



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

***PETROEDMONDIA SYRIACA (BOISS.) TAMAMSCH.
BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR***

DEMET AKALGAN

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

EKİM 2017



***PETROEDMONDIA SYRIACA* (BOISS.) TAMAMSCH. BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Demet AKALGAN

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

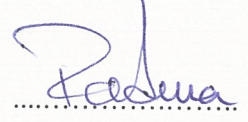
EKİM 2017

Demet AKALGAN tarafından hazırlanan “*Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Fatma TOSUN

Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul Medipol Üniversitesi

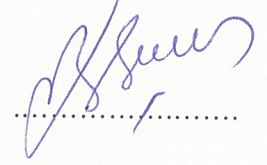
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan : Prof. Dr. Bilge ŞENER

Farmakognozi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

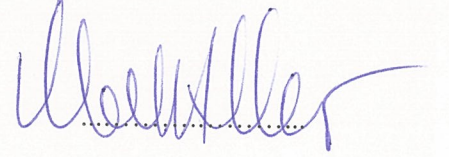
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Mahmud MİSKİ

Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi

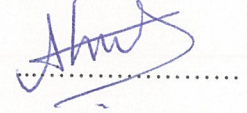
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Ayşe UZ

Farmakognozi Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

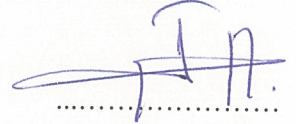
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Uğur TAMER

Analitik Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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



Tez Savunma Tarihi: 23 / 11/ 2017

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

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Demet AKALGAN

23/11/2017

PETROEDMONDIA SYRIACA (BOISS.) TAMAMSCH. BİTKİSİ ÜZERİNDE
FARMAKOĞNOZİK ARAŞTIRMALAR

(Doktora Tezi)

Demet AKALGAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ekim 2017

ÖZET

Çalışmamızda, *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. (Apiaceae) bitkisinin sitotoksik aktivite yönünden incelenmesi ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bitkinin kökünden izole edilip saflaştırılan kumarinler fiziksel ve spektral özelliklerinden yararlanılarak 3'-isobutiriloksi marmesin asetat, 3'- α -angeloiloksi deltoin, smyrnioridin, deltoin, marmesin asetat, skoparon, bergapten, psoralen, kolladonin, 14'-asetoksi badrakemin, marmesin ve 14'-hidroksi badrakemin olarak teşhis edilmiştir. Bitkinin köklerinden toplam on üç bileşik izole edilmiştir. Üç bileşik ilk kez bu çalışmada izole edilmiştir. Diğer bileşikler ise daha önce bilinmekle beraber bu bitkiden ilk defa izole edilmiştir. Ekstreler, MCF-7 hücre hattında MTT yöntemi ile sitotoksikite yönünden değerlendirilmiştir. Bitkiden elde edilen bileşiklerin ve kumarin karışımının sitotoksik aktivitesi araştırılmış, sitotoksik aktivitesi kayda değer bulunmuştur. Bitki kumarin türevi bileşikler ve sitotoksik aktivite açısından ilk kez tarafımızdan incelenmiştir.

Bilim Kodu : 1017

Anahtar Kelimeler : *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch, kumarin, MTT, 3'-isobutiriloksi marmesin asetat, 3'- α -angeloiloksi deltoin, smyrnioridin, deltoin, marmesin asetat, skoparon, bergapten, psoralen, kolladonin, 14'-asetoksi badrakemin, marmesin, 14'-hidroksi badrakemin, sitotoksik aktivite.

Sayfa Adedi : 156

Danışman : Prof. Dr. Fatma TOSUN

PHARMACOGNOSIC RESEARCHES ON
PETROEDMONDIA SYRIACA (BOISS.) TAMAMSCH

(Ph. D. Thesis)

Demet AKALGAN

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

October 2017

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the cytotoxic activity of *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. (Apiaceae) and to determine the responsible compounds from this activity. The isolated and purified 12 coumarins from the roots of the plant were identified as 3'-isobutyryloxymarmesin acetate, 3'- α -angeloyloxydeltoid, smyrnioridine, deltoin, marmesin acetate, scoparone, bergapten, psoralen, colladonin, 14'-acetoxybadrakemin, marmesin and 14'-hydroxybadrakemin using their physical and spectral characteristics. Three compounds of them were isolated for the first time in this study. The extracts (hexan, CH₂Cl₂ etc.) were evaluated for cytotoxicity by the MTT method using MCF-7 cell line. The cytotoxic activity of the compounds obtained and the coumarin mixture were investigated and the cytotoxic activity was found to be significant. This is the first report on the chemical composition and cytotoxic activity of the roots of *P. syriaca*. The cytotoxic activity of the coumarin mixture was found to be significant.

Science Code : 1017

Key Words : *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch, coumarin, MTT, 3'-isobutyryloxymarmesin acetate, 3'- α -angeloyloxy deltoin, deltoin, smyrnioridine, deltoin, marmesin acetate, scoparone, bergapten, psoralen, colladonin, 14'-acetoxybadrakemin, marmesin, 14'-hydroxy badrakemin, cytotoxic activity.

Page Number : 156

Advisor : Prof. Dr. Fatma TOSUN

TEŞEKKÜR

Tez konumu belirleyip çalışmalarımın her anında beni destekleyen, hiçbir yardımını esirgemeyen ve her türlü yardımı sunan, her zor anımda varlığını hissettiren Sayın Prof. Dr. Fatma TOSUN'a çok teşekkür ederim.

Gösterdiği ilgi ve destekten dolayı tez izleme komitesi üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Bilge ŞENER'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarımda engin bilgilerini her zaman gösteren tez izleme komitesi üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Mahmud MİSKİ'ye çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Fakültemiz Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim için maddi destek sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimine (Proje No:02/2014-01) çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle beni yalnız bırakmayan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botanik Bilgiler.....	3
2.1.1. Apiaceae (Umbelliferae) Familyası.....	3
2.1.2. <i>Petroedmondia</i> Tamamsch. cinsi	4
2.1.3. <i>Petroedmondia syriaca</i> (Boiss.) Tamamsch.....	4
2.2. Kumarinler	5
2.2.1. Kimyasal yapıları.....	9
2.2.2. Biyosentezleri	17
2.2.3. Kumarinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	23
2.2.4. Ekstraksiyon, ayırma, saflaştırma, miktar ve yapı tayini yöntemleri	23
2.2.5. Kumarinlerin biyolojik aktiviteleri.....	25
2.2.6. Kumarinlerin endüstriyel kullanımı ve kullanılışları	53
2.2.7. Kumarinin diğer potansiyel kullanımları.....	56
2.2.8. Kumarinlerin toksisiteleri	56
2.2.9. Furanokumarinlerin kullanım alanları	57

	Sayfa
2.2.10. Furanokumarinlerin fototoksisitesi.....	58
2.3. <i>Petroedmondia</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Olan Çalışmalar	59
2.4. Sitotoksik Aktivite Tayini.....	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM	61
3.1. Materyal.....	61
3.2. Yöntem.....	62
3.2.1. Ekstraksiyon	63
3.2.2. Ayırma ve saflaştırma için kullanılan yöntemler	63
3.2.3. Sitotoksik aktivite tayini.....	67
3.2.4. Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma çalışmaları	69
4. BULGULAR	75
4.1. Biyoaktivite Rehberliğinde İzolasyon Çalışması Bulguları.....	75
4.2. İzolasyon ile Elde Edilen Bileşiklere Ait Bulgular.....	79
4.2.1. PS-1 kodlu bileşiğe ait bulgular (3'- α -isobutiriloksi-marmesin asetat)....	79
4.2.2. PS-2 kodlu bileşiğe ait bulgular (3'- α -angeloiloksi-deltoin).....	86
4.2.3. PS-3 kodlu bileşiğe ait bulgular (Smyrnioridin)	90
4.2.4. PS-4 kodlu bileşiğe ait bulgular (Deltoin).....	95
4.2.5. PS-5 kodlu bileşiğe ait bulgular (Marmesin asetat).....	101
4.2.6. PS-6 kodlu bileşiğe ait bulgular (Skoparon)	104
4.2.7. PS-7 kodlu bileşiğe ait bulgular (Bergapten+ Psoralen)	106
4.2.8. PS-8 kodlu bileşiğe ait bulgular (Dezasetil-smyrnioridin)	108
4.2.9. PS-9 kodlu bileşiğe ait bulgular (Kolladonin).....	113
4.2.10. PS-10 kodlu bileşiğe ait bulgular (14'-asetoksi-badrakemin).....	119
4.2.11. PS-11 kodlu bileşiğe ait bulgular (Marmesin).....	125
4.2.12. PS-12 kodlu bileşiğe ait bulgular (14'- hidroksi-badrakemin)	129
5. TARTIŞMA	135

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	137
KAYNAKLAR	139
ÖZGEÇMİŞ	155



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kumarin ve türevlerinin kısa tarihçesi.....	6
Çizelge 2.2. Basit kumarin örnekleri	10
Çizelge 2.3. Linear furanokumarin örnekleri- psoralen tipi	13
Çizelge 2.4. Açısal furanokumarin örnekleri- angelin tipi	14
Çizelge 2.5. Kumarin ve Bazı Türevlerinin Endüstriyel Kullanımı ve Toksisiteleri.....	54
Çizelge 2.6. Yapılarına göre kumarin türevi bileşiklerin kullanımı	55
Çizelge 3.1. İTK ve Preparatif İTK analizlerinde kullanılan çözücü sistemleri	64
Çizelge 3.2. Kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri	65
Çizelge 3.3. NMR spektrumu için kullanılan cihaz	67
Çizelge 3.4. Kök petrol eteri ve diklorometan ekstresinin ana kolon fraksiyonları	70
Çizelge 4.1. Ekstre ve fraksiyonların hücre canlılığı % inhibisyon oranları	76
Çizelge 4.2. C ve F fraksiyonundan izole edilen bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri	76
Çizelge 4.3. Elde edilen tüm bileşiklerin kodu, adı ve formülü	79

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Piranokumarin örnekleri	12
Şekil 2.2. Dihidropirano kumarin örnekleri	12
Şekil 2.3. Dihidro kumarin örnekleri	14
Şekil 2.4. Dimerkumarin örneği- Bishidroksikumarin (Dikumarol)	15
Şekil 2.5. Diğer kumarin türevleri	15
Şekil 2.6. Izokumarinler ve kromonlar	16
Şekil 2.7. Kumarin biyosentezi	18
Şekil 2.8. Fenilpropanoid yolağı	19
Şekil 2.9. Linear ve angular furanokumarinlerin biyosentezi	22
Şekil 2.10. Kumarik asidin oluşumu	24
Şekil 2.11. Kumarin analog varfarin ve K vitamini döngüsü	30
Şekil 2.12. Fototoksik kumarinlerin DNA'nın pirimidin halkasına bağlanması	59
Şekil 2.13. MTT boyasının mitokondri üzerindeki etkisi	60
Şekil 3.1. Sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlarda bulunan bileşiklerin izolasyonu	71
Şekil 4.1. Kök petrol eteri ekstresinin sitotoksosite grafiğı	77
Şekil 4.2. Kök diklorometan ekstresinin sitotoksosite grafiğı	77
Şekil 4.3. C kodlu fraksiyonun sitotoksosite grafiğı	78
Şekil 4.4. F kodlu fraksiyonun sitotoksosite grafiğı	78
Şekil 4.5. PS-1 kodlu bileşik: 3'- α -isobutiriloksi-marmesin asetat	82
Şekil 4.6. PS-2 kodlu bileşik: 3'- α -angeloiloksi-deltoin	86
Şekil 4.7. PS- 3 kodlu bileşik: Smyrniordin (3'-angeloiloksi-marmesin asetat)	90
Şekil 4.8. PS-4 kodlu bileşik: Deltoin (Marmesin angelat)	96
Şekil 4.9. PS-5 kodlu bileşik: Marmesin Asetat	101
Şekil 4.10. PS-6 kodlu bileşik: Skoparon	104

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. PS-7 kodlu bileşikler: Bergapten (A) + Psoralen (B)	106
Şekil 4.12. PS-8 kodlu bileşik: Dezasetil-smyrnioridin.....	109
Şekil 4.13. PS-9 kodlu bileşik: Kolladonin.....	114
Şekil 4.14. PS-10 kodlu bileşik: 14'-asetoksi-badrakemin	120
Şekil 4.15. PS-11 kodlu bileşik: Marmesin	125
Şekil 4.16. PS-12 kodlu bileşik: 14'-hidroksi-badrakemin	129



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. <i>Petroedmondia syriaca</i> bitkisinin doğadaki görünüşü	61
Resim 3.2. Çalışmada kullanılan kök ve meyve.....	62
Resim 4.1. PS-1 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	83
Resim 4.2. PS-1 kodlu bileşiğin dihidrofuranokumarin iskeletine ait proton sinyallerini gösteren genişletilmiş ¹ H NMR alt alan spektrumu	84
Resim 4.3. PS-1 kodlu bileşiğin izopropiloksi yan zinciri ile ester protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR üst alan spektrumu.....	85
Resim 4.4. PS-2 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	87
Resim 4.5. PS-2 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumunda alt alanda yer alan H-4, H-5, H-8, H-3', H-3, H-3"', H-3'''' ve H-2' protonlarına ait sinyalleri ile CDCl ₃ sinyalini içeren genişletilmiş ¹ H-NMR spektrumu	88
Resim 4.6. PS-2 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumunda üst alanda yer alan H-4''', H-4''''', H-5''', H-5''''', H-2'' ve H-3'' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu	89
Resim 4.7. PS-3 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	91
Resim 4.8. PS-3 kodlu bileşiğin H-4, H-5, H-8, H-3' ve H-3 protonlarına ait sinyalleri ile CDCl ₃ sinyalini içeren genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	92
Resim 4.9. PS-3 kodlu bileşiğinin H-3'''' ve H-2' protonlarına ait sinyallerini içeren genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	93
Resim 4.10. PS-3 kodlu bileşiğin asetil, angeloil ve dihidrofuran halkasına bağlı izopropil metillerinin protonlarının sinyallerini gösteren genişletilmiş üst alan ¹ H NMR spektrum	94
Resim 4.11. PS-4 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	97
Resim 4.12. PS-4 kodlu bileşiğin H-4, H-8, H-5, H-3 ve H-3'''' protonlarına ait sinyalleri ile CDCl ₃ sinyalini içeren genişletilmiş ¹ H NMR alt alan spektrumu	98
Resim 4.13. PS-4 kodlu bileşiğin H-2' ve H-3'a ve H-3'b protonlarına ait sinyalleri içeren orta alan genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	99
Resim 4.14. PS-4 kodlu bileşiğin H-4''', H-5''', H-3'' ve H-2'' protonlarına ait sinyalleri içeren üst alan genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu	100
Resim 4.15. PS-5 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	102

Resim	Sayfa
Resim 4.16. PS-5 kodlu bileşiğin kumarin iskeletine ait H-4, H-8, H-5 ve H-3 protonlarına ait pikleri içeren aromatik alanın genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu	103
Resim 4.17. PS-6 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	105
Resim 4.18. PS-7 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	107
Resim 4.19. PS-8 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	110
Resim 4.20. PS-8 kodlu bileşiğin H-4, H-5, H-8, H-2', H-3, H-3''' ve H-3' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR alt alan spektrumu	111
Resim 4.21. PS-8 kodlu bileşiğin H-4'', H-5'', H-2'' ve H-3'' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR üst alan spektrumu	112
Resim 4.22. PS-9 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	115
Resim 4.23. PS-9 kodlu bileşiğin H-4, H-5, H-6, H-8 ve H-3 protonlarına ait sinyallerini içeren genişletilmiş ¹ H NMR alt alan spektrumu	116
Resim 4.24. PS-9 kodlu bileşiğin H-12' a ve b, H-11' a ve b, H-3' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR orta alan spektrumu	117
Resim 4.25. PS-9 kodlu bileşiğin H-9', H-7', H-6', H-2', H-1' ve H-5' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR üst alan spektrumu	118
Resim 4.26. PS-10 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	121
Resim 4.27. PS-10 kodlu bileşiğin H-4, H-5, H-6, H-8 ve H-3 protonlarına ait sinyalleri ile CDCl ₃ sinyalini içeren genişletilmiş ¹ H NMR alt alan spektrumu	122
Resim 4.28. PS-10 kodlu bileşiğin H-12'a ve b, H-11'-a ve b, H-14'-a ve b, H-3' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR orta alan spektrumu	123
Resim 4.29. PS-10 kodlu bileşiğin H-9', H-7', H-6', H-2', H-1', H-5', H-15' ve H-13' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR üst alan spektrumu	124
Resim 4.30. PS-11 kodlu bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	126
Resim 4.31. PS-11 kodlu bileşiğin kumarin iskeletine ait H-4, H-8, H-5 ve H-3 protonları piklerini içeren alt alan (düşük alan) genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu	127
Resim 4.32. PS-11 kodlu bileşiğin orta alanda bulunan H-2' ve H-3'-a ve b protonlarına ait pikleri içeren genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	128

Resim	Sayfa
Resim 4.33. PS-12 kodlu bileşimin ^1H NMR spektrumu	130
Resim 4.34. PS-12 kodlu bileşimin H-4, H-5, H-6, H-8 ve H-3 protonlarına ait sinyalleri ile CDCl_3 sinyalini içeren genişletilmiş ^1H NMR alt alan spektrumu	131
Resim 4.35. PS-12 kodlu bileşimin H-12'-a ve b, H-11'-a ve b, H-3', H-14'-a ve b protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR orta alan spektrumu	132
Resim 4.36. PS-12 kodlu bileşimin H-9', H-7', H-6', H-2', H-1' ve H-5' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR üst alan spektrumu	133



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

Hz	Hertz
kg	Kilogram
MHz	Megahertz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim

Kısaltmalar

Açıklamalar

AChE	Asetilkolinesteraz
AKT	Protein kinaz B
ALI	Akut Akciğer Hasarı
CAT	Katalaz
AMPK	Aktive edilmiş protein kinaz
BChE	Butirilkolinesteraz
BMP-2	Kemik morfojenik protein 2
c-MET	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
COSY	Correlation spectroscopy
DMAPP	Dimetilallilpirofosfat
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

Kısaltmalar**Açıklamalar**

FHF	Fulminant hepatik yetmezlik
GGT	Gama glutamil transpeptidase
D-GaIN	D-galaktozamin
H₁N₁	İnfluenza A
HCC	Hepatoselüler karsinom
HL-60	Promiyelositik lösemi hücresi
HIV-1	İnsan bağışıklık güçsüzleştirici virüs
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HRMS	Yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumu
LDH	Laktat dehidrogenaz
IC₅₀	İnhibisyon konsantrasyonunun yarısı
IFN-gamma	İnterferon gama
IL-2	İnterlökin 2
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JNK1/2	c-jun N-terminal kinaz 1/2
LD₅₀	Deney hayvanlarınınin %50 sini öldüren doz
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen-aktive protein kinaz
MCL-1	Myeloid lösemi hücresi farklılaştırılmış proteini
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MMP-2	Matriks metalloproteinaz
MPLC	Orta basınçlı sıvı kromatografisi
MS	Kütle spektrumu
mTOR	Atipik serin/treonin kinaz enzimi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid
NADPH	Nikotin amid adinil nükleotid fosfat
NFAT	Aktive T hücresi nükleer faktörü
NF-Kb	Nükleer faktör kappa B
NIOSH	National Instutue for Occupational Safety and Health
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans

Kısaltmalar**Açıklamalar****NO**

Nitrik oksit

NSCLC

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinoması

7-OHC

7-hidroksi kumarin

PBMC

Periferik kan mononükleer hücre

PI3k

Fosfatidilinositol 3-kinaz

PİTK

Preparatif ince tabaka kromatografisi

PKC

Protein kinaz

PPAR

Proliferator aktive edici reseptör

PUVA

Psoralen+ultraviyole A

RANKLTartar dirençli nükleer faktör- κ B ligandı**SOD1**

Süper oksida dismutaz 1

TNF- α

Tümör nekroz faktör alfa

TLR4

Toll benzeri reseptör 4

TRAF 6

Tümör nekroz faktörü reseptör ilişkili faktör 6

UV

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Petroedmondia syriaca (Boiss.) Tamamsch., Apiaceae familyasında yer alan bir bitkidir. Bitki Türkiye florasında *Smyrniopsis* cinsi altında ve *Smyrniopsis cachroides* olarak kayıtlı olmakla birlikte daha sonra İran florasında ayrı bir cins olan *Petroedmondia* cinsi içinde ve *Petroedmondia syriaca* olarak verilmiştir [1,2].

Türkiye florasında *Smyrniopsis* cinsi altında kayıtlı olan diğer *Smyrniopsis* türü *S. aucheri* ise İran florasında *Smyrniopsis* cinsi içinde verilmektedir [1,2].

Apiaceae familyası bitkileri kumarin, seskiterpen, seskiterpen kumarin vb. yapıda bileşikler taşımaktadır [3-7]. Kumarinlerin antibakteriyel, antiinflamatuvar, spazmolitik, sitotoksik aktivitelerinin olduğu, furanokumarinlerin ise vitiligo tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [3-6, 8]. Seskiterpen kumarinlerin ise antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiviral, AChE inhibitörü, sitotoksik ve antitümör aktivite gösterdikleri saptanmıştır [7-9].

Türkiye florasında *Smyrniopsis* cinsi altında kayıtlı olan *Smyrniopsis aucheri* bitkisinden ise nachsmyrin, smyrnioridin, smyrinol, smyrindiol ve smyrindiolose isimli kumarin yapısında bileşiklerin elde edildiği belirtilmektedir [10-15].

Literatür araştırması ile üzerinde yapılmış olan bir çalışmaya rastlamadığımız *P. syriaca* bitkisinin köklerinden hazırladığımız ekstrede sitotoksik aktivite saptanmış ve aktiviteden sorumlu olan bileşikleri belirlemek amacıyla biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlama çalışması planlanmıştır. Böylece bitkinin hem kimyasal yapısı hem de aktivitesi açıklanarak bilime katkı yapılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Petroedmondia syriaca (Boiss.) Tamamsch. bitkisi üzerinde Farmakognozik araştırmalar isimli çalışmamızla ilgili teorik bilgiler; Botanik bilgiler, kumarinler hakkında genel bilgiler, *Petroedmondia* türleri üzerinde yapılmış olan çalışmalar, sitotoksik aktivite tayini hakkında genel bilgiler olmak üzere dört bölümde toplanmaktadır.

Botanik bilgiler bölümünde, bitkinin ait olduğu familya, cins ve tür özellikleri verilmiştir.

İkinci bölümde kumarinlerin kimyasal yapıları, biyosentezleri, elde edilmeleri ile yapı tayinlerinde kullanılan yöntemler, kullanılışları ve fototoksitesitesi hakkında bilgi verilmiştir.

nc bölümde, *Petroedmondia syriaca* zerinde yapılmış çalışmaya rastlanmamış olması ve Türkiye florasında *Smyrniopsis* cinsi altında kayıtlı olması nedeniyle *Smyrniopsis aucheri* zerinde yapılmış olan çalışmalara yer verilmiştir.

Dördüncü bölümde ise, sitotoksik aktivitenin tayini amacıyla kullanılan biyolojik test açıklanmıştır.

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Apiaceae (Umbelliferae) Familyası

Spermatophyta bölümünün Angiospermae alt bölümü, Dicotyledonae sınıfı, Apiales takımında yer alan Apiaceae familyası 300 cins ve 3000 kadar türü kapsamaktadır. Memleketimizde 99 cins ve 419 türü bulunmaktadır [16-20].

Genellikle bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar alternan, nadiren sub-oppozit veya halka dizilişli, genellikle stipulasız, basitten çok paralıya kadar, petioller genellikle geniş ve tabanda okrealıdır. iek durumu genellikle bileşik umbella, nadiren basit umbella, kapitulum ve simozdur. Ana umbellanın tabanında brakteler ve ikincil umbellanın tabanında brakteoller bulunabilir veya bulunmayabilir. Çiçekler epigin, hermafrodit veya tek eşeylidir, bitki nadiren dioiktir. Sepal yoktur veya küçüktür, bazen sepaller eşit büyüklükte olmayan beş küçük diş şeklinedir. Beş tane petal taşımaktadır, petaller genellikle tepede ikiye atallanmaktadır, bütün petaller eşittir veya diş tarafta dizili olanlar ierdekilerden daha

geniştir. Petaller beyaz, sarı, sarımsı-yeşil, açık mavi veya pembe renklidir. Beş tane stamen taşımaktadır. Ovaryum iki karpellidir, her lokulusta bir ovül yer alır, iki stilus taşır, stilus tabanları stilopodyum şeklindedir ve ovaryumun tepesini örter. Meyvalar olgunlukta her biri tek tohumlu iki merikarpa ayrılan bir şizokarptır. Merikarplar karpoforla dorsal veya lateral olarak birbirine bağlıdır. Her merikarpta beş tane kosta ve dört tane valekulum bulunmaktadır. Mezokarpta valekulumların hizasında ve merikarpların birbirine bakan yüzlerinde salgı kanalları vardır. Apiaceae familyasına dahil olan bitkilerde, her merikarptaki salgı kanalının sayısı ve düzenlenişi farklıdır. Dorsal yüzeyde genellikle altı, bazen dört; birleşme yüzeyinde ise iki salgı kanalı bulunmaktadır. Benzer kanallar bitkinin kök ve gövdesinde de oluşmaktadır. Merikarplar üzerindeki dorsal ve lateral kostalar uzayarak birer kanat şeklini alabilir. Kostalar, Apiaceae familyasındaki cins ve türlerin teşhisi için çok önemlidir. Teşhiste yaprakların alternan, pennat, bipennat veya tripennat olması da önem taşımaktadır [17-20].

2.1.2. *Petroedmondia Tamamsch. cinsi*

Çok yıllık bitkilerdir, gövde çıplak ve dallanmıştır. Yapraklar kınlı, pinnatisekt, oblong, tabanı dekurenttir. Umbella ışınları uzun ve çok sayıda olup köşelidir. Brakteler triangular. Kaliks dişleri tam olarak görülmemektedir. Petaller büyük ve sarı renklidir. Stilopodium düz, merikarplar prizma şeklindedir [1].

2.1.3. *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch.

(Syn: *Colladonia syriaca* Boiss., *Smyrniopsis cachroides* Boiss.)

Gövdesi 0.7-1 m boyunda, çıplak, etli ve yuvarlak, tabanda 1.5-2 cm çaptadır, üst kısmı ise vertisillat dallanma gösterir. Taban yaprağı oblong, kısa saplı, laminası pinnatisekt, 2-3 çift yaprakçık taşır, loblar lanseolat, 24x9 cm, tabanı dekurent, kenarları krenattır. Gövde yaprakları oblong kınlıdır. Ana umbella 23-35 tane 15-17 cm uzunlukta ve köşeli ışın taşır. İkincil umbella 10-16 ışınlıdır. Kaliks dişleri tam olarak görülmemektedir. Petaller büyük ve sarı renkli olup tepesi kaşık şeklinde ve eğiktir. Meyva prizma şeklinde ve 10-11 mm uzunlukta olup tabanı kuneattır. Stilopodium düzdür [1]. Çiçeklenme: 5.-6. aylarda. Habitat: Mısır tarlaları, kumlu yol kenarları, 500-900 m [2].

Yayılışı: Suriye ölu, Kuzey Irak, İnan, Ürdün. Iran-Turan Fitocoğrafik bölgesi [1, 2].

Doğu Anadolu: Diyarbakır-Ergani, 900 m, *D.* 22033! Elazığ: Elazığ'ın 22 km doğusu, *Reese*. Adıyaman: Samsat'a giden yol, Adıyaman'dan 22 km, *Alava* 6994! Urfa: Urfa'dan Akçakale'ye 500 m, *D.* 28093! Diyarbakır: Diyarbakır, *D.* 22153! Mardin: Cizre-Hessan arasında Cudi Dağı'nın güney eteklerinde, 600-700 m, *D.* 42767! [2]. Şanlıurfa: Siverek-Karacadağ, A. Duran 9616

2.2. Kumarinler

Kumarin ilk kez Voleg tarafından 1822'de izole edilmiş ve Perkin tarafından 1868'de sentezlenmiştir. FDA tarafından hayvansal veriye dayanarak 1950'de yasaklanmış, daha sonra hayvan verileri ışığında bir çok revizyon yapılnca kullanımı tekrar gündeme gelmiştir. Aşağıdaki çizelgede kumarin türevlerinin izole edilmesinden günümüzde antitümör olarak kullanılmasına kadar olan süreçte kısa tarihçesi yer almaktadır [21].

Çizelge 2.1. Kumarin ve türevlerinin kısa tarihçesi

Yıl	Kumarin ve türevlerinin tarihçesi
1822	Voleg tarafından izole edildi.
1868	Perkin tarafından sentezlendi.
1954	FDA tarafından yasaklandı.
1955	NIOSH tarafından, 1.kategori kanserojen olarak gösterildi.
1956	Farelerde, hepatotoksik özelliği araştırıldı. Metabolizması türlerde farklılık gösterdi. Amerika Birleşik Devletleri'nde yemeklerdeki kullanımı durdurulmuştur.
1965	İngiltere'de piyasadan geri çekildi.
1966	Farelerde karaciğer hasarına neden olduğu saptandı.
1969	Farelerde safra yolu karsinomasının gelişimi bildirildi. İnsanlar üzerinde metabolik veri sağlandı.
1971	İnsanlarda lenfodema tedavisinde etkili olduğu saptandı.
1974	Dikumarolün antibakteriyel ve antifungal etkiye sahip olduğu tespit edildi. Dikumarolün, protrombini inhibe ettiği ve diğer koagüle proteinleri sentezlediği saptandı. Babunlar üzerinde metabolik veri sağlandı. 7-hidroksilaz kumarin izoenziminde kantitatif farklılıklardan dolayı farelerde ırksal farklılık tespit edildi. Avrupa Konseyi tarafından gıdalarda bulunmasına izin verildi.
1975	<i>In- vivo</i> olarak makrofajlarda artmış fagositoz ve proteolize neden olduğu gösterildi.
1976	<i>In- vivo</i> olarak makrofajlarda nötral proteazların etkinliğini arttırdığı, DMBA ile birlikte kanserojen olmadığı, <i>In- vivo</i> olarak fibrosin bozulmasına neden olduğu saptandı.
1977	Bruselloz tedavisinde kullanıldı.
1978	İnsanlarda mutajenik olmadığı ve daha az hepatotoksik olduğu saptandı. Flavonoid olarak sınıflandırıldı. <i>In-vivo</i> makrofajlara kemotaktik olduğu gösterildi.

Çizelge 2.1. (devam) Kumarin ve türevlerinin kısa tarihçesi

1979	Makrofajları <i>in vivo</i> olarak aktive ettiği, <i>İn vivo</i> anti-inflamatuar aktivite gösterdiği, İnsanlara benzer babunlarda farmakokinetik profili saptandı.
1981	Fotosensitive, alerjik ve tahriş edici olmadığı, Melanoma tedavisinde simetidin ile kombine tedavisinin olabileceği gösterildi.
1983	Hastalarda <i>in vivo</i> baskılayıcı T hücresi oranını artırarak iyileşmeye yardımcı olduğu bulundu.
1984	Doğal öldürücü hücrelerin aktivitesini <i>in vitro</i> arttırdığı kanıtlandı.
1986	<i>In vitro</i> EJ- <i>ras</i> onkogen içeren hücre hattında tümör oluşmasını inhibe ettiği bulundu.
1987	Bazı hücre hatlarının büyümesini <i>in vitro</i> inhibe ettiği saptandı.
1988	IL-2 ile sinerjik olarak hareket ederek <i>in vitro</i> olarak fare böbrek karsinomasında antitümör etki oluşturduğu, <i>in vitro</i> olarak doğal öldürücü hücre aktivitesini arttırdığı görüldü.
1989	<i>In- vitro</i> prostat adenokarsinomasında etkili tedavi olduğu, 7-OHC metabolitinin, insan ve fare hücrelerinin <i>in vitro</i> büyümesini inhibe ettiği, <i>in vivo</i> olarak monositler tarafından DR ekspresyonu arttırdığı, hastaların küçük bir kısmında (%0,37) idiosenkratik hepatotoksisiteye neden olduğu saptandı.

Kumarinlerle 1990 ve sonrası yapılan biyolojik aktivite çalışmaları ayrıntılı olarak tezin kumarinlerin biyolojik aktiviteleri kısmında verilmiştir (Bknz. Bölüm 2.2.5).

İlk kez Fabaceae familyasından *Dipteryx odorata*, *Coumarouna odorata* (hint baklası) bitkisinin tohumlarından (*Tonca Semen*, Tonka bean) izole edildiğinden, bitkiye Guyana’da verilmiş olan yöresel isimden (coumarou) yararlanılarak kumarin ismi verilmiştir [3,4].

Kumarinler, bitkinin tüm kısımlarına dağılmış olmasına rağmen en çok meyvede (*Aegle marmelos*, *Tetrapleura tetraptera*), tohumlarda (*Calophyllum cerasiferum* Vesque ve *Calophyllum inophyllum* Linn), köklerde (*Ferulago campestris*), yapraklarda (*Murraya paniculata*, *Phellodendron amurense* var. *wilsonii*) ve tropikal yağmur ormanı ağacı latekslerinde (*Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*), ayrıca yeşil çay ve hindiba gibi

gıdalarda, çin tarçını yağı, tarçın kabuğu yağı ve lavanta yağı gibi esansiyel yağlarda da yüksek oranda bulunurlar [22-24].

Kumarinler (2H-1-benzopiran-2-on) bitkilerde bulunan fenolik maddelerdir ve benzen ile α -piron halkasının birleşmesinden oluşur. 1300'den fazla kumarin bitki, bakteri ve mantarların sekonder metaboliti olarak tanımlanmıştır. Çalışılmış prototip bileşikleri 1,2-benzopiron veya daha az bilinen *o*-hidroksisinnamik asit ve laktondur [3,4].

Fabaceae, Astraceae, özellikle Apiaceae ve Rutaceae familyası bitkilerinde ise değişik yapıda ve kompleks yapılı kumarinler bulunmaktadır [4-6]. 30 farklı familyaya dağılmış, 150 farklı tür bildirilmiştir [22].

Kumarin türevi bileşiklerin bitkiler alemindeki yayılışı [3]

Bacteriophyta: Actinomycetes, Streptomycetae, Phycomycetae,

Mycophyta: Ascomycetae, Basidiomycetae

Pteridophyta: Polypodiaceae, Lindsayoideae

Spermatophyta: *Gymnospermae* (Cupressaceae, Pinaceae),

Angiospermae, Monocotyledonae (Araceae, Cyperaceae, Graminae, Iridaceae, Juncaceae, Liliaceae, Musaceae, Orchidaceae, Palmae),

Dicotyledonae (Acanthaceae, Aceraceae, Amaranthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Apocynaceae, Araliaceae, Aristolochiaceae, Asclepiadaceae, Balsaminaceae, Berberidaceae, Bignoniaceae, Burseraceae, Calycanthaceae, Campanulaceae, Capparidaceae, Caprifoliaceae, Cayophyllaceae, Chenopodiaceae, Chlorantaceae, Cneoraaceae, Combretaceae, Compositae, Convolvulaceae, Coriariaceae, Crassulaceae, Cruciferae, Cunoniaceae, Diapensiaceae, Dipsacaceae, Dipterocarpaceae, Ebenaceae, Ericaceae, Euphophorbiaceae, Fagaceae, Fouquieriaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Glaucidiaceae, Goodeniaceae, Guttiferae, Hamamelidaceae, Hippocastanaceae, Hippuridaceae, Labiatae, Lauraceae, Lecythidaceae, Leguminosae, Loasaceae, Loganiaceae, Lythraceae, Magnoliaceae, Malvaceae, Melastomaceae, Maliaceae, Moraceae,

Myrtaceae, Nepenthaceae, Ochnaceae, Olacaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Passifloraceae, Pittosporaceae, Platanaceae, Polemoniaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae, Rhizophoraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Salicaceae, Samydaceae, Sapindaceae, Sapotaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Simaroubaceae, Solanaceae, Sonneratiaceae, Sterculiaceae, Tamaricaceae, Theaceae, Thymelaceae, Tiliaceae, Ulmaceae, Violaceae, Vitaceae, Zygophyllaceae)

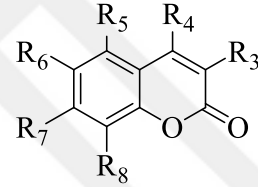
2.2.1. Kimyasal yapıları

Doğal kumarinler kimyasal yapılarına göre 6 sınıfa ayrılırlar [22]. Hemen hemen tüm doğal kaynaklı kumarin türevi bileşikler, 7. konumda hidroksil grubu taşır (umbelliferon), 6, 7 -di- ve 6, 7, 8 -trihidroksi kumarinler de vardır. Hidroksil grupları metil eteri halinde ya da oz bağlanmış olarak bulunabilir. 6. ya da 8.konumda prenil taşıyan kumarinler ile linear ya da açısız furano- ve piranokumarinlere ve dimerkumarinlere rastlanmaktadır [4]. Doğal kumarinlerin fiziko kimyasal özellikleri ve terapötik uygulamaları süstitüsyon modeline bağlıdır [22-26].

Basit kumarinler

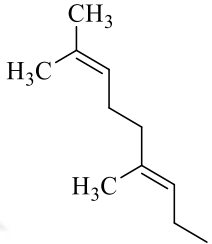
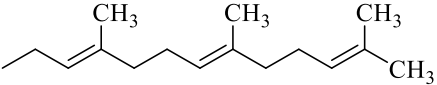
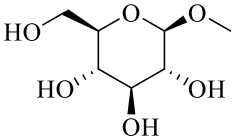
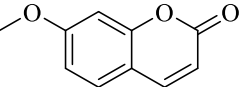

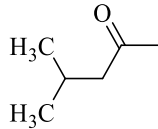
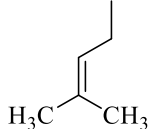
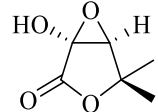
Kumarin halkasına mono-, di- ve tri- süstitüentlerin bağlanması ile meydana gelen kumarinlerdir [25].

Çizelge 2.2. Basit kumarin örnekleri



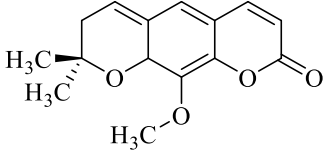
	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Kumarin	H	H	H	H	H	H
Umbelliferon	H	H	H	H	OH	H
	H	H	H	OH	H	H
Herniarin	H	H	H	H	OCH ₃	H
Eskuletin	H	H	H	OH	OH	H
Skopoletin	H	H	H	OCH ₃	OH	H
Skopolin		H				
Fraksetin	H	H	H	OCH ₃	OH	OH
Isofraksidin	H	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Dafnetin	H	H	H	H	OH	OH
Leptodaktilon	H	H	OCH ₃	H	OH	OCH ₃
Skoparon	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Ostenol	H	H	H	H	OH	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{H}_2\text{C}-\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Ostol	H	H	H	H	OCH ₃	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{H}_2\text{C}-\text{C}=\text{C} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$

Çizelge 2.2. (devam) Basit kumarin örnekleri

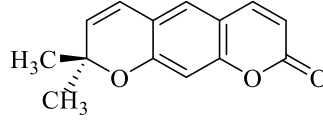
Ostrutin	H	H	H		OH	H
Ammoresinol		OH	H	H	OH	H
Kihoriin	H	H	H	OH		H
Dafnoretin		H	H	OCH ₃	OH	H
Leptodaktilon	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OH
Mammeisin	H		OH		OH	
Mikromelin	H	H	H		OCH ₃	H

Piranokumarinler

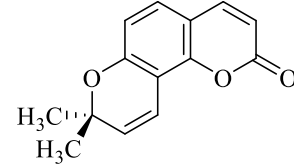
Kumarin halkasının piran halkası ile kondensasyonu sonucu meydana gelen kumarin türevleri bu grubu oluşturmaktadır [25].



Luvangetin



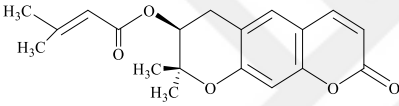
Ksanthletin



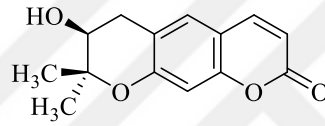
Seselin

Şekil 2.1. Piranokumarin örnekleri

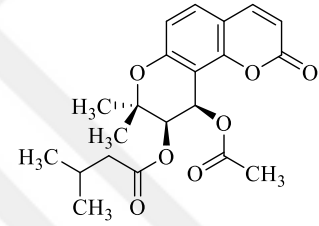
Dihidropirano kumarinler



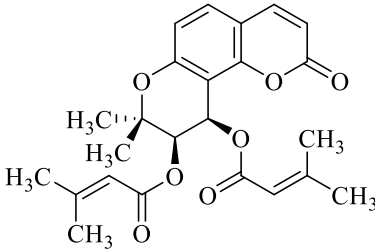
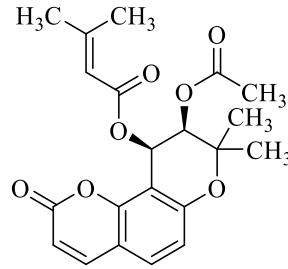
Dekursin



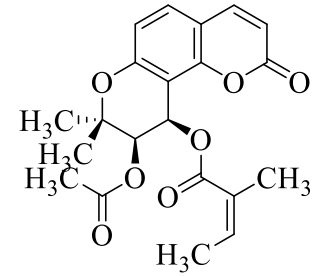
Dekursinol



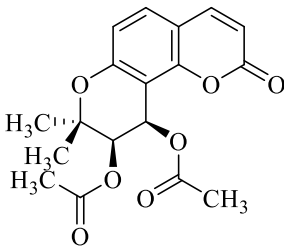
Dihidrosamidin

Disenesionil *cis*-kellakton

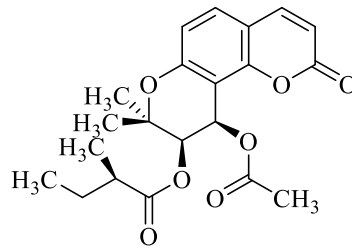
Izoamidin



Pteriksin



Samidin



Visnadin

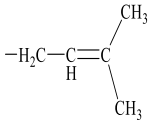
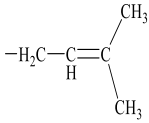
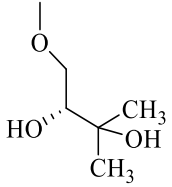
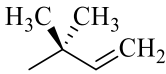
Şekil 2.2. Dihidropirano kumarin örnekleri

Furanokumarinler

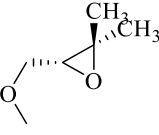
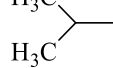
Kumarin halkasının furan halkası ile kondensasyonu sonucu meydana gelen kumarin türevleridir. Furan halkasının kumarin halkasına bağlanma yerine göre (C6/C7) doğrusal (linear) ve (C7/C8) açısıl (angular) furanokumarinler olmak üzere iki gruba ayrılırlar [25]:

Doğrusal (Linear) Furanokumarinler

Çizelge 2.3. Linear furanokumarin örnekleri- psoralen tipi

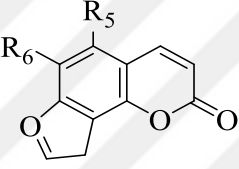
	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Psoralen	H	H	H	H	H	H
Bergapten	H	H	OCH ₃	H	H	H
Ksantotoksin	H	H	H	H	H	OCH ₃
Ksantotoksol	H	H	H	H	H	OH
İmperatorin	H	H		H	H	H
Alloimperatorin	H	H		H	H	OH
Izopimpinellin	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃
Byakangelisin	H	H	OCH ₃	H	H	
Kalepensin		H	H	H	H	H

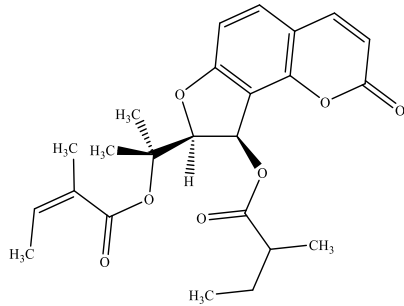
Çizelge 2.3. (devam) Linear furanokumarin örnekleri- psoralen tipi

Oksipsödanin	H	H		H	H	H
Psödanin	H	H	H	OCH ₃		H
Trioksalen	H	CH ₃	H	H	CH ₃	H

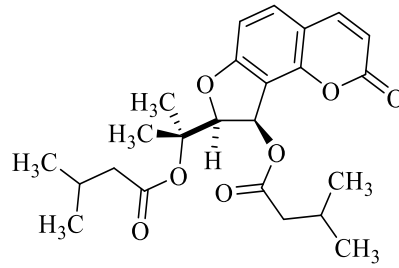
Açısal (Angular)Furanokumarinler

Çizelge 2.4. Açısal furanokumarin örnekleri- angelin tipi

		
	R5	R6
Angelisin	H	H
Izobergapten	OCH ₃	H
Sphondin	H	OCH ₃
Pimpinellin	OCH ₃	OCH ₃

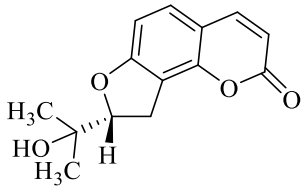
Dihidrofuranokumarinler

Archangelisin

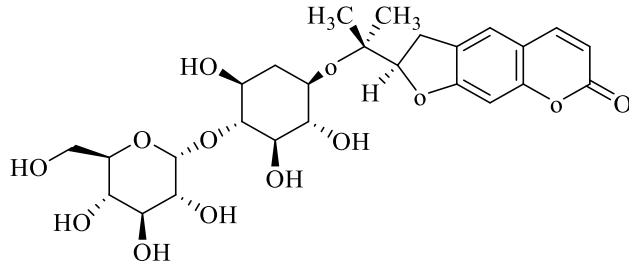


Athamantin

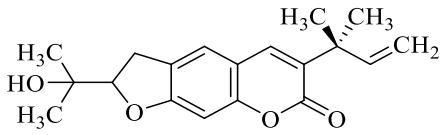
Şekil 2.3. Dihidrookumarin örnekleri



Kolumbianetin



Dekuroside III

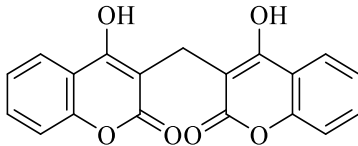


Heliettin

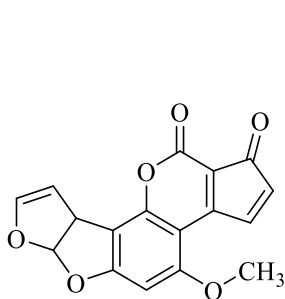
Şekil 2.3. (devam) Dihidroksikumarin örnekleri

Dimer kumarinler

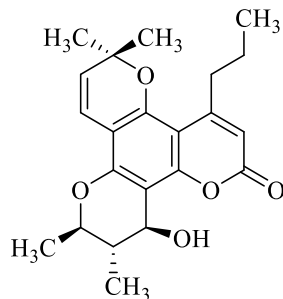
İki kumarin halkasını aktif olan 3. konumdan birleşmesiyle dimer yapıda kumarin türevi maddeler meydana gelmektedir [25].



