Zupko, I., Berenyi, A., Forgo, P., Szabo, P., Hohmann, j., 2010. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*, *Phytotherapy Research*, 24:11, 1664-1669.
- Davis, P. H., Hedge, I. C., 1975. The Flora of Turkey; Past, Present and Future. *Condonella*, (30), 331- 351
- Davis, P. H., 1975. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, (5), 465-585
- Davis, P. H., 1988. *Flora of Turkey East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, (10), 431- 463
- El-Masry, S., Vuilhorgne, M., Evans, F. J., 1984. Sesquiterpene lactones from *Aegialophila pumila*, *Planta Medica*, 50:1, 115.
- Ertürk, Ö., Demirbağ, Z. 2003. *Scorzonare mollis* Bieb. (*Compositae*) bitkisinin Antimikrobiyal aktivitesi. *Çevkor*, 47: 27- 31

- Esmaili, A., Rustaiyan, A., Nadimi, M. (2005). Volatile constituents of *Centaurea depressa* M.B. and *Carduus pycnocephalus* L. Two *Compositae* herbs growing wild in Iran. *J. Essent. Oil Res*, 17: 539- 541
- Flamini, G., Antognoli, E., Morelli, I., 2001. Two flavonoid and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*, 57, 559-564
- Goldman, P. 2001. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. *Annals of Internal Medicine*, 135: 594- 600
- Gonnet, J.F. (1993). Flavonoid glycoside variation in wild specimens of *Centaurea Triumfetti* (Compositae) and comments on its relationships with *Centaurea Montana* based on flavonoid fingerprints, *Bio Syst Ecol*, 21(3): 389- 96
- Guevara, A.P., Vargas, C., Sakuari, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H., Nishino, H., 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera*, *Lam. Mutat Res.*, 440(2), 181-188.
- Hakim, M. S. 1982. Medicinal and Aromatic Plants in History- The History of Medicinal and Aromatic Plants 13. Karachi
- Heywood, V. H., 1978. Flowering Plants of the World, Oxford University Press, London, 262- 268.
- Joehrer, K., Obkircher, M., Neureiter, D., Parteli, J., Zelle-Rieser, C., Maizner, E., Kern, J., Hermann, M., Hamacher, F., Merkel, O., Wacht, N., Zidorn, C., Scheideler, M., Greil, Richard, 2012. Antimyeloma activity of the sesquiterpene lactone cnicin: impact on Pim-2 kinase as a novel therapeutic target, *Journal of Molecular Medicine (Heidelberg, Germany)*90:6, 681-693.
- Karagöz, A., Cevahir, G., Özcan T., Sadıkoğlu, N., Yentür, S., Kuru, A., 2002. Bazı yüksek hazırlanan sulu ekstraktların antiviral aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 29-31 Mayıs
- Karamenderes, C., Demirci, B., Baser, K.H.C. 2008. Composition of essential oils of ten *Centaurea* L. taxa from Turkey. *J Ess Oil Res*, 20(4), 342-9
- Karawya, M. S., Hilal, S. H., Hifnawy, M. S., El-Hawary, S. S., 1977. Isolation and preliminary pharmacological and microbiological screening of cnicin from *Centaurea calcitrapa* L. growing in Egypt, *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16:4, 445-455.
- Klug, W. S., Cummings, M.R., 2002. *Genetik*, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 24, 28, 635- 651
- Kraoti, A., Skaltsa, H., Lazari, D., Sokovic, M., Garcia., B., Harvala, C., 2002. Secondary Metabolites from *Centaurea deusta* with Antimicrobial Activity, *Z. Naturforsch.* 57c, 75- 80
- Kupeli, A., Ergun, E., F., 2004. The Biological Activity Of *Centaurea* L. Species, *G.U. Journal of Science*, 17(4): 149-164
- Liu, Y., Wang, M. W. 2007. Botanical drugs: challenges and opportunities Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. *Life Sciences*, 82: 445-449.
- Ma, X., Li, Y.F., Gao, Q., Ye, Z.G., Lu, X.J., Wang, H. P., Jiang, H. D., Bruce, I. C., Xia, Q.(2008). Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of Endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery, *Life Sci*, 83: 110-117

- Middleton, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., Nahar, L., Reid, R., Sarker, S.D. (2003). Dibenzylobutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochem Syst Ecol*, 31(6): 653-6
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwel, V.W., 2004. Harper' in Biyokimyası (Çev. Ed: Dikmen, N., Özgüven, T.) Barış Kitabevi, İatanbul
- Öksüz, S., Serin, S. (1997). Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*, *Phytochemistry*, 46(3): 545-8
- Santos, M. D., Almeida, M.C., Lopes, N. P., Souza G.E.P. (2006). Evaluation of the Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol Pharm Bull* 29(11): 2236-40
- Sarker, S. D., Dinan, L., Sik, V., Rees, H.H. (1998). Moschatine: An unusual steroidal Glycoside from *Centaurea moschata*, *Phytochemistry*, 48(6): 103943
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L., Leblebici, E.(1995). Tohumlu Bitkiler Sistematığı, E.Ü. Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 116, E.Ü. Basımevi, Bornova- İzmir
- Sezik, E., Yesilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. (1997). Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces, *Econ Bot*, 51 (3): 195- 211.
- Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., Tanaka, T. (2001). Traditional.
- Schneider, G., Lachner, I., 1987. Analysis and pharmacological activity of cnicin, *Planta Medica*, 53:3, 247-251.
- Tüfekçi, A.R., 2010. Köy Göçüren (*Cirsium arvense* L. scop. subsp. *vestitum*) Bitkisinin Bazı Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. (Y. Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Tokat.
- Vanhaelen-Fastre, R., 1972. Antibiotic and cytotoxic activities of cnicin, isolated from *Cnicus benedictus*, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 27:6, 683-683.
- Wang, W., Zhao, Y., Raybum, E.R., Hill, D.L., Wang, H., Zhang, R., 2007. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*, *Cancer Chemother Pharmacol*, 59, 589-601
- Wagenitz, G., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Ed: Davis P. H., Vol: 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, (1975). Pp: 465- 585.
- Yaylı, N., Baltacı, C., Gök, Y., Aydın, E., Uçuncu, O., 2006. Sesquiterpene lactones From *Centaurea helenioides* Boiss. *Turk J Chem.*, 3. 229- 233.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Semra ŞANAL

Doğum Tarihi ve Yeri: 22.11.1991/ KADIKÖY

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Telefon: 05300861160

E- mail: semra.sanal@hotmail.com

Eğitim

| Derece | Eğitim Birimi | Yılı |
|---------------|--|------------|
| Yüksek Lisans | Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya- Organik Kimya Anabilim Dalı- TOKAT | 2013-2016 |
| Lisans | Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü- TOKAT | 2009- 2013 |
| Lise | Hasan Şadoğlu Lisesi- İSTANBUL | 2005- 2009 |

ALDIĞI BURSLAR

1. TÜBİTAK- BİDEB 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Burs Programı