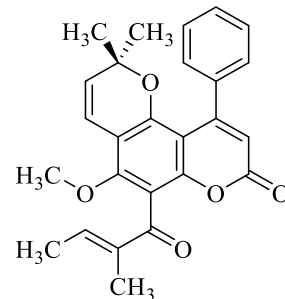
Şekil 2.4. Dimerkumarin örneği- Bishidroksikumarin (Dikumarol)



Aflatoksin B1

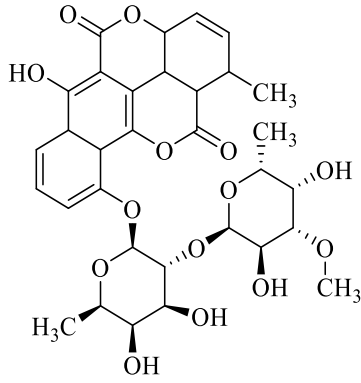


Kalanolid A

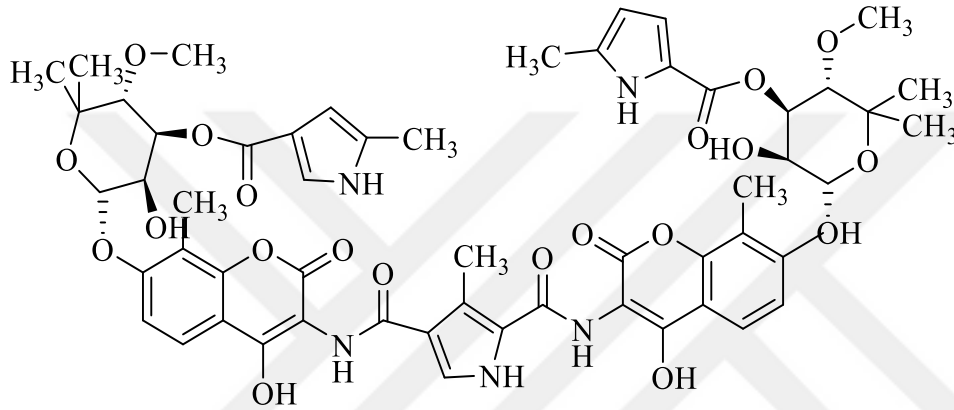


Kalofilolid

Şekil 2.5. Diğer kumarin türevleri

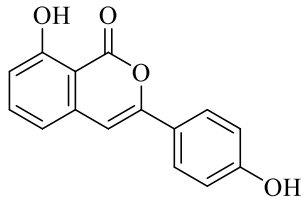


Kartreusin

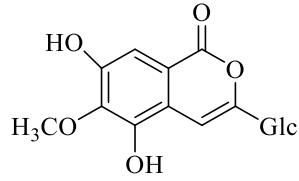


Kumermisin A1

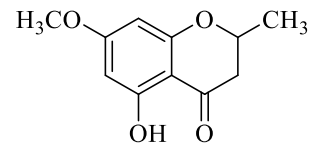
Şekil 2.5. (devam) Diğer kumarin türevleri



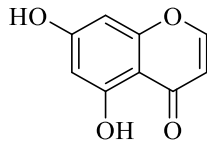
Hydrangenol



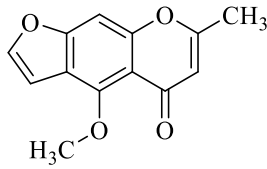
Bergenin



Eugenin



5,7 Dihidroksi kromon



Visnagin

Şekil 2.6. İzokumarinler ve kromonlar

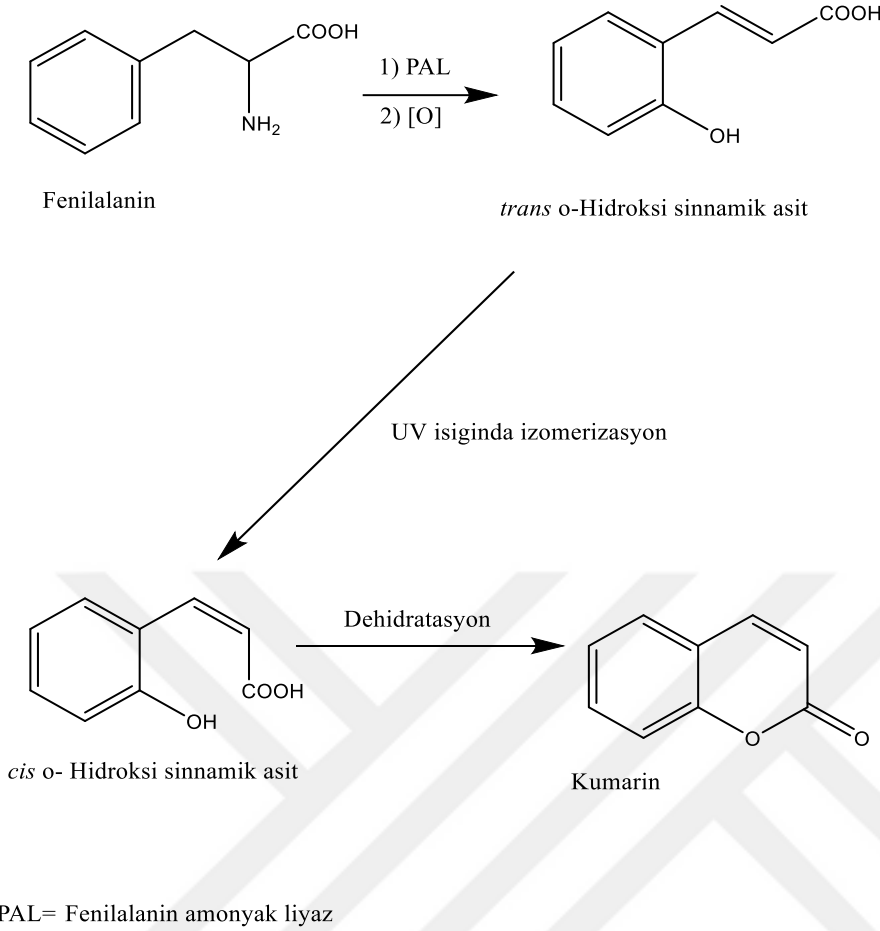
2.2.2. Biyosentezleri

Çevre koşulları ve mevsimsel değişiklikler bitkinin diğer kısımlarındaki kumarin oranını etkileyebilmektedir [26].

Kumarin biyosentezi Bourgaud ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Doğada bulunan kumarinler substitüsyon ve konjugasyon sonucu oluşan çeşitli permutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Birçok farmakolojik ve biyokimyasal çalışmalar, kumarin ve kumarinin birincil metaboliti olan 7-hidroksikumarin üzerinden oluşmuştur. İlk farmakolojik çalışmalar ve diğer daha kapsamlı yayınlar, basit ve daha kompleks doğal kumarinlerin oluşumsal, kimyasal ve biyokimyasal özellikleriyle ilgilenmiştir [21, 26].

Kumarin biyosentezi

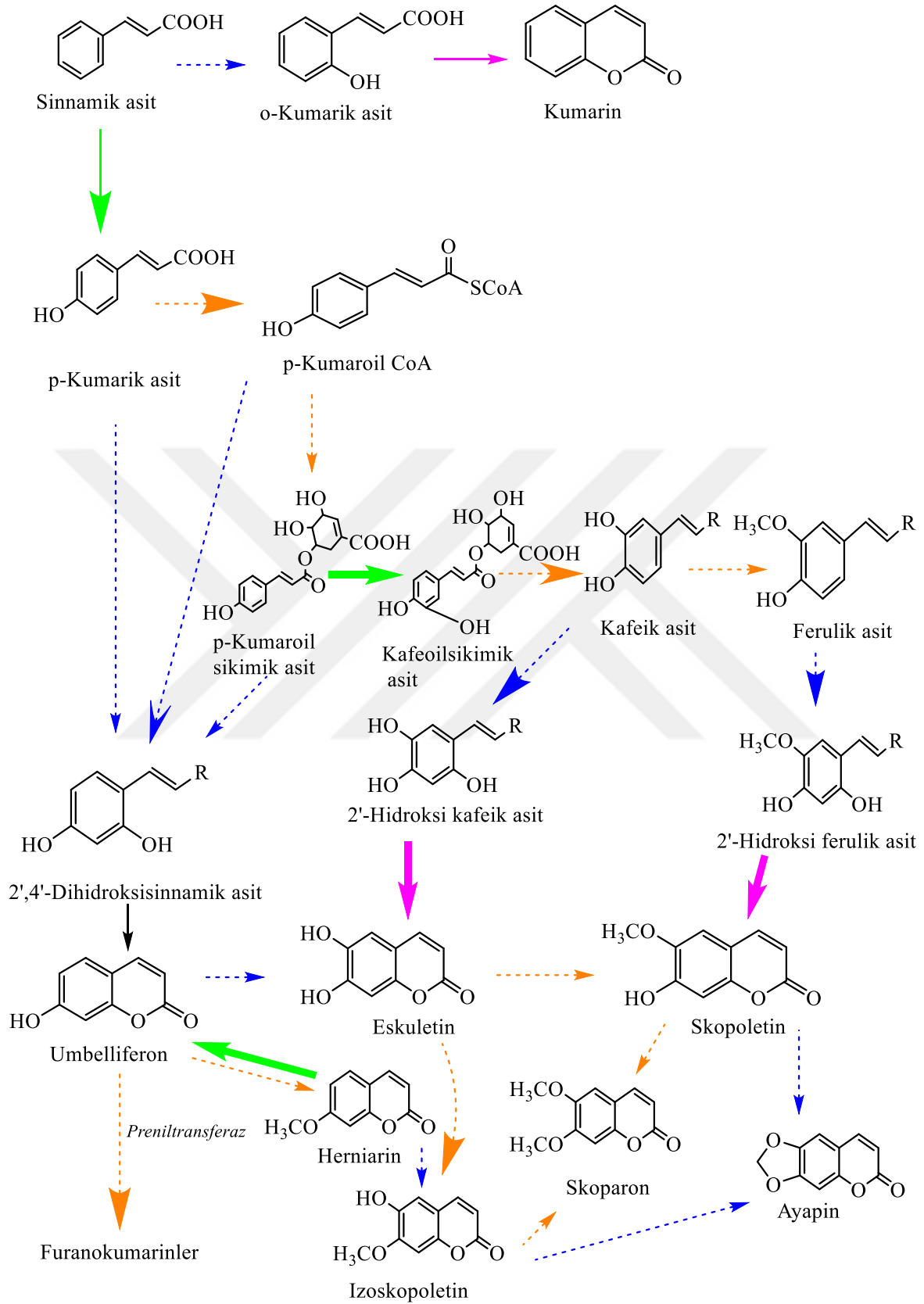
Fenilalaninin önce enzimatik deaminasyonu ve sonra *orto* konumundan oksidasyonu ile *trans orto*-hidroksisinnamik asit oluşmaktadır. *Trans orto*-hidroksisinnamik asitin UV ışık katalizörlüğünde, izomerizasyonla *cis* formuna dönüşmesi neticesinde fenol ve asit grupları birbirine yakın olan *cis orto*-hidroksisinnamik asit meydana gelmektedir. *Cis orto*-hidroksisinnamik asidin dehidratasyonu ile de kumarin yapısı oluşmaktadır (Şekil 2.7). Önce *para* daha sonra *orto* konumunda oksidasyondan sonra izomerizasyon ve dehidratasyon olursa 7-hidroksi kumarinler meydana gelmektedir [5].



Şekil 2.7. Kumarin biyosentezi

Hidroksisinnamik asitlerin *orto*-hidroksilasyonu asıl basamaktır. Ancak, sitokrom P450 reaksiyonu bitkilerde; basit kumarin, umbeliferon ve hidroksillenmiş kumarin biyosentezi için kritik bir akıştır. Multiple P450 enzimleri, furanokumarin sentezi, umbelliferondan türetilmiş fitoaleksinler için önemlidir [27].

Sinnamik asitten sitokrom P450 ile *para*-hidroksi sinnamik asite (*p*-kumarik asit) ve oradan umbelliferon oluşumuna kadar geçen süreçte aydınlatılan kısımlar Şekil 2.8'de gösterilmiş, bitkilerde kumarin biyosentezinde Sitokrom P450 enzimleri için ana yolak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Şekilde 2.8'de fenilpropanoid yolağı görülmektedir. Yeşil oklar, P450 enziminin rol aldığı, mavi oklar enzim P450 enziminin tahmini olarak yer aldığı, turuncu oklar P450 enziminin rol almadığı, mor oklar ise laktonizasyon basamakları göstermektedir [27].



Şekil 2.8. Fenilpropanoid yolağı

Kumarin biyosentez yolağı kapsamlı olarak 1960 ve 1970'lerde açıklanmıştır. Radyo aktif işaretli sinnamik asit, kumarin ve 7-hidroksi kumarine bağlanmıştır. *Lavandula officinalis* ile yapılan çalışma laktonizasyon için *para*-hidroksilasyonun, *orto*-hidroksilasyondan önce geldiğini ortaya çıkarmıştır. Böylelikle, umbelliferonun *cis-p*-kumarik asitten türediğı görülmüştür. Kumarin ise *cis*-sinnamik asitten meydana gelmektedir[27].

Umbelliferonun şekillenmesi, 4-kumarik asit veya onun ester türevlerinden ilerlemektedir. Sinnamik asidin 4-kumarik aside dönüşmesi, sinnamate 4-hidroksilaz, CYP73A familyasından bir sitokrom P450 monooksijenaz tarafından katalize edilir [27].

Furanokumarinlerin biyosentezi

Umbelliferonun (7-hidroksikumarin) dimetilallil pirofosfat (DMAPP) ile prenilasyonu sonucu furan halkası oluşur. Bu prenilasyonun 6. veya 8. karbondaki olması ile linear veya açılmal furanokumarinler oluşur. Linear furanokumarinler, benzen halkasının 6. konumundaki prenilasyonuyla, angular furanokumarinler ise 8. konumundaki prenilasyon ile meydana gelir. 6. veya 8. izoprenilkumarin'in siklizasyonu muhtemelen 7. konumdaki hidroksilin, izopentenil zincirindeki çifte bağın oksidasyonu ile oluşan epoksite nükleofilik atağı ile meydana gelmektedir. Oluşan hidroksi-izopropil-dihidro-furanokumarinin oksidatif dealkilasyonu neticesinde furanokumarin yapısı meydana gelmektedir. Daha sonra 5. veya 8. ya da her iki pozisyonda oksidazlar ve O-metil transferazların katalizlemesi ile süstitüsyon olmaktadır [3,4] (Şekil 2.9)

Şekil 2.9'da umbelliferonun 6 konumundaki prenilasyonu ile preniltransferaz enzimleri ile demetilsüberozinin marmesine dönüşümü, daha sonrası sitokrom P450 ve marmesin sentaz (+) marmesine ve oradan psoralene, yine sitokrom P450 enzimi ile psoralen 8-monooksijenaz ve psoralen 5-monooksijenaz enzimleri ile önce ksantotoksil ile bergoptole, akabinde ksantotoksin ile bergaptene dönüşüp izopimpineline dönüşeceği bulunmuştur. 5-ve 8- hidroksilasyon yollarının ikisi de bu nihai ürünü verir [34]. Umbelliferonun 8 konumundaki prenilasyonu ile oluşan ostenolden sitokrom P450 ve kolumbianetin sentaz enzimi ile (+) kolumbiabetin, yine sitokrom P 450 ve angelisin sentaz ile angelisin ve oradan sfondin ve pimpinellin oluşur [27].

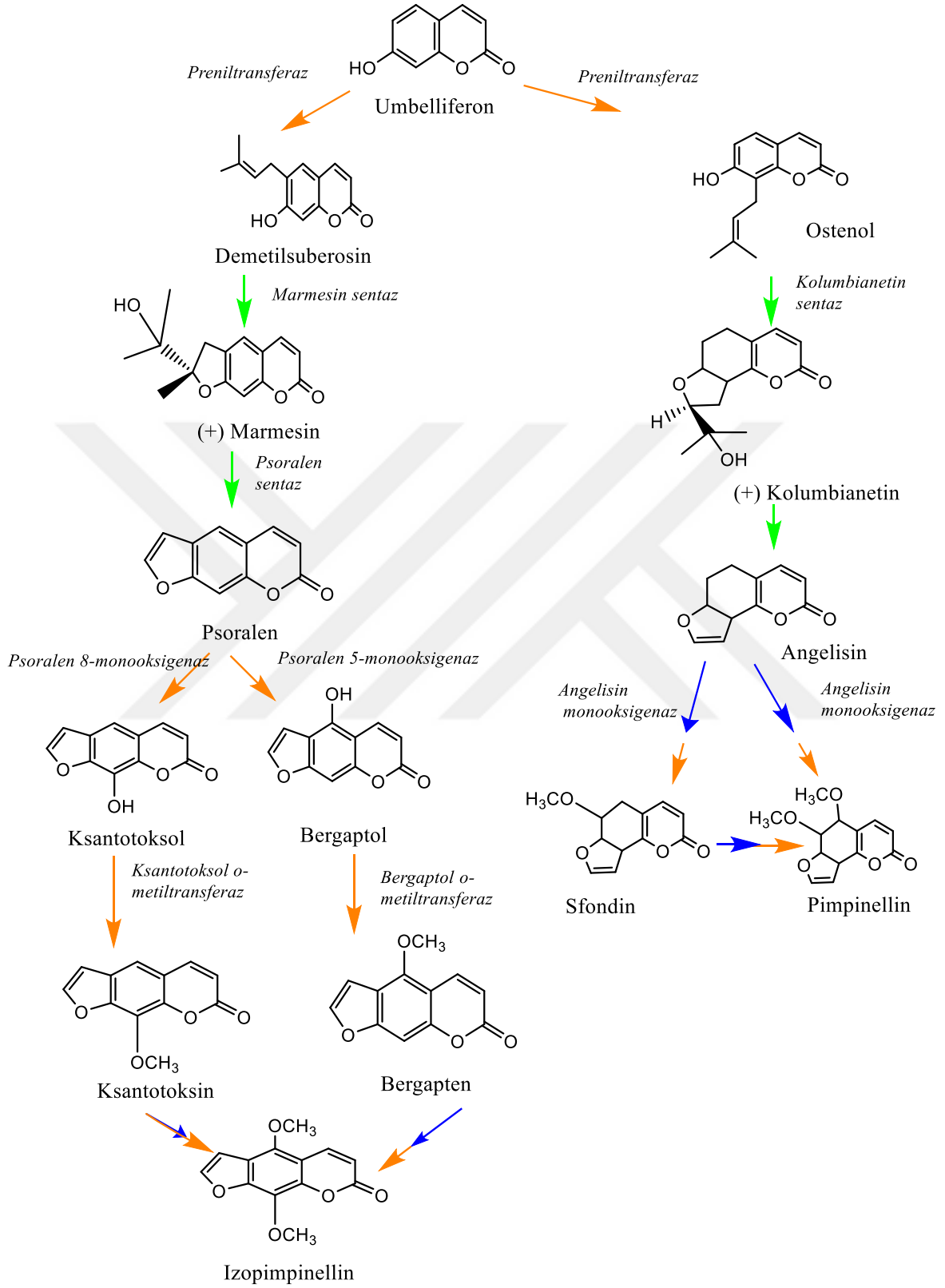
Linear furanokumarinler; Demetilsuberosin, 2 ayrı sitokrom P450 enzimi tarafından, marmesine ve daha sonra psoralene dönüştürülür. Psoralen 5- monooksigeneaz, psoralenin bergaptole, bergaptol o-metiltransferaz ise bergaptolün bergaptene dönüşümünü katalize eder. Psoralen 8- monooksigeneaz, psoralenin ksantoksole, ksantoksol o-metiltransferaz ise ksantoksolün ksantoksine ve nihayetinde son yollarda ksantoksinin ve bergaptenin izopimpinelline dönüştüğü görülmüştür. İzopimpinellinin oluşum yolu *Heracleum lanatum*'da araştırılmış ve ksantotoksinin en etkili prekürsör olduğu görülmüştür. Kolumbianetin angelisine transformasyonu, marmesinin psoralene dönüşmesine çok benzerdir (Şekil 2.9) [27].

Açısal furanokumarinler bitkilerde linear furanokumarinlerden daha az bulunur ve angular linear kumarinler eşliğinde görülürler [27].

Sitokrom P450 enzimi etkisi olduğu literatüle kesinleşen yollar yeşil, varsayılanlar mavi, kesin olmayanlar turuncu oklar ile Şekil 2.9'de gösterilmiştir.

Linear Furanokumarinler

Angular Furanokumarinler



Şekil 2.9. Linear ve açıl furanokumarinlerin biyosentezi

2.2.3. Kumarinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kumarinin moleküler ağırlığı 146.15'tir. Kumarinler, renksiz ve parlaktır. Hoş ve karakteristik bir kokuya sahiptir. Erime noktaları 68-70°C ve kaynama noktaları 303°C' dir. Kumarin, UV absorpsiyonludur (kloroformda maksimum 272 nm). Kumarinler, bitkilerde aglikon ya da glikozitleri şeklinde bulunur. Kumarinlerin aglikonları benzen, yağ, eter, kloroform, dietil eter, alkolde (metanol, etanol) çözünür, ancak suda çözünmez ya da çok az çözünür. Kumarinlerin glikozidleri, su ve alkolde çözünebilir [25].

2.2.4. Ekstraksiyon, ayırma, saflaştırma, miktar ve yapı tayini yöntemleri

Kumarinler serbest halde alkol ve apolar çözücülerde, heterozit halinde ise az ya da çok suda çözünürler. Bu özelliklerinden ekstraksiyon işlemlerinde yararlanılır [4]. Taze veya kurutulmuş bitki materyalinin petrol eteri, benzen, kloroform, eter, aseton ve metanol gibi çeşitli solvanlarla ekstraksiyonu ile kumarin karışımı elde edilmektedir [3].

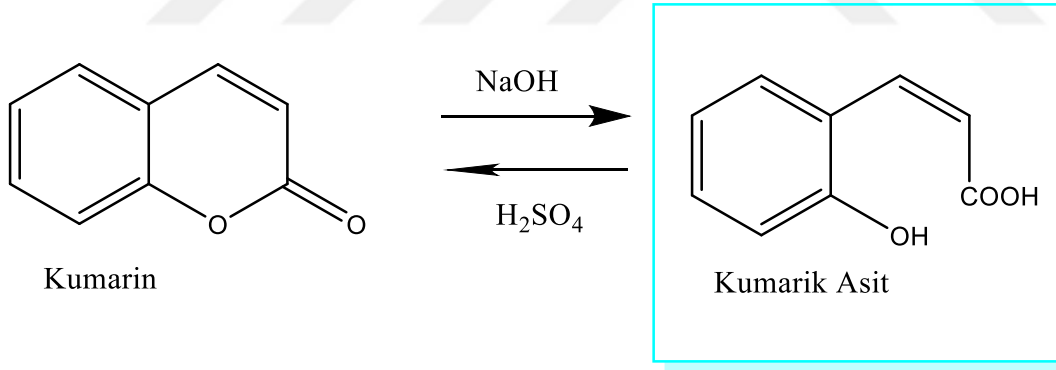
Kumarinler farklı kimyasal yapılar ve çeşitli hidrofilik – hidrofobik özellikler göstermektedir. Bitkisel materyalden kumarinleri tüketmek için klasik ekstraksiyon yöntemlerinde (Soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon, perkolasyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon) artan polarite ve elüsyon gücünde birçok solvan kullanılır. Petrol eteri, *n*-pentan, *n*-hekzan, dietil eter, aseton, metanol veya bunların karışımları en çok kullanılanlardır [25].

Bitkisel materyalden kumarinlerin izolasyonu başka şekillerde de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerden bir tanesi kumarin yapısındaki lakton türüne dayanır. KOH'in alkol veya sulu alkol çözeltisi kumarinin lakton halkasını çözer (kaynayan su banyosu üzerinde) ve kumarik asit ortaya çıkar. Amidasyon sonrası bu asitler kumarinleri siklize eder ve kumarinler petroleteri kullanılarak ekstre edilebilir. Tarif edilen metodun birçok dezavantajı vardır. Çünkü kumarinler değişken maddelerdir. Kumarinlerin yan zincirdeki epoksit yapısı ve ester bağları asit ve bazlara duyarlıdır. Bitkilerden kumarinlerin izolasyonu için diğer iki yöntem (1) süblimasyon ve yüksek vakumda fraksiyonlayarak distilasyon; (2) organik çözücülerden kristalizasyondur. Su buharı ile distilasyon daha güvenlidir, ancak bu yöntem kumarinler ile birlikte uçucu yağların da izolasyonunu sağlar bu da kumarinlerin tek olarak ayırımı zorlaştırır [25].

Bitkisel materyalden kumarinleri izole etmek için kullanılan en modern teknik süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) 'dur [25].

Elde edilen kumarin karışımından kumarin türevi bileşiklerin ayırımında kağıt kromatografisi İTK (İnce Tabaka Kromatografisi), p-İTK (Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi), kolon kromatografisi, MPLC (Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi), HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ve fraksiyonlu kristallizasyondan yararlanılmaktadır [3-5, 26].

Kumarin yapılarına, taşıdıkları süstitüentlere ve KOH ya da NaOCH₃ ile alkalilendirildiklerindeki durumlarına göre karakteristik UV spektrumu verirler. Kumarinler, İTK'de elde edilen kromatogram UV ışıktta incelendiğinde, revelatör olarak püskürtülen amonyak ile renk şiddeti artan, mavi, sarı ve mor renkte görülürler. Kumarinler alkali ile muamele edildiği zaman lakton halkasının açılması ile kumarinik asit meydana gelmektedir. Kumarinik asit de UV ışığı altında kuvvetli mavi- yeşil floresans göstermektedir[4].



Şekil 2.10. Kumarik asidin oluşumu

Miktar tayinleri spektrofotometrik olarak ya da HPLC ile yapılabilir [3,4].

Kumarin türevi bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında Ultraviyole (UV), Infrared (IR), Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) ve Kütle Spektrumlarından (MS) yararlanılmaktadır [3,25].

2.2.5. Kumarinlerin biyolojik aktiviteleri

Kumarinlerin biyolojik aktivitesi çeşitlidir ve kimyasal yapısına bağlıdır. *Melilotus alba* L.den izole edilen dikumarol, antitrombotik ve antikoagulan özelliklere sahiptir. Bu nedenle dikumarol, kalp enfarktüsü, arteriyel ve venöz embolide de kullanılır. *Peucedanum japonicum*' den izole edilen psoralen, ksantotoksin, bergapten, imperatorin ve *Toddalia asiatica* ağacından izole edilen braylin gibi son dönemde bitkisel materyalden izole edilen diğer kumarinler de benzer özelliklere sahiptir. Kumarinlerin dolaşım sistemindeki kullanımında, hipotansif etkisinden, koroner damarları gevşetici ve tonik özelliklerinden yararlanılır. *Artemisia scoparia*'dan izole edilen skoparon, *Archangelica officinalis* den izole edilen angelisin, *Aesculus hippocastanum* kabuğu, çiçek ve meyvesinden izole edilen eskulinde de aynı özellikler görülür[25].

Eskulin, alt ekstremitedeki varis tedavisinde kullanılan jeller ve merhemlerin, hemoroid tedavisinde de oral ilaçların bileşimine girerek yaygın olarak kullanılır. Ayrıca *Ammi visnaga* L. meyvelerinde bulunan visnadin, dihidrosamidin ve samidin gibi piranokumarinler güçlü diyastolik özelliklere sahiptir. Bazı kumarinler kalp kasında ve damarlarda Ca⁺⁺ kanal bloke etme özelliklerine sahiptir [25]. Eskulin venöz tonik ve vasküler koruyucu ajan ve bazen de vitamin faktör P olarak refere edilir. Bir piranokumarin olan visnadin koroner vazodilatör etkisinden dolayı kullanılır ve antispazmodik etkiye sahiptir [3,4].

Kumarinlerin fonksiyonları tam olarak açıklanamamakla birlikte bitki büyüme regülatörü, bakteriostatik ve fungostatik etkili oldukları belirtilmektedir [22]. 4-hidroksi kumarin türevidir olan ve *Streptomyces* türlerinden elde edilen novobiosin ve kumermisin antibiyotik etkili bileşikleridir [3].

Basit kumarinlerden umbelliferon antibakteriyel, herniarin antienflamatuar etkilidir. Skopoletin spazmolitik etkisi vardır. Fraksetin diüretik etkili bir bileşiktir [3]

Kumarinler (1,2- benzopironlar) fitopatojenlere karşı savunma, abiyotik streslere yanıt, oksidatif stres düzenlenmesi ve muhtemelen hormonal regülasyon gibi süreçlere dahil olurlar [27].

Fraxinus exelsior' den izole edilen fraksidin, izofraksidin ve diğer kumarinler kolagog ve koleretik özelliklere sahiptir. Kolesistit tedavisinde spazmolitik özelliklerinden ötürü kullanılır [25].

Antienflamatuvar aktivite

Kumarin, antienflamatuvar özellik gösterir ve ödem tedavisinde kullanılır. Stimule edilmiş fagositoz, enzim üretimi ve proteoliz nedeniyle hasar görmüş dokudaki ödemi ortadan kaldırır [22].

8'-asetoksi-5'-S-hidroksi umbelliprenin, NF- κ B'yi (nüklear faktör kappa-B) inhibe ederek antienflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir [7].

Kumarin türevlerinin antienflamatuvar aktivitesi, karagenan ile indüklenmiş fare pençesi ödeminde ibuprofen ile karşılaştırmalı çalışılmış ve kumarinin karagenan ile indüklenmiş fare pençesi ödeminde karşı önemli bir inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.01$) [28].

Benzer etki mekanizmaları olan antienflamatuvar ilaçlar (Reparil® ve Venoruton®) ve kumarinin etkinliği, termal ödem tedavisinde araştırılmış, kumarin ve sodyum rutin sülfat en etkin bulunmuştur. Kumarinin ödem üzerine etkiyi, fagositoz ve enzim üretimini stimüle ederek proteolizis oluşturarak yaralı dokulardan ödemi çözer [29].

İmperatorin, LPS (lipopolisakkarit) ile stimüle edilmiş RAW 264,7 hücrelerinde ve karagenan enjekte edilmiş farelerde antienflamatuvar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Arttırılmış iNOS ve COX-2 protein salınımının inhibisyonu ve karagenan-enjekte edilmiş pençelerin nötrofil infiltrasyonu, imperatorin kaynaklıdır [30].

Akdeniz bölgesindeki tıbbi bitkilerden antienflamatuvar bileşenlerle ilgili çalışmada, *Oppopanax chironium* (L.) köklerinden izole edilen furanokumarinlerin T-hücre fonksiyonları aktivitesi değerlendirilmiştir. Heraklin ve imperatorin, konsantrasyona bağlı primer T hücrelerinde T hücre reseptör kaynaklı proliferasyonuna engel olmuştur. Transkripsiyonel seviyede imperatorinin inhibisyon mekanizmaları Jurkat T hücrelerinde NF- κ B, NFAT ve AP-1 transripsiyonel faktörlerinin, transkripsiyonel aktivitelerini ve DNA bağlantısı incelendiğinde imperatorinin NF- κ B ve AP-1 transkripsiyon faaliyetlerini etkilemeksizin hem DNA'ya bağlanan NFAT'yı hem transkripsiyonel aktiviteleri

engellemiştir. Bu bulgular doğal furanokumarinlerin immunomodülatör ve antiinflamatuvar aktivitelerine dair yeni görüşler sağlamaktadır [31].

Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve hücre canlılığı araştırıldığında, TNF- α (tümör nekroz faktör-alfa) aktiviteli hücrelerde, endotelial hücrelere monosit adezyonu ve adezyon moleküllerinin ve sinyal moleküllerinin salınımı *Cimicifugae Rhizome*'den izole edilen izoimperatorin, cimisine E, 23-*o*-asetilhengmanol-3-kslosid en az PPAR- γ 'nin artışı ile VCAM'ın TNF- α 'nin indüklü salınımını engeller [32].

Justica pectoralis'in hidroalkol ekstresi (EHA) ve majör bileşenleri kumarin (CM) ve umbelliferon (UMB) farelerde karagenan ve dekstran indüklü pençe ödemi üzerinde, asetik asit olası analjezik ve antiödem etkiler için yapılan çalışmada, EHA, CM ve UMB antinosiseptif etkiler göstermiştir [33].

Kumarinler, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve serbest radikal kaynaklı yaralanmayı içeren prosesleri etkileyen geniş bir fenolik bileşenler sınıfını oluşturur. Eskuletin ve 4-metil-eskuletinin antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri doğrudan trinitrobenzen sulfonik asit (TNBS) ile indüklü fare kolit iltihabının deneysel modelinde bu bileşenlerin etkileri araştırılmıştır. Makroskopik (diyare, lezyon uzantısı, kolon ağırlığı/uzunluk oranı ve zarar skoru) ve biyokimyasal parametreler (miyeloperoksidaz, alkalın fosfataz ve glutatyon) değerlendirilmiştir. Bu bileşenlerin özellikle 4-metil-eskuletinin intestinal enflamatuvar barsak hastalıklarının tedavisinde etkili olabileceğini ortaya çıkarılmıştır. Akut kolit modelinde; eskuletin, diyarede azalma ve glutatyon içeriğinin düzelmesi lezyonları azaltmıştır. Benzer etkiler 4-metil eskuletinin verilmesi ile de elde edilmiştir. Eskuletinle kıyasla 4-metil-eskuletinin etkinliğinin fazla olması C-4'deki metil grubunun varlığı ile ilişkilendirilmiştir [34].

Artemisia capillaris'ten izole edilen 9 majör bileşen skopoletin, skopolin, skoparon, eskuletin, kersetin, kapilarisin, izoramnetin, 3-*o*- robinoniosid, izoramnetin 3-*o*-galactosid ve klorojenik asitin deri inflamasyonunda 5-LOX inhibisyonu aktivitesi *in-vitro* ve *in-vivo* aktiviteleri kanıtlanmıştır [35].

Kumarinlerin antioksidan ve anti-eikosanoid özellikleri, reaktif oksijen türlerinin eikosanoid üretimi içinde yer aldığı hastalıkların tedavisi için non-toksik anti-enflamatuar ajanların dizaynında kullanılabileceği çalışmalarla gösterilmiştir [36].

Hint literatüründe pek çok tıbbi özelliği olduğu bildirilen *Seseli indicum*'un tohumları, farelerde yapılan çalışmalarda, seselinin, karagenan ile indüklenen akut enflamasyona karşı doz bağımlı anti-enflamatuar etki göstermiştir [37].

Ostolün lipopolisakkarit tarafından indüklenen TNF- α , NO ve siklooksijenaz-2 üretimini, makrofajlarda p38, JNK $\frac{1}{2}$ (c-jun N-terminal kinaz $\frac{1}{2}$), PKC (protein kinaz)- α ve PKC- ξ fosforilasyonunu, ayrıca NF κ B (nükleer faktör kappa B) aktivasyonunu ve ROS (reaktif oksijen türleri) salınımını inhibe ederek anti-enflamatuar aktivite göstermektedir [38].

Skoparon, *Artemisia capillaris* filizinin başlıca bileşenidir, doğu ülkelerinde safra yolu enfeksiyonları ve hepatit tedavisinde kullanılmaktadır. Skoparon, uyarılmamış makrofajlarda hiçbir sitotoksik etki göstermemiş ama IFN- γ /LPS veya LPS ile stimülasyon üzerine prostaglandin E₂ (PGE₂) ve nitrik oksit (NO) salınımını azaltmıştır. RAW 264,7 hücreleri stimüle eden IFN- γ /LPS'de indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) supresyonu ile bağlantılı olarak önleyici etkileri bulunmuştur. Skoparon, RAW 264,7 hücrelerini stimüle eden LPS'de tümör nekrozis faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-1 β ve IL-6 üretimini de azaltmıştır. Bu sonuçlar göstermektedir ki, skoparon, iNOS ve COX-2 salınımını önleyerek makrofajlarda NO ve PEG₂ gibi enflamatuar mediatörlerin üretimini azaltmaktadır [39].

Lipopolisakkarit (LPS) aktive edilmiş RAW 264, 7 makrofaj hücrelerinde NO üretimi üzerinde doğal olarak meydana gelen çeşitli furanokumarinlerin etkileri *in-vitro* olarak değerlendirilmiş ve angelisin, pimpinellin, sphondin, byakangelikol, oksipsödanin, oksipsödanin hidrat, ksantotoksin ve knidilinin potansiyel NO üretim inhibitörleri olduğunu ve nitrit üretimi inhibisyonu için IC₅₀ değerleri 19,5; 15,6; 9,8;16,9;16,8;15,8;16,6 ve 17,7 μ g/mL'tir. Yapı aktivite bağlantıları bu furanokumarinlerin NO üretim inhibitör aktivitelerini ortaya çıkarmıştır. Pimpinellin ve sfondin gibi angelisin tipi aktivitelerin psoralen tipi olanlardan daha güçlü olduğu görülmüştür. Angelisin tipinde C6 pozisyonundaki metoksilin varlığı, aktiviteyi arttırmak için gereklidir. Doza bağlı olarak sphondinin 2,5-20 μ g/ml'de İNOS protein salınımını engellediğini görülmüştür. İNOS

enzim aktivitesi 12 saat LPS ile uyarılmış ve sphondin 24 saat (24 µg (ML) verilmiş ancak İNOS enzim aktivitesini engellememiştir. İNOS'un bilinen spesifik inhibitörü L-NAME (100 µM) aynı protokolle pozitif protokol olarak çalıştırılmış ve %50'den daha fazla inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Sonuçlar, sphondinin NO üretim inhibisyon aktivitesinin doğrudan İNOS enzim aktivitesinin inhibisyonu ile değil, İNOS salınımının etkisi yüzünden olduğunu göstermektedir. Bu yüzden sphondin doku zedeleyen enflamasyonda güçlü bir NO üretim inhibitörüdür [40].

Antikoagülan aktivite

Melilotus officinalis (tatlı yonca) yiyen sığırlarda meydana gelen kanamalara sebep olan ve 4- hidroksi kumarin dimeri olan dikumarol, antikoagülan etkilidir. Tek başına veya heparin ile birlikte venöz tromboz ve akciğer embolisinin profilaksisi ve tedavisinde kullanılır [3-5].

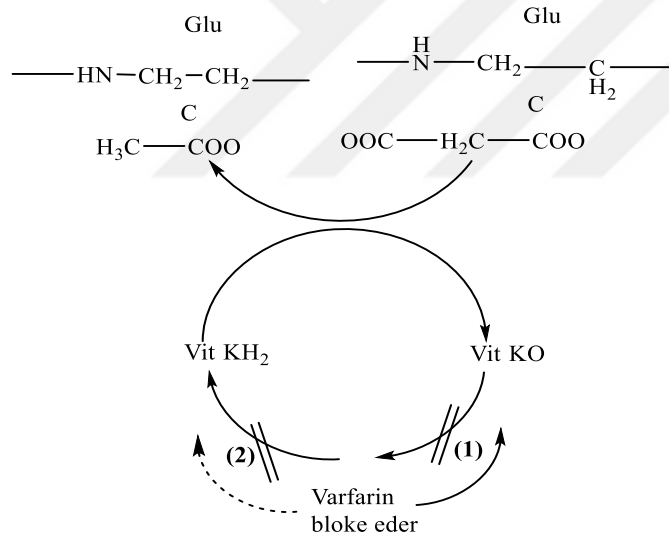
Kumarin türevi antikoagülanlar vitamin K'nın kompetitif inhibitörleridir. Dikumarol yapısından hareketle varfarin ve nikumalon gibi antikoagülanlar sentezlenmiştir [5,6].

Kumarinler, vitamin K antagonistleridir ve pıhtılaşma faktörlerini inhibe ederek etkisini gösterir. K vitamini ve 2,3 epoksitlerinin (vitamin K epoksit) siklik interkonversiyonuna müdahale ederek oluşturur [40-43].

K vitamini, K vitaminine bağımlı proteinlerinin N-terminal bölgelerinde γ -karboksilglutamat, glutamat rezidülerinin post-translasyonel karboksilasyonu kofaktördür [41-45]. Bu koagülasyon faktörleri (faktörler II, VII, IX ve X), biyolojik aktiviteleri için γ -karboksilasyona ihtiyaç duyar. Kumarinler antikoagülan etkilerini, kısmen karboksilatlı ve dekarboksilatlanmış proteinlerin prokoagülan aktivitesini azaltıp K dönüşüm döngüsünü inhibe ederek gösterirler [46].

Antikoagülan etkilerine ek olarak, vitamin K antagonistleri, düzenleyici antikoagülan protein C ve S'nin karboksilasyonunu inhibe eder ve bu nedenle prokoagülan etki gösterebilirler. Kalsiyum iyonlarının varlığında, karboksilasyon, koagülasyon proteinlerinde fosfolipid yüzeylerde kofaktöre bağlanmayı sağlayan konformasyonel değişikliğe neden olur [47-49].

Karboksilasyon reaksiyonunun indirgenmiş hali olan K vitamini (vitamin KH_2), moleküler oksijen ve karbon dioksit gerektirir ve vitamin KH_2 'nin Vitamin K epoksite oksidasyonuna bağlıdır. Vitamin K epoksit daha sonra iki redüktaz adımı vasıtasıyla vitamin KH_2 'ye dönüştürülür. K vitamini antagonistine duyarlı olan ilki, vitamin K epoksiti, vitamin K_1 antagonistlerine nispeten duyarsız iken ikinci vitamin K_1 'i vitamin KH_2 'ye indirgerken, K vitamini K_1 vitaminine (K_1 vitamininin doğal gıdalardaki şekli) indirgemektedir. Vitamin K antagonistleri ile yapılan muamele, KH_2 vitamininin tükenmesine yol açar, böylece vitamin K bağımlı koagülan proteinlerin γ -karboksilasyonunu sınırlar. Kumarinlerin antikoagülan aktivitesi, vitamin K_1 tarafından engellenebilir (ya yiyeceklerle alınır veya terapötik olarak uygulanır), çünkü ikinci redüktaz basamağı, vitamin K antagonistlerine nispeten duyarsızdır (Şekil 2.10). Büyük miktarda K_1 vitamini ile tedavi edilen hastalar, bir haftaya kadar varfarine direnç gösterebilirler. Çünkü K_1 vitamini karaciğerde birikir ve kumarine duyarsız redüktaz mevcuttur [43-45].



- (1) KO redüktaz: Varfarin duyarlıdır.
- (2) K-redüktaz: Göreceli olarak varfarin dirençlidir.

Şekil 2.11. Kumarin analog varfarin ve K vitamini döngüsü

Magydaris tomentosa (Desf.) çiçeklerinin aseton ve metanollü ekstralarının fitokimyasal araştırmasında umbelliprenin, ostol, imperatorin, sitropten ve (+) meranzin hidratin antikoagülan aktivitesi değerlendirildiğinde, *ex-vivo* çalışmalar, bu bileşiklerin antikoagülan etkili olduğunu göstermiştir [50].

İran'ın batısında yetişen *Ferula carducorum* Boiss.&Hausskn bitkisini, bölge halkı süt ürünlerinin ve arındırılmış tereyağ (ghee)'ların tüketim tarihini uzatmak için doğal koruyucu olarak kullanırlar. Bitkinin toprak üstü kısımlarından izole edilen kumarinler suberosin ve suberenol, ($p < 0.05$) kontrolüne kıyasla 3 ve 6 mg/kg dozlarda protrombin zamanını (PT) uzatmıştır. En uzun PT suberosin için 6 mg/kg (17.4 s)'dır. Kumarinlerin farelerde antikoagülan etki göstermesine rağmen bitkinin oral alımı akut ya da sub kronik toksisitelere sebep olmamıştır [51].

Peucedanum japonicum bitkisinin köklerinden elde edilen öjenin, selinidin, pteriksin, imperatorin, bergapten, knidilin ve visaminol *in-vitro* olarak, kuvvetli antiplatelet agregasyon aktivitesi göstermiştir [52].

Antibakteriyel aktivite

Kumarinin kendisi çok düşük antibakteriyel aktiviteye sahiptir, ammosesin ve ostruthin gibi uzun zincirli hidrokarbon süstitüsyonları içeren *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus* ve *Staphylococcus aureus* gibi geniş Gram (+) bakteri spektrumuna karşı inhibe edici aktivite göstermiştir [22].

Aegle marmelos'un yeşil meyvelerinden elde edilen bir başka kumarin bileşiği olan anthogenol, *Enterococcus*'a karşı aktivite göstermiştir [22].

Magydaris tomentosa çiçeklerinin aseton ve metanol ekstratlarından izole edilen (+) meranzin hidrat, umbelliprenin, ostol, imperatorin ve sitroptenin antibakteriyel aktivitesi Gram (+) ve (-) ve bakterilere karşı test edilmiş, izole edilen kumarinlerin bakterilerin bakteristatik etkili ve en aktif bileşiklerin imperatorin (32 -128 µg/mL MİK) ve sitropten (16-256 µg/mL MİK) olduğu belirtilmiştir [50].

Sicilya'da toplanan *Ferulago campestris*'in köklerinden izole edilen grandivittin, agasyllin ve aegelinol benzoatın, antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve bu kumarinlerin, ATCC suşlarında *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter aerogenes* Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (16 ve 32 MİK sırasıyla: aegelinol ve agasyllin) [53].

Staphylococcus aureus, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter aerogenes* gibi Gram (+) ve Gram (-) bakteri suşlarına karşı aegelinol ve agasillin anlamlı antibakteriyel aktivite göstermiştir. *Helicobacter pylori*'ye karşı 5 ve 25 mg / mL arasında doza bağlı inhibisyon ile antibakteriyel aktivite göstermiştir [22].

Iransahi ve arkadaşları, *Serratia marcescens* Gram (-) bakterisinde kırmızı pigment üretimi üzerinde umbelliprenin inhibitör aktvitesini keşfetmiştir. Fakat umbelliprenin, *Bacillus subtilis*, *Bacillus creus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aeureus*, *Staphylococcus epidermis* dahil çeşitli mikroorganizmalara karşı zayıf antibakteriyel aktivite göstermiştir [27].

Vepris glomerata köklerinden ve gövde kabuğundan prenillenmiş sinnamaldehit, *p*-hidroksi sinnamik asit, kafeik asit, metil sinnamat, hesperitin, skoparaon, skimmianin, syringaresinol ve 2 limonoid (limonin ve limonil asetat) izole edilmiş ve bileşenlerin antibakteriyel analizi, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, 25923) ve *Shigella dysenteriae*'nin standart suşlarına karşı 8'den 16 mm'ye uzanan bir inhibisyon bölgesi göstermiştir. Prenillenmiş sinnamaldehit, düşük konsantrasyonlarda (MİK 2µg/mL ve 0.4 µg/mL) *Staphylococcus aureus* ve *Shigella dysenteriae*'nin büyümesini engellemiştir. Hesperetin, güçlü antibakteriyel aktivite gösterirken, limonoidler, skoparon ve skimmianin orta derecede antibakteriyel aktivite göstermişler, sinnamik asit türevleri ise test patojenlere karşı aktivite göstermemiştir [54].

Varolan doğal kumarinlerin çoğu yüksek bitkilerden izole edilirken bazıları mikroorganizmalarda keşfedilmiştir. Mikrobiyal kaynaklardan elde edilen önemli kumarinler, novobiosin, kumermisin ve kartrösindir. Novobiocin, *Streptomyces niveus* ve *Streptomyces spheroides*'tan fungal metabolit olarak izole edilmiş, *Corinebacterium diphtheria*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces pneumoniae* ve *Streptomyces pyogenes* gibi Gram (+) mikroorganizmalara ve *Haemophillus influenzae*, *Neisseria meningitides* ve *Pasteurella* gibi Gram (-) mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite ve DNA giraz inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Yapısal olarak novobiosine benzeyen kumermisin, novobiosine göre *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı 50 kat daha potenttir ancak bakteriostatik etki oluşturur ve organizma yavaş yavaş direnç geliştirir. Kumermisin aynı zamanda *Escherichia coli* DNA girazı ile katalize edilen DNA'nın süper-sarmalını inhibe eder [55].

Streptomyces chartreusis'den izole edilen şartrözün, nadir bir yapıya sahiptir ve ağırlıklı olarak Gram (+) bakterilere karşı etkilidir, ancak toksisitesi nedeniyle bileşik, terapötik uygulama için denenmemiştir [22].

Ferula persica var. *persica* köklerinin kloroform ve su ekstrelerinin antibakteriyel aktivitesi, disk difüzyon metodu ile incelenmiştir. *F.persica* köklerinin kloroform ekstresi antibakteriyel aktivite gösterirken, köklerin su ekstresi herhangi bir aktivite göstermemiştir. Preparatif ince tabaka kromatografisi (P-İTK) ile köklerin kloroform ekstresi biyoanalizi ve fraksiyonu ile bazı bakterilere karşı aktif olan bileşeni umbelliprenindir ve *B.subtilis*, *B. Cereus*, *E. Coli*, *K.ponumoniae*, *S.typhi*, *S.aereus* ve *S.epidermillis* 'ye karşı aktiftir [56].

Ferula szowitsiana köklerinden elde edilen seskiterpen kumarin galbanik asit, *Staphylococcus aureus*'un metisilin, tetrasiklin ve siprofloksasine dirençli izolatları disk difüzyon metodu kullanılmış ve antibiyotikler üzerinde *S.aureus*'un dirençli suşlarına karşı galbanik asidin güçlü bir aktivitesi olduğu ortaya konulmuştur [57].

Ferula szowitsiana köklerinin aseton ekstresinin, penisilin G ve sefaleksinin antibakteriyel aktivitesi üzerindeki etkisi *Staphylococcus aureus*'a karşı değerlendirildiğinde, test suşlarına karşı sefaleksinin için MİK'da en fazla azalma galbanik asit kombinasyonunda gözlenmiştir. Bu sonuçlar, galbanik asidin düşük konsantrasyonunun (100 µg/ml) penisilin G ve sefaleksinin antimikrobiyal aktivitesini arttırdığı ve bu bileşiklerin kombine tedavisi halinde *S .aureus*'a karşı kullanımı olabileceğini orataya koymuştur [58].

Angelica lucida meyvelerinden izole edilen imperatorin, isoimperatorin, heraklenol, oksipösedanın hidrat, heraklenin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiş, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı aktivite göstermiştir [59].

Antifungal aktivite

Doğal olarak oluşan furanokumarin olan ve antifungal aktivite gösteren angelisinin *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformas*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Aspergillus niger*'e karşı

antifungal aktiviteleri rapor edilmiş ve angelisin türevlerinin toksisite göstermediği gösterilmiştir [60].

Psoralen, imperatorin ve ostruthindin antifungal aktivite göstermektedir [22].

Janet ve Hazera isimli iki maydanoz (*Petroselinum crispum*) kültüründe yapılan çalışmada, 24°C'de *Botrytis cinera* Pers. ile inokulasyondan sonra 4 gün boyunca Janet ve Hazera'dan alınan yapraklardaki (+) marmesin konsantrasyonları 17'den 145 µg g⁻¹ ham ağırlık ve 8'den 15 µg g⁻¹ ham ağırlığa artış göstermiştir. 4. günden sonra seviyeler düşmüştür. 24°C'de *B.cinerea*'lı aşılama sonrası 4 gün Janet ve Hazera'da çürüme olayı 4 ve 68 mm² olmuştur. Patojenik fungi *B.cinerea*, *alternaria alternata* (Fr.) Keissler ve *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bray için (+) marmesinin EC₅₀ değerlerinin sırasıyla 30, 40 ve 25 µg mL⁻¹ olduğu görülmüştür [61].

Psoralea corylifolia kök ve yapraklarında psoralen içeriğini arttırmak için değişik konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200 ve 250 µM/L) elisitör jasmonik asit, %60 sukroz ve bitki büyüme regülatörleri ile birlikte kullanılmış, kök örneğinin metanolik ekstresi bakteriyel ve fungal patojenlere karşı etkili antimikrobiyal aktivite göstermiştir [62].

Greyfurt yağı ve kabuklarından izole edilen, heterosiklik oksijenaz kumarinler olan pranferin, meranzin, bergapten, dihidroksibergamotin ve marmin antimikrobiyal ve sitotoksik özellik göstermiştir [63].

Angelica pubescens'den izole edilen ostolün kobay trakeasının kontraksiyonu üzerinde etkisi incelendiğinde; ostol (25-100 µmol/L), teofilin (10-1000 µmol/L), nifedipin (0.1-100 µmol/L) konsantrasyona bağımlı olarak karbakol, prostaglandin F_{2α} (PGF 2α), U46619 (tromboksan A₂ analogu) ve lökotrien C₄ (LTC₄)'ün sebep olduğu trakeal düz kasının kontraksiyonunu bastırmaktadır. Ostol (10-100 µmol/L) konsantrasyona bağımlı olarak, cAMP ve cGMP fosfodiesteraz aktivitesini engelleyerek trakealis üzerinde non-spesifik sedatif etki göstermiştir [64].

Antiviral aktivite

Birçok doğal ürün anti-HIV ajanları olarak tanımlanmıştır ve kumarin çekirdeğine sahip bileşikler bunlar arasındadır. İnofillum ve kalanolidler, yeni HIV inhibitörleridir. Dev Afrika

salyangozu *Achatina fulica*'dan inofillum A, inofillum B, inofillum C, inofillum E, inofillum P, inofillum G₁ ve inofillum G₂ izole edilmiştir. İnofillum B ve P sırasıyla 38 ve 130 nM IC₅₀ değerleri ile HIV ters transkriptazı inhibe etmiştir ve her ikisi de hücre kültüründe HIV-1'e (1,4 ve 1,6 µM IC₅₀) karşı aktiftir [65].

Calophyllum lanigerum (Clusiaceae) yapraklarından iki izomer, (+) - kalanolide A ve (-) - kalanolide B izole edilmiş, her ikisinin de HIV-1 replikasyonuna karşı tamamen koruyucu olduğu gösterilmiştir [66].

(+) - Kalanolid A, HIV-1'e karşı güçlü bir aktiviteye sahip nukleosid olmayan ters transkriptaz inhibitörüdür. (-) - kalanolid B ve (-) - dihidrokalanolid B, (+) - kalanolid A'ya benzer antiviral özelliklere sahiptir [88, 135]. Hem (+) - kalanolid A hem de (+) - dihidrokalanolid A, nötr pH'da stabil olup halen HIV enfeksiyonlarının tedavisi için geliştirilmektedir [67].

Calophyllum inophyllum Linn ve *Calophyllum cerasiferum* Vesque'in tohumları yağından sırasıyla inofillum A ve (-) - kalanolide B izole edilmiş, her ikisi de güçlü HIV-1 ters transkriptaz inhibitörleridir [68].

Calophyllum lanigerum var. *austrororiaceum* ve *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide* (King) P. F. Stevens (Clusiaceae) ekstrelerinden izole edilen psödokordatolid C ve kalanolid F gibi piranokumarinler anti-HIV aktivitesi göstermiştir [69].

Kumarinler ve yapısal bağlantılı bileşenlerinin son zamanlarda insan bağışıklık yetmezliği virüsü tip 1 (HIV) aktivitesi ileri sürülmektedir. İmperatorinin T-hücre hatları ve HeLa hücreleri halinde, kabarcıklı stomatit-pseudo-tip veya gp160-enveloped recombinant HIV-1 enfeksiyonunu engellediği rapor edilmiştir. Bu rekombinant virüsler viral replikasyonun markırı olarak lusiferazı belirtmektedir. İmperatorin, viral hücre siklusunda ters transkripsiyonu ve integrasyon adımlarını engellememiştir. İmperatorinin güçlü bir şekilde siklin D1 ekspresyonunu engellediği ve hücre döngüsünü G1 fazında durdurduğu görülmüştür. Bu nedenle AIDS'in tedavisinde furanokumarinlerin potansiyel terapötik rol oynama ihtimalini arttırmaktadır [70].

Herpes simpleks tedavisi için seskiterpen kumarin olan badrakemin asetat, kellerin ve samarkandin *Ferula assa-foetida*'nın gum resininden izole edilmiştir. Sitotoksosite ve antiviral aktivitenin değerlendirmesi sonucunda kellerinin önemli derecede 10,5 ve 2,5 µg/mL, herpes virüs tip1 (HSV-1)'ne karşı etkili olduğu gösterilmiştir [71].

Antikanser aktivite

Kumarinler, çok yönlü farmakolojik etkiler gösteren doğal ve sentetik bileşenler sınıfıdır. Biyoaktif bileşenlerin araştırılmasında kumarinlerin sayısız etkileri vardır ve antikanser ilaç dizaynı ve keşfi için en işlevli bileşenler sınıfından biridir. Kanser hücrelerinin tedavisinde 7-hidroksi kumarin, 6-nitro-7-hidroksi kumarin, skopoletin ve eskuletin gibi bazı kumarinlerin olası kullanımları araştırılmıştır. Kumarinler, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla, hücre döngüsünü bloke ederek hücre apoptozisini azaltarak, östrojen reseptörü regüle ederek veya topoizomerez gibi DNA bağlantılı enzimleri inhibe ederek kanser oluşumunun değişik evrelerinde antitümör aktivite göstermiştir [72].

Kanser kemoterapisinde, kumarinlerin potansiyel uygulamaları nedeniyle, antikanser aktivitesi olan kumarin türevlerinin sentezi ve dizaynı üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli hücre hatlarına karşı antikanser aktivitelerini geliştirmek amacıyla, kumarin çekirdeğini değişik pozisyonlara modifiye etmek için çok sayıda girişimlerde bulunmaktadır. Kumarin çekirdeği üzerindeki modifikasyon ile farklı etki mekanizmasına sahip çok sayıda bileşik elde edilmiştir. Amid, hidrazid veya C-3'de (hetero) aril bileşenleri, metilen bağlı 4-süstitüe kumarinler, *o*-süstitüe 7-hidroksi kumarinler, 3,4-birleşik kumarinler ve hibrit kumarinler en dikkat çeken yapılardır. Kumarin türevi daha aktif ve daha az toksik antikanser ilaçların rasyonel dizaynı ve geliştirilmesinde bu tarz araştırmaların çok yararlı olduğuna inanılmaktadır [72].

7-hidroksi kumarin, birçok kanser tiplerinde üzerinde çok durulan Siklin D1 (cyclin D1) salınımını engeller. Bu bulgu, kanser tedavisinde kullanılmasına yol açar [73].

Eskuletin, HL-60 lösemi hücrelerinde G1 fazının tutulmasına yol açarak, retinoblastoma protein fosforilasyonunun inhibisyonundan sonuçlanan büyüme ve hücre döngüsünün ilerlemesine engel olur. Genisteinin çeşitli karsinoma hücre hatlarının hücre büyümesi

üzerinde önleyici etkilere neden olduğu ve kanser tedavisi için potansiyel aday olabileceği gösterilmiştir [73].

Kumarin ve kumarin türevi bileşiklerin etkileri 2 hücre hattı, MCF-7 meme karsinomu ve A549 akciğer karsinomu üzerinde araştırılmış, hücre büyümesi üzerinde en güçlü inhibitör etkiyi genistein ve eskuletinin gösterdiği belirtilmiştir [73].

Cnidium monnieri (L.) Cusson, tıp doktorları tarafından kullanılan Çin ilacıdır. Ostol bitkinin en önemli bioaktif bileşenidir. Ostol, *C.monnieri*'den izole edilmiş ve *in-vitro* ve *in-vivo* antitümör etkileri çalışılmıştır. P-388 D1 hücreleri *in-vivo* engelleyebildiği ve Hela hücrelerinde apoptozisleri *in-vitro* azalttığı ortaya atılmıştır. Ostolün antitümör ilaçların geliştirilmesinde iyi bir öncü bileşen olduğu ileri sürülmüştür [74].

Yeni selenophene kumarinler çeşitli tümör hücre hatları üzerinde sodyum selenitten daha yüksek aktivite ve daha düşük toksisite göstermiş ve matriks metalloproteinazları (MMP-1, MMP-14) matrigel üzerinde anjiogenezisleri *in-vitro* ve *in-vivo* engelleyebilmişlerdir. Bileşenler antioksidan ve pro-oksidan özellikler göstermiştir [75].

5'-asetoksi-8'-hidroksi umbelliprenin ve 10'-R-asetoksi-11'-hidroksi umbelliprenin iki yeni seskiterpen kumarin ve yeni bir diterpen 15-hidroksi-6-en-dehidroabietik asit, 27 bilinen bileşenle beraber biyoanalizli fraksiyonlama ile *Ferula assa-foetida*'nın CHCl₃ ekstresinden izole edilmişlerdir. Bileşenlerin bir kısmı influenza A virüsüne (H₁N₁) (IC₅₀ 0,26-0,86 µg/mL) karşı amantadinden (IC₅₀ 0,92 µg/mL) daha yüksek potens göstermiştir ve Hep G2, Hep3B ve MCF7 kanser hücre hattına karşı iyi potens (IC₅₀ 0,51; 2,6 ve 3,5 µg/mL) sergilemiştir [76].

Farklı tümör hücre hatlarında birkaç tıbbi bitkinin sitotoksik aktivitesi incelenmek amacıyla bölge halkının kullandığı 11 bitki türü İran'ın Hamedan bölgesinden toplanmıştır. Bitkilerin metanolik ekstraktları hazırlanıp 4 tane insan kanser hücre hattı A549 (insan akciğer adenokarsinomu), MCF-7 (insan meme adenokarsinomu), HepG2 (karaciğer hepatoselüler karsinomu) ve HT-29 (insan kolon kolorektal karsinomu) ve bir tane normal hücre hattı MDBK (Madin-Darby sığır böbreği epitel) üzerindeki sitotoksik etkileri, MTT analizi kullanılarak incelenmiştir. Antiproliferatif aktivite, *Primula auriculata*'dan alınan ekstre

MCF7, HepG2 ve HT29 hücrelerine karşı, IC_{50} 2579; 35,79 ve 43,34 $\mu\text{g}.\text{ML}^{-1}$ ile en yüksek sitotoksositeyi göstermişlerdir [77].

Ferula sinkiangensis tohumlarından elde edilen aralarında kolladoninin de bulunduğu seskiterpen kumarinler izole edilmiş, AGS (mide), HeLa ve K562 (kan) insan hücre hattını 127 ve 226,6 μM arasında %50 inhibe ederek sitotoksik aktivite göstermiştir [78].

Meksika'da Jose Sullivan Lopez-Gonzalez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kumarin ve 7-hidroksi-kumarinin küçük hücreli olmayan akciğer karsinoması (NSCLC) hücre hattı (skuamöz, büyük hücreli ve adenokarsinomlu) üzerinde sitostatik ve apoptotik aktivitesi araştırılmış, hücre çoğalmasının inhibisyonunu sağladığı, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir. Hücre bölünmesinin inhibisyonunun 3H-timidin eklenmesi ile olduğu saptanmıştır. Hücre döngüsü aşamaları üzerine bu etkiler 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kumarin veya 7-hidroksi kumarinin propidyum iyodür ve akış sitometrisi ile kullanılarak saptanmıştır. Kumarin ve 7-hidroksi-kumarin tüm akciğer karsinoma hücre duvarlarında hücre döngüsünü G1 fazında durdurarak hücre büyümesini inhibe etmiştir. Apoptozis intranükleozomal DNA parçalanma ile ilişkili değildir. Skuamöz akciğer karsinoma hücre duvarlarında apoptoz gözlenmemiş ama G1 hücre döngüsünde durdurmada artış tespit edilmiştir. Periferal kan mononüklear hücrelerinde (PBMC'de) sadece yüksek konsantrasyonlarda kumarin bileşiklerinde sitotoksik etki ortaya çıkmıştır. Kumarinin diğer anti-neoplastik ilaçlar ile kombine kullanımları küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC) tedavisinde etkinlik sağlamaktadır [79].

Kumarin (1,2-benzopiron) ve onun metaboliti 7-hidroksikumarin *in-vivo* ve *in-vitro* ortamda antitümöral etkiye sahip bulunmuştur [79-86].

İki hafta boyunca, 7 g kumarin günlük tedavisinden sonra herhangi bir yan etki bildirilmemiştir. Kumarin ve 7-hidroksi-kumarin dahil olmak üzere bazı kumarin bileşiklerinin çeşitli kanser türlerinden hücre duvarının büyümesini engellediği görülmüştür [79, 84-87].

Simetidin kombinasyonu ile kumarin (1-2-benzopiron), ilerlemiş renal hücre karsinomalı bazı hastalarda objektif antitümör yanıtlar verebilmiştir. Simetidinli ya da simetidinsiz kumarinin klinik gelişimi renal hücre karsinomuna özel referansla (RCC) gözden

geçirilmiştir. Kumarin ve simetidinin faz 1 çalışması üzerinde, tedavi edilen RCC'li canlılığı ile ilgili sunulmuştur. RCC için kumarinin aktif randomize, çift körlü plasebo kontrollü çalışmanın dizaynı ve açıklaması tartışılmıştır. Kumarinin başlıca insan metaboliti olan oral 7-hidroksi kumarin faz1'in devamı için rapor edilmiştir [88].

Hidrojen peroksitle indüklenen sitotoksositeye karşı fraksinin koruyucu etkileri insan umbilikal ven endotel hücrelerinde incelenmiştir [89].

Chartreusin, murin L1210, P388 lösemileri ve B16 melanoma'ya karşı antitümör özellikleri sergilediği gösterilmiştir. 3"-Demethylchartreusin, *Streptomyces chartreusis* tarafından üretilen yeni bir antitümör antibiyotiktir ve chartreusinin aglikonu aynı fakat farklı yapıda şeker içeren analogudur [90].

Eskuletin, antitümör aktivite göstermektedir ve kültüre alınmış primer nöronları N-metil-D-aspartat toksisitesinden kurtarmıştır [91,92]

Ferulago campestris'in kumarinlerinin çoğu, grandivittin, agasyllin, aegelinol benzoat ve ostol, A549 akciğer kanseri hücre hattına karşı sitotoksik aktivite göstermiştir. *Cassia* yaprağından izole edilen kumarin, sitotoksik aktivite sergilemiştir [22].

Seskiterpen prenillenmiş kumarin türevi olan feruneol, *Ferula vesceritensis*'den izole edilmiştir ve mitokondriyel etkileri araştırılmıştır. Ferunelol oksidatif fosforilasyonun inhibisyonuna sebep olmuştur. Düşük konsantrasyonda ferunelol, mitokondriyal solunum sınırlaması olmaksızın adenin nükleotid translokaz inhibisyonu ile ATP sentezine engel olmuştur. Daha yüksek konsantrasyonda ferunelol oksijen tüketimini engellemiştir [93].

Ferula szowitsiana'den izole edilen umbellipreninin insan kanser hücreleri ve insan birincil fibroblastları üzerinde sitotostatik ve sitotoksik etkisini değerlendirmek için resazurin indirme test ve FAC analizi kullanılmıştır. Umbelliprenine karşı hücre duyarlılığının sırasıyla; M4Beu (metastatik pigmentli malign melanoma) > A549 (küçük olmayan akciğer karsinoması) ile PC3 (androjen dirençli prostat karsinoması) > PA1 (over teratokarsinoması) > insan birincil fibroblastı ile MCF-7 (meme adenokarsinoması) > DLD1 (kolon adenokarsinoması) gözlenmiştir. M4Beu hücre çoğalması, G1'deki hücre döngüsü tutulması ve kaspaz bağımlı apoptozun indüksiyonu ile engellenmiştir. Umbelliprenin sitotoksik

etkisinin, M4Beu hücreleri içinde birincil fibroblastlardan daha belirgin olduğu görülmüştür. Oral yoldan verilen umbelliprenin ve kumarin içeren yiyecekler ve halk ilaçları malignan melanomanın erken oluşup gelişmesine karşı koruyucu olabilir. Bu hipotezi test etmek için *in-vivo* araştırmalara gerek vardır [94].

Matriks metalloproteinazlar, (MMP) fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynar. *Ferula persia* var. *persia*'nın kloroform ekstresi araştırıldığında, köklerin total ekstresinin tümör hücre hattı üzerinde önleyici bir etki gösterdiği görülmüştür. Bu ekstrenin biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlamada 2 bileşeni izole edilmiştir. Umbelliprenin ve persicausulphide B'nin minimal toksik doz seviyelerinde en yüksek MMP inhibitör etkisi görülmüştür. MMP aktivitesinin inhibisyonu kanser gibi hastalıklarda tedavi şekli içinde ele alındığında, bu bileşenler anti-MMP terapötik türevlerin hazırlanmasında umut verici olabilmektedir [95].

Ostol ve imperatorinin antitümör ve sitotoksik aktiviteleri, apoptozisi indükleyerek kanser baskılayıcı işlevini yerine getirdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir [96-109].

Farelerde, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen akut akciğer hasarı üzerine skoparonun koruyucu etkileri ve moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. LPS'nin intranazal instilasyonu ile indüklenen akut akciğer hasarının fare modeli, *in-vivo* olarak skoparonun koruyucu etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. Skoparon tedavisinin, *in-vivo* LPS ile uyarılan pulmoner ödemi, histolojik şiddetleri, miyeloperoksidaz aktiviteyi ve TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üretimini belirgin şekilde zayıflattığı görülmüştür. Ayrıca skoparonun *in-vivo* alveolar makrofajlarda LPS ile uyarılan TLR4 ekspresyonunu, NF- κ B aktivasyonunu, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β üretimini inhibe etmiştir. Skoparonun, TLR4 aracılı NF- κ B sinyal yollarının bastırılması yoluyla LPS ile uyarılan akut akciğer hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [110].

PC12 hücrelerinde *Liriodendron tulipifera* kök kabuğundan izole edilen skoparonun nörit büyümesi üzerine etkileri araştırılmıştır. 200 μ M konsantrasyonda, skoparon PC12 hücrelerinden belirgin derecede nevit büyümesini uyandırmıştır. Hücre içi siklik AMP'nin ve Ca²⁺ konsantrasyonunun seviyeleri 200 μ M skoparon ile arttırılmıştır. Hücre dışı sinyalle düzenlenmiş protein kinaz (ERK), siklik AMP'ye bağımlı protein kinaz (PKA), protein kinaz C (PKC) ve Ca²⁺ / kalmodulin kinaz II (CaMK II) aktivitelerini 200 μ M'de skoparon

arttırmıştır. Skoparon ile indüklenen nevrit büyüme, bir PKA inhibitörü (H89), bir PKC inhibitörü (GF109203X) ve bir aCaMKII inhibitörü (KN62) olan bir mitojen ile aktive olan protein kinaz inhibitörü (U0126) tarafından engellenmiştir. Bu kinaz inhibitörleri NGF ile ilişkili olarak skoparon nevrit büyümesini azaltmıştır. PC12 hücrelerinde ERK, PKA, PKC ve CaMK II'nin yukarı akış adımlarını uyararak skoparonun nevrit büyümesini indükleyebildiğini ortaya koymaktadır [111].

6-Nitro-7-hidroksi kumarin (6-NO₂-7-OHC) ve 3, 6, 8- trinitro-7- hidroksi kumarinin (3, 6, 8-NO₂-7-OHC) DNA sentezi ve hücre döngüsü olayları üzerindeki etkileri ile araştırılmıştır. Karşılaştırmalı çalışmalar, 7-OHC (7-hidroksi kumarin)'nin insanda kumarin ana metabolitini kullanması sonucunda gerçekleştirilmiştir. 6-NO₂-7-OHC ve 3, 6, 8-NO₂-7-OHC'nin 7-OHC'den farklı olarak geri dönüşümsüz sitotoksik ajanlar olduğu bulunmuştur. Her üç türev DNA sentezini inhibe etmiş, ancak 7-OHC sadece geri dönüşümsüz bir şekilde hareket eden nitro-türevleri olmuştur. Sitometrik çalışmalar, nitro türevlerinin hem doz hem zamana bağımlı, S faz birikimine neden olduğunu göstermiştir. 7-OHC ve diğer nitro türevleri seçici ve geri dönüşümsüz sitotoksositeye sahip oldukları için malign melanoma tedavisinde yeni terapötik ajanlar olarak gösterilebilmektedir [112].

Nitrik oksit türevi arginin ve onun nitrojen dioksit ve peroksinitrit gibi türevleri inflamasyon ve karsinogenez çoklu basamaklarında rol oynar. 4 furanokumarin ve 8 kromonlar kurutulmuş *Saposhnikovia divaricata* kökünden izole edilmiş ve makrofaj hücre hattı RAW 264,7'de lipopolisakkarit (LPS)'le indüklü NO sentezi üzerinde etkileri için değerlendirilmiştir. Makrofaj hücrelerinden NO salınımlı bir indeks olarak nitrit üretiminin inhibisyonu Griess reaksiyonu ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. İmperatorin ve deltoinin potansiyel NO üretim inhibitörü olduğunu ve onların nitrit üretim inhibisyonu IC₅₀ değerlerinin 17,3 ve 11,6 µg/mL olduğunu göstermiştir. iNOS enzim aktivitesinin imperatorin ya da deltoini tedavi ile engellenmediğini ancak her iki bileşenin de iNOS protein salınımını inhibe ettiği ortaya çıkmıştır [113].

Wistar farelerinde, renal oksidatif stresi ve tümör artırıcı yanıtı artıran Fe-NTA üzerinde kumarinin düzenleyici etkisi rapor edilmiştir [114].

Japonya'da sebze olarak yenilen "ashita-ba"dan alınan altı çeşit düz tip furanokumarinler (imperation, izoimperatoin, okspsödanin, pabulenol, neobyakanjelikol ve byakangelisin) ve

aynı yapıya sahip üç çeşit antitümör kumarinler (psoralen, bergapten ve ksantotoksin) arasında yapı-aktivite bağlantısı/ilişkisi tartışılmış, bu bileşenler arasında imperatorin ve izoimperatorin 50 mg/ml konsantrasyonunda güçlü inhibitör etki göstermiştir, geri kalan diğer bileşenlerde daha az ya da hiç aktivite görülmemiştir [115].

Macaranga gigantifolia Merr. yapraklarının metanol ekstresinden izole edilen skopoletin, P-388 murine lösemi hücrelerine karşı MTT analiz metodu ile yapılan sitotoksiklik testinde IC₅₀ 15.42 ug/mL ile güçlü bir sitotoksik aktivite göstermiştir [116].

Angelica dahurica kökünden izole edilen kumarinlerin sitotoksiklik MTT metodu ile L1210, HL-60, K562 ve B16F10 tümör hücre hatları üzerinde araştırılmış, pangelin ve oksipösedanın hidrat asetonid tümör hücre hatlarında 14,6 µg/mL ve 8,6 µg/mL, IC₅₀ değerinde potent sitotoksik aktivite göstermiştir [117].

Dorstenia foetida yapraklarından linear furanokumarinler 5-(2,3 epoksi-3-metil-butoksi)-kalepensin, 5-metoksi-3-(3-metil-2,3 dihidroksibutil)-psoralen-diasetat, 5-metoksi-3-[3-(β-D-glukopiranosiloksi)-2-asetiloksi-3-metil-butil]-psoralen ve 5-(3-metil-2,3-dihidroksibutiloksi)-3-[3-(β-D-glukopiranosiloksi)-2-hidroksi-3-metil-butil] psoralen ve kumarin türevi 7-hidroksi-5-metoksi-6-karboksi-metil-3-[3-(β-D-glukopiranosiloksi)-2-hidroksi-3-metil-butil]-kumarin, psoralen, bergapten, isopimpinellini fellopterin, 5-metoksi klepensin ve turbinatokumarin izole edilmiş, *D.foetida*'nın non-polar ekstresi, antifungal, antibakteriyel ve sitotoksik aktivite göstermiştir [118].

Afraegle paniculata tıbbi bitkisinden izole edilen marmesinin, yakın ultraviyole (NUV) ve uzun dalga boyu ultraviyole veya siyah ışığa (BL) duyarlı Çin hamster V79 hücrelerinde, sitotoksiklik ve mutajenitesi değerlendirilmiş, marmesinin karanlıkta son derece sitotoksik olduğu görülmüştür [119].

Doğu ülkelerinde hepatit ve safra enfeksiyonları için kullanılan *Artemisia capillaris* filizinin önemli bileşeni skoparonun aktivitesi, interlökin-8 (IL-8), monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) salınımı ve nükleer faktör kappa B (NF-KB)'nin aktivitesi üzerinde forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ile aktive edilmiş U937 insan monositleri halinde incelendiğinde, skoparonun (5-100 µM) uyarılmamış hücrelerde hiçbir sitotoksik etkiye sahip olmadığı, skoparonun konsantrasyona bağlı olarak IL-8 ve MCP-1 protein salınımını azalttığı ve IL-8

ve MCP-1, mRNA seviyelerinin salınımını PMA ile indüklediği, PMA ile stimüle hücrelerde NF-kB aktivitesi ve NFkB DNA kompleks seviyesini engellediği, 1kBα fosforilasyonun NF-kB1 p50 Re1A p65 ve c-Relp75 nükleer translokasyonu engellediği, PMA stimüle U937 hücrelerde kemokinez (IL-8 ve MCP-1) salınımını engellediği ve skoparonun potansiyel mekanizmasının NF-kB aktivasyon inhibisyonu olabileceği ve bunu da 1kBα fosforilasyonun supresyonu yoluyla NF-kB alt üniteleri (NF-kB1, p50, Re1A,p65 ve c-Relp75) translokasyon inhibisyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir [120].

Pankreas kanser hücrelerinin yok olma rezisdanslarını önleme kapasiteleri değerlendirildiğinde hücre yaşamını besince zengin ve besince yetersiz durumlarda kıyaslayan sitotoksitate analizi kullanılmıştır. İzole edilen 17 bileşikten 6'sı PANC-1 e karşı zayıf aktivite göstermiş, PANC-1, MIA PaCa-2 ve Capan-1 kanser hücre hatlarına karşı aktif bulunmuştur [121].

Antihipertansif aktivite

Skopoletin, *Tetrapleura tetraptera* meyvelerinden izole edilmiş ve laboratuvar hayvanlarında düz kas gevşetici aktivitesi ile *in-vitro* ve *in-vivo* hipotansif özellik göstermiştir [22].

Dihidromammea C/OB, Batı Afrika ağacı *Mammea africana* tohumlarından izole edilen yeni bir kumarindir [22]. Çalışmada *Mammea africana*'nın kök kabuğunun metanol ve diklorometan ekstralarının N^w-nitro-L-arginin metil ester ile indüklenen hipertansif 250-300 g ağırlığında 12-16 haftalık erkek albino Wistar fareleri üzerinde antihipertansif etkileri araştırılmıştır [122, 123]. *Mammea africana*'nın kök kabuğunun diklorometan ve metanol ekstraları, streptozotosin ile indüklenen erkek albino Wistar diyabetik sıçanlarda (3 aylık, ağırlık: 200-250 g) önemli antihiperглиsemik etkinlik sergilemiştir [124].

Antitüberküloz aktivite

Phellodendron amurense var. *Wilsonii* ' den izole edilen fellodenol A, (+)-(S)-marmesin ve ksantiletent 60 µg / mL konsantrasyonda antitüberküloz aktivite sergilemiştir [22].

Fatoua pilosa'nın bütün bitkisinden umbelliferon, pelolenol A, psoralen ve skopoletin, bergapten, (+)-(S)-marmesin, (+)-(S)-rutaretin ve ksantiletin izole edilmiştir. Skopoletin ve

umbelliferon bileşiklerinin sırasıyla 42 ve 58,3 µg / mL MİK değerleri ile *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv'ye karşı aktif olduğu bulunmuştur [90].

Antikonvülzan aktivite

Ostol ve imperatorinin, valproat ile karşılaştırmalı antikonvülzan etki araştırmasında maksimal elektroşok ve chimney testi kullanılmış, sonuçlara göre imperatorinin 167-290 mg/kg, ostolün 253-639 mg/kg, valproatın ise 189-255 mg/kg doz aralığında etkili olduğu tespit edilmiştir [125].

Doğal bir kumarin türü olan ostolün antikonvülzan etkileri, fare maksimal elektroşok indüklü modelde araştırılmıştır. Ostolün antikonvülzan etkileri, sistemik uygulamasından sonra (i.p) 15, 30, 60 ve 120 dakikalarda belirlenmiş, fare maksimal elektroşok indüklü nöbet modelinde nöbetleri bastırıldığı için epilepsinin diğer hayvan modellerinde yeni tedavi seçeneği haline gelmektedir [126].

Farelerde, maksimal elektroşok indüklü nöbet testinde, 4 tane doğal furanokumarinin (bergapten, imperatorin, oksipsödanin ve ksantotoksin) antikonvülzan aktiviteleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Bergapten, imperatorin, oksipsödanin ve ksantotoksinin antikonvülzan etkileri, sistematik (intraperitoneal) uygulamalarından sonra 15, 30, 60 ve 120 dakikalarda değerlendirilmiş, yetişkin albino İsviçre farelerinde aurikular elektrotlar aracılığıyla verilen akımla (sine-wave, 25 mA, 500V, 50Hz, 0,2 stimüle süresi) arka ayak gerilimi nöbet aktivitesi yapılmıştır. Maksimal elektroşok indüklü nöbetlere karşı, imperatorin ve ksantoroksin (psoralenin C-8 süstitüe türevi) güçlü antikonvülzan aktivite gösterirken, bergapten ve oksipsödanin (psoralenin C-5 süstitüe türevi) herhangi bir antikonvülzan aktivite meydana getirmemiştir. İmperatorin ve ksantotoksin, hayvanları maksimal elektroşok indüklü nöbetlere karşı korumuşlar, bergapten ve oksipsödanin, ksantotoksin ve imperatorine kimyasal ve yapısal benzerliklerine rağmen kriz testinde hiçbir antikonvülzan aktivite göstermemişlerdir [127].

Skoparonun rejyoselektif 7-demetilasyonu, fare karaciğeri sitokrom P450 izoform CYP2B1'in fenobarbital benzeri indüksiyonunun göstergesi olarak, antiepileptik ilaç fenitoin ile kullanılmıştır. Fenobarbital ve fenitoin ile indüksiyon sonrası, Cyp2c29 ile katalize edilen yeni reaksiyon dizisi, fare karaciğer mikrozomlarında tanımlanmıştır.

Skoparonun Cyp2c29'a bağımlı 6-demetilasyonu, izoskopoletin daha fazla oksidasyona duyarlı bir ara maddedir. Oksidasyon 30,31 μM Km ile Cyp2c29 tarafından katalize edilmiş ve yeni metabolit 3-[4-metoksi-p- (3,6) -benzokinon]-2-propenoatın oluşumuyla sonuçlanmıştır. Bu yeni metabolit iki ardışık oksidasyon tepkimesinin ürünüdür ve izoskopoletin üzerinde halka oksijen türevleri ile seri hidrolizle laktona ilerler, lakton halkasının açılması oksidatif hidrolizi sağlar. Farklı sitokrom P450 izoformlarını ayırt etmek için skoparonun diferansiyel oksidasyonu indikatör olarak kullanılabilir [128].

Multiple Sklerozda kullanılan kumarinler

Chen ve arkadaşları ostolün TNF- α , interferon- γ ve interlökinleri modüle ederek multipl skleroz tedavisinde potansiyel tedavi edici olduğunu tespit etmiştir [129].

Antiadipojenik aktivite

Fraxinus rhynchophylla (Oleaceae) kök kabuklarından fraksidin, fraksetin, frakin, eskuletin, eskulin ve skopoletin izole edilmiştir. Eskuletin *in-vitro* test sistemi ile preadipozit hücre hattı olan 3T3-L1'e karşı en güçlü antiadipojenik aktiviteyi göstermiştir [22].

Gerçek zamanlı PCR analizi, skoparonun önemli adipojenik transkripsiyon faktörleri, PPARc, C/EBPa'nın adipozitlerle karşılaştırıldığında mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Adipozit spesifik genler aP2 ve CD36 / FAT, skoparon tedavisi ile olgun adipositler azalmıştır. Skoparon, PPARc hedef genlerin artan ekspresyonunu, rosiglitazon ve GW9662 ile tedavi edilen hücrelere yakın olana kadar inhibe etmiştir. Skoparon, PPARc antagonik etkiye sahiptir ve 3T3-L1 preadipozitlerinde PPARc inhibisyonu ile adipojenik genlerin azalması yoluyla farklılaşmayı bastırmıştır [130].

Sitokrom P450 inhibisyon aktivite

Ammi majus (Umbelliferae) tohumlarında bulunan metoksalen (8-metoksipsoralen) *in-vitro* olarak güçlü mikrozomal P450 inhibitörüdür [64] ve insan sitokrom P4502A6 aktivitesi üzerine etkilidir [131].

Antihiperglisemik aktivite

Fraksidin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz oluşumunu inhibe edip antihiperglisemik etkinlik göstermiştir [132].

Antioksidan aktivite

Fraksin, H₂O₂ kaynaklı oksidatif strese karşı, yüksek konsantrasyonda (0.5mM) serbest radikal süpürme etkisi ve hücre koruyucu etki göstermiştir [133].

Eskuletin antioksidan özellik sergilemiştir [134]. Fraksin ve eskulin, *Actinidia deliciosa* (kivi) ve *Actinidia chinensis*'in sapları ve meyvelerinde karakterize edilmiştir [135].

Grandivittin, agasillin, aegelinol benzoat ve ostolun antioksidan aktiviteleri, insan tümör lökositleri üzerindeki etkileri ve izole edilmiş polimorfonükleer kemilüminesans üzerine etkileri ile birlikte değerlendirilmiştir [53].

Potansiyel intestinal antiinflamatuvar aktivitenin, antioksidan özelliklerle ilgili olup olmadığını kanıtlamak için 6 tane kumarin türevinin (skopoletin, skoparon, fraksetin, 4-metil-umbelliferoneskulin ve dafnetin) hem antioksidan hem de intestinal antiinflamatuvar aktiviteleri değerlendirilmiştir. Farelerde TNBS (2,4,6-trinitrobenzenülfonikası) intrakolonik uygulama ile intestinal inflamasyon indüklenmiş ve oral yoldan kumarinlerle tedavi edilmiştir. Kolitis indüksiyonundan 48 saat sonra öldürülmüş, laparotomiden sonra kolonik segmentler alınıp makroskopik ve biyokimyasal parametreler (glutatyon), miyeloperoksidaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu kumarinlerin antioksidan özellikleri lipid peroksidaz ve DPPH analizleriyle incelenmiştir. Eskulin, skoparon ve dafnetinli tedavi, en iyi koruyucu etkiyi göstermiştir. Dafnetin ve fraksetin lipid peroksidasyonu engelleyerek antioksidan aktivite gösterirken kumarin türevlerinin hepsi DPPH analizinde antioksidan aktivite göstermiştir. 4-metil-umbelliferon haricinde kumarinler ayrıca glutatyon seviyelerinin karşı hareketi ya da miyeloperoksidaz aktivitesinin inhibisyonu aracılığı ile antioksidan aktivite göstermiştir [136].

Kumarin türevlerinin intestinal antiinflamatuvar aktivitesinin antioksidan özellikleri ile ilgili olması, kumarin türevlerince zengin yiyeceklerin (dafnetin, eskulin ve skoparon) tüketilmesi intestinal inflamatuvar hastalıkların önlenmesini sağlar [136].

Nöroprotektif aktivite

Eskuletin, 20 µg / mL uygulanan farelerde orta serebral arter tıkanma modelinde, serebral iskemi / reperfüzyon hasarında nöroprotektif etki göstermiştir ve iskemiden 30 dakika önce intraserebroventriküler olarak uygulanmıştır [137].

PC12 hücrelerinde dopamin salınımı üzerine skoparonun etkileri araştırılmıştır. Skoparon, 50-200 µM'de, kültür ortamında dopamin salınmasını arttırmıştır. Bununla birlikte, salınan dopamin düzeyleri, hücre dışı Ca²⁺ yokluğunda ve adenil siklaz inhibitörü MDL-12,330A ile değiştirilmemiştir. Skoparon PKA, CaMK II ve synapsin I'in fosforilasyonunu ve CaMK II fosforilasyonu ile K⁺ 'nın indüklediği dopamin salınım düzeylerini de arttırmıştır. Bu sonuçlar, skoparonun, siklik AMP düzeyleri ve Ca²⁺ akışı tarafından aracılık edilen PKA ve CaMK II aktivasyonu yoluyla, sinapsin fosforilasyonu ile dopamin salınımını arttırdığını düşündürmektedir [138].

Canarium patentinervium Miq. yaprakları etanol ekstresinden izole edilen skopoletin 1.76±0.01µM ve 0.27±0.02µM'e eşit IC₅₀'li 5-lipoksigenaz ve asetil kolinesterazın enzimatik aktivitesini inhibe etmiş, bu bulgular skopoletin nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için kullanılabileceğini göstermektedir [139].

Broussonetia kazinoki'den izole edilen marmesin, siklin bağımlı kinaz ve siklinleri içeren hücre döngü ilişkili proteinlerin aşağı regülasyonu ile VEGF-A endotelial hücre artışını inhibe etmiş ve pRb hipofosforilasyona ve G1 faz hücre döngü tutulmasına yol açmıştır. Marmesin tedavisi, VEGF-A endotelial hücre göçünü, istilasını ve kapiler yapı oluşumunu *in vitro* ve anjiogenik gelişmeyi *ex- vivo* ortadan kaldırmıştır. Marmesinin, anti-anjiogenik aktiviteleri VEGF-A uyarılı sinyali veren yolların inaktivasyonu ve VEGF reseptör-2 insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2, integrin β1 ve integrin benzeri kinaz içeren hücre yüzey sinyali veren moleküllerin aşağı regülasyonu oluşturulmuştur. Bu bulgular açıkça anjiogenezleri regüle etmede marmesinin farmakolojik rolü olduğunu desteklemektedir ve kanser dahil anjiogenezis bağlantılı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde potansiyel terapötik ajan olarak daha fazla değerlendirmesine zemin oluşturmaktadır [140].

Antileishmanial aktivite

Seskiterpen kumarinler üzerindeki ilk antileishmanial testler 2007 yılında 48 saatlik inkübasyondan sonra *Leishmania major promastigote*'lara karşı umbelliprenin ve galbanik asidin inhibitör aktiviteleri saptandığı zaman gerçekleştirilmiş, hem umbelliprenin hem de galbanik asidin *L. Major promastigote*'ların büyümesini engellediği ortaya çıkmıştır. Umbelliprenin 17,1 µM'lik bir IC₅₀ değer ile dikkate değer bir aktivite gösterirken, galbanik asit 164.8 µM'lik IC₅₀ değer ile promastigotlara karşı zayıf inhibitör aktivite göstermiş, *F.szowitsiana* köklerinin ekstresi ise 11.8 µg/mL'lik bir IC₅₀ değeri göstermiştir [27].

Günümüz çalışmasında, katalizör olarak Ho³⁺ doped CoFe₂O₄ nanopartiküller kullanılarak toplam 12 yeni 3-(3-(1-H-indol-3-il)-3-fenil propanoil)-4-hidroksi-2H-kromen-2-on türevleri dizayn edilip, sentezlenmiş ve potansiyel antileishmanyel ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bileşenlerin bir kısmı, standart sodyum stiboglukonat (IC₅₀=490.00 ug/mL) ile karşılaştırıldığı zaman önemli antileishmanyel aktiviteye (IC₅₀=95.50,95.00 ve 99.00 ug/mL) sahip olduğu görülmüş, hidroksi toluen (IC₅₀=16,5 ug/ml) ve askorbik asit (IC₅₀ =12,8 µg/ml) standartları ile kıyaslandığında ise iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir. Moleküler docking çalışmaları yapıldıktan sonra, 13 a ve 13d bileşenlerinin pteridine redüktaz 1 enzimini önleme potansiyeline sahip olduğu görülmüş, farmakokinetik parametreleri umut verici sonuçlar göstermiştir ve sentezlenen bileşenlerin hiçbiri Lipinski'nin 5 kuralını bozmamıştır [141].

Antiöstrojenik aktivite

Lee SH ve Jangn HD'ın yapmış olduğu çalışmada skoparonun antiosteoporotik etkisi değerlendirilmiş ve skoparon, güçlü bir hücrel antioksidan kapasite göstermiştir. Skoparonun c-junN-terminal kinaz (JNK)/ekstre ile iyonda ve kafeinsiz asit fosfataz (TRAP) ekspresyonunda baskılanmış katepsin K ve tartar dirençli nükleer faktör-κB ligandı (RANKL) kaynaklı osteoklast reseptörünün reseptör aktivatörünü inhibe ettiği bulunmuştur. Skoparon, NADPH (nikotinamidadinilükleotid fosfat) oksidaz1'i azaltıp (Nox1) ekspresyonunu ve aktivasyonunu, tümör nekroz faktörü reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF6) - cSrc-fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3k) sinyal yolağı oluşturup ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri sisteminin bozulmasını önlemiştir. Skoparon süper oksidaz dismutaz 1 (SOD1) ve katalazın (CAT) ekspresyonunu arttırmıştır. Skoparonun RANKL'a bağlı

osteoklast farklılaşması üzerindeki inhibe edici etkisinin, Nox1 ekspresyonunu inhibe ederek ROS ve süperoksidasyon üretimini baskılayıcı etkisinden olduğu düşünülmektedir [142].

Antiallerjik aktivite

Cnidium monneieri meyvelerinden izole edilen ostolün, kontakt dermatit ile deri anaflaksisi üzerinde antiallerjik etkili olduğu kanıtlanmıştır [143].

Y.H. Choi ve G.H. Yan *in-vitro* olarak, skoparonun mast hücrelerinde IgE-aracılı alerjik yanıtı azalttığını göstermiştir. Skoparon, antinitrofenil IgE ile uyarılan sıçan peritoneal mast hücrelerinden (RPMC) histamin salımını doz bağımlı olarak azaltmış, RPMC'de tümör nekroz faktörü- α ve interlökin-6 gibi sitokinlerde pro-inflamatuar ekspresyonu ve salgılanmasını azaltmıştır. Skoparonun oral alımı, sıçanlarda pasif kütanoz anaflaksiyi inhibe etmiştir. Skoparon ile ön tedavi, kalsiyum alımını ve p38 mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) aktivitesini inhibe etmiş, RPMC'de I κ B α fosforilasyonunu baskılayarak nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) p65 altbirim translokasyonunu bloke etmiştir. Bu bulgular alerjik hastalıklarda skoparonun etkili terapötik ajan olarak kullanılabilceğini işaret etmektedir [144].

Hepatoprotektif aktivite

Skoparonun farelerde D-galaktozamin (D-GaIN)/ lipopolisakkarit (LPS)-kaynaklı fulminant (ani gelişen) hepatik yetmezlik üzerinde koruyucu etkilerini ve moleküler mekanizmalarını inceleyen çalışmada, skoparonun D-GaIN/LPS kaynaklı karaciğer hasarını TLR-aracılı inflamatuvar yolağın inhibisyonu ile azalttığı görülmüştür. Fulminant hepatik yetmezlik, farelerde intraperitoneal D-GaIN (800 mg/kg)/LPS (40 μ g/kg) ile oluşturulmuş, fareler, D-GaIN/LPS uygulamasından 1 saat önce intraperitoneal skoparon ile tedavi edilmiş, D-GaIN/LPS uygulaması mortaliteyi, serum aminotransferaz aktivitesini ve toll benzeri reseptör 4 (TLR4) protein ekspresyonunu belirgin olarak artırmış ve bu artışlar skoparon tarafından azaltılmıştır. D-GaIN/LPS uygulaması, primer yanıt gen 88 protein ekspresyonu miyeloid diferansiyasyonunu, p38 fosforilasyonunu, ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazı ve c-Jun N-terminal kinazı, nükleer faktör κ B ve fosforile c-Jun'un nükleer protein ekspresyonunu ve serum tümör nekroz faktörü- α ve interlökin-6 düzeylerini belirgin olarak

arttırmış ve bu artışlar skoparon tarafından azaltılmıştır. İnterferon protein ekspresyonunun toll-reseptör-ilişkili aktivatörünün artmış düzeyleri, interferon düzenleyici faktör 3 fosforilasyonu (IFN) ve D-GaIN/LPS uygulanmış farede serum IFN- β düzeyleri skoparon tarafından azaltılmıştır. Skoparon, TLR aracılı inflamatuvar yolağın inhibisyonu ile D-GaIN/LPS ile indüklenen karaciğer hasarını zayıflatmıştır [145].

Ünlü Çin tıbbi bitkisi olan Yinchenhao'nun (*Artemisia annua L.*) önemli bileşeni skoparon hepatit ve karaciğer rahatsızlıklarının önlenmesi ve tedavisinde umut vaatmektedir [146].

Artemisia capillaris herba'dan elde edilen skoparon karaciğer transplantasyonunda iskemik hasarı azaltabilmektedir [147].

Zosima absinthifolia ekstresi ve kumarin (+) - kolumbianadin ve (-) - deltoin, CCl₄ ile uyarılan farelerde hepatotoksosite testinde, potansiyel hepatoprotektif ve anti-inflamatuvar etkiler açısından değerlendirilmiştir. Lipopolisakkarit üretiminde TNF- α inhibisyonu ile THP-1 stimüle makrofajlarını uyarmıştır. Hem *Zosima absinthifolia* ekstresi, hem de kumarinler ALT / AST düzeyleri ve histopatolojik muayene ile teyit edilen hepatoprotektif aktivite göstermiştir [148].

Kumarin (1,2-benzopiron) ve kumarin türevleri, eskuletin (6,7- dihidroksi kumarin), skoparon (6,7-dimetoksi kumarin) ve 4-metilumbelliferon (7-hidroksi-4- metil) tarafından Sprague-Dawley farelerinde karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etki araştırılmıştır. Hepatik yaralanmada, oksidatif stres için lipid peroksidasyon üretimi, malondialdehit (MDA), antioksidan enzimlerin aktiviteleri superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) değerlendirilmiştir. Gamma glutamil transpeptidaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH) hepatik hasarın biyolojik göstergesi olarak plazma içinde incelenmiştir. Dikkate değer bir şekilde, karbontetraklorüre (CCl₄) maruz farelerin karaciğerinde MDA aktivite seviyelerinin yüksek, SOD ve CAD aktivite seviyelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. CCl₄ uygulaması, serum içinde LDH ve GGT seviyelerini arttırmıştır. Eskuletin (30 mg kg⁻¹,oral) ve skoparon (35 kg⁻¹,oral) ile farelerin ön tedavisi önemli derecede MDA seviyelerinde düşüşü ve SOD ve CAD'deki artışı önlerken, 4-metil umbelliferon (35 mg kg⁻¹) ve kumarin (30 mg kg⁻¹), serum enzimlerinde artışa karşı hiçbir etki göstermemiştir. Serumda azaltılmış LDH ve GGT düzeyleri, eskuletin

ve skoparonunun oksidatif stresin önlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir [149,150].

Aşırı yağlı gıdalarla beslenmiş farelerde hepatik steatoz ve lipid metabolizması üzerinde kestane iç kabuk ekstresinin (CISE) etkileri değerlendirilmiş, CISE uygulanan farelerde hepatik triaçilgliserol ve plazma lipid seviyelerinde önemli bir şekilde azalma olduğu görülmüştür. Lipojenik genler SREBP-1c, FAS, ACCs, ACAT ve HMG-CoA için mRNA salınım seviyeleri, CISE verilen farelerde azalmıştır. ($p < 0.05$) CISE, FAS ve HMG-CoA redüktaz aktivitesini bastırılmış ve CPT aktivitesini arttırmıştır. CISE'nin aktif bileşenini belirlemek için CISE'nin fraksiyonlarına ayrılmış, skoparon ve skopoletin izole edilmiştir. Skoparon ve skopoletini ihtiva eden CISE'nin hepatik steatoz üzerinde inhibitör etkisi, aşırı yağlı gıdalarla beslenmiş farelerde yağ asidi oksidasyonu artışı ve lipid sentez supresyonu sonucu olabilmektedir. CISE, karaciğer yağlanmasını önlemeye fayda sağlayabilmektedir [151].

Antiastımatic aktivite

Tavşan plazmasında skoparonun farmakokinetiği, Silica C18 kullanılarak geliştirilen yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Skoparonun 2,0 veya 3,6 mg/kg'lık dozda intravenöz uygulanmasının akabinde plazma konsantrasyonunun zaman çizelgesinin açık iki bölmeli modele uyduğu tespit edilmiştir. AUC değerleri doz bağımlı olarak artmıştır. Ortalama $t_{1/2}$ değerleri, yarılanma ömrünün dozdan bağımsız olduğunu göstermiştir. Tavşan plazmasında skoparonun dağılımının ve eliminasyonunun nispeten hızlı olması, skoparonun sprey inhalerleri tarafından kolaylıkla uygulanabileceği ve ilişkili yan etkilerin az olduğunu düşündürmektedir. Fang ve arkadaşlarının laboratuvar çalışmaları, skoparonun trakeal düz kasları önemli derecede rahatlattığını göstermiştir. Skoparonun izole edilmiş kobay trakeal düz kasındaki hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyonlarını doğrudan düşürdüğü bildirilmiştir [152].

Diğer aktiviteler

Merkezi sinir sistemi üzerinde angelisinin sedatif ve hipnotik özelliklere sahip olduğu, 4-metil-7- hidroksi-8-piperidinin ise uyarıcı olduğu tespit edilmiştir [25, 28].

Fungus, *Aspergillus flavus* tarafından üretilen toksik kumarinler, aflatoksin karsinojenik aktiviteye sahiptir [25].

Ovaryumu çıkarılmış sıçanların uteruslarında yapılan bir çalışmada 3-fenilkumarin (kumestrol)in östrojenik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür [3].

Thanakha (*Hesperethusa crenulata* L.) ağaç kabuklarından izole edilen marmesinin, UVA ışınlarını (320-380 nm) absorbe etmek için doğal bir UVA filtresi olarak yararlı olabileceği gösterilmiştir [153].

Fitoaleksinler oksijenli kumarin türevleridir ve bitkilerde mantar enfeksiyonu, fiziksel hasar, kimyasal yaralanma veya patojenik bir işleme yanıt olarak üretilirler [22]. Özellikle furano- ve piranokumarinlerin bitki koruyucu rolü vardır ve sık sık stres koşullarında, kendiliğinden fitoaleksin olarak biyosentez edilirler. Fitoaleksinler, çeşitli biyotiklere (Bakteriler, virüsler, mantarlar, larves) ve inorganiklere (metal iyonları, herbisitler, deterjanlar, vs.) yanıt olarak bitkiler tarafından sentezlenir. Fitoaleksinlerin ortak özelliği, bakteri, böcek ve virüs gibi istilacı maddeleri inhibe etmek veya yok etmektir [154-156].

Skoparon üretimi, özellikle *C. limon* meyveleri aşılandıktan sonra incelenen tüm tür ve çeşitlerde gözlenmiştir. *P. digitatum*'a karşı Turunçgil meyvelerinin savunma mekanizmalarına flavanonlar, flavonlar, polimetoksiflavonlar (fitoantisipin) ve skoparon (fitoaleksin) güçlü etki göstermektedir [157].

Kumarinler, düşük konsantrasyonlarda, bitki büyümesini teşvik eden maddeler ile sinerjik aktivite gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda ise bitki büyüme hormonlarının antagonistleri olarak hareket ederek bitki büyümesini inhibe eder. Yüksek konsantrasyonlarda psoralen ve 8- metoksipsoralen, mutajenik maddelerdir [25].

(+) marmesinin depolama esnasında patojenlere karşı büyük bir rol oynadığına dair kanıtlar gösterilmiştir, (+) marmesin karanlıkta psoralenlerden en az 100 kat daha büyük antifungal aktiviteye sahiptir [158].

2.2.6. Kumarinlerin endüstriyel kullanımı ve kullanılışları

Benzopiranlar içinde kumarinleri ve flavonoidleri bulunduran bir grup bileşendir. Bu bileşenler sebzelerde, meyvelerde, tohumlarda, fındık, çay, kahve ve şarapta bulduklarından benzopiranlara gıdaca maruz kalmak oldukça önemlidir ve ortalama Batı tarzı beslenmenin günde 1 g karışık benzopiranlar ihtiva ettiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle bu bileşenlerin farmakolojik ve terapötik özelliklerinin yıllardır neden araştırıldığını anlamak zor değildir [27].

Kumarin, kokusundan ötürü başta endüstri olmak üzere geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tatlandırıcı ve parfüm fiksatorü dahil lavanta gibi doğal yağların kokusunu arttırıcı, tütünl  ürünlerin tat ve kokusunu stabilize edici, boya ve lastiğın kokusunu maskeleyici ve poroziteyi azaltmak için elektroplate olarak kullanılmaktadır, ayrıca nikelin parlaklığını arttırmaktadır [21].

Kumarinin doğal ve sentetik birçok türevi vardır ve ekonomik önem arz etmektedir. 3,4-dihidroksikumarin çokça parfüm endüstrisinde kullanılır. 6-metilkumarin, lezzet artırıcı olarak, 7-hidroksikumarin güneş koruyucu ve floresan parlaticılarda kullanılmaktadır (Çizelge 2.2).

7-hidroksi kumarin türevleri, florojenik enzim substratları, 7-amino- 4-metilkumarin, 4-metil- umbelliferon ve diğer kumarin türevleri lazer boyaoları olarak kullanılmaktadır. Bu türevlerden en önemli türev, 4-hidroksikumarindir ve dikumarol ve varfarinin öncüsüdür, ikisi de vitamin K antagonistleridir. Aminometil kumarin asetik asit (AMCA) antikorların ve lektinlerin işaretlenmesi için kullanılan floresan bir işarettir [21].

AMCA (aminometil kumarin asetik asit) proteine birleştirildiği zaman, UV absorpsiyon piki 355 nm çıkmıştır, bu yeni pik önceden kullanılan antikor tanımları üzerinde AMCA'nın birçok avantajını göstermiştir. Bu yüzden AMCA, birçok doku bileşenlerinin lokalizasyonunun tanımı olarak kullanımını kolaylaştıran özelliklere sahiptir: Floresans izotiyosiyanat ile kıyaslandığında fotostabildir, nötr PH ya da daha aşağıda maksimum floresansa sahiptir, şekillenen bileşenler izoelektrik noktada çok az ya da hiç değişiklik göstermezler. İyi bir kontrast gösterir ve otoflorosans ortaya çıkmaz. Fotobleaching'e karşı dayanıklıdır. AMCA fluoresansının özellikleri hemen hemen 4-metilumbelliferonun

özellikleri ile aynıdır ve çok sayıda oluşmuş florojenik enzim substrat bölünmesini şekillendirir ve iyi belgelenmiş florometrik prosedürler mevcuttur [21].

Çizelge 2.5. Kumarin ve Bazı Türevlerinin Endüstriyel Kullanımı ve Toksisiteleri [21]

Bileşik	Toksisite	Uygulamaları
Kumarin	LT	Tatlandırıcı Sabitleştirici Lezzet stabilizatörü Gıda katkı maddesi Koku maskeleyici Elektroplate
4-Hidroksikumarin	Antikoagülan	Dikumarol ve varfarin üretimi
Varfarin	Antikoagülan	Rodentisit
3,4-dihidroksikumarin	LT	Parfüm endüstrisi
6-Metilkumarin	Fotoallerjen	Lezzet arttırıcı

Çizelge 2.5. (devam) Kumarin ve Bazı Türevlerinin Endüstriyel Kullanımı ve Toksisiteleri [21]

7-Hidroksikumarin	LT	Güneş perdeleri Floresan parlaticı
4-metilumbelliferon	LT	Lazer boyası
Aminometil kumarin asetik asit (AMCA)	LT	Floresan etiketi
Flavon- 8- asetik asit	LT	Kanser tedavisi

LT = toksisite ile ilgili sınırlı bir kanıt.

Kumarinin birçok türevleri antikoagülan, tümörstatik ve immünostimülatör özellik gösterir ve ilaç olarak kullanılır [21].

Çizelge 2.6. Yapılarına göre kumarin türevi bileşiklerin kullanımı [22]

1	Basit kumarin	Kumarin	Antienflamatuar
		Eskuletin	Anti-enflamatuar, Antikanser, Antiadipojenik, Antioksidan, Nöroprotektif
		Ostole	Antibakteriyel, Antifungal, Antikanser, Antikonvülzan, Antioksidan
		Novobiosin	Antibakteriyel
		Kumermisin	Antibakteriyel
		Chartreusin	Antibakteriyel, Antitümör, Antikanser
		Fraksin	Antiadipojenik, Antioksidan
		Umbelliferon	Antitüberküloz
		Fraksidin	Antiadipojenik Antihiperglisemik
		Phellodenol A	Antitüberküloz
		Eskulin, fraksetin	Antiadipojenik
2	Furano kumarin	İmperatorin	Anti-enflamatuar, Antibakteriyel, Antifungal, Antiviral, Antikanser Antikonvülzan
		Psoralen	Antifungal, Antitüberküloz
		Bergapten	Antitüberküloz [90]
		Metoksalen	Sitokrom P450 inhibitörü
3	Dihidrofurano kumarin	Anthogenol	Antibakteriyel
		Marmesin, rutaretin	Antitüberküloz [90]
4a	Linear furanokumarin	Grandivittin	Antibakteriyel
		Agasyllin	Antibakteriyel
		Aegelinol benzoat	Antibakteriyel
		Ksanthyletin	Antitüberküloz
4b	Açısal furanokumarin	Inophyllum A, B, C, E, P, G1 ve G2	Antiviral
		Calanolide A, B, F	Antiviral
		(+)Dihydrocalanolide A,B Pseudocordtolide C	Antiviral
5	Bikumarin	Dikumarol	Antikoagulan

2.2.7. Kumarinin diğerk potansiyel kullanımları

Kumarinin 6-hidroksi kumarin (6-OHC) gibi bazı türevleri fotoalerjik özelliklere sahiptir, deri yüzeylerindeki lekelerin 6-OHC ile doldurulduğu ve spesifik periyotlarda 300-360 nm UV maruziyetteki fotomaksimizasyon testi değerlendirildiğinde, bölgede kırmızı kabartının gelişmesi fotoalerjik özelliği olduğunu göstermektedir. Kanserin foto dinamik tedavisi, uygun dalga boyunda ışığa duyarlı ilaç ve ışık kombinasyonu kullanılarak tümör hücrelerini yok eden tedavi metodudunda, ışık, ilaçla absorbe edilir ki, fotokimyasal yollarla çevresindeki hücreye toksisite oluşumuna yol açar. Işığa duyarlı olarak sınıflandırılan bu ilaçlar, oksijen singlet ya da serbest radikal oluşumunu içerir ve membran yıkımına yol açar. Bu yıkım ışığa duyarlı ilaç tepkisinin sonucudur. Kumarin ve 7-OHC, ışığa duyarlı değildir. Kumarin, Libya'da leprosi ve herpesli hastaların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. [21]

2.2.8. Kumarinlerin toksisiteleri

Kumarinin metabolizması ve toksisitesi, babun karaciğer biyopsisinde lizozomal değişikliklere ve bromsülfalin atılım testine dayalı olarak araştırıldığında, bromsülfalin atılım testinin sonuçları ekskresyonun erkeklerde değil ama dişilerde uzadığını ve üç ay sonra normale döndüğünü göstermiştir. Histokimyasal lizozomlar, normalden daha büyüktür ve iki doz seviyesinde (50 ve 100 ppm seviyelerinde) tedavi periyodundan sonra karaciğerde dağılmıştır, bu sonuçlar hepatotoksik etkinin göstergesidir [21].

Kumarinin faredeki hepatotoksik etkisini göstermek için birçok hepatik mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz bileşenleri (etilmorfin-N-demetilaz, 7-etoksikumarin 0-demetilaz ve sitokrom P-450 içeriği), fareye verilmiş, bu farede enzimlerin inhibe edildiği görülmüştür [21].

Glukoz 6-fosfatazın, 14-C kumarine maruziyeti takip edilerek araştırılmıştır. Glutatyon, miktarı için spektrofotometrik metot ayrıca kumarinin reaktif ürünlerini metabolize edip etmediği ve ekskresyon öncesi glutatyonla birleşip birleşmediğini araştırmak için kullanılmıştır. Glutatyon seviyeleri, 2 saat içerisinde azalmıştır, glukoz 6-fosfataz aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Üretilen reaktif metabolit miktarını detoksifiye etmek için hepatosit yeteneğini azalttığı fikri ortaya atılmıştır. Bu reaktif metabolitler, doku makro

moleküllerine bağlı olabileceğinden sentrilobüler karaciğer nekrozu varlığını açıklamaktadır [21].

2.2.9. Furanokumarinlerin kullanım alanları

Furanokumarinler sensibilibite özelliklerinden ötürü yaygın olarak kullanılır. Bazı hidroksi- ve metoksikumarinler UV ışını absorblama yeteneğine sahiptirler ve anti-UV filtreleri ile güneş koruyucu kremlerin bileşimine ilave edilirler [43,187-189].

Furanokumarinler, oral ve topik olarak uygulandığında deride pigmentasyonun arttığı görülmüştür. Bu özelliklerinden dolayı az dozlarda vitiligo tedavisinde kullanılmışlardır [4,5].

Ksantotoksin, uzun dalga boyundaki UV ışık varlığında, psoriazisin fotokemoterapisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [5].

Bergapten (5-metoksipsoralen) ve metoksalen (ksantotoksin=8-metoksipsoralen=8-MOP) psoriazis ve vitiligo gibi dermatolojik hastalıkların fotokemoterapisinde [PUVA(psoralen+UV-A) tedavisi] kullanılır. 20-40 mg furanokumarin tek dozda ve dahilen alınır, iki saat sonra güneş ışığına veya uzun dalga UV radyasyonuna (UVA, 320-380 nm) maruz kalmak gerekir. UVA ya maruz kalma ilk seferde 10-15 dakika olmalı, süre yavaş yavaş uzatılmalıdır. Genellikle 20 uygulamada netice elde edilir. PUVA tedavisi hamilelere, çocuklara, böbrek ve kalp yetersizliği olanlara uygulanmamalıdır [4]. PUVA tedavisi sindirim sistemi rahatsızlıklarına, katarakt ve kansere (cilt ve akciğer) sebep olabilir [4-6].

Bergapten derinin bronzlaşmasında kullanılan güneş yağının bileşimine girmektedir. Güneş losyonlarının bileşimine giren bergamot yağı gibi doğal ürünler, melanositlerin sayısını ve melanin üretimini artırır, cildin tipine, nem miktarına, ürünün tatbiki ile güneşe çıkma zamanı arasında geçen süreye, güneşte kalma süresine ve sıklığına bağlı olan fototoksik reaksiyonlara sebep olabilirler [4].

İyi koşullarda saklanmayan besinlerde üreyen *Aspergillus flavus*' ların meydana getirdiği ve hepatotoksik etkileri nedeniyle besin zehirlenmelerine neden olan karsinojenik etkili aflatoksinler furanokumarin türevi bileşiklerdir [3].

Furanokumarinler, bitkilerde doğal büyüme regülatörüdür. Ayrıca herbisid ve fungusid olarak kullanılırlar [134-137].

2.2.10. Furanokumarinlerin fototoksitesisi

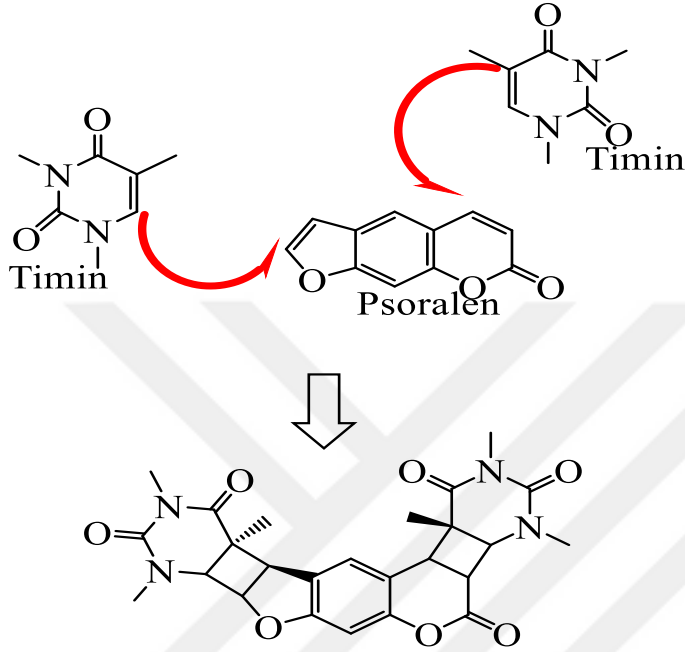
Fotoaktif furanokumarinlerden bergapten, 5-8- metoksipsoralenin deri pigmentasyonunu önleyen UV'nin DNA yıkımının bir işareti olduğu kanıtlandığından, güneş yağlarının kullanımı büyük ölçüde azaltılmıştır. "Berloque dermatis"den sorumlu doğal bergamot yağı artık parfümlerde kullanılmamaktadır [159].

Psoriasis (Sedef hastalığı) nüfusun yaklaşık olarak %2'sini etkileyen yaygın deri hastalığıdır. Düzensiz ilerlemesi, tedaviye değişken yanıtlar vermesi ve ilaçların yan etkilerinden dolayı psoriasis tedavisi sıklıkla zordur. Bu kompleks hastalığın uygun tedavi şekli araştırılırken tarama metodunun (screening) etkinliği oldukça önemlidir. *Ammi majus*'dan izole edilen linear furanokumarin ksantotoksin, ilk kez 50 yıl kadar önce vitiligo tedavisinde kullanılmıştır. Dermatologlar A. Lerner ve T. Fitzpatrick sedefin tedavisini daha ileriye taşımıştır. 320-400 nm aralığında uzun dalga ultraviyole ışın tedavisi öncesi oral ve topikal sedef ilaçlarının uygulanması günümüzde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kontrol edilebilir yan etkileri ve iyi karakterize edilmesi ile psoriasisın elverişli ve etkin tedavisi oluşturulmuştur. PUVA, keratonositlerin hızlı artışını bastırır. PUVA uygulamasında bulantı, kusma, şiddetli kaşıntı ve kızarıklık gibi advers etki durumunda, ksantotoksin bergapten ile yer değiştirebilir. Ksantotoksin, UVA'ya maruz kalmadan önce yüzeye uygulanır. Işın tedavisinden daha kısa olması ve gastrointestinal hepatik ya da diğer sistemik yan etkilerin oluşmaması bu uygulamanın avantajlarıdır. Trimetilpsoralen ve türevlerinin lenfosit çoğalmasını ksantotoksinden çok daha fazla önlediği ve psoriasisın en güvenilir ve en etkili tedavisinden biri olduğu anlaşılmıştır [160].

Angular furanokumarinler, geometrik şekillerinden dolayı uzun süre çapraz bağlı duramazlar. Oluşan bağlantı miktarı, derinin ışığa duyarlılığına bağlıdır. 4, 6, 4'-trimetilangelisinin çapraz bağları arttırdığı görülmektedir. *Artemia salina* (deniz karidesi) toksisite testinde, linear furanokumarinler, bergapten, psoralen ve ksantotoksin fototoksik aktivite gösterirken, basit kumarin olan umbelliferone hiçbir fototoksisite göstermemiştir [160].

A. salina metodu eş zamanlı toksisite çalışmalarında, psödaninin iridasyon zamanı dikkate alınmadan larvalara karşı toksik olduğu görülmüştür [160].

Fototoksik kumarinler 3,4 veya 4',5' pozisyonlarından ya da her iki pozisyondan, DNA'nın pirimidin halkasına bağlanır. Hem 3,4 hem 4', 5' pozisyonlarından bağlandığında nükleik asitlerin baz çiftlerine (pirimidin halkalarına) çapraz bağla bağlanarak genomda lezyon oluşturmaktadır [4,5].



Şekil 2.12. Fototoksik kumarinlerin DNA'nın pirimidin halkasına bağlanması

Yapı-aktivite çalışmaları neticesinde doğal furanokumarinler arasında en yüksek fototoksik aktivite psoralende görülmüş bunu sırasıyla ksantotoksin, bergapten ve angelisin izlemiştir. Fotosensitizer aktivite için furanokumarin yapısı gereklidir. Ancak aktivite açısıl furanokumarinlerde az, linear furanokumarinlerde ise oldukça yüksektir. 5. veya 8. konumlarda ya da her iki konumda birden hidroksil fonksiyonu varsa aktivite görülmez fakat bu hidroksil gruplarından sadece bir tanesi metillendiğinde aktivite tekrar ortaya çıkar. 4., 5'. veya 8. konumdaki metil sübstitüenti aktiviteyi azaltmaz fakat 3 veya 4' konumdaki sübstitüsyon aktiviteyi azaltmaktadır. 5. ve 8. konumlardaki metoksil grupları da aktiviteyi azaltmaktadır. 3, 4, 5 ve ilave olarak 8. konum kovalen bağlar yapar ve psoralen yapısına sübstitüentler ilave olduğunda molekülün dokulara absorpsiyonu engellenmektedir [3].

2.3. *Petroedmondia* Türleri Üzerinde Yapılmış Olan Çalışmalar

Daha önce bu türde yapılmış çalışmaya rastlanmamış olup, en yakın tür olan *Smyrniopsis aucheri* üzerinde yapı aydınlatma çalışmaları yapılmıştır. Smyrindol, smyrindiol,

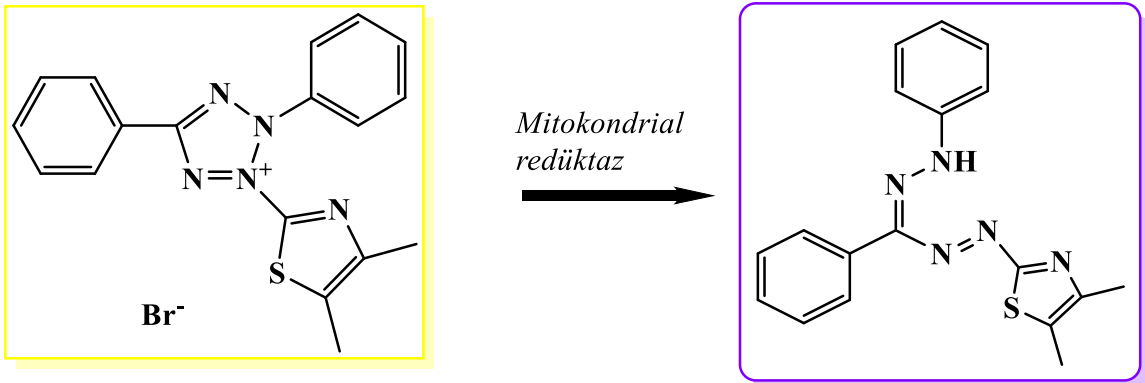
smyrniorin, smyrioridin, nachmyrin, smyrindiolose'in yapıları tayin edilmiştir [10, 12-14].

S. aucheri'nin uçucu yağının antimikrobiyal özelliği araştırılmış ve incelenen yağ güçlü kandidasidal aktivite göstermiştir [11].

2.4. Sitotoksik Aktivite Tayini

Suda çözünür tetrazolyum tuzlarının (örn., MTS, XTT ve MTT) formazanlarına biyolojik olarak indirgenmesi genel olarak hücre "redoks aktivitesi" nin bir göstergesi olarak görülür. Tepkime esas olarak mitokondriyal enzimler ve elektron taşıyıcılarına atfedilir. Bununla birlikte, MTT indirgemesi aynı zamanda birtakım nonmitokondriyal enzimler tarafından katalize edilebilir [161].

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] yöntemi sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik bir test yöntemidir. MTT indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak adsorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formaza indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmekte ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir. Sitotoksite arttıkça formazan oluşumu azalmakta, yani renk açılmaktadır [162].



Şekil 2.13. MTT boyasının mitokondri üzerindeki etkisi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızda kullandığımız *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. bitkisi Şanlıurfa ili Siverek ilçesi Karacadağ yöresinden 16/06/2013 tarihinde meyveli iken toplanmıştır.



Resim 3.1. *Petroedmondia syriaca* bitkisinin doğadaki görünüşü

Prof. Dr. Ahmet Duran tarafından teşhis edilen bitkinin herbaryum örnekleri Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda (A. Duran 9616) kayıtlıdır.



Resim 3.2. Çalışmada kullanılan kök ve meyve

Deneylerde standart bileşik olarak kullandığımız bergapten ve skoparon Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Petroedmondia syriaca bitkisinin meyvaları ve parçalara ayrılan kökü oda sıcaklığında gölgede kurutulmuştur.

Bitki materyali kurutma işlemi ardından toz edildikten sonra artan polaritede çözücüler kullanılarak tüketilmiştir.

3.2.1. Ekstraksiyon

Bitkinin kökü ve meyvesi ayrı ayrı önce petrol eteri ile sonra diklorometan ve en son metanol ile oda sıcaklığında maserasyon yöntemi ile tüketilmiştir. Tüketme sonrası süzgeç kağıdından süzülen ekstreler 40°C'de rotavapor yardımı ile yoğunlaştırılmıştır. Yoğunlaştırılan metanol ekstresi 90:10 su:metanol karışımında çözüldükten sonra etil asetat ile tüketilmiştir.

Uygun incelikte toz haline getirilmiş 100 g kökten 2,45 g petrol eteri ekstresi, 0,32 g diklorometan ekstresi ve 10,90 g metanol ekstresi elde edilmiştir. Metanol ekstresinden etil asetat ile tüketme sonucu elde edilen etil asetat ekstresi 0,62 g ve kalan sulu metanollü ekstre miktarı ise 10,07 g'dır. Ekstreler Çizelge 3.1 'de verilen çözücü sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisine uygulanmıştır.

Uygun incelikte toz haline getirilmiş 10 g meyveden, oda sıcaklığında maserasyon yöntemi ile 0,1853 g petrol eteri ekstresi, 0,1961 g diklorometan ekstresi ve 1,1253 g metanol ekstresi elde edilmiştir. Metanol ekstresinden etil asetat ile tüketme sonucu elde edilen etil asetat ekstresi 0,0526 g ve kalan sulu metanollü ekstre miktarı ise 1,0727 g'dır. Ekstreler Çizelge 3.1'de verilen çözücü sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisine uygulanmıştır.

Kök ve meyveden elde edilen ekstreler üzerinde sitotoksik aktivite çalışmaları yapılmıştır.

3.2.2. Ayırma ve saflaştırma için kullanılan yöntemler

İnce tabaka kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisi yönteminden, ekstrelerin incelenmesi, kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonlardan benzer olanların birleştirilmesi, elüsyonun bittiğinin anlaşılması, preparatif ince tabaka kromatografisi için uygun çözücü sisteminin geliştirilmesi ve izole edilen bileşiklerin saflıklarının kontrolü için yararlanılmıştır.

İTK şartları:

Plak:	Silika jel 60 F254 adsorbanı ile kaplanmış 0,20 mm kalınlığında hazır alüminyum plak (Merck No: 5554)
Çözücü sistemi:	(Bkz. Çizelge 3.1)
Revelatör:	%10'luk anisaldehit çözeltisi
Laboratuvar sıcaklığı:	21°C

Örnekler uygun çözücü ile çözülerek kromatografi plakalarına ince cam kapiler yardımıyla uygun konsantrasyonda ve plağın alt kenarından 1,5 cm yükseklikteki start çizgisine 1 cm aralıklarla tatbik edilmiş tamamen kurutulduktan sonra içinde 1 cm yükseklikte çözücü sistemi bulunan ve atmosferi çözücü sistemi buharı ile doyurulmuş kromatografi tankında developpe edilmiştir. İTK analizi deneysel olarak saptanmış çözücü sistemleri ile yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Kromatografi tankında developpe edilen plaklar developman işleminden sonra tanktan alınmış ve kurumaya bırakılmıştır. Plaklar kurduktan sonra önce UV 254 nm ve 366 nm dalga boylu ışık altında incelenmiş daha sonra %10'luk anisaldehit çözeltisi püskürtülerek 120°C'deki etüvde 5 dakika bekletilmiştir.

Çizelge 3.1. İTK ve Preparatif İTK analizlerinde kullanılan çözücü sistemleri

No	Çözücü sistemi	Oranı
S1	Sikloheksan: Etil asetat	90:10
S2	Sikloheksan: Etil asetat	70:30
S3	Sikloheksan: Etil asetat	10:10

Kolon kromatografisi

Hazırlanan ekstrelerin fraksiyonlandırılmasında ve elde edilen ana fraksiyonların daha ileri fraksiyonlandırılma işleminde kolon kromatografisi yönteminden yararlanılmıştır.

Kolon kromatografisi şartları:

Kolon:	4 cm çapında 100 cm uzunluğunda cam kolon 2,5 cm çapında 40 cm uzunluğunda cam kolon 1,5 cm çapında 40 cm uzunluğunda cam kolon
Adsorban:	Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare) Silika jel 60 (0,04- 0,063 mm, Merck No: 9385)
Çözücü sistemi:	(Bkz.Çizelge 3.2)
Laboratuvar sıcaklığı:	21° C
Elüsyon hızı:	4 ml/ dk

Fraksiyonlandırılacak ekstreler için uygun adsorbanlar tercih edilmiş ve uygun boyutlarda cam kolonlar kullanılmıştır. Ana kolonda kullanılan Sephadex™ LH-20 elüsyona başlamak için kullanılacak çözücü sistemi ile şişirildikten sonra kolona doldurulmuştur. Fraksiyonlandırılacak ekstre kolona yüklenmiş ve elüsyon işlemine başlanmıştır. Toplanan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisine uygulanmıştır. Kromatogramlar incelenerek benzer leke veren fraksiyonlar birleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Kolon kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri

No	Çözücü sistemi	Oranı
S4	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:4:1
S5	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:3:2
S6	n-Hekzan: Diklorometan: Metanol	7:2:3
S7	n-Hekzan: Etil asetat	100:0 → 50:50

Preparatif ince tabaka kromatografisi (PİTK)

Kolon kromatografisinden elde edilen ve ince tabaka kromatografisinde birden fazla leke içerdiği belirlenen fraksiyonlardaki bileşiklerin ayrımı için preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

PİTK şartları:

Plak:	Silika jel 60 F 254 (Merck No: 5744) ile kaplanmış 20X20 cm boyutunda cam plak
Çözücü sistemi :	(Bkz.Çizelge 3.1)
Revelatör:	%10'luk anisaldehit çözeltisi
Laboratuvar sıcaklığı:	21°C

Ayrımı yapılacak fraksiyon uygun çözücü ile belirli konsantrasyonda çözülmüş, kapiler yardımıyla plakın alt kenarından 1.5 cm yükseklikteki start çizgisine şerit halinde tatbik edilmiş ve kurutulduktan sonra içerisinde 1 cm yükseklikte çözücü sistemi bulunan ve atmosferi çözücü sistemi buharı ile doyurulmuş olan kromatografi tankında developpe edilmiştir. Developman sonrası tanktan alınan plaklar kurutulduktan sonra UV 254 nm ve 366 nm dalga boylu ışık altında incelenmiş ve gerektiğinde bileşiklerin bulunduğu yeri belirlemek için plakların iki yanı kapatılarak orta yerine aşağıdan yukarıya revelatör püskürtülmüştür. Bileşiklerin bulunduğu yerler plak üzerinde işaretlenerek adsorban bantlar halinde kazanmış ve toz edilmiştir. Adsorbandan bileşikleri ayırmak için kloroform: metanol (90:10) çözücü sistemi kullanılmıştır. Bu çözücü sistemi ile elüsyon, süzme ve yoğunlaştırma işleminden sonra İTK ile saflık kontrolü yapılmıştır.

Spektroskopik yöntemler

Uygulanan kromatografik yöntemlerle saf halde elde edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması için NMR¹ spektrumları alınmış ve verilerin değerlendirmesinde mevcut

¹ NMR spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez laboratuvarında çekilmiştir. NMR spektrumlarını çeken Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER'e teşekkür ederiz.

literatür bilgilerinden yararlanılmıştır. Cihaza ait teknik bilgiler Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. NMR spektrumu için kullanılan cihaz

Yöntem	Cihaz
¹ H NMR	Varian mercury 400 MHz FT- NMR Spektrometre

3.2.3. Sitotoksik aktivite tayini

Sitotoksik aktivite tayini MTT yöntemi ile yapılmıştır. Ekstrelerin sitotoksik aktivite tayini Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında yapılmıştır². Daha sonra elde edilen bileşiklerin aktivite tayini Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında yaptırılmadığı için Karachi Üniversitesi'nde (International Center for Chemical and Biological Science-Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research)³ yaptırılmıştır.

Ekstrelerin sitotoksik aktivite tayini:

Ekstreler RPMI-1640 besiyerinde çözülerek stok çözelti ve bu çözülden de sıvı besiyeri ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda (1, 5, 25, 100, 250 µg/ml) test çözeltisi hazırlanmıştır. MTT, PBS (fosfat tampon çözeltisi) içinde 5 mg/ ml olacak şekilde çözülerek süzölmüştür. Ekstraksiyon tamponu olarak %45'lik N,N dimetil formamid içinde çözülmüş %23 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (pH 4.7) hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plaklara 50 µl besiyeri içine MCF-7 hücresi ekimi yapılmış ve üzerine 50 µl test çözeltileri (her konsantrasyon için ayrı ayrı ve 4 kuyucuk olarak) eklenmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı şartlarda saf ekstre eklenmeden inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. 48 saat sonunda kuyucuklara 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 80 µl tampon çözeltisi (SDS) ilave

² Sitotoksik aktivite tayininin Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında yapılmasını sağlayan Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya teşekkür ederiz.

³ Sitotoksik aktivite tayininin Karachi Üniversitesi'nde yapılmasını sağlayan Prof. Muhammed İqbal CHOUDHARY'ye teşekkür ederiz.

edilmiş ve 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 12 saat sonra 540 nm'de absorbanans değerleri belirlenmiştir [163].

Hücre inhibisyonu Eş. 3.1'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

% inhibisyon= $[1 - (\text{test çözeltisinin bulunduğu kuyucukdaki ortalama canlı hücre sayısı} / \text{kontrolün bulunduğu kuyucukdaki canlı hücre sayısı}) \times 100]$ (3.1).

Test uygulanan çözeltinin etkinliği % inhibisyon oranına göre değerlendirilmektedir. Hatok ve arkadaşlarına göre % inhibisyon oranı %75 ve üzerinde olduğunda hücreler test çözeltisine çok duyarlı, %50 ile %75 arasında olduğunda orta derecede duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Biz de çalışmamızda aktivite görülen en düşük konsantrasyon olan 25µg/ml konsantrasyonda %50 ve daha yüksek oranlarda inhibisyon sağlayan ekstre, ve fraksiyonlardaki bileşiklerin aktiviteden sorumlu olacağını düşünerek değerlendirme yaptık.

Kök materyalinden elde edilen ekstrelerin gösterdiği biyolojik aktiviteye baktığımızda petrol eteri ve diklorometan ekstresinin hemen hemen eşit ve diğer ekstrelerden çok yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle aktiviteden sorumlu bileşik/bileşiklerin belirlenebilmesi için çalışmaya petrol eteri ve diklorometan ekstresi üzerinden devam edilmiştir.

Meyve materyalinden elde edilen ekstrelerde ise kayda değer bir aktivite görülmediği için üzerinde izolasyon çalışması yapılmamıştır.

Bileşiklerin sitotoksik aktivite tayini:

MCF-7 hücre hatları %10 fetal bovine serum (Sigma, St. Louis,USA) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma, St. Louis,USA) besiyerinde 37C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri içerisinde 8x10⁴ MCF-7 hücresi olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroyuğa uygulanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra her kuyucuğa 50 µg/mL konsantrasyonda ekstre veya 50 µM konsantrasyonda saf madde ya da referans madde ilave edilmiştir. 48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir kuyucuğa 0,5 mg/mL konsantrasyondaki MTT den 200 µL ilave edilmiş ve 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO'da çözülmüş ve mikroyuğ

okuyucu (Spectra Max plus, Molecular Devices, CA, USA) kullanılarak 570 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanılmıştır.

Hücre inhibisyonu Eş. 3.2'de verilen formüle göre hesaplanmıştır.

% İnhibisyon = $100 - \left[\frac{\text{numunenin absorbası} - \text{negatif kontrol absorbanısı}}{\text{pozitif kontrol absorbanısı} - \text{negatif kontrol absorbanısı}} \times 100 \right]$ (3.2).

%50 ve daha fazla inhibisyon gösteren, bileşiklerin IC₅₀ değerleri EZ-fit5 software kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.4. Biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma çalışmaları

Kök petrol eteri ve diklorometan ekstresi üzerinde yapılan çalışmalar

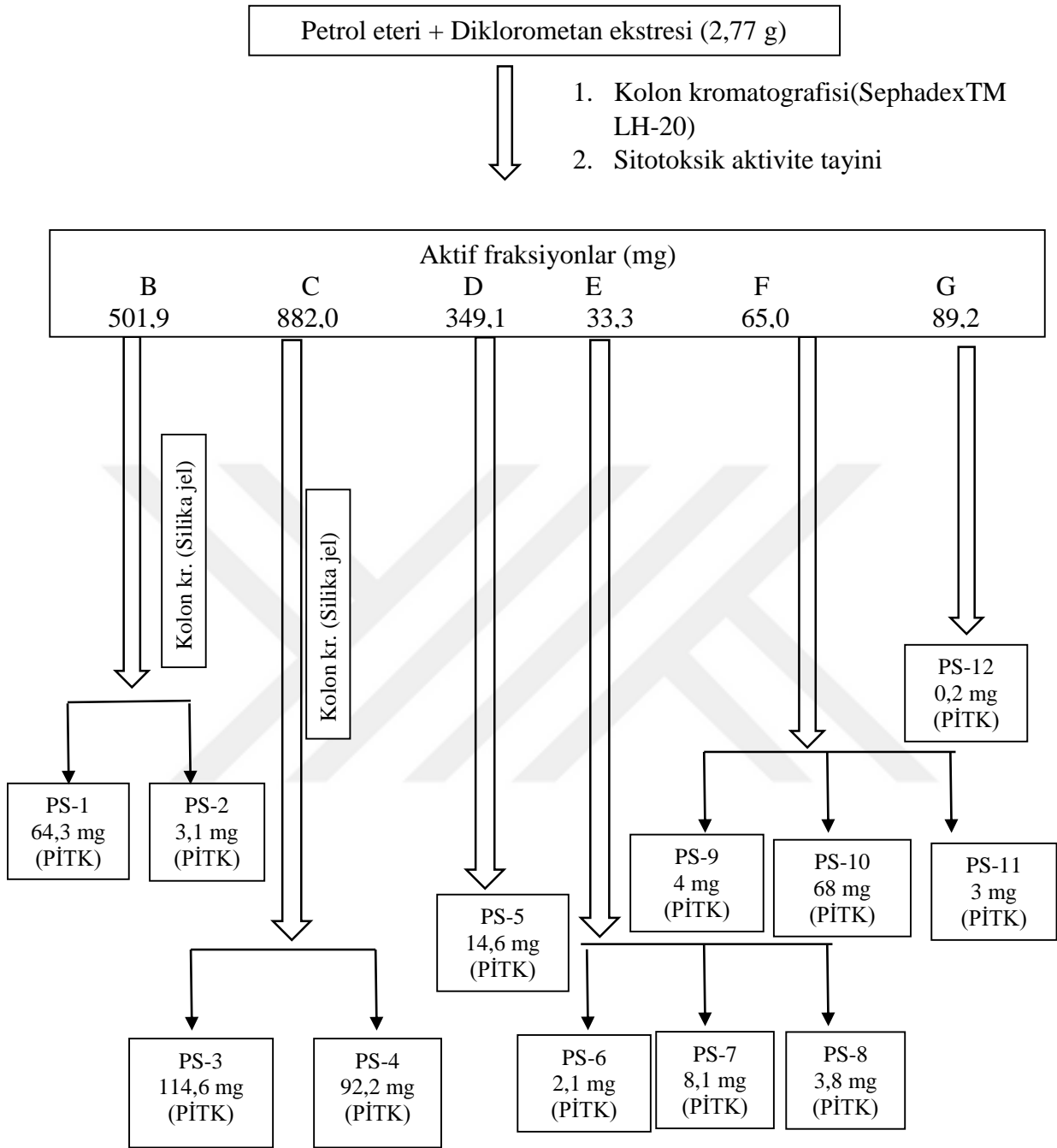
Kök petrol eteri ve diklorometan ekstreleri, 25µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını sırasıyla %77,22 ve %77,12 oranında inhibe ettikleri, İTK kromatogramları incelendiğinde benzer lekeler taşıdıkları görüldüğü için ve ekstre miktarını çoğaltmak amacıyla birleştirilmiştir. 4 cm çapında 100 cm uzunluktaki cam kolona, S4 çözücü sistemi ile şişirilmiş Sephadex™ LH-20, 50 cm yükseklikte doldurulmuştur. 2,77 g petrol eteri ve diklorometan ekstresi S4 çözücü sistemi ile çözündürülmüş ve kolona ilave edilmiştir. S4 çözücü sistemi ile ve 4 ml/dk hızda 10 ml'lik fraksiyonlar alınarak elüsyona başlanmıştır. 40. fraksiyondan itibaren S5 çözücü sistemi ile ve 25 ml'lik fraksiyonlar toplanarak elüsyona devam edilmiştir. 60. fraksiyondan sonra S6 çözücü sistemi kullanılmış ve 50 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlar İTK analizine tabii tutulmuş ve benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlara verilen kodlar ve miktarları çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Çizelgede görülen fraksiyonlar üzerinde sitotoksik aktivite tayini çalışması yapılmıştır. Sitotoksik aktivite görülen fraksiyonlardaki bileşikler izole edilip sitotoksik aktiviteleri tayin edilerek aktiviteden sorumlu bileşikler belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 3.4. Kök petrol eteri ve diklorometan ekstresinin ana kolon fraksiyonları

Fraksiyon	Fraksiyon kodu	Miktarı (g)
1-3	A	0,1552
4-9	B	0,5019
10-24	C	0,8820
25-38	D	0,3491
39-56	E	0,0333
57-68	F	0,0650
68-71	G	0,0892

Sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlar üzerinde yapılan çalışmalar

Ana kolon fraksiyonları üzerinde yapılmış olan sitotoksik aktivite çalışması sonuçlarına baktığımızda 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını B fraksiyonun % 49,58 oranında, C fraksiyonunun % 75,55 oranında, F fraksiyonunun ise % 88,23 oranında inhibe ettiği görülmektedir. D, E ve G fraksiyonları ise 100 µg /ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını %50 ve daha yüksek oranlarda inhibe etmiştir. Fraksiyon miktarlarına baktığımızda C fraksiyonunun aktivite görülen fraksiyonlar içindeki oranı % 45,92, F fraksiyonununki ise % 3,38'dir. En yüksek aktivitenin görülmüş olduğu C ve F fraksiyonundaki bileşiklerin izole edilerek aktivitelerinin saptanması için izolasyon çalışmaları yapılmış ancak bunun yanı sıra bitki üzerinde şimdiye kadar yapılmış olan herhangi bir fitokimyasal çalışmaya rastlamadığımız için 100 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını % 50 ve daha yüksek oranlarda inhibe etmiş olan B, D, E ve F fraksiyonları üzerinde de izolasyon çalışmaları yapılmıştır.



PS-12
0,2 mg
(PİTK)

Şekil 3.1. Sitotoksik aktivite gösteren fraksiyonlarda bulunan bileşiklerin izolasyonu

B Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar

B kodlu fraksiyonda izolasyon ve saflaştırma işlemleri için kolon kromatografisi uygulanmıştır. Silika jel 60 (0,04–0,063 mm, Merck No: 9385) adsorbantı n-hekzan ile süspansiyon haline getirilmiş ve 1,5 cm çapındaki cam kolona 30 cm yükseklikte doldurulmuştur. Yeterli miktarda n-hekzanda çözündürülüp 1 g kolon adsorbantı ilave

edildikten sonra çözücüsünden kurtarılmış olan B kodlu fraksiyon+adsorban karışımı kolona yüklenmiştir. Elüsyon S7 çözücü sistemi ile ve 30 ml'lik fraksiyonlar toplanarak gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlar S1 çözücü sistemi kullanılarak İTK ile kontrol edilmiş, aynı R_f'de leke veren fraksiyonlar birleştirilmiş ve bu fraksiyonlarda bulunan iki bileşiğin izolasyonu için preperatif ince tabaka kromatografisi tercih edilmiştir. S1 çözücü sistemi kullanılarak yapılan PİTK'den alınan bantlar kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilmiş, elüatlar İTK analizine tabi tutulmuş ve tek leke verdikleri görüldükten sonra bu bileşiklerden birine PS-1 (64,3 mg), diğerine ise PS-2 (3,1 mg) kodu verilmiştir.

C Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar

C kodlu fraksiyonda izolasyon ve saflaştırma işlemleri için kolon kromatografisi kullanılmıştır. Silika jel 60 (0,04–0,063 mm, Merck No: 9385) adsorbanı n-hekzan ile süspansiyon haline getirilmiş ve 2,5 cm çapındaki cam kolona 40 cm yükseklikte doldurulmuştur. Yeterli miktarda n-hekzanda çözündürülüp 1 g kolon adsorbanı ilave edildikten sonra çözücüsünden kurtarılmış olan C kodlu fraksiyon+adsorban karışımı kolona yüklenmiştir. Elüsyon S7 çözücü sistemi ile ve 30 ml'lik fraksiyonlar toplanarak gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlar S1 ve S2 çözücü sistemi kullanılarak İTK ile kontrol edilmiş, aynı R_f'de leke veren fraksiyonlar birleştirilmiş ve bu fraksiyonlarda bulunan 2 majör bileşiğin izolasyonu için preperatif ince tabaka kromatografisi tercih edilmiştir. S2 çözücü sistemi kullanılarak yapılan PİTK'den alınan bantlar kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilmiş, elüatlar İTK analizine tabi tutulmuş ve tek leke verdikleri görüldükten sonra bu bileşiklerden birine PS-3 (114,6 mg), diğerine ise PS-4 (92,2 mg) kodu verilmiştir.

D Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar

D kodlu fraksiyon için S2 çözücü sistemi ile preperatif ince tabaka kromatografisi yapılmasının uygun olduğuna karar verilmiştir. D kodlu fraksiyonun majör bileşiğine ait olan bant alınmış, kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edildikten sonra İTK analizine tabi tutulmuş ve saf olduğu anlaşıldıktan sonra elde edilmiş olan bu bileşiğe PS-5 (14,6 mg), kodu verilmiştir.

E Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar

E kodlu fraksiyondaki bileşiklerin izolasyonu için S3 çözücü sistemi kullanılarak preparatif ince tabaka kromatografisi uygulanmasına karar verilmiştir. PİTK plağından 3 bant kazınarak alınmıştır. Bantlar ayrı ayrı kloroform:metanol (90:10) karışımı ile elüe edilmiş ve adsorbanından ayrılan bileşikler saflık kontrolü için S3 çözücü sistemi ile İTK analizine tabi tutulmuştur. Saf olarak elde edilen bileşiklere PS-6 (2,1 mg), PS-7 (8,1 mg) ve PS-8 (3,8 mg) kodu verilmiştir.

F Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar

F kodlu fraksiyonda görülen bileşikleri elde edebilmek için preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. PİTK'de S3 çözücü sistemi kullanılmış ve izole edilen 3 bileşiğin saflık kontrolü İTK ile S3 çözücü sisteminde yapılmıştır. Saf olarak 4 mg ağırlığında elde edilen bileşiğe PS-9, 68 mg olarak elde edilen bileşiğe de PS-10 ve 3 mg olarak elde edilen bileşiğe de PS-11 kodu verilmiştir.

G Kodlu fraksiyon üzerinde çalışmalar

G kodlu fraksiyondan preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemi ile ve S3 çözücü sistemi kullanılarak izole edilen G kodlu fraksiyonun majör bileşiğinin saflık kontrolü İTK ile S3 çözücü sisteminde yapılmıştır. Saf olarak ve 0,2 mg ağırlığında elde edilen bu bileşiğe PS-12 kodu verilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Biyoaktivite Rehberliğinde İzolasyon Çalışması Bulguları

Petroedmondia syriaca bitkisinden elde edilen ekstrelerin, fraksiyonların ve bileşiklerin sitotoksik aktivitesini tayin etmek için MCF-7 hücre hatları üzerinde MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromür] testi uygulanmıştır.

Petroedmondia syriaca bitkisinin kök ekstrelerinden petrol eteri ve diklorometan ekstresi 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını hemen hemen eşit oranda inhibe etmiştir. Etil asetat ekstresinde 100 µg/ml, metanol ekstresinde ise 250 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı inhibisyonu görülmektedir. Meyve materyalinin petrol eteri ve diklorometan ekstresi 250 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı inhibisyonu göstermiştir. (Çizelge 4.1). Kök petrol eteri ve diklorometan ekstrelerinin sitotoksikite grafikleri aşağıda görülmektedir (Şekil 4.1 ve 4.2).

C ve F kodlu fraksiyonların 25 µg/ml konsantrasyonda %50'den daha yüksek oranda inhibisyon gösterdiği Çizelge 4.1'den anlaşılmaktadır. C ve F kodlu fraksiyonların sitotoksikite grafikleri aşağıda görülmektedir (Şekil 4.3 ve 4.4).

A fraksiyonunda hiçbir aktivite görülmezken B, D, E ve G fraksiyonlarında aktivite 100 µg/ml konsantrasyonda başlamaktadır. En aktif fraksiyon ise 25 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda % 88,23 inhibisyon gösteren F fraksiyonudur (Çizelge 4.1).

Aktif olan C kodlu fraksiyondan 2 bileşik (PS-3, PS-4) izole edilmiştir. Bu iki bileşik kök ekstresinden elde edilmiş olan en yüksek aktiviteli bileşiklerdir. Aktif olan F kodlu fraksiyondan ise 3 bileşik (PS-9, PS-10, PS-11) izole edilmiştir. Bu üç bileşikten ikisi (PS-9, PS-10) IC₅₀ değerlerine bakıldığında kök ekstresinin en yüksek etkiyi göstermiş olan bileşikleridir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Ekstre ve fraksiyonların hücre canlılığı % inhibisyon oranları

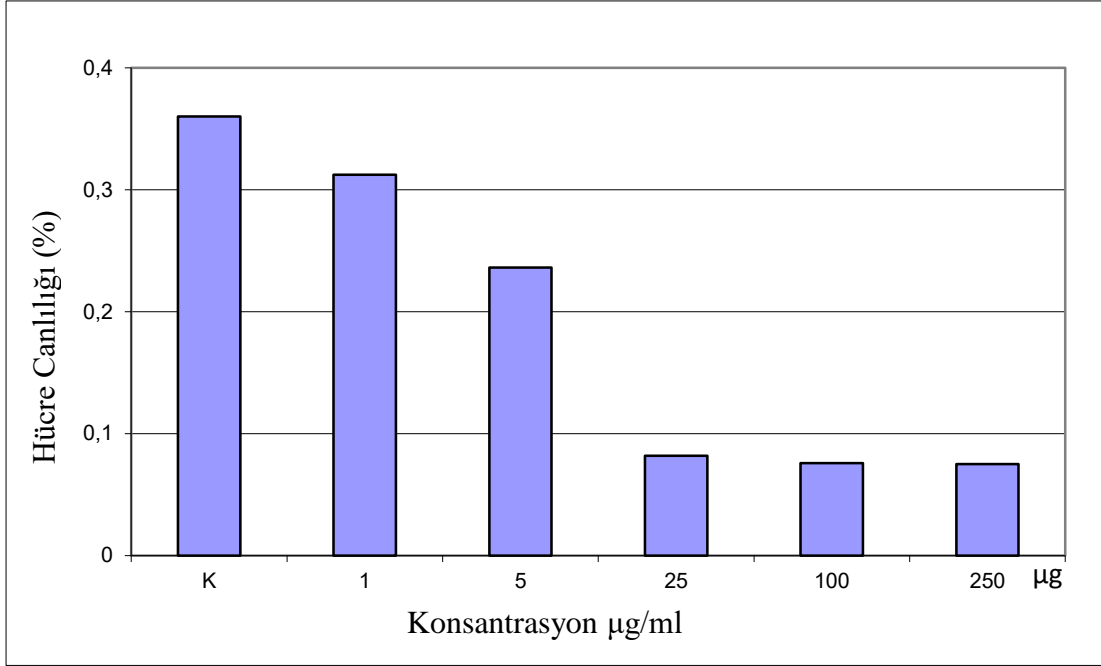
		Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)					% inhibisyon
		1	5	25	100	250	
1	Kök-Petrol eteri	13,26	34,37	77,22	78,96	79,16	
2	Kök-Diklorometan	32,56	36,76	77,12	78,73	78,87	
3	Kök-Metanol	-	7,78	7,15	25,99	53,65	
4	Kök-Etil asetat	13,83	13,60	19,14	53,34	75,32	
5	Meyve-Petrol eteri	-	-	7,35	28,34	56,14	
6	Meyve-Diklorometan	-	-	7,45	28,12	55,45	
	Fraksiyonlar						
1	A	-	-	-	-	-	
2	B	-	21,05	49,58	60,53	52,63	
3	C	7,55	22,56	77,55	85,45	85,44	
4	D	-	8,44	16,64	80,33	80,34	
5	E	-	-	-	78,57	78,57	
6	F	-	8,24	88,23	88,23	88,23	
7	G	2,17	2,17	39,13	50,36	63,63	

Çizelge 4.2. C ve F fraksiyonundan izole edilen bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri

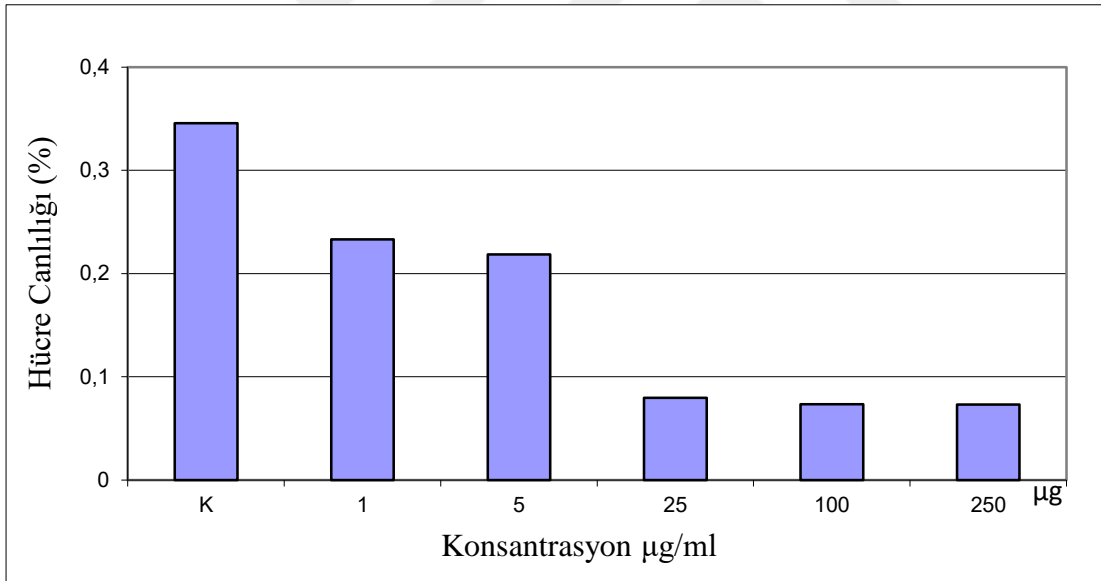
Bileşikler	Konsantrasyon	İnhibisyon (%)	IC ₅₀ +SS (μM)*
PS-3	50 $\mu\text{g/mL}$	38,19	-
PS-4	50 $\mu\text{g/mL}$	100,26	88,93+1.14
PS-9	50 $\mu\text{g/mL}$	100,21	29,32+0,08
PS-10	50 $\mu\text{g/mL}$	76,76	27,91+ 1,2
PS-11	50 $\mu\text{g/mL}$	0,06	-
Doksorubisin	50 $\mu\text{g/mL}$	89,19	0,92+0,1

*%50 ve daha fazla inhibisyon gösteren, bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

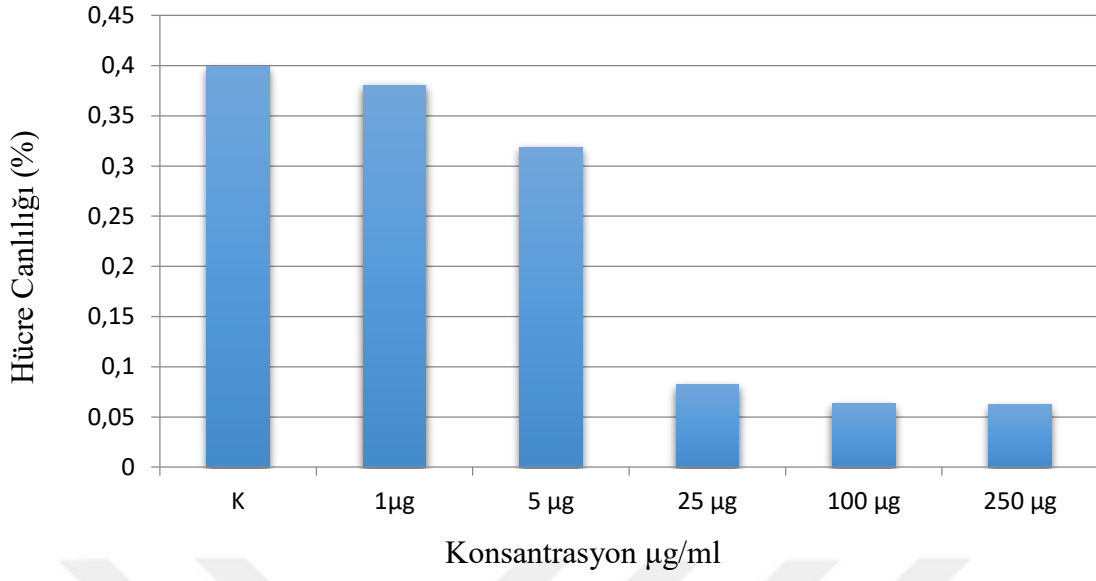
SS: Standart sapma



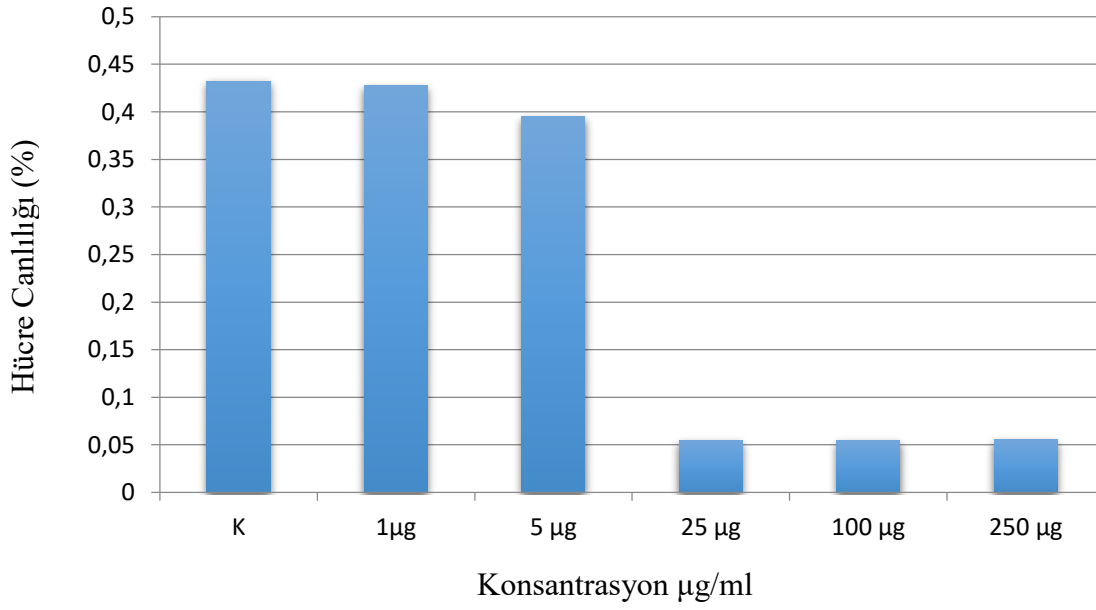
Şekil 4.1. Kök petrol eteri ekstresinin sitotoksosite grafiği



Şekil 4.2. Kök diklorometan ekstresinin sitotoksosite grafiği



Şekil 4.3. C kodlu fraksiyonun sitotoksosite grafiği



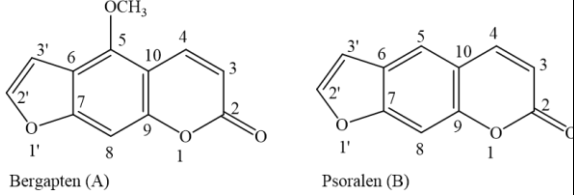
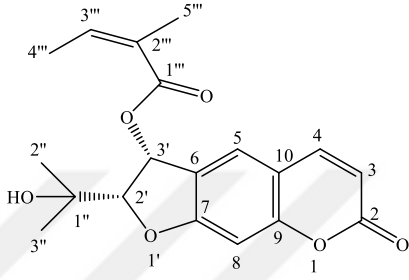
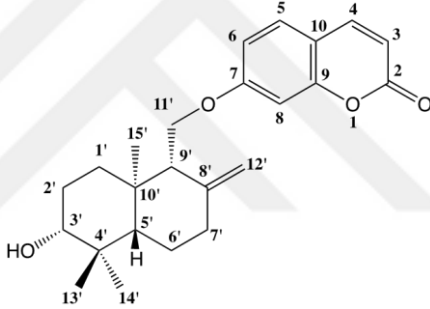
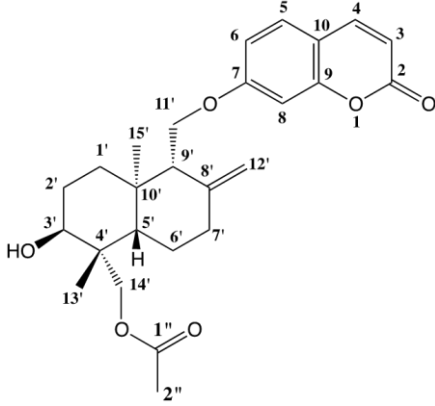
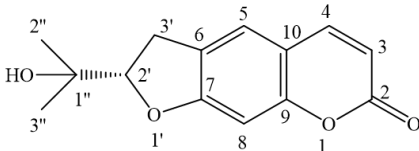
Şekil 4.4. F kodlu fraksiyonun sitotoksosite grafiği

4.2. İzolasyon ile Elde Edilen Bileşiklere Ait Bulgular

Çizelge 4.3. Elde edilen tüm bileşiklerin kodu, adı ve formülü

Bileşğin Kodu	Bileşğin Adı	Bileşğin Formülü
PS-1 kodlu bileşik	3'- α -isobutiriloksi-marmesin asetat	
PS-2 kodlu bileşik	3'- α -angeloiloksi-deltoidin	
PS- 3 kodlu bileşik	Smyrnioidin (3'-angeloiloksi-marmesin asetat)	
PS-4 kodlu bileşik	Deltoidin (Marmesin angelat)	
PS-5 kodlu bileşik	Marmesin Asetat	
PS-6 kodlu bileşik	Skoparon (6,7-dimetoksi-2H-kromen-2-on)	

Çizelge 4.3. (devam) Elde edilen tüm bileşiklerin kodu, adı ve formülü

Bileşğin Kodu	Bileşğin Adı	Bileşğin Formülü
PS-7 kodlu bileşikler	Bergapten (A)+ Psoralen (B)	 <p>Bergapten (A) Psoralen (B)</p>
PS-8 kodlu bileşik	Dezasetil-smyrniordin	
PS-9 kodlu bileşik	Kolladonin	
PS-10 kodlu bileşik	14'-asetoksi-badrakemin	
PS-11 kodlu bileşik	Marmesin	

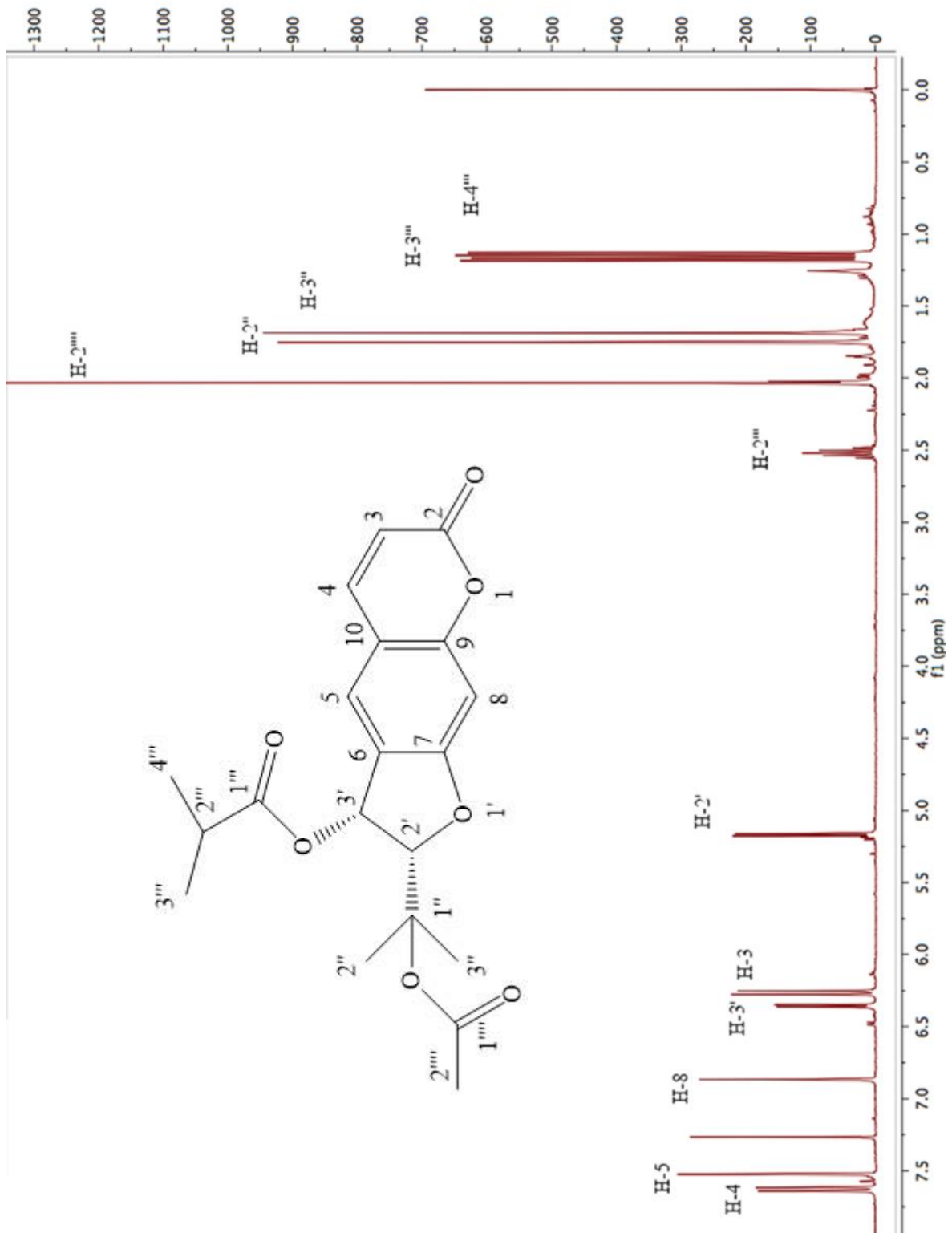
Çizelge 4.3. (devam) Elde edilen tüm bileşiklerin kodu, adı ve formülü

Bileşiğin Kodu	Bileşiğin Adı	Bileşiğin Formülü
PS-12 kodlu bileşik	14'-hidroksi-badrakemin	

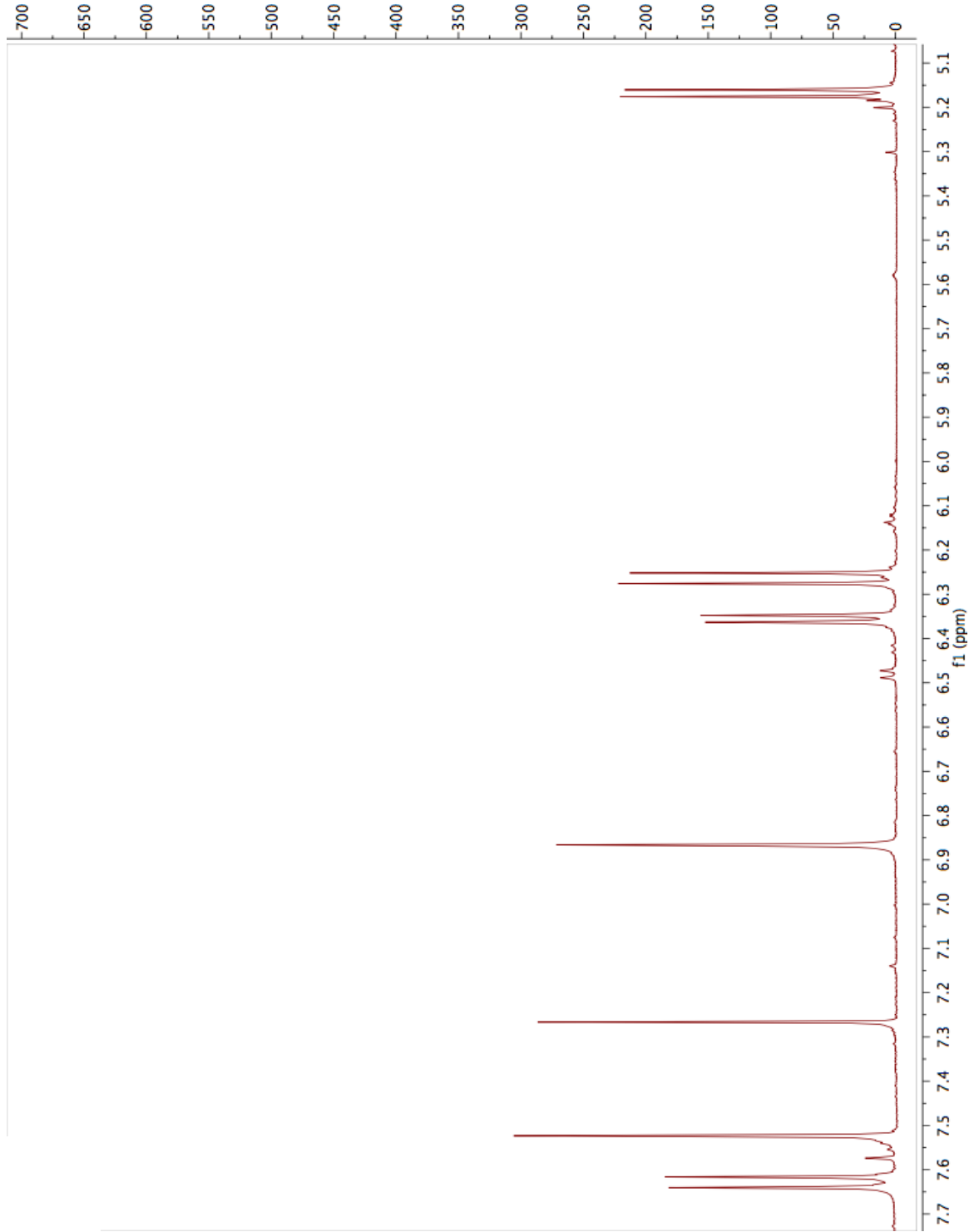
4.2.1. PS-1 kodlu bileşiğe ait bulgular (3'- α -isobutiriloksi-marmesin asetat)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,63 (1 H, *d*, $J=9,7$ Hz, H-4); 7,53 (1 H, *s*, H-5); 6,87 (1 H, *s*, H-8); 6,36 (1 H, *d*, $J=6,4$ Hz, H-3'); 6,26 (1H, *d*, $J=9,7$ Hz, H-3); 5,17 (1H, *d*, $J=6,4$ Hz, H-2'); 2,52 (1H, *sept*, H-2''); 2,03 (3H, *s*, H-2'''); 1,75 (3H, *s*, H-2''); 1,69 (3H, *s*, H- 3''); 1,18 (3H, *d*, $J=7,1$ Hz, H-3'''); 1,14 (3H, *d*, $J=7,1$ Hz, H-4''').

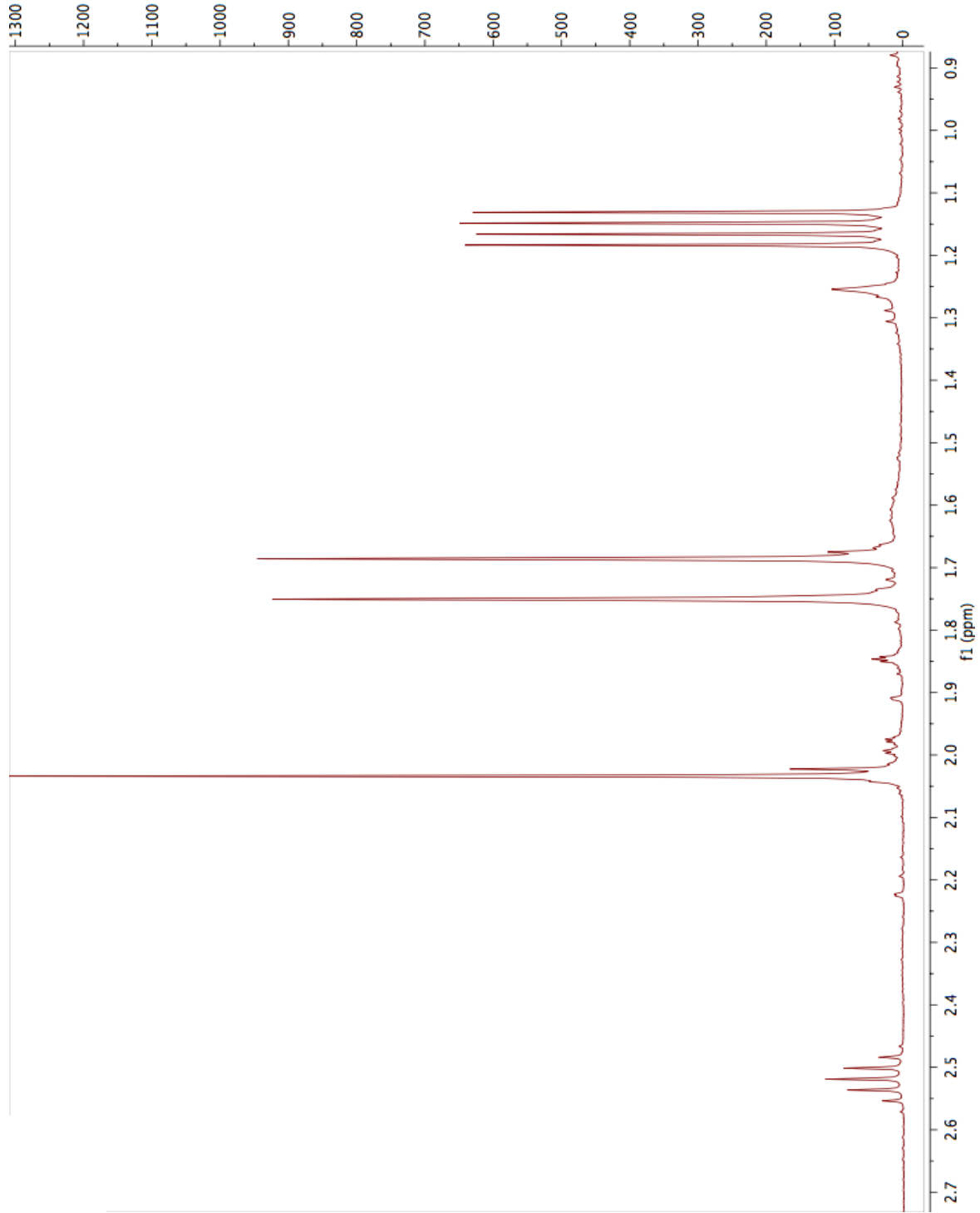
PS-1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunun alt alanında 6,7-disübstitüe kumarin iskeletine ait karakteristik her biri 1H büyüklüğünde δ 7,63 ve 6,26 ppm'de iki dublet ile 7,53 ve 6,87 ppm de birer singlet sinyalleri bulunmaktadır. δ 7,63 ve 6,26 ppm'de gözlenen sinyallerinin aynı olan J değerleri (9,7 Hz) ve iki sinyalinde dublet olması sadece birbirleriyle etkileştiklerini göstermektedir. 3. ve 4. konumlarında substitüent taşımayan bütün kumarinlerde karakteristik olarak görülen bu AB dubletlerinden δ 6,26 ppm'de görülen H-3 sinyali kumarin karbonilinin elektronları çekmesi nedeniyle 3 no'lu karbon üzerinde elektron yoğunluğu artması nedeniyle (perdelenme) daha üst alanda görünür. Elektronların karbonil oksijenine doğru çekilmesi aynı zamanda 4 no'lu karbonun üzerindeki elektron yoğunluğunun azalmasına (perdelenmenin azalması) ve H-4 sinyalinin alt alana δ 7,63 ppm'e kaymasına neden olur. δ 7,53 ve 6,87 ppm'deki birer protonluk singlet sinyalleri sırası ile H-5 ve H-8 protonlarına ait olan sinyallerdir. Proton NMR'ının alt alanında kumarin halkasına ait olan sinyallerin yanı sıra δ 6,36 ppm'de ve biraz daha üst alanda δ 5,17 ppm'de yine bir AB sisteminin sinyalleri olan integrasyonları bir proton değerinde olan iki dublet yer almaktadır, her iki dubletin J değeri 6,4 Hz olup bu sinyaller kumarin halkasına 6. ve 7. karbonlardan bağlı olan dihidrofuran halkasının üzerindeki H-3' ve H-2' protonlarına aittir.



Resim 4.1. PS-1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.2. PS-1 kodlu bileşimin dihidrofuranokumarin iskeletine ait proton sinyallerini gösteren genişletilmiş ¹H NMR alt alan spektrumu



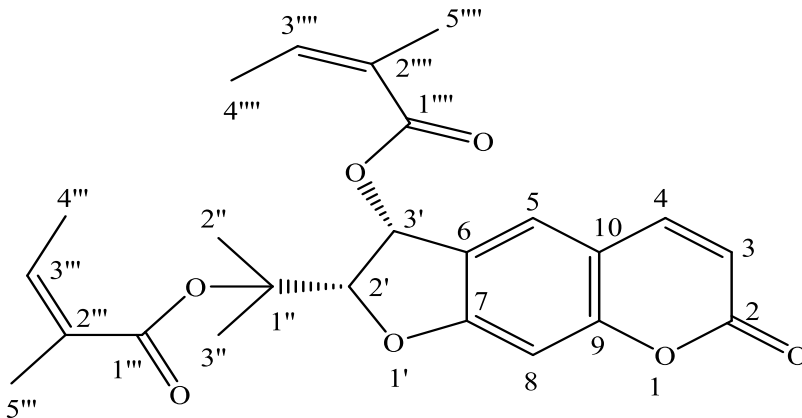
Resim 4.3. PS-1 kodlu bileşğin izopropiloksi yan zinciri ile ester protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR üst alan spektrumu

4.2.2. PS-2 kodlu bileşiğe ait bulgular (3'- α -angeloiloksi-deltoidin)

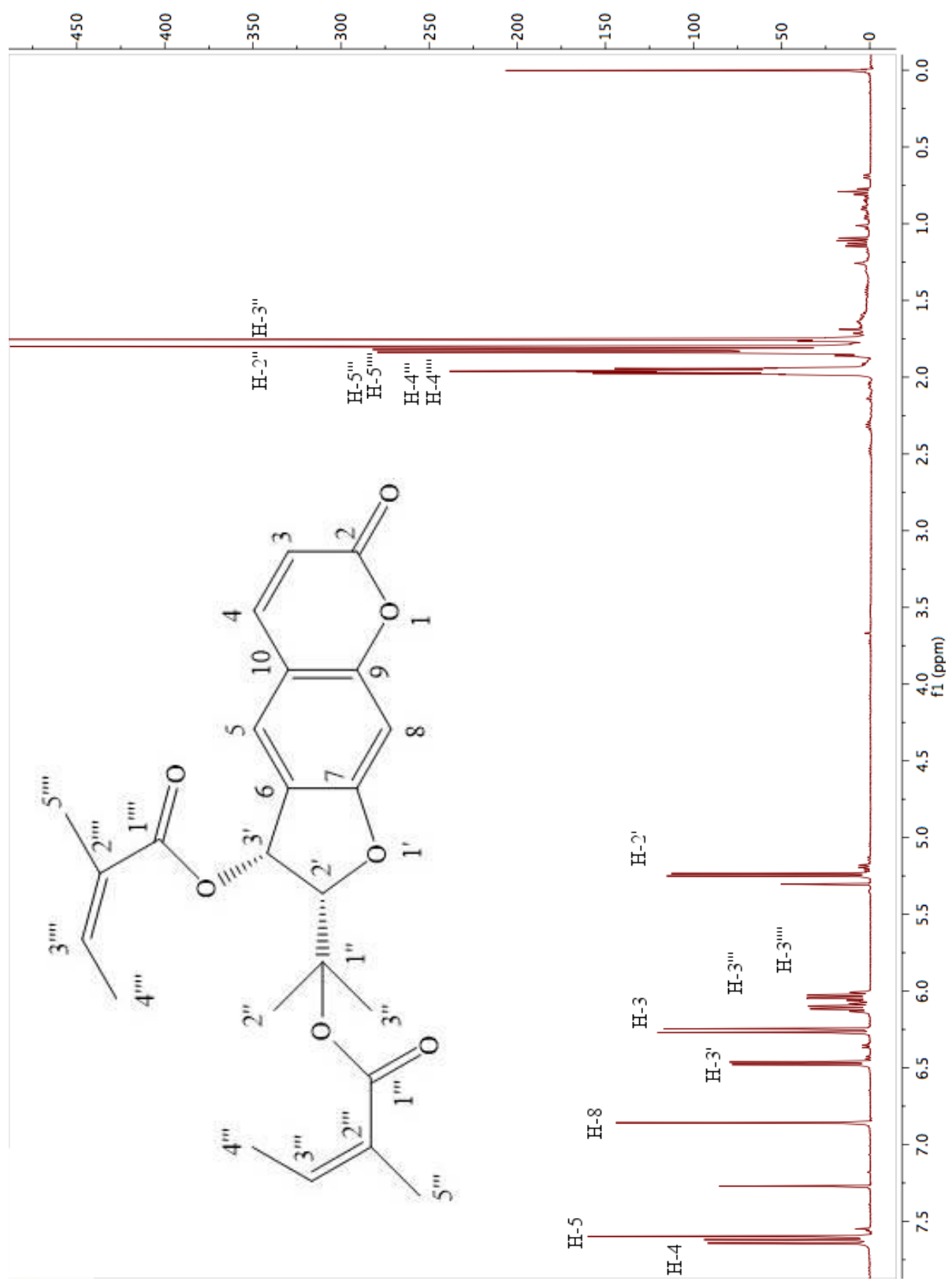
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,63 (1 H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-4); 7,60 (1 H, *s*, H-5); 6,86 (1 H, *s*, H-8); 6,47 (1 H, *d*, $J=6,4$ Hz, H-3'); 6,26 (1H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-3); 6,11 (1H, *qq*, $J=7,4$ Hz ve $J= 1,5$ Hz H-3'''); 6,03 (1H, *qq*, $J=7,4$ Hz ve $J= 1,5$ Hz H-3'''); 5,24 (1H, *d*, $J=6,4$ Hz, H-2'); 1,96 (6H, *m*, H-4''' ve H4'''); 1,84 (3H, *q*, $J=1,5$ Hz, H- 5'''); 1,82 (3H, *q*, $J=1,5$ Hz, H- 5'''); 1,80 (3H, *s*, H-2'' veya H-3''); 1,75 (3H, *s*, H-3''' veya H-2'').

PS-2 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu PS-1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumuna çok benzemektedir. PS-2 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunda PS-1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunda görülen asetil ve isobutiroiloksi ester gruplarının sinyalleri bulunmamaktadır. Bu sinyaller yerine δ 6,11 ve 6,03 ppm'de iki angeloiloksi grubunun 3''' ve 3'''' vinilik protonları ($J = 7,4$ Hz ve $J = 1,5$ Hz, *quartet quarteti*, herbiri 1 H değerinde), δ 1,96 ppm'de 4''' ve 4'''' vinilik metil gruplarının protonları (6 protonluk *multiplet*) ile δ 1,84 ve 1,82 ppm'de 5''' ve 5'''' vinilik metil gruplarının protonları (üçer protonluk *quartet*, $J = 1,5$ Hz) görülmektedir. ^1H NMR spektrumundaki bu farklılıklar PS-2 kodlu bileşiğin 3'- α -angeloiloksi-deltoidin olduğunu kanıtlamaktadır.

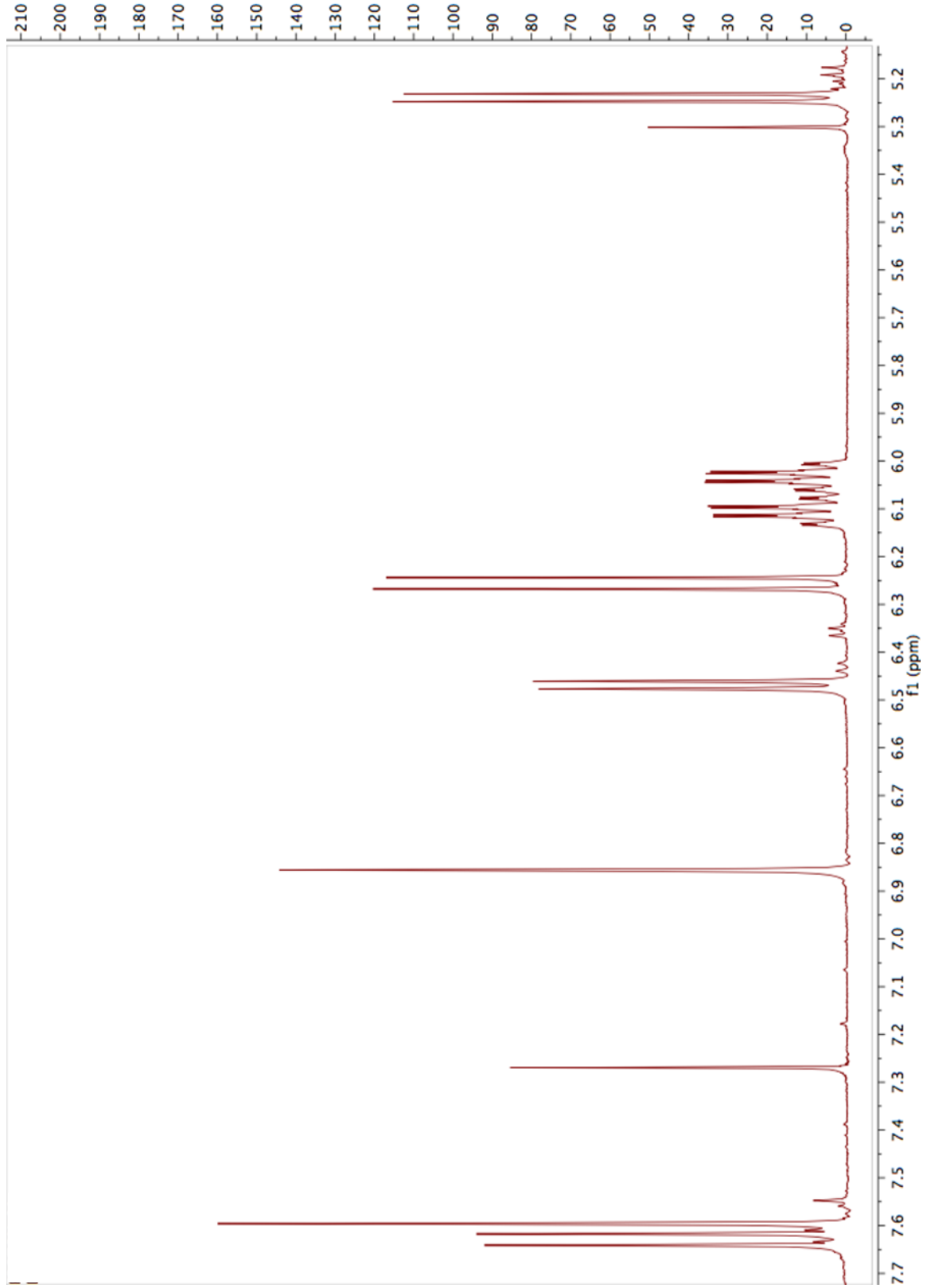
Literatür taramasında bu bileşiğin daha önce izole edilmediği anlaşılmıştır. Bileşik miktarı çok az olduğundan kanıtlayıcı diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşiğin yeniden ve daha fazla miktarda elde edilerek gerekli spektroskopik yöntemlerin uygulanabilmesi için çalışmaya devam edilmektedir.



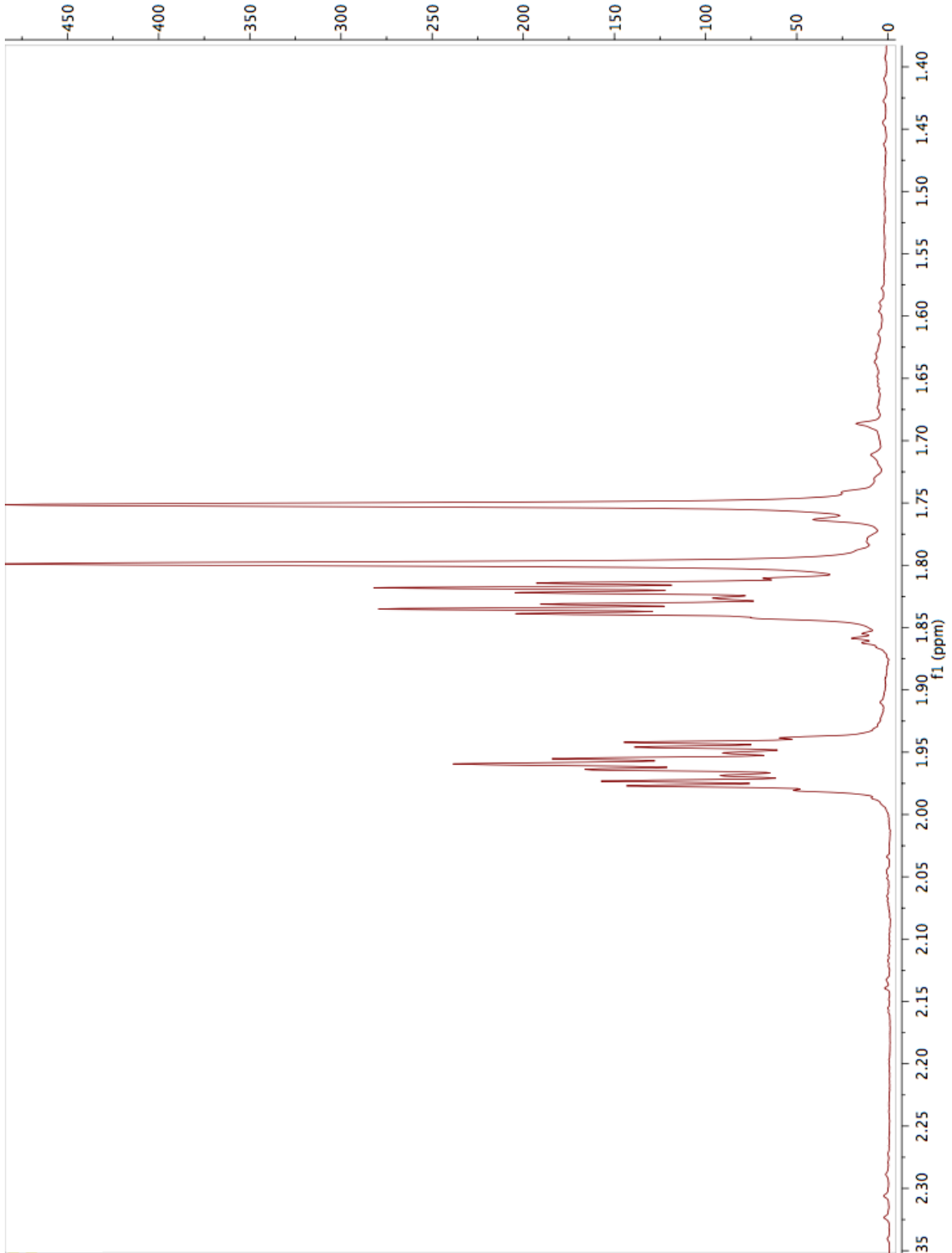
Şekil 4.6. PS-2 kodlu bileşik: 3'- α -angeloiloksi-deltoidin



Resim 4.4. PS-2 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.5. PS-2 kodlu bileşimin 1H NMR spektrumunda alt alanda yer alan H-4, H-5, H-8, H-3', H-3, H-3'', H-3''' ve H-2' protonlarına ait sinyalleri ile CDCl₃ sinyalini içeren genişletilmiş 1H-NMR spektrumu



Resim 4.6. PS-2 kodlu bileşğin ^1H NMR spektrumunda üst alanda yer alan H-4'', H-4''', H-5'', H-5''' ve H-2'' ve H-3'' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

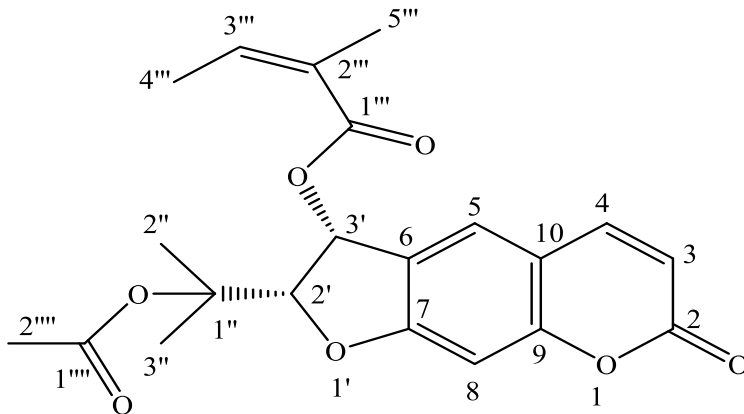
4.2.3. PS-3 kodlu bileşiğe ait bulgular (Smyrnioridin)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,63 (1 H, *d*, $J=9,7$ Hz, H-4); 7,58 (1 H, *s*, H-5); 6,87 (1 H, *s*, H-8); 6,48 (1 H, *d*, $J=6,4$ Hz, H-3'); 6,26 (1H, *d*, $J=9,7$ Hz, H-3); 6,13 (1H, *qq*, $J=7,3$ Hz ve $J=1,5$ Hz H-3'''); 5,19 (1H, *d*, $J=6,4$ Hz, H-2'); 2,02 (3H, *s*, H-2'''); 1,99 (3H, *dq*, $J=7,3$ Hz ve $J=1,5$ Hz, H-4'''); 1,85 (3H, *q*, $J=1,5$ Hz, H-5'''); 1,75 (3H, *s*, H- 2''); 1,68 (3H, *s*, H- 3'').

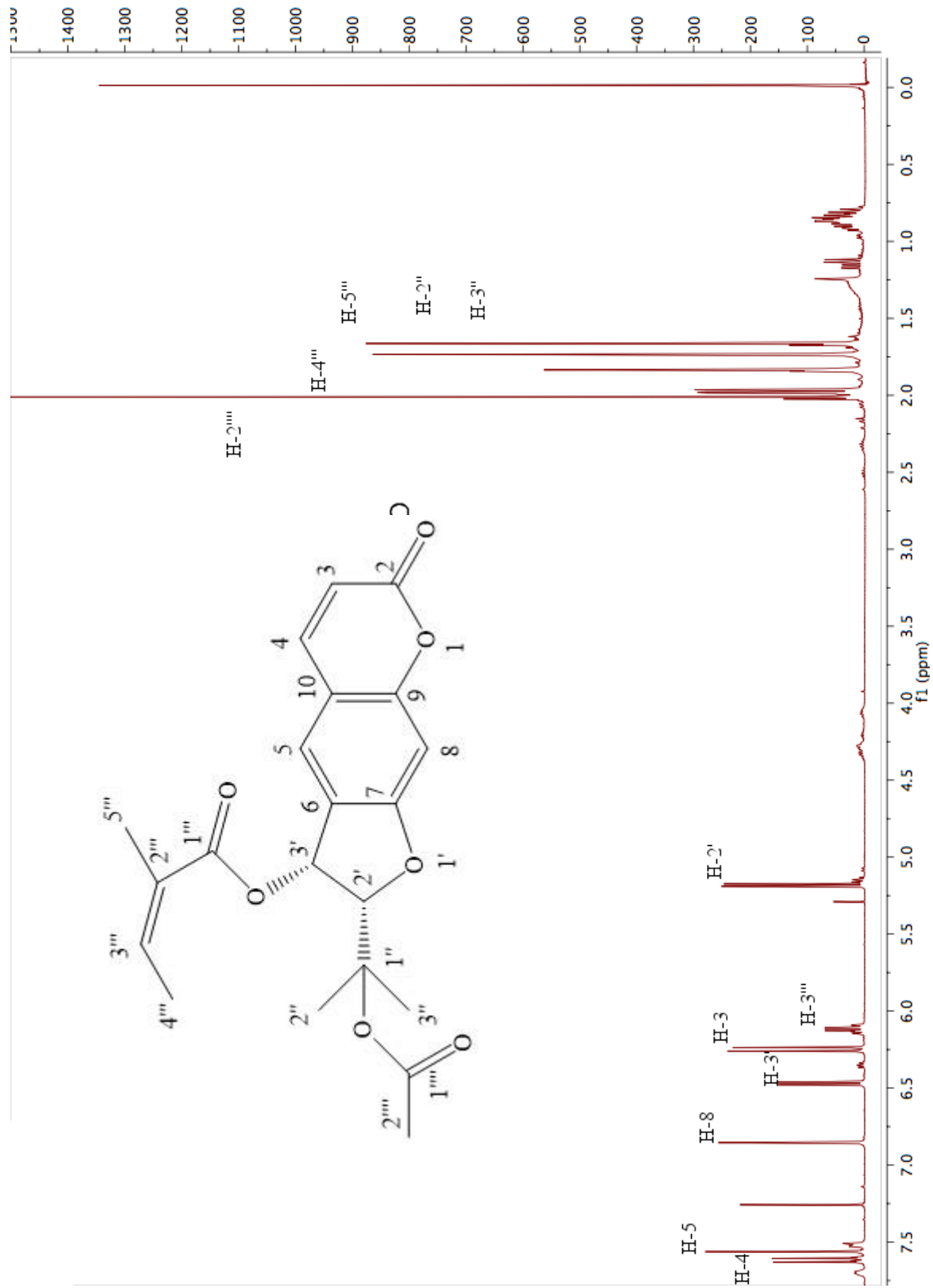
PS-3 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu da PS-1 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumuna çok benzemektedir. δ 2,02 ppm'deki 3 protonluk singlet pik H-2''' asetil metil protonlarına ait olup PS-1 kodlu bileşikte olduğu gibi PS-3 bileşiğinde de asetat esteri varlığını gösterir.

PS-3 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunun PS-1 kodlu bileşikten farkı izopropionat ester grubu sinyalleri yerine angelat esteri sinyalleri içermesi, yani δ 6,13 ppm'de 1 H değerinde kuartet kuarteti bölünmesi gösteren ($J=7,3$ Hz ve $J=1,5$ Hz) H-3''' protonunun sinyali, δ 1,99 ppm'de 3 H değerinde dublet quarteti bölünmesi gösteren ($J=7,3$ Hz ve $J=1,5$ Hz) H-4''' metil protonlarının sinyali ile δ 1,85 ppm'de 3 H değerinde quartet bölünmesi gösteren ($J=1,5$ Hz) H-5''' metil protonlarının sinyali bileşikteki ikinci esterin angelat esteri olduğuna kanıtlamaktadır.

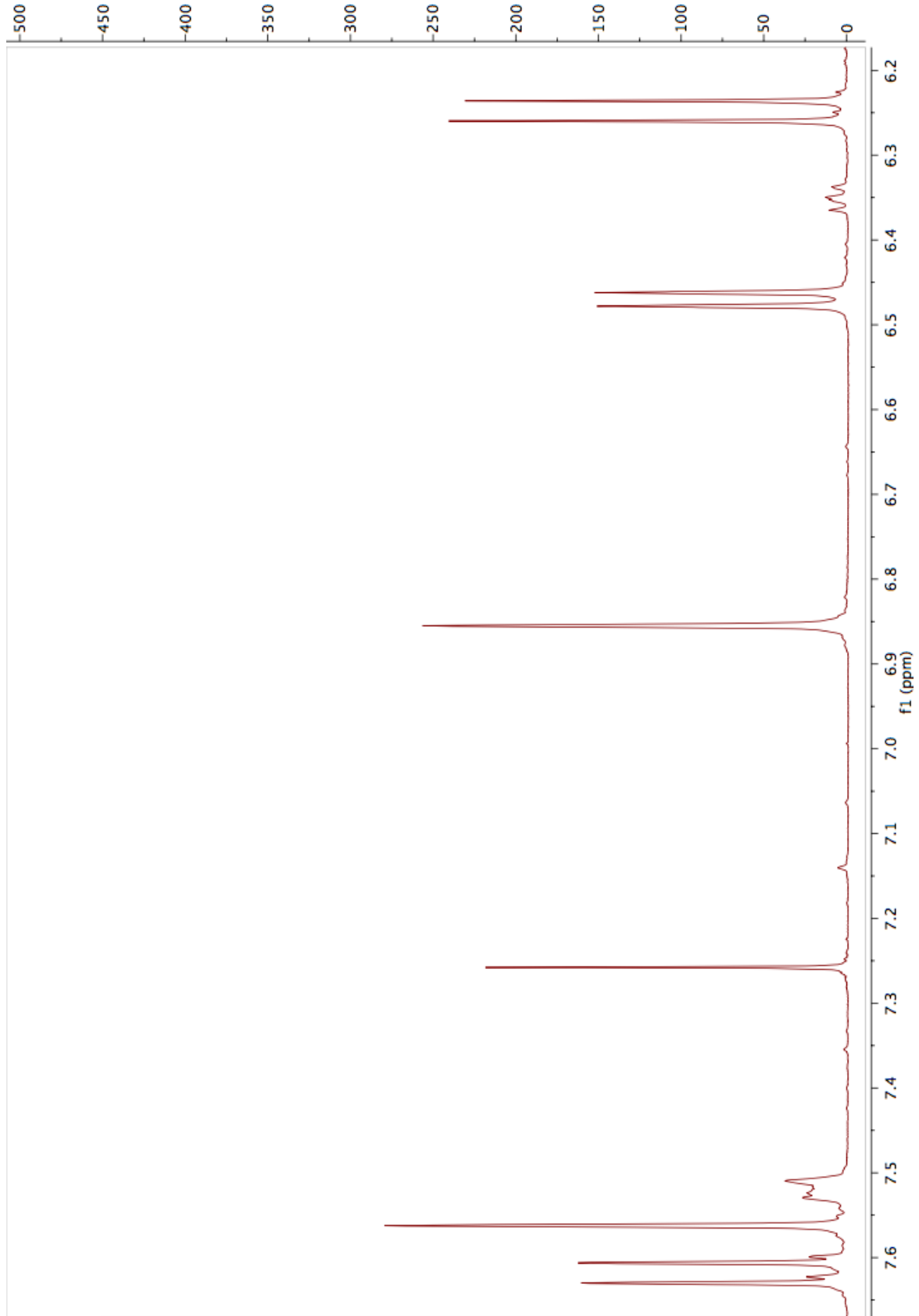
PS-3 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunda gözlemlenen sinyaller ve bu sinyallerin J değerlerine bakıldığında bileşiğin smyrnioridin adlı bileşik ile uyumlu bir spektruma sahip olduğu görülmektedir. Literatür bilgileri ile karşılaştırıldığımız zaman bu bileşiğin smyrnioridin olduğu anlaşılmaktadır [12].



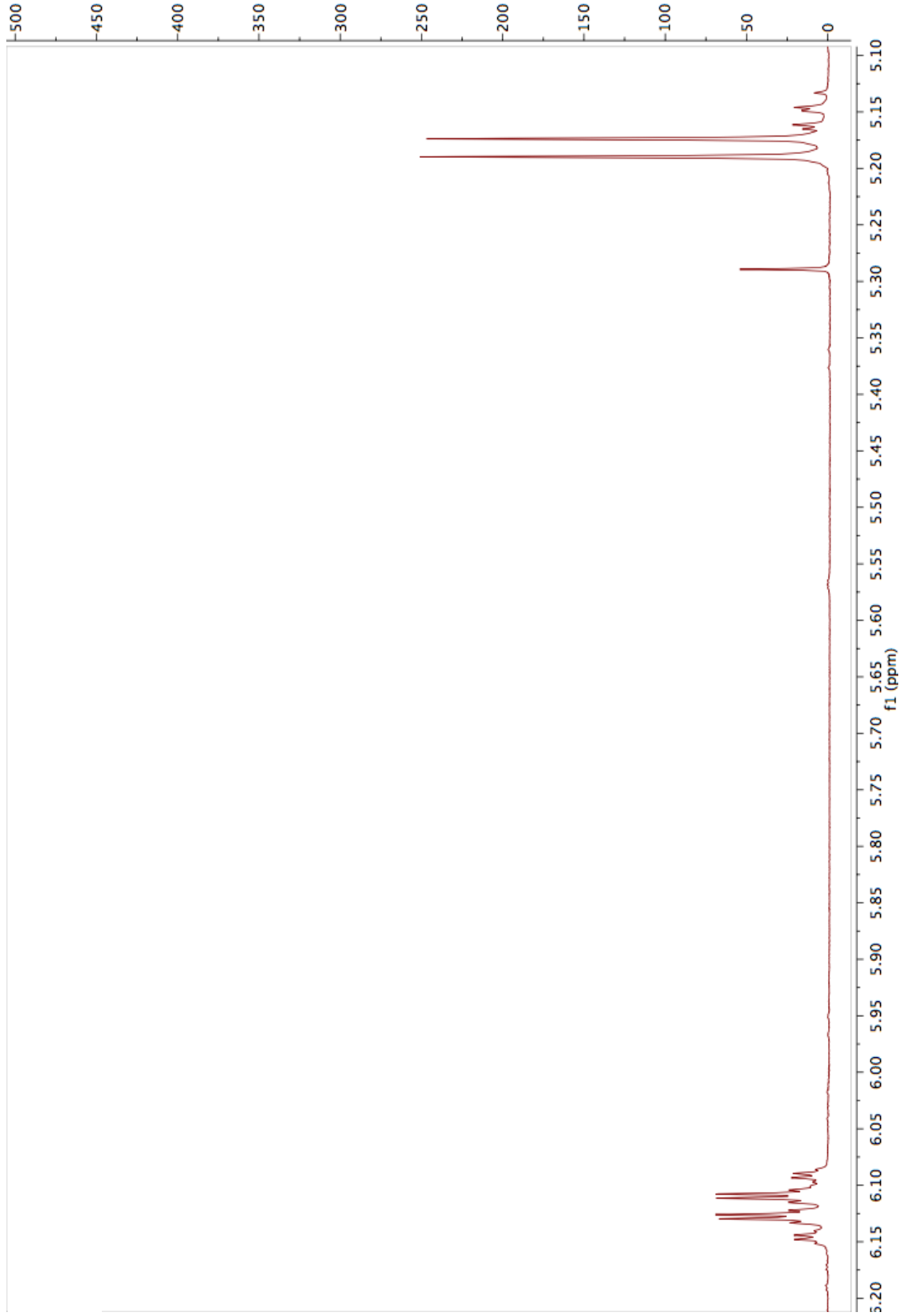
Şekil 4.7. PS- 3 kodlu bileşik: Smyrnioridin (3'-angeloiloksi-marmesin asetat)



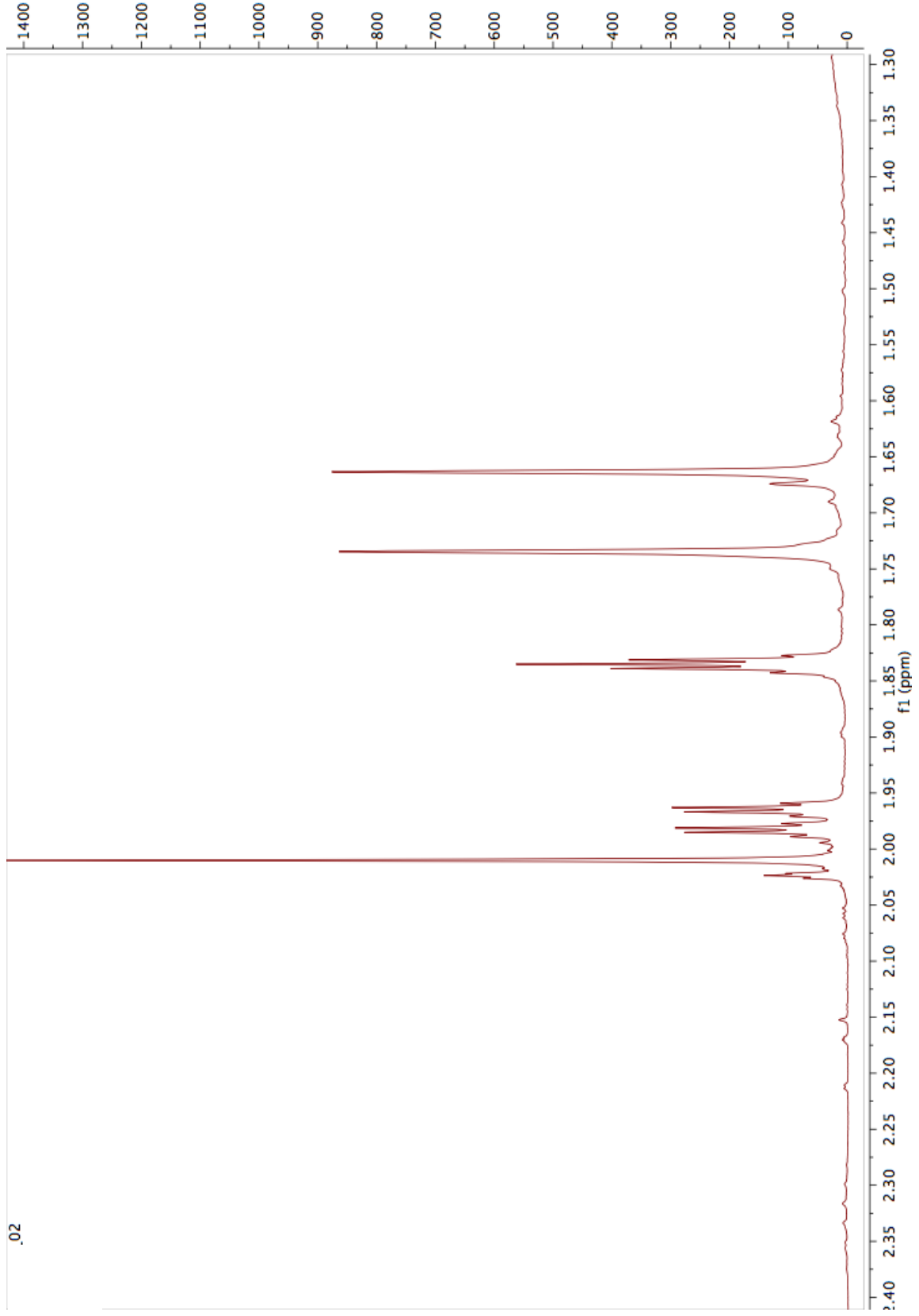
Resim 4.7. PS-3 kodlu bileşğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.8. PS-3 kodlu bileşimin H-4, H-5, H-8, H-3' ve H-3 protonlarına ait sinyalleri ile CDCl_3 sinyalini içeren genişletilmiş ^1H NMR spektrumu



Resim 4.9. PS-3 kodlu bileşğinin H-3''' ve H-2' protonlarına ait sinyallerini içeren genişletilmiş ^1H NMR spektrumu



Resim 4.10. PS-3 kodlu bileşğin asetil, angeloil ve dihidrofuran halkasına bağlı izopropil metillerinin protonlarının sinyallerini gösteren genişletilmiş üst alan ^1H NMR spektrum

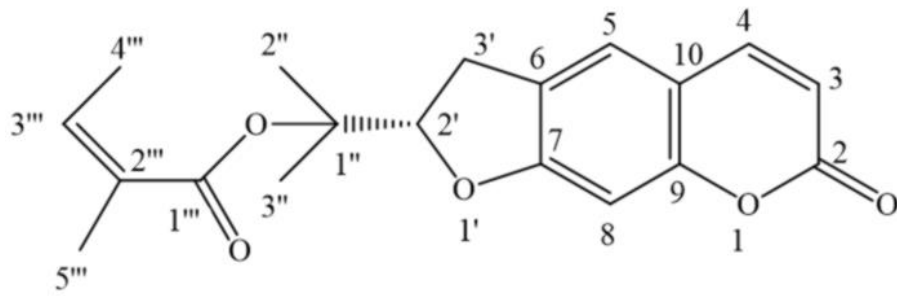
4.2.4. PS-4 kodlu bileşiğe ait bulgular (Deltoin)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,58 (1 H, *d*, $J=9,3$ Hz, H-4); 7,20 (1 H, *brs*, H-8); 6,72 (1 H, *s*, H-5); 6,20 (1 H, *d*, $J=9,3$ Hz, H-3); 5,97 (1H, *qq*, $J=1,5$ Hz ve $J=7,2$ Hz, H-3'"); 5,05 (1H, *dd*, $J=7,7$ Hz ve $J=9,6$ Hz, H-2'); 3,28 (1H, *dd*, $J=9,6$ Hz ve $J=15,6$ Hz, H-3'a), 3,23 (1H, *dd*, $J=7,7$ Hz ve $J=15,6$ Hz, H-3'b); 1,88 (3H, *dq*, $J= 7,2$ Hz ve $J= 1,5$ Hz, H- 4'"); 1,66 (3H, *brq*, $J= 1,5$ Hz, H-5'"); 1,61 (3H, *s*, H-3" veya H-2"); 1,60 (3H, *s*, H-3" veya H-2")

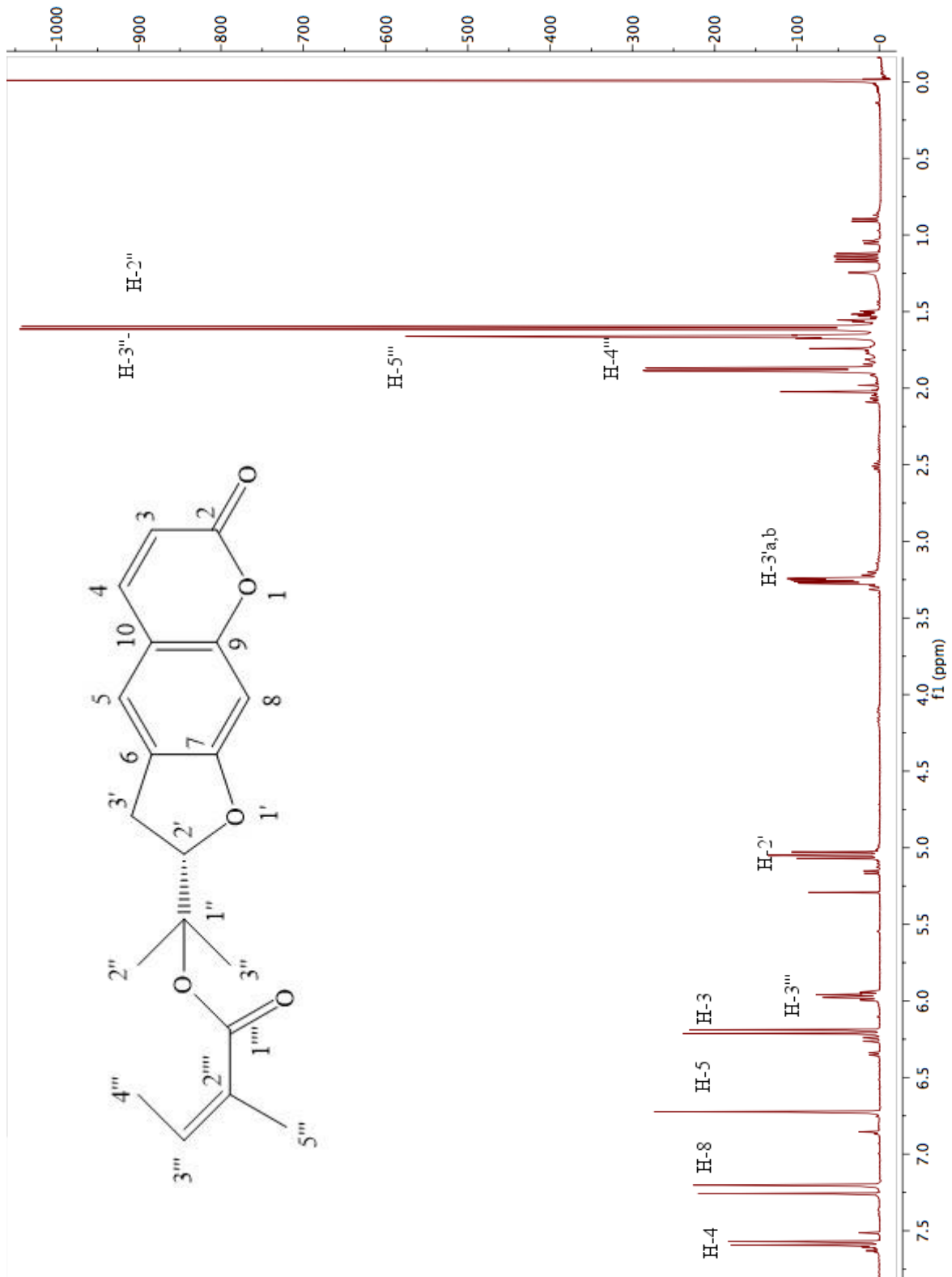
PS-4 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunun aromatik bölgesinde gözlemlenen δ 7,58 ve 6,20 ppm'deki birer protonluk iki dublet ($J=9,3$ Hz) ile δ 7,20 ve 6,72 ppm'deki birer protonluk iki singlet sinyalleri bu bileşiğin önce tartışılan bileşikler gibi linear tetrahidrofurano-kumarin yapısına sahip bir bileşik olduğunu göstermektedir. PS-1 – PS-3 bileşiklerinden farkı tetrahidrofuran halkasındaki H-2' ve H-3' protonlarının sinyallerinin iki dublet şeklinde görülmesi yerine H-2' protonunun δ 5,05 ppm'de bir protonluk dublet dubleti ($J=7,7$ Hz ve $J=9,6$ Hz) şeklinde, H-3' protonlarının ise merkezleri 3,28 ve 3,23 ppm'de olan iki tane birer protonluk dublet dubleti (ABX bölünmesinin AB kısmını oluşturan sinyaller halinde sırasıyla $J=9,6$ Hz ve $J=15,6$ Hz ile $J=7,7$ Hz ve $J=15,6$ Hz bölünmelerini veren H-3'a ve H-3' b sinyalleri) şeklinde görünmesi dihidrofuran halkasının 3. konumunda süstitüent olduğunu göstermektedir.

^1H NMR spektrumunda δ 5,97 ppm'de gözlenen bir protonluk kuartet kuarteti sinyali (1H, *qq*, $J=1,5$ Hz ve $J=7,2$ Hz, H-3'"), δ 1,88 ppm'de gözlenen 3H değerinde *dublet quartet* sinyali (3H, *dq*, $J= 7,2$ Hz ve $J= 1,5$ Hz, H- 4'") ile δ 1,66 ppm'de görülen 3H değerinde genişlemiş kuartet sinyali (3H, *brq*, $J= 1,5$ Hz, H-5'") bileşiğin bir angelat esteri içerdiğini belirtmektedir. H-2' protonunun δ 5,05 ppm'de görünmesi, H-3" ve H-2" metil protonlarının üçer protonluk singletlerinin δ 1,61 ve 1,60 ppm'de gözlenmesi angelik asidin bileşiğin H-1" konumundaki tersiyer hidroksil üzerinden esterleştiğini göstermektedir.

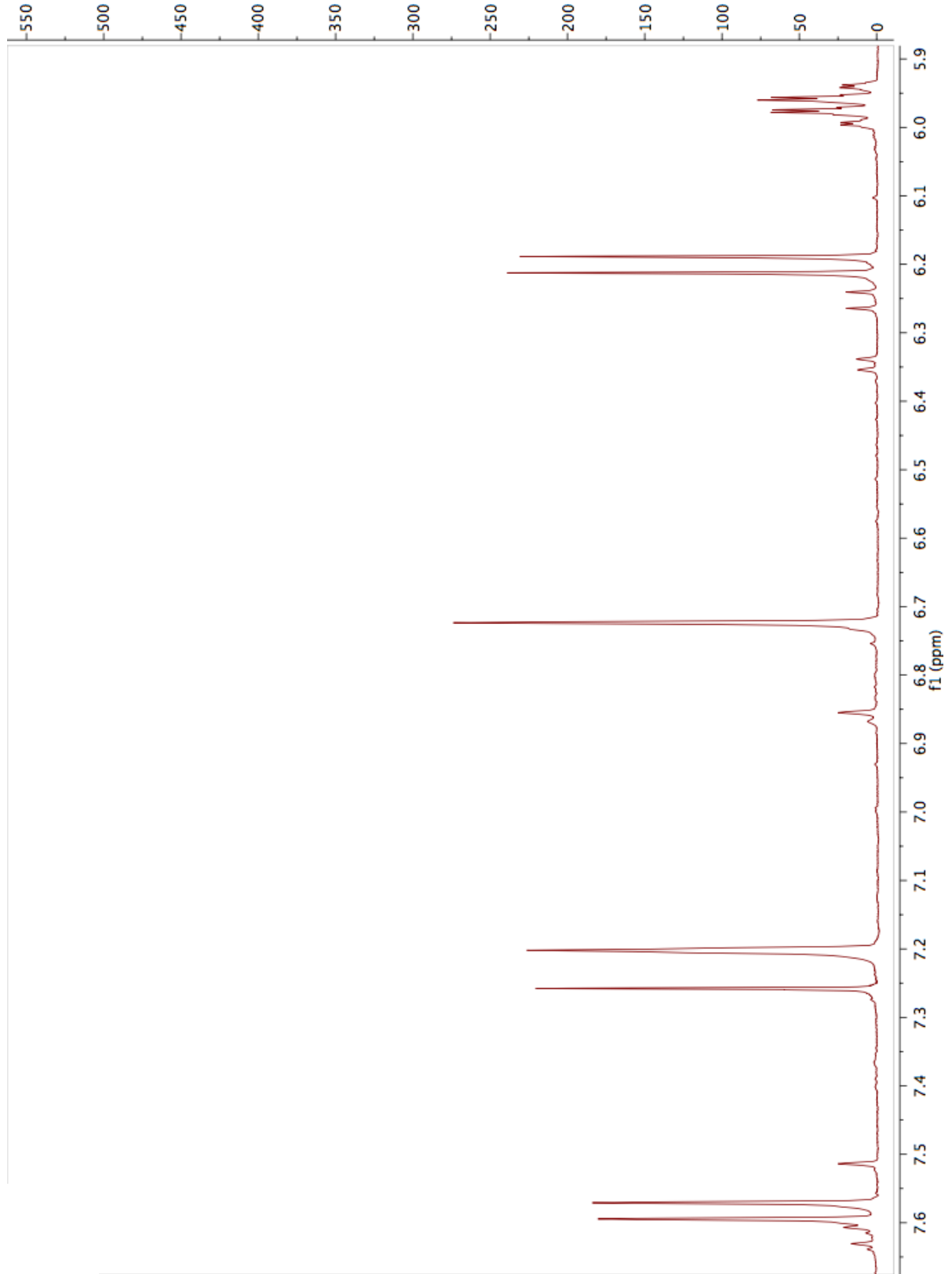
PS-4 bileşiğinin NMR spektrumu verilerinin literatürde deltoin (marmesin angelat) bileşiği için verilen değerlerle uyumlu olması bu bileşiğin deltoin olduğunu kanıtlamaktadır [52,165].



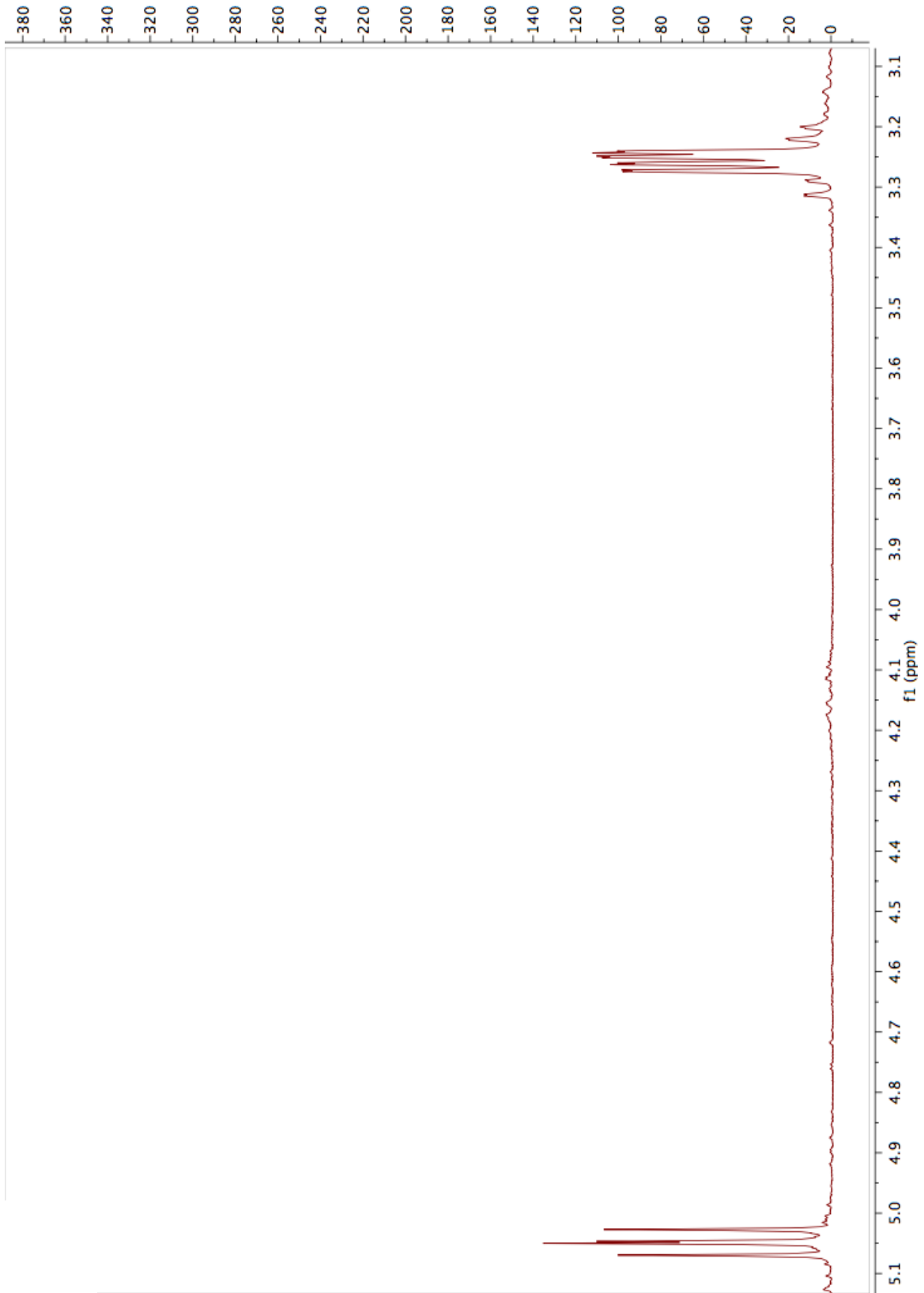
Şekil 4.8. PS-4 kodlu bileşik: Deltoin (Marmesin angelat)



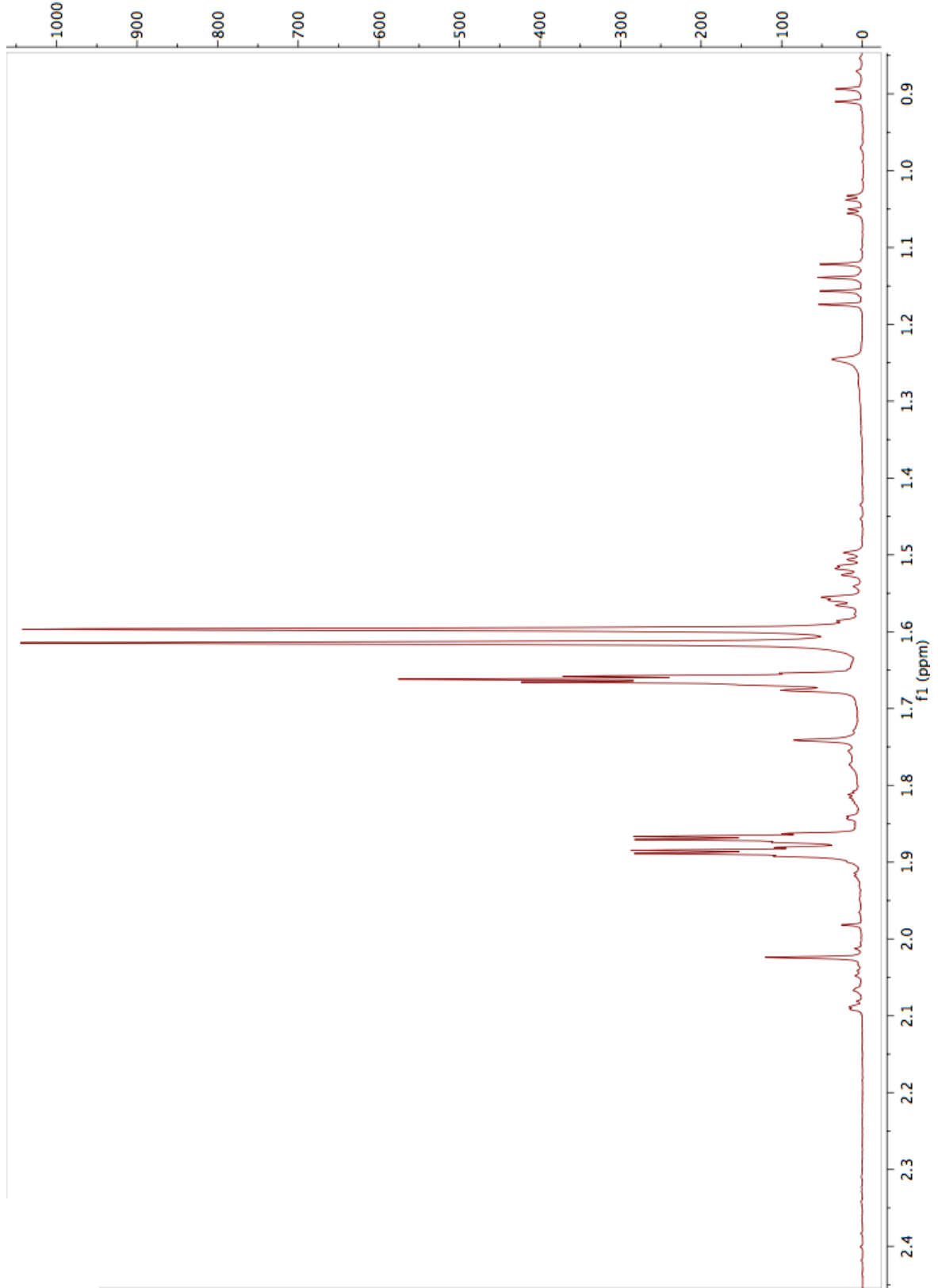
Resim 4.11. PS-4 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.12. PS-4 kodlu bileşğin H-4, H-8, H-5, H-3 ve H-3''' protonlarına ait sinyalleri ile CDCl_3 sinyalini içeren genişletilmiş ^1H NMR alt alan spektrumu



Resim 4.13. PS-4 kodlu bileşğin H-2' ve H-3'a ve H-3'b protonlarına ait sinyalleri içeren orta alan genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

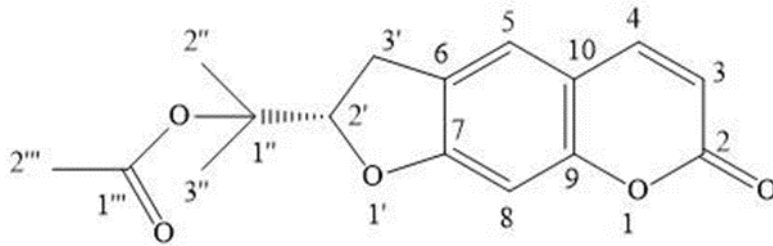


Resim 4.14. PS-4 kodlu bileşiğin H-4'', H-5'', H-3'' ve H-2'' protonlarına ait sinyalleri içeren üst alan genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

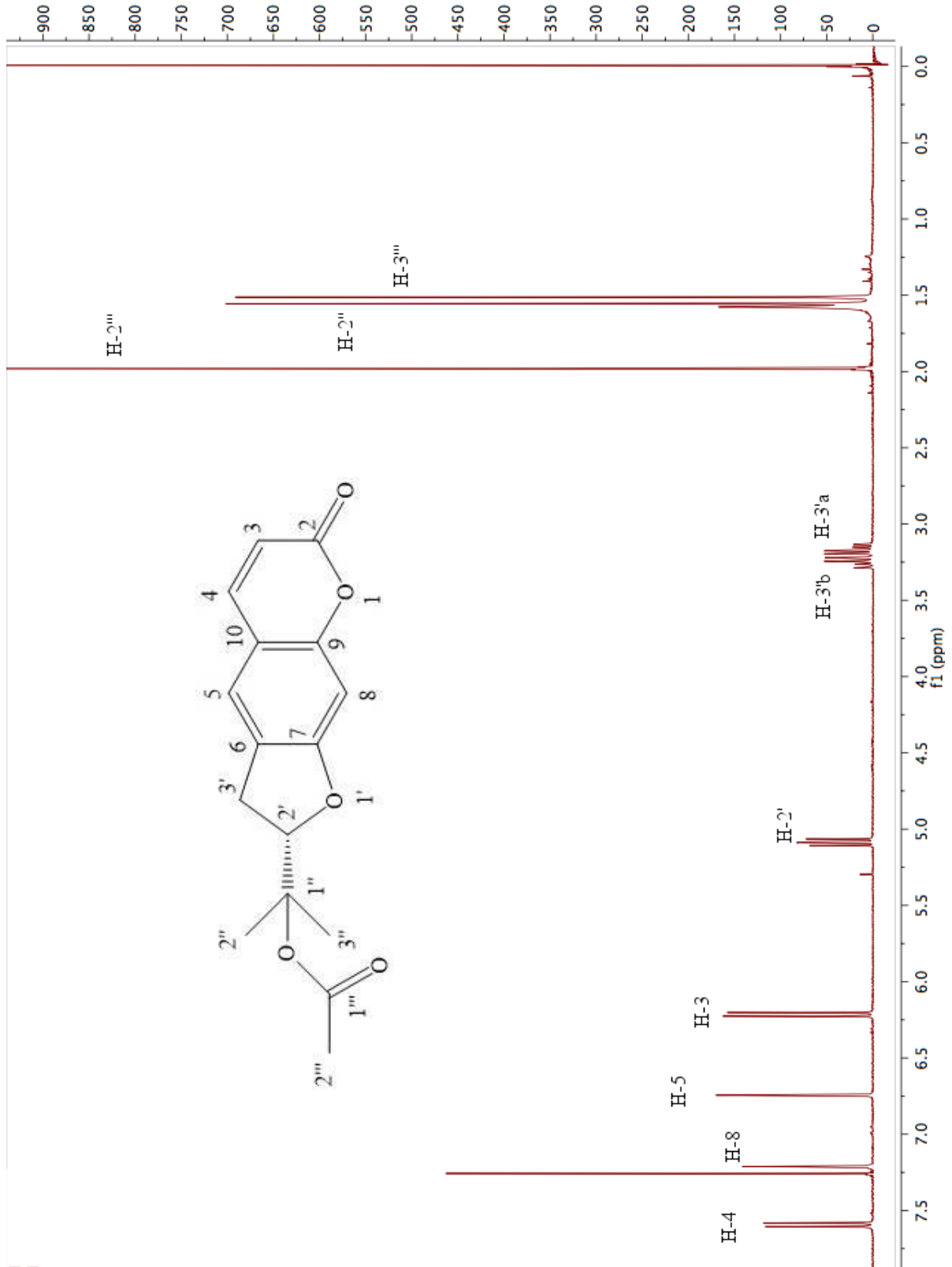
4.2.5. PS-5 kodlu bileşiğe ait bulgular (Marmesin asetat)

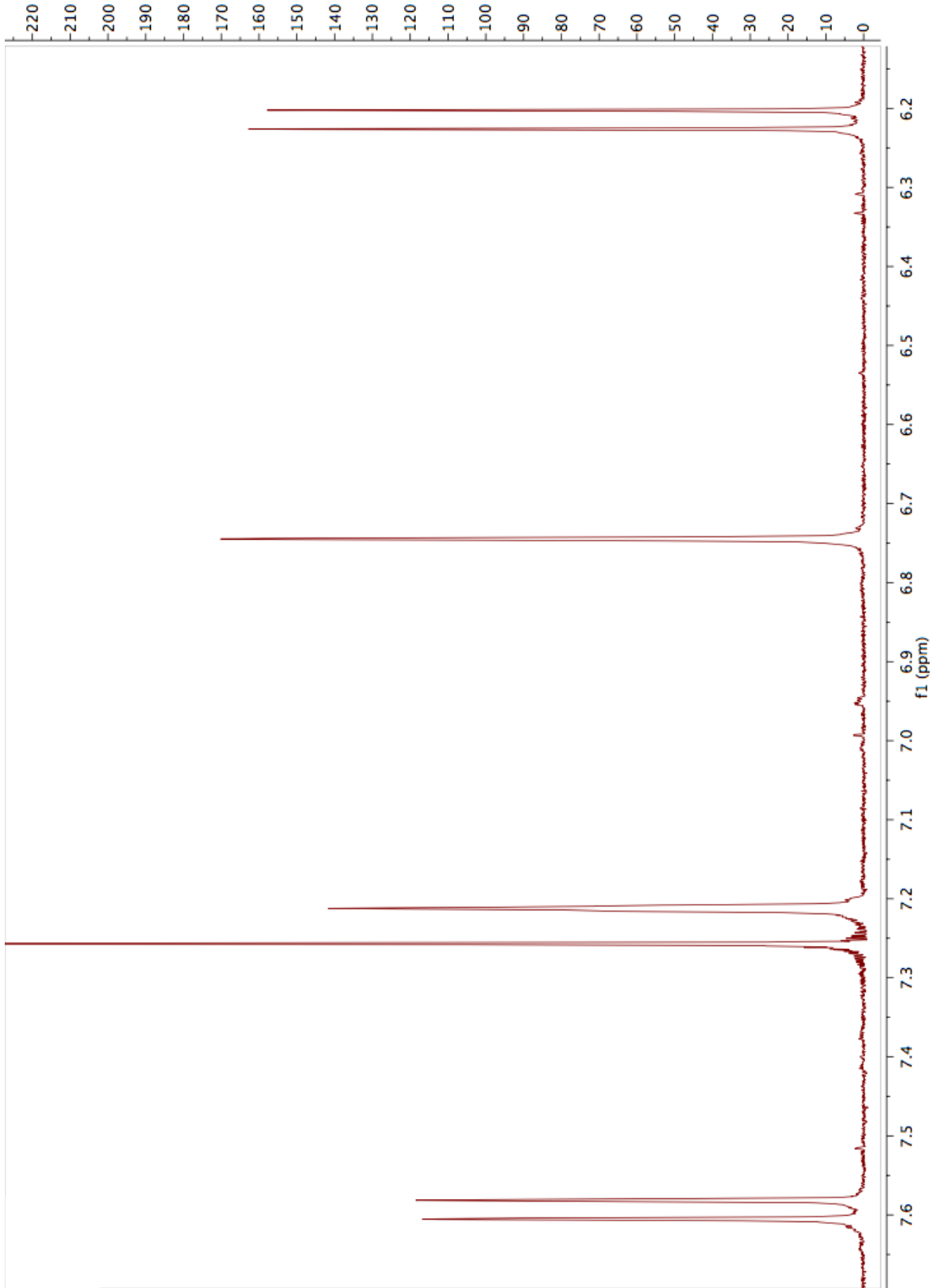
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,59 (1 H, *d*, $J=9,35$ Hz, H-4); 7,22 (1 H, *brs*, H-8); 6,75 (1 H, *s*, H-5); 6,22 (1 H, *d*, $J=9,3$ Hz, H-3); 5,09 (1H, *dd*, $J=7,6$ ve $J=9,6$ Hz, H2'); 3,25 (1H, *dd*, $J=9,6$ ve 16 Hz, H-3'a); 3,16 (1H, *dd*, $J=7,6$ ve 16 Hz, H-3'b); 1,98 (3H, *s*, H-2''); 1,56 (3H, *s*, H-2'''); 1,51 (3H, *s*, H-3'')

PS-5 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu PS-4 kodlu bileşiğin spektrumuna çok benzemektedir, PS-5'in ^1H NMR spektrumunun PS-4'ün spektrumundan farkı angelat esterine ait sinyallerin spektrumda bulunmaması buna karşılık δ 1,98 ppm'de 3H değerinde bir asetat esteri metil sinyali içermesidir. Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda gözlemlenen sinyaller literatürde marmesin asetat bileşiğinin proton NMR spektrumu sinyalleri ile karşılaştırıldığında verilerin literatür verileri ile uyumlu olması bu bileşiğin marmesin asetat olduğunu göstermektedir [166].



Şekil 4.9. PS-5 kodlu bileşik: Marmesin Asetat

Resim 4.15. PS-5 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

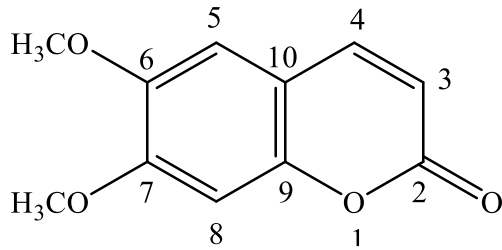


Resim 4.16. PS-5 kodlu bileşimin kumarin iskeletine ait H-4, H-8, H-5 ve H-3 protonlarına ait pikleri içeren aromatik alanın genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

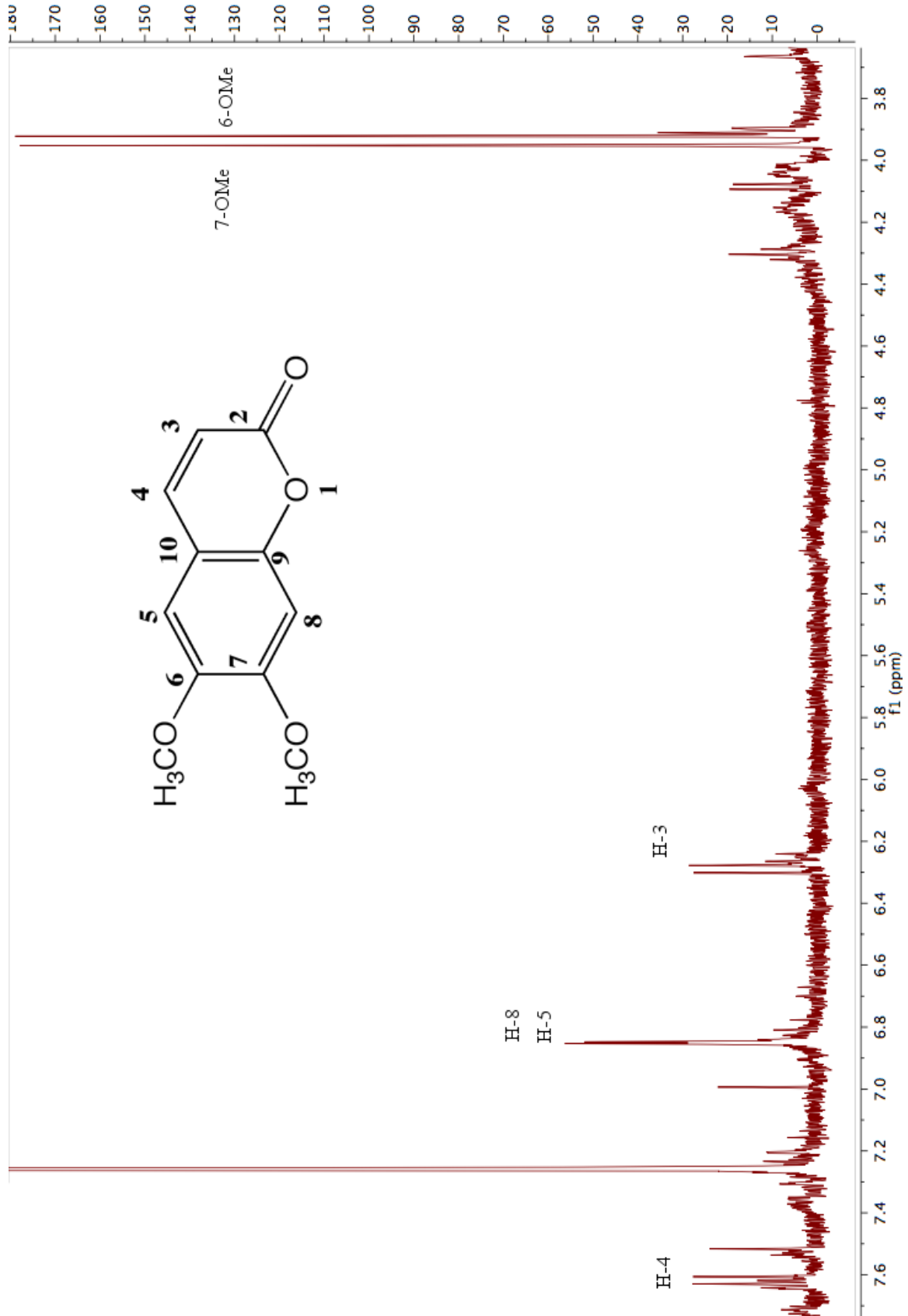
4.2.6. PS-6 kodlu bileşiğe ait bulgular (Skoparon)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,63 (1 H, *d*, $J=9,6$ Hz, H-4); 6,81 (1 H, *s*, H-8); 6,81 (1 H, *s*, H-5); 6,24 (1 H, *d*, $J=9,6$ Hz, H-3); 3,93 (3H, *s*, 7-OMe); 3,91 (3H, *s*, 6-OMe);

PS- 6 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumuna bakıldığında aromatik bölgede δ 6,24, 6,81, 6,81 ve 7,63 ppm'de sinyaller bulunmaktadır. Sinyaller incelendiğinde iki tanesinin dublet iki tanesinin ise singlet olduğu görülmektedir ve hepsi 1H büyüklüğündedir. δ 6,24 ve 7,63 ppm'deki sinyallerinin aynı olan J değerleri ve iki sinyalinde dublet olması birbiriyle etkileştiğini göstermektedir. Sinyallerin aromatik bölgenin iki ucuna doğru kayması kumarin iskeletinin varlığına işaret etmektedir. δ 3,91 ve 3,93 ppm'de 3H büyüklüğündeki sinyaller aromatik halkada 6. ve 7. konumda birbirine komşu iki metoksi grubuna ait olan protonları göstermektedir. Aromatik bölgedeki iki sinyalin aynı yerde olması ve aromatik yapıya bağlı iki metoksil grubunun varlığı bu metoksil sübstitüentlerinin birbiri ile komşu karbonlarda olduğunu göstermektedir. Kumarin iskeletinin benzen halkasının simetrik olması halkada singlet veren H-5 ve H-8 protonlarının δ 6,81 ppm'de birbirlerine çok yakın iki singlet halinde çıkmasına neden olmaktadır. Tüm bu verilerin skoparon bileşiğinin proton NMR'ı için literatürde verilen değerler ile uyumlu olması bu bileşiğin skoparon olduğunu göstermektedir [54,111,130,145,151,167].



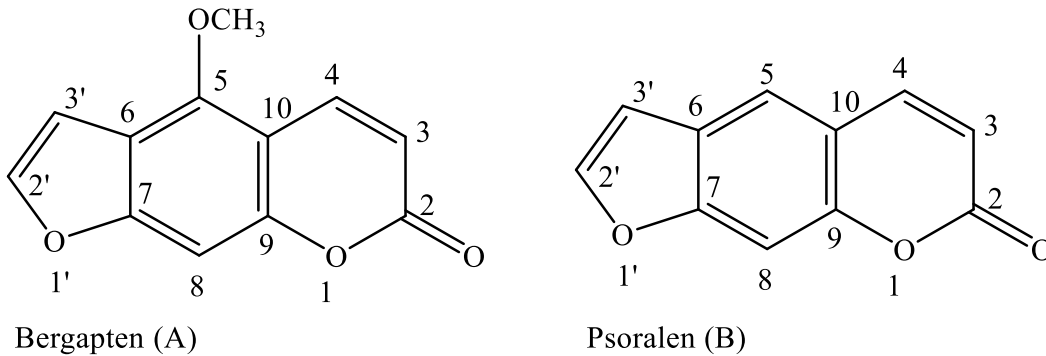
Şekil 4.10. PS-6 kodlu bileşik: 6,7-dimetoksi-2H-kromen-2-on (Skoparon)

Resim 4.17. PS-6 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

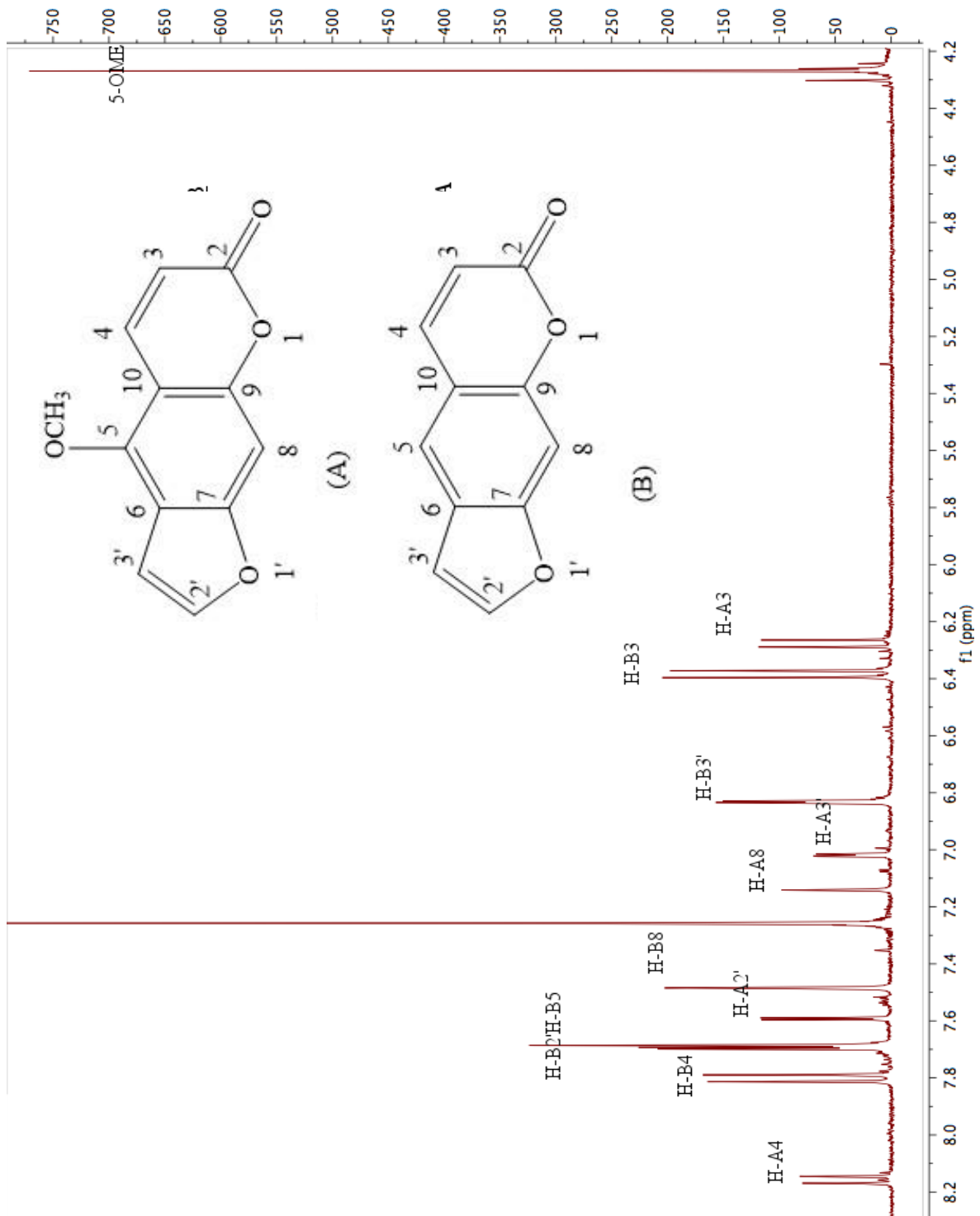
4.2.7. PS-7 kodlu bileşiğe ait bulgular (Bergapten+ Psoralen)

- (A) Bergapten ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8,15 (1 H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-4); 7,59 (1 H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-2'); 7,12 (1H, *s*, H-8); 7,02 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-3'); 6,27 (1H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-3); 4,27 (3H, *s*, 5- OMe).
- (B) Psoralen ^1H NMR (400 MHz, DCCl_3). δ ppm: 7,80 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz, H-4); 7,70 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-2'); 7,46 (1H, *s*, H-8); 7,68 (1H, *s*, H-5); 6,83 (1H, *d*, $J=2,2$ Hz, H-3'); 6,38 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz, H-3);

PS-7 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu incelendiğinde aromatik bölgede 11 sinyal görülmektedir. Dikkatle incelendiği zaman spektrumda 4 tane AB sisteminin bulunduğu fark edilmektedir. Bu durum iki farklı kumarin yapısı olduğu şüphesi uyandırmıştır. J değerleri ve sinyallerin konumu incelendiği zaman aromatik bölgenin iki ucuna kayan yarılmalara görülmektedir. δ 8,15 ve 6,27'deki dublet sinyaller ile δ 7,59 ve 7,02'deki dublet sinyaller birbirleri ile etkileşmektedir. δ 7,80 ve 6,38'deki dublet sinyaller ile δ 7,70 ve 6,83'deki dublet sinyallerde birbiri ile etkileşmektedir. Ayrıca δ 8,15'e kayma furanokumarinlerin 5. Konumunda süstitüent olması ile açıklanmaktadır [149]. δ 4,27'de aromatik yapıya bağlı metoksil protonların varlığı 5. Konumunda metoksil olan furanokumarin varlığını göstermektedir. Aromatik bölgede bu sinyaller dışında δ 7,12 ile δ 7,46 ve 7,68 sinyalleri bulunmaktadır. δ 4,27'de bulunan metoksil protonlarının sinyalleri dışında alifatik bölgede sinyal bulunmaması sadece aromatik yapıdan oluşan furanokumarin yapısını işaret etmektedir. Eldeki veriler ile literatür verileri karşılaştırıldığında 5-metoksil içeren furanokumarin yapısının bergapten ile ikinci furanokumarin yapısının ise psoralen ile uyumlu olduğu gözlenmiştir [52,63,117,118,154,168,169].



Şekil 4.11. PS-7 kodlu bileşikler: 4-metoksi-7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-7-on [Bergapten (A)] + 7*H*-furo[3,2-*g*]kromen-7-on [Psoralen (B)]



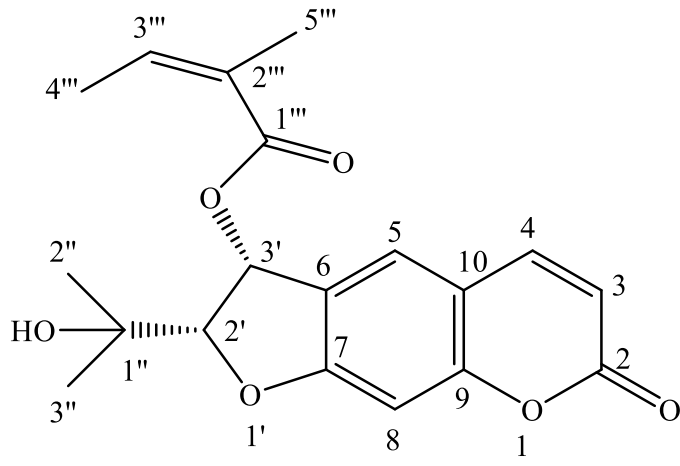
Resim 4.18. PS-7 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu

4.2.8. PS-8 kodlu bileşiğe ait bulgular (Dezasetil-smyrnioridin)

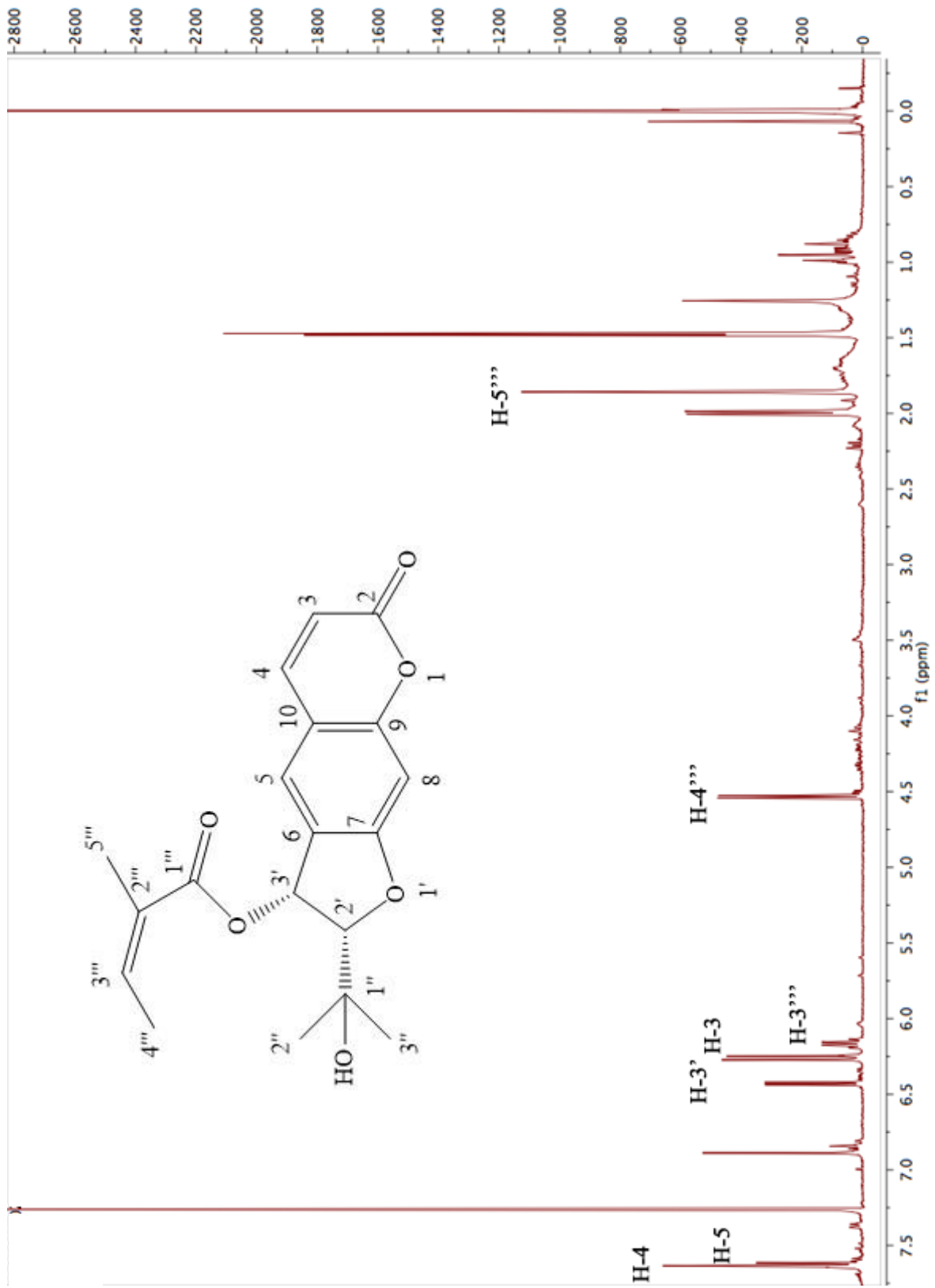
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,63 (1 H, *s*, H-5); 7,62 (1 H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-4); 6,89 (1 H, *s*, H-8); 6,43 (1 H, *d*, $J=6,3$ Hz, H-3'); 6,26 (1H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-3); 6,17 (1H, *qq*, $J=7,3$ Hz ve $J=1,5$ Hz, H-3''); 4,57 (1H, *d*, $J=6,3$ Hz, H-2'); 2,00 (3H, *dq*, $J=7,3$ Hz ve $J=1,5$ Hz, H-4'''); 1,85 (3H, *q*, $J=1,5$ Hz, H-5'''); 1,48 (3H, *s*, H-2''); 1,47 (3H, *s*, H-3'').

PS-8 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu PS-3 kodlu smyrnioridin bileşiğinin ^1H NMR spektrumuna çok benzemektedir, bu iki bileşiğin ^1H NMR spektrumları arasındaki farklar PS-3 kodlu bileşiğin spektrumunda δ 2,02 ppm'de gözlenen asetat grubunun üç protonluk metil singletinin PS-8 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda olmaması, PS-3 bileşiğinin δ 5,19 ppm'de görülen bir protonluk H-2' dubletinin PS-8 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda δ 4,57 ppm'e kaymış olması yine PS-3 bileşiğinin spektrumunda δ 1,75 ve 1,69 ppm'de gözlenen H-2'' ve H-3'' metillerine ait üçer protonluk *singlet*lerin PS-8 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda δ 1,48 ve 1,47 ppm'de görünmesi PS-3 bileşiğinin 1''. konumunda bulunan asetoksi grubunun PS-8 bileşiğinde esterleşmemiş bir hidroksil grubu halinde olduğunu kanıtlamaktadır. Buna karşılık PS-3 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda δ 6,48 ppm'de bir protonluk dublet halinde gözlenen H-3' sinyalinin PS-8 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda yine δ 6,43 ppm'de bulunması, PS-8 bileşiğinde bulunan angelat esterinin PS-3 bileşiğinde olduğu gibi 3'. konumundaki hidroksil üzerinden esterleşmiş olduğunu göstermektedir. PS-8 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda gözlenen sinyaller bu bileşiğin yapısının Dezasetil-smyrnioridin (veya 3'-angeloiloksi-marmesin) olduğunu kanıtlamaktadır.

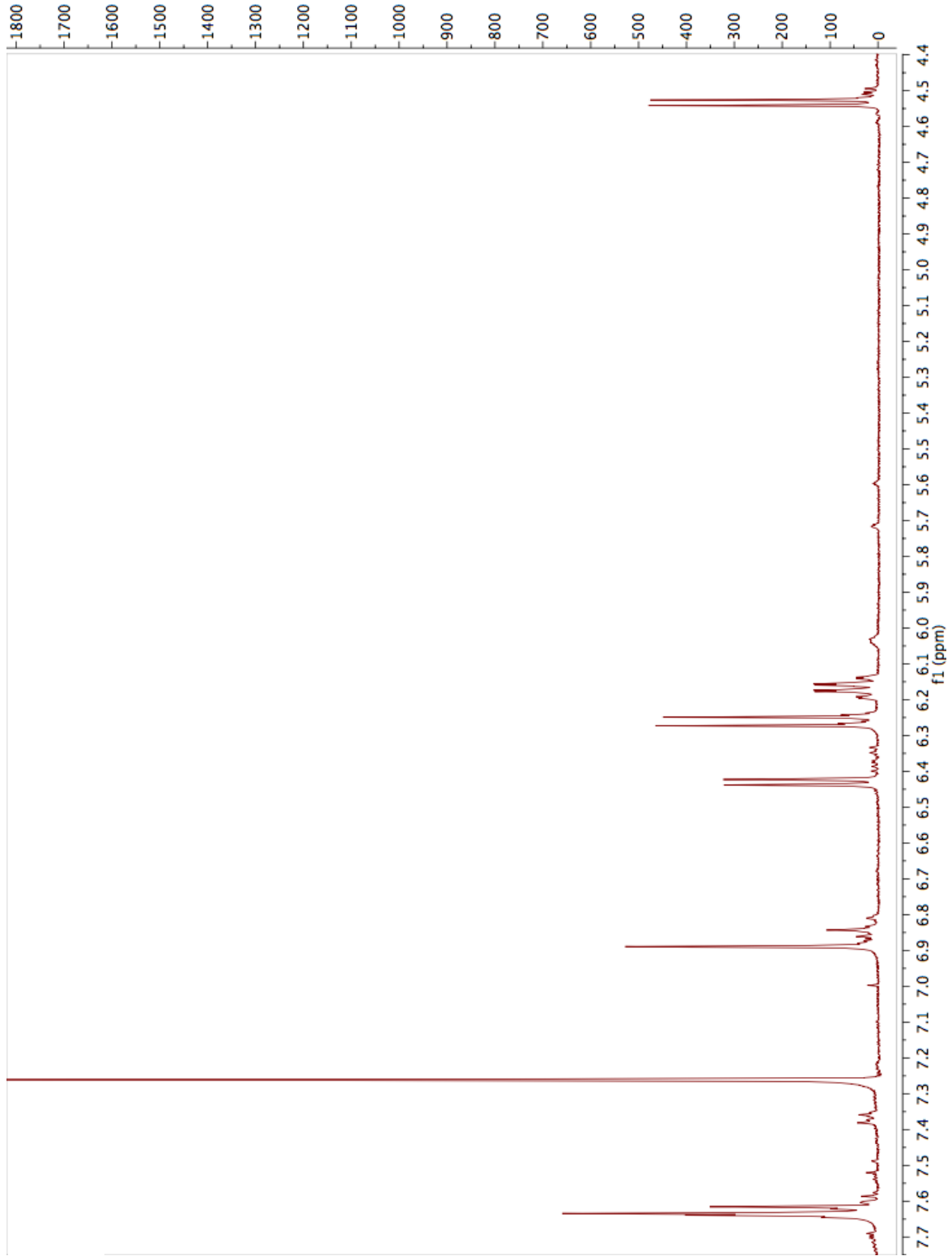
Literatür taramasında bu bileşiğin daha önce izole edilmediği anlaşılmıştır. Bileşik miktarı çok az olduğundan PS-8 bileşiğinin yapısını kesin olarak kanıtlamak için gerekli diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşiğin yeniden ve daha fazla miktarda elde edilerek gerekli spektroskopik yöntemlerin uygulanabilmesi için çalışmaya devam edilmektedir.



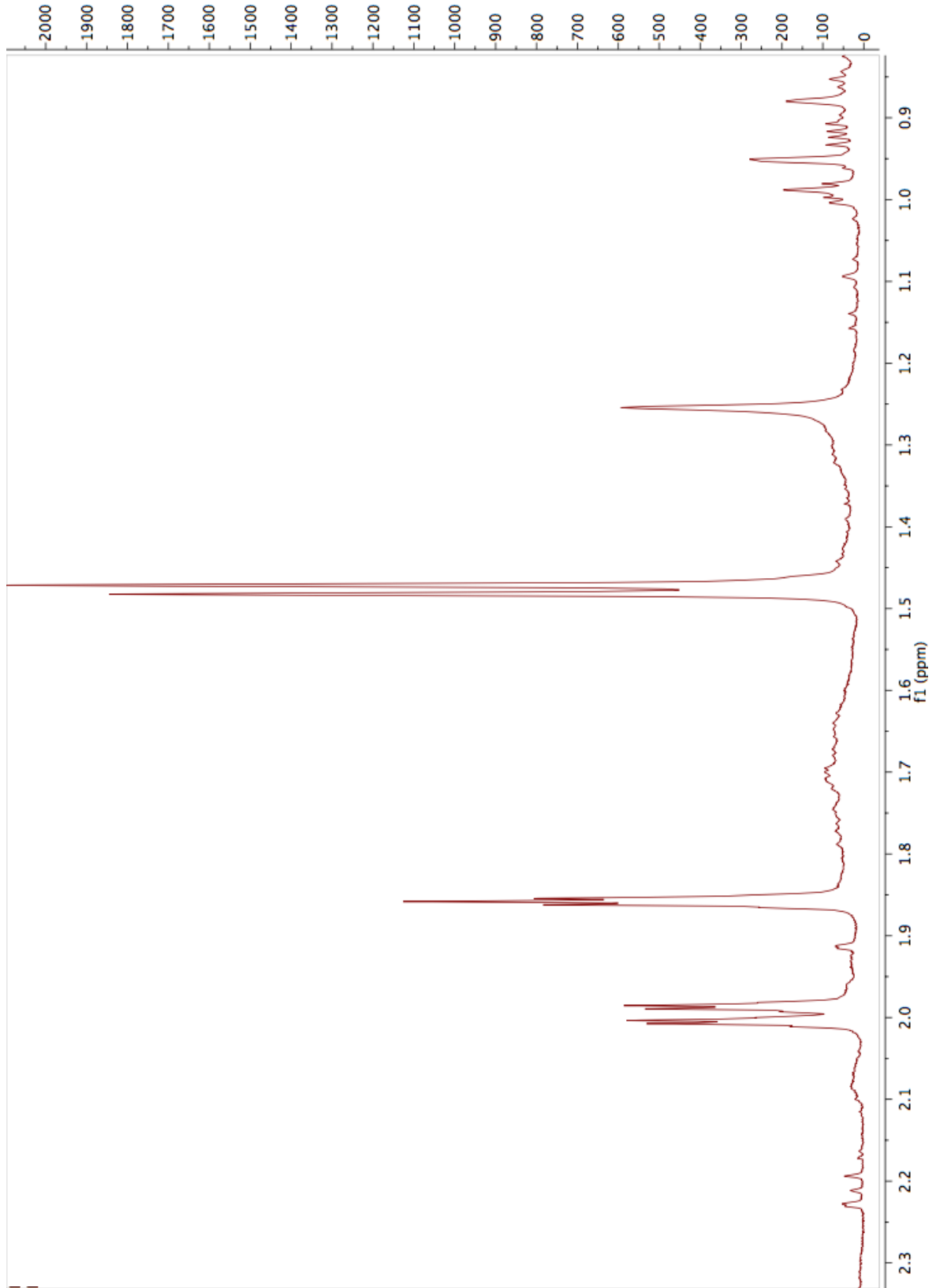
Şekil 4.12. PS-8 kodlu bileşik: Dezasetil-smyrnioridin



Resim 4.19. PS-8 kodlu bileşimin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.20. PS-8 kodlu bileşğin H-4, H-5, H-8, H-2', H-3, H-3''' ve H-3' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR alt alan spektrumu

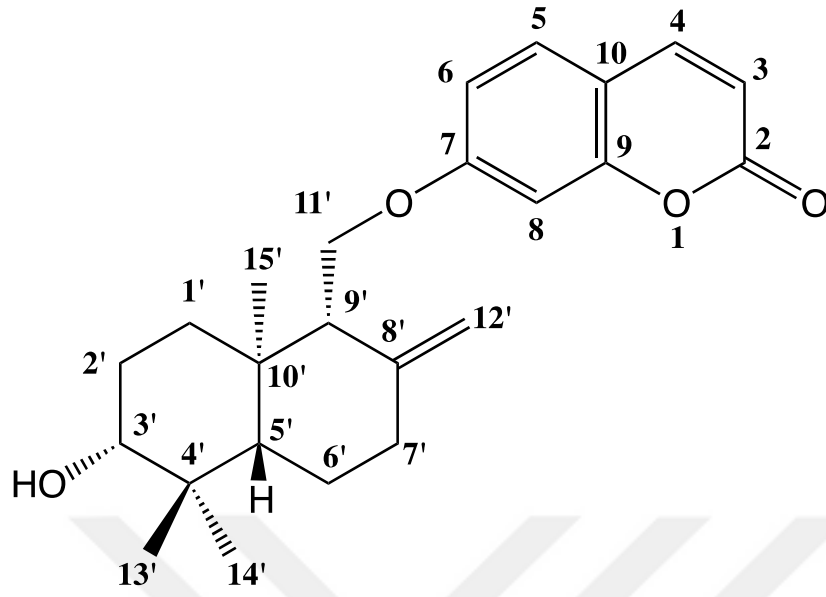


Resim 4.21. PS-8 kodlu bileşğin H-4'', H-5'', H-2'' ve H-3'' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR üst alan spektrumu

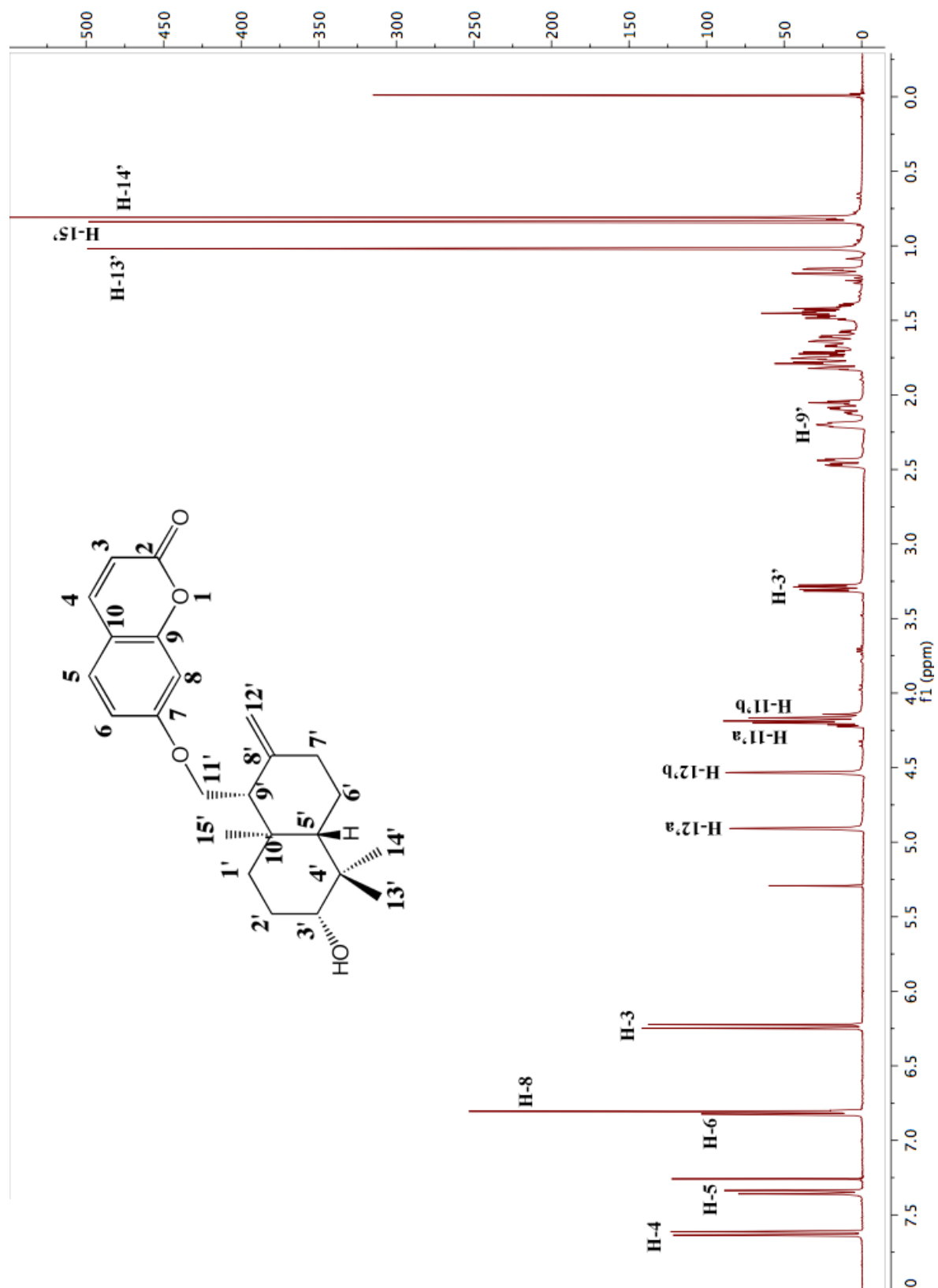
4.2.9. PS-9 kodlu bileşiğe ait bulgular (Kolladonin)

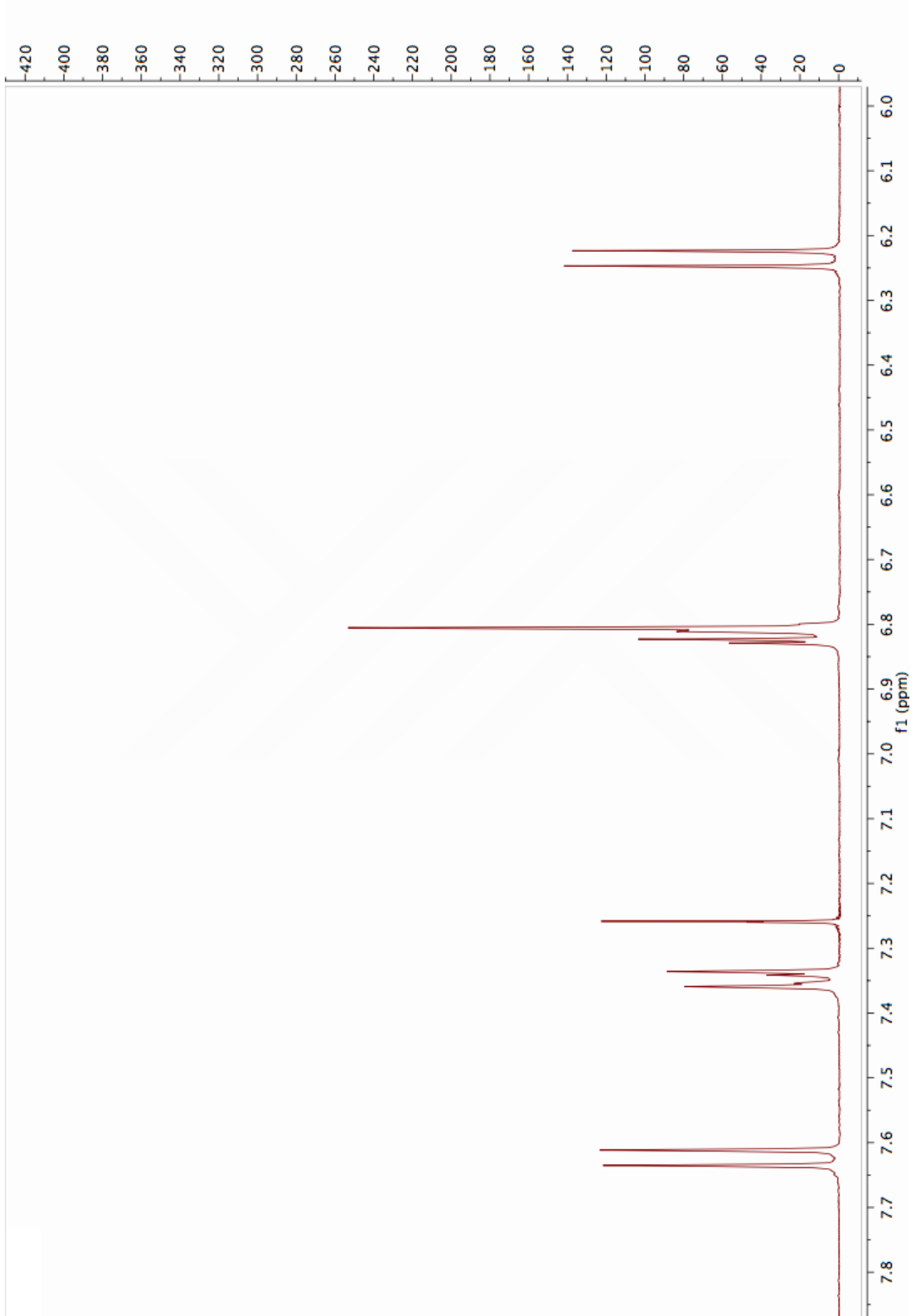
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,62 (1 H, *d*, $J=9,8$ Hz, H-4); 7,35 (1 H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-5); 6,82 (1 H, *dd*, $J=9,5$ Hz ve $J=2,4$ Hz, H-6); 6,81 (1 H, *d*, $J=2,4$ Hz, H-8); 6,24 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz, H-3); 4,91 (1H, *brd*, $J=1,2$ Hz, H-12'a); 4,53 (1H, *brd*, $J=1,2$ Hz, H-12'b); 4,21 (1H, *dd*, $J=4,4$ Hz ve $J=9,7$ Hz, H-11'a); 4,16 (1H, *dd*, $J=7,7$ Hz ve $J=9,7$ Hz, H-11'b); 3,30 (1H, *dd*, $J=4,5$ Hz ve $J=11,7$ Hz, H-3'); 2,21 (1H, *brt*, $J=4,4$ Hz ve $J=7,7$ Hz, H-9'); 1,00 (3H, *s*, H-15'); 0,85 (3H, *s*, H-14'); 0,80 (3H, *s*, H-13').

PS-9 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu *Petroedmondia syriaca*'dan elde edilen diğer kumarinlere benzemeyen kompleks bir spektrum, spektrumun aromatik alanında δ 7,62 ve 6.24 ppm'de görülen birer protonluk iki dublet ($J=9,8$ Hz) kumarin halkasında 4. ve 3. konumdaki protonlara ait olup, δ 7,35 ppm'deki bir protonluk dublet ($J=9,5$ Hz) ile δ 6,82 bir protonluk dublet dubleti ($J=7,2$ Hz ve $J=2,4$ Hz) ve δ 6,81 ppm'deki bir protonluk dublet ($J=2,4$ Hz) sırasıyla kumarin iskeletindeki 5., 6. ve 8. konumdaki protonları göstermektedir (Resim 4.22 ve 4.23). PS-9 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunun aromatik bölgesindeki sinyaller molekülün umbelliferon yani 7-hidroksikumarin türevi bir bileşik olduğunu belirtmektedir. Molekülün ^1H NMR spektrumunun orta alanında gözlemlenen δ 4,91 ve 4,53 ppm'deki birer protonluk genişlemiş dubletler (her biri $J=1,2$ Hz) bileşiğin kumarin olmayan kısmındaki bir halka dışı metilen grubuna ait protonlar olup, δ 4,21 ve 4,16 ppm'deki birer protonluk dublet dubletleri (sırasıyla $J=4,4$ Hz ve $J=9,7$ Hz ile $J=7,7$ Hz ve $J=9,7$ Hz) bir oksijene bağlı karbon atomu üzerindeki iki protonun oluşturduğu ABX sisteminin AB kısmını oluşturan sinyaller olup umbelliferonun 7. karbonundaki hidroksile eterik bağla bağlı olan metilen grubu üzerindeki protonlara aittir. δ 3,30 ppm'de bulunan bir protonluk dublet dubleti ($J=4,5$ Hz ve $J=11,7$ Hz) sinyali molekülün kumarin olmayan kısmında yer alan ve ekvatoryel konumda olan bir hidroksile komşu olan bir protona aittir. PS-9 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunun üst alanında δ 1,00, 0,85 ve 0,80 ppm'de gözlemlenen üçer protonluk metil singletleri molekülün kumarin olmayan kısmında üç tersiyer metil grubu olduğunu belirtmektedir. PS-9 bileşiğinin ^1H NMR spektrumundaki karakteristik sinyaller molekülün muhtemelen kolladonin olarak bilinen bir seskiterpen kumarin eter olabileceğini göstermektedir, kolladonin'in literatürde yayınlanmış olan ^1H NMR spektrumu ile PS-9 bileşiğinin spektrumu karşılaştırıldığında spektrumlardaki sinyal değerlerinin tamamen uyuşmakta dolayısı ile bu bileşiğin kolladonin olduğunu kanıtlanmaktadır [170, 171].

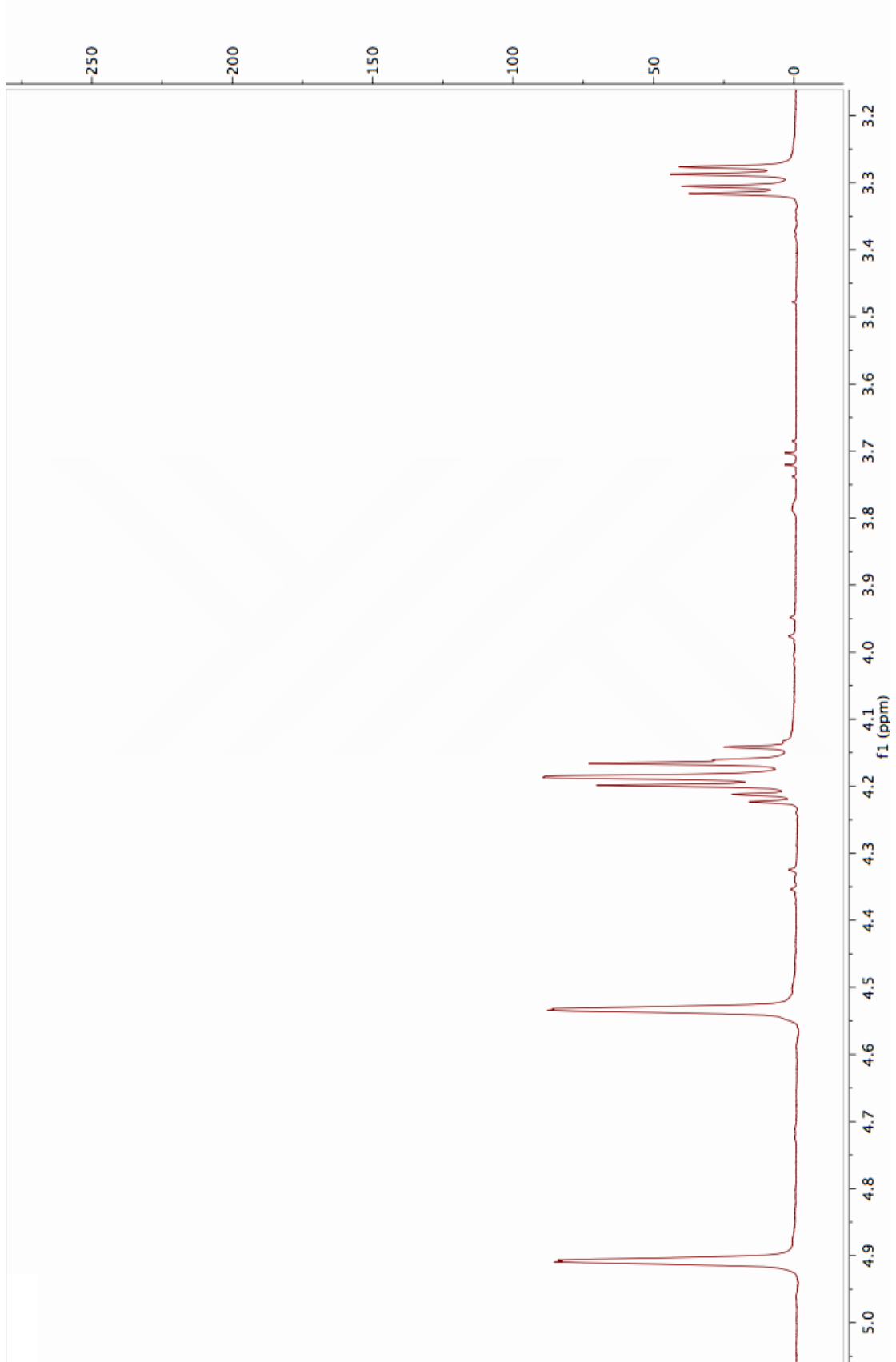


Şekil 4.13. PS-9 kodlu bileşik: Kolladonin

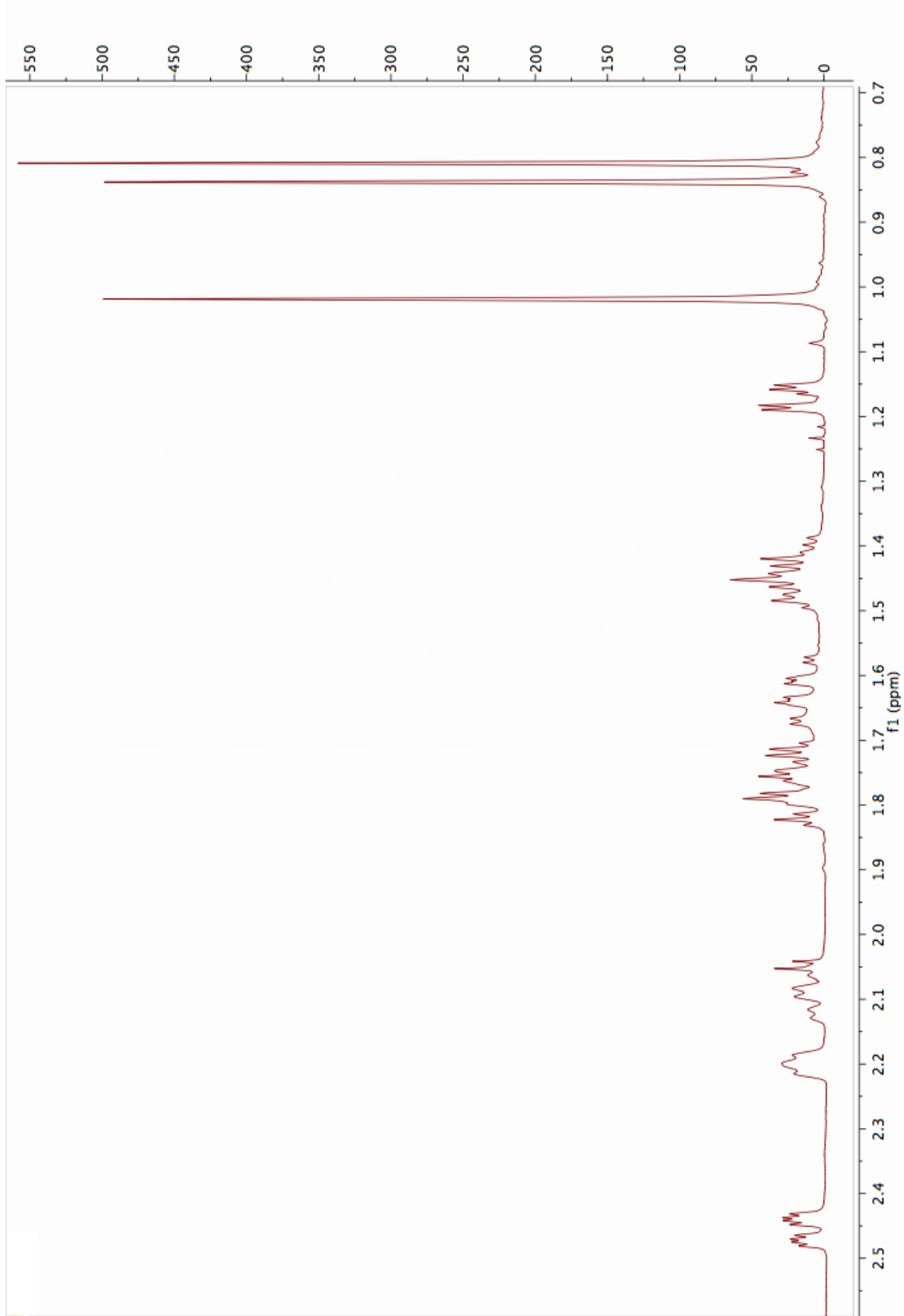
Resim 4.22. PS-9 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.23. PS-9 kodlu bileşiğin H-4, H-5, H-6, H-8 ve H-3 protonlarına ait sinyallerini içeren genişletilmiş ^1H NMR alt alan spektrumu



Resim 4.24. PS-9 kodlu bileşimin H-12' a ve b, H-11' a ve b, H-3' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR orta alan spektrumu

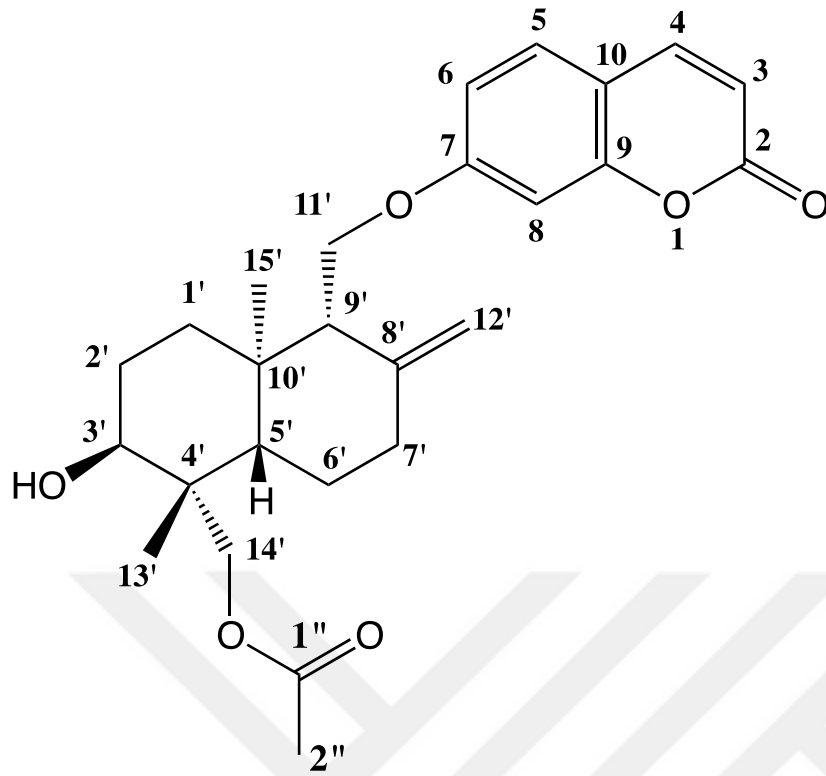


Resim 4.25. PS-9 kodlu bileşiğin H-9', H-7', H-6', H-2', H-1' ve H-5' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR üst alan spektrumu

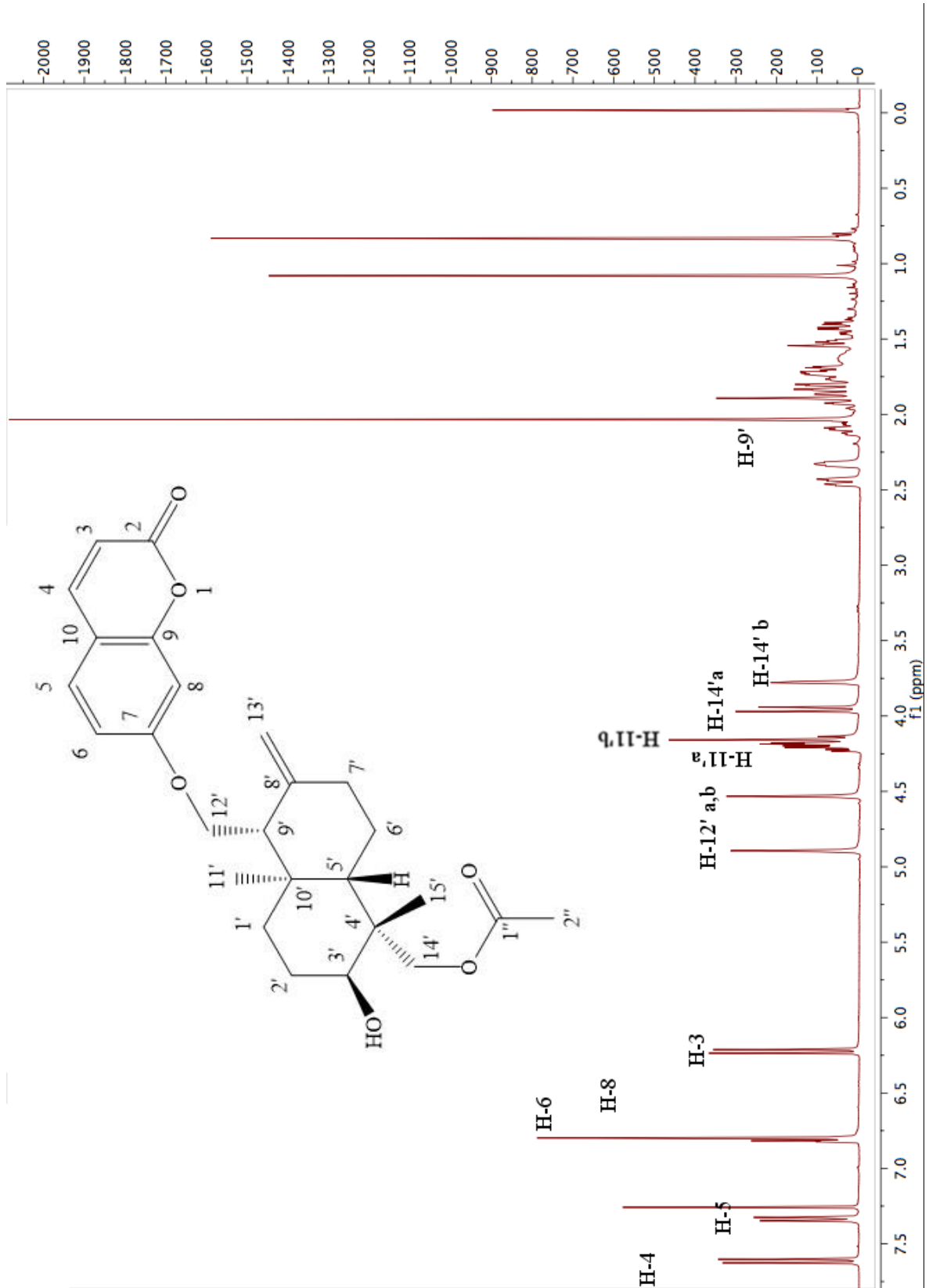
4.2.10. PS-10 kodlu bileşiğe ait bulgular (14'-asetoksi-badrakemin)

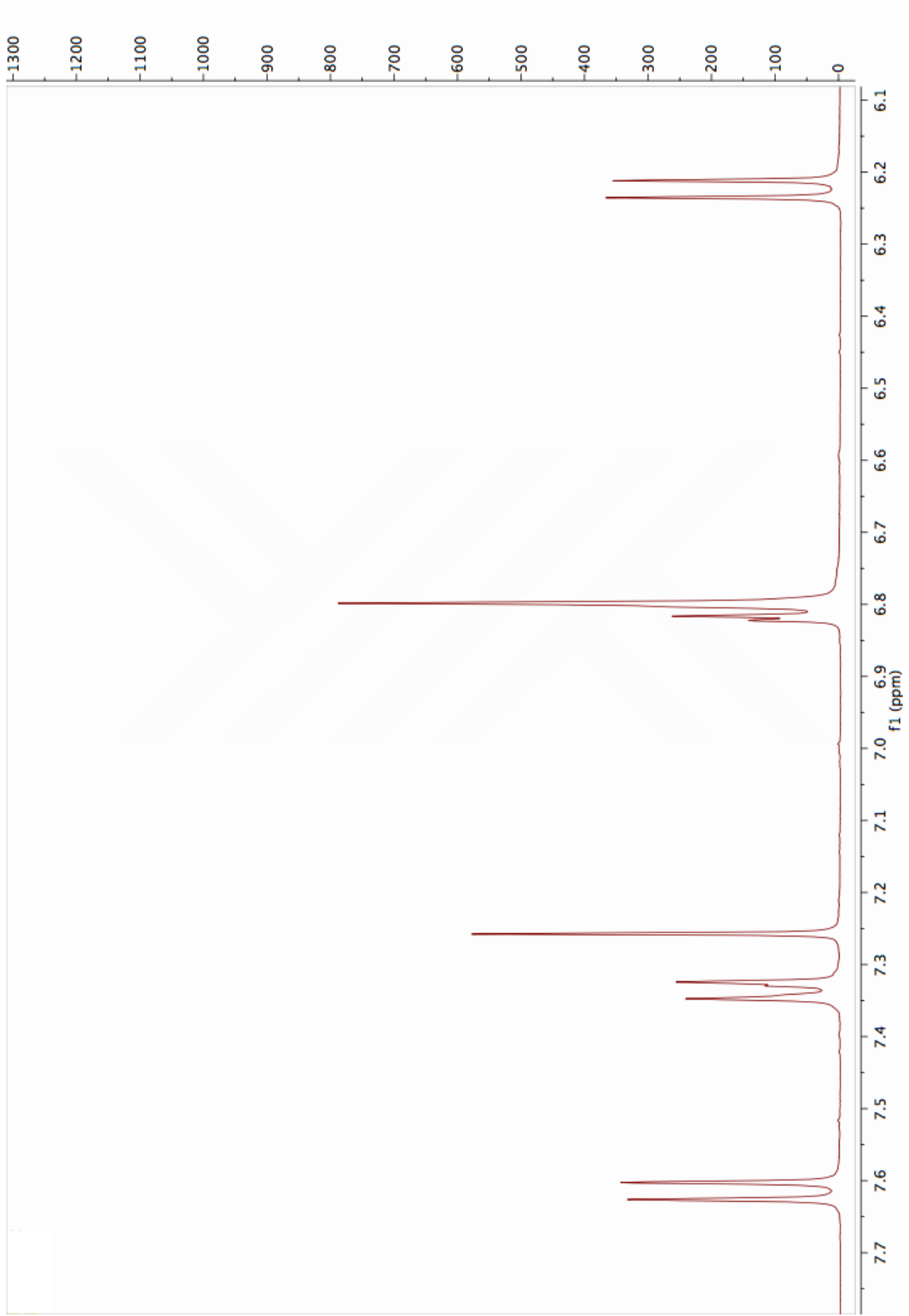
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,62 (1 H, *d*, $J=9,8$ Hz, H-4); 7,35 (1 H, *d*, H-5); 6,8 (1 H, *dd*, $J=7,2$ Hz ve $J=2,6$ Hz, H-6); 6,8 (1 H, *s*, H-8); 6,24 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz, H-3); 4,90 (1H, *brs*, H-12'a); 4,54 (1H,*brs*, H-12'b); 4,22 (1H, *dd*, $J=4,1$ Hz ve $J=9,7$ Hz, H-11'a); 4,16 (1H, *dd*, $J=8,7$ Hz ve $J=9,7$ Hz, H-11'b); 4,17 (1H, *d*, $J=11,3$ Hz, H-14'a); 3,95 (1H, *d*, $J=11,3$ Hz, H-14'b); 3,78 (1H, *brs*, H-3'); 2,33 (1H, *brt*, H-9'); 2,05 (3H, *s*, H-2''); 1,09 (3H, *s*, H-13'); 0.84 (3H, *s*, H-15').

PS-10 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu PS-9 kodlu (kolladonin) bileşiğin ^1H NMR spektrumuna benzemektedir. PS-10 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumundaki farklılıklar PS-9 spektrumunda görülen üç tersiyer metil piki yerine δ 1,09 ve 0.84 ppm'de üç protonluk iki tersiyer metil singleti olması, üçüncü tersiyer metil yerine δ 4,17 ve 3,95 ppm'de birer protonluk iki dubletin ($J=11,3$ Hz, -OCH₂- protonlarına ait AB sistemi) bulunması 14'. konumundaki metil grubunun biyogenetik yolakla oksitlenerek hidroksi metil haline dönüştüğünü ve δ 2,05 ppm'deki üç protonluk asetil metiline ait singlet bu hidroksi metil grubunun asetat esteri halinde olduğunu göstermektedir. Bu farklılıklara ilaveten δ 3,78 ppm'deki bir protonluk geniş singlet sinyali PS-9 bileşiğinde 3'. konumundaki ekvatoryel hidroksil grubunun PS-10 bileşiğinde aksiyal stereokimyaya sahip olduğunu göstermektedir. Bu farklılıklar PS-10 bileşiğinin 14'-asetoksibadrakemin yapısına sahip olduğunu belirtmektedir, daha önce *Heptaptera anisoptera* türünden elde edilen bu bileşiğin literatürdeki ^1H NMR spektrumu PS-10 bileşiğinin ^1H NMR spektrumu ile tamamen uyuşmaktadır bu da PS-10 molekülünün 14'-asetoksibadrakemin olduğunu kanıtlamaktadır [172,173].



Şekil 4.14. PS-10 kodlu bileşik: 14'-asetoksi-badrakemin

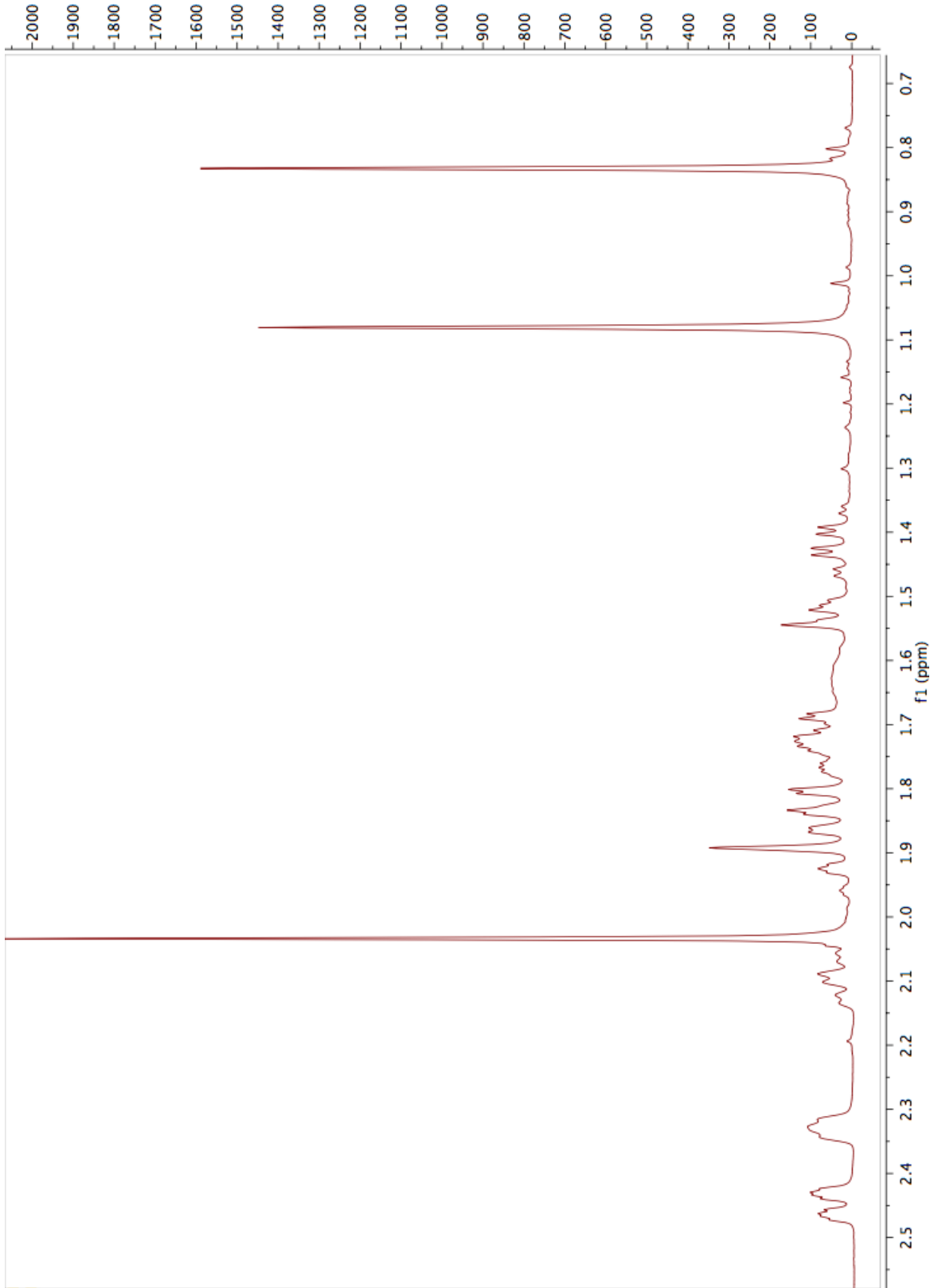
Resim 4.26. PS-10 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.27. PS-10 kodlu bileşimin H-4, H-5, H-6, H-8 ve H-3 protonlarına ait sinyalleri ile CDCl_3 sinyalini içeren genişletilmiş ^1H NMR alt alan spektrumu



Resim 4.28. PS-10 kodlu bileşiğin H-12'a ve b, H-11'-a ve b, H-14'-a ve b, H-3' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR orta alan spektrumu

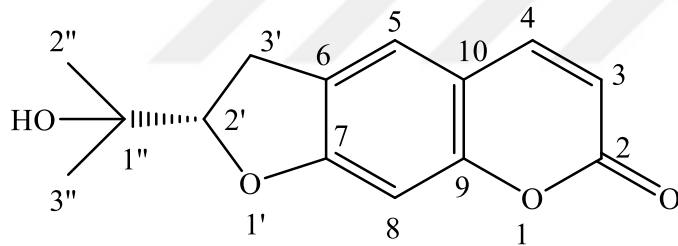


Resim 4.29. PS-10 kodlu bileşğin H-9', H-7', H-6', H-2', H-1', H-5', H-15' ve H-13' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR üst alan spektrumu

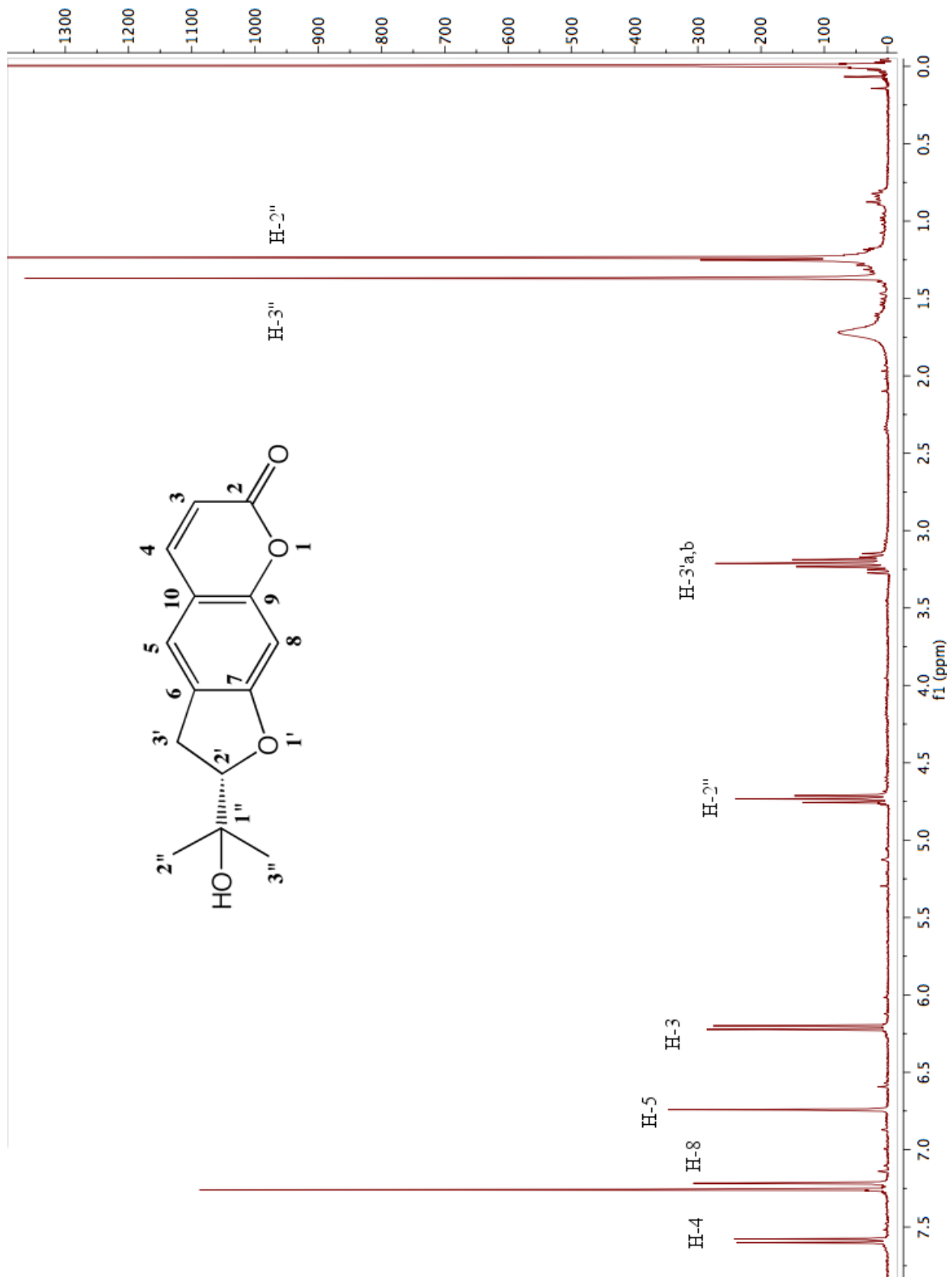
4.2.11. PS-11 kodlu bileşiğe ait bulgular (Marmesin)

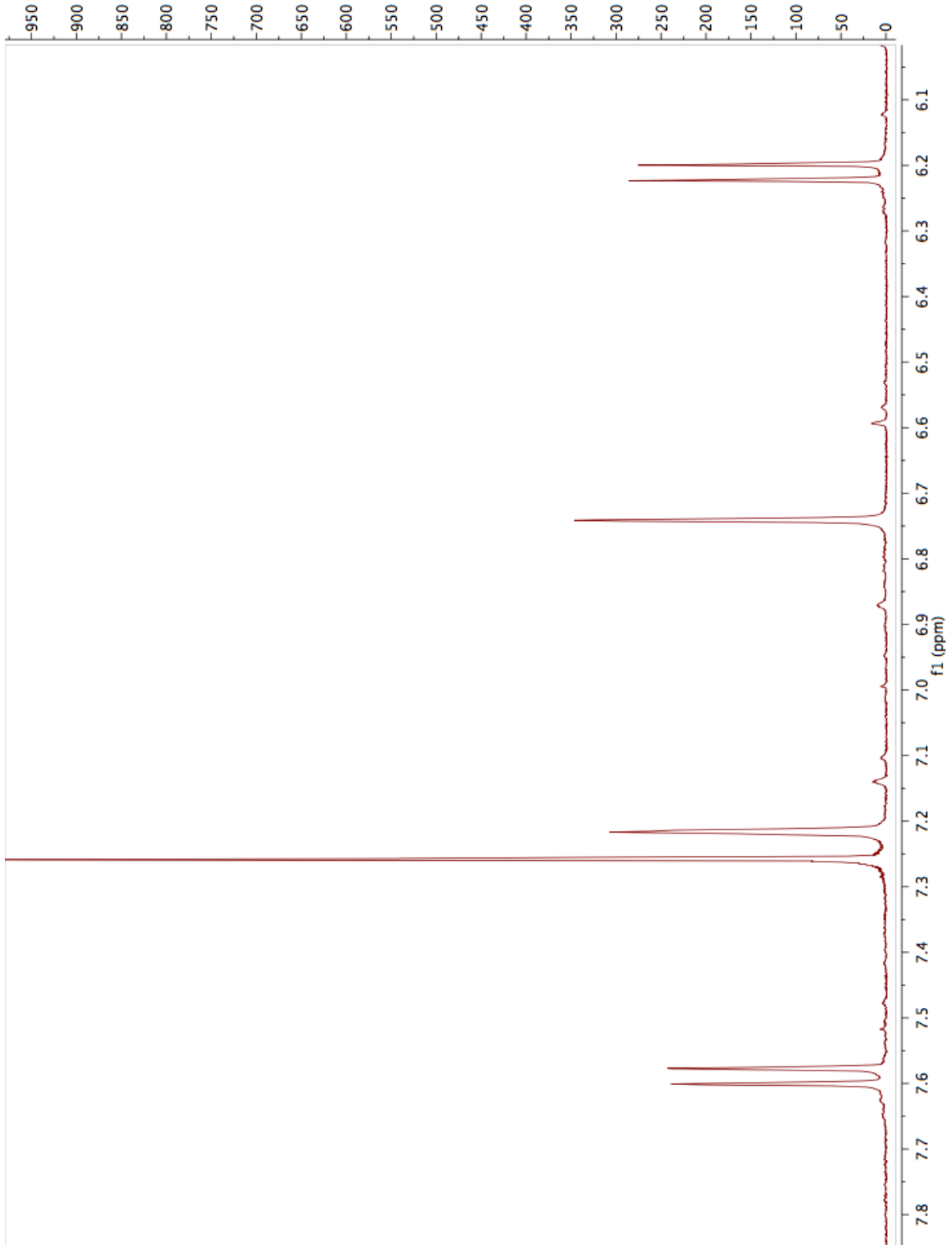
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,59 (1 H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-4); 7,22 (1 H, *brs*, H-8); 6,74 (1 H, *s*, H-5); 6,21 (1 H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-3); 4,73 (1H, *t*, $J=8,5$ Hz, H-2'); 3,24 (1H, *brdd*, $J = 8,5$ ve $15,6$ Hz, H-3'a); 3,18 (1H, *brdd*, $J = 8,5$ ve $15,6$ Hz, H-3'b), 1,37 (3H, *s*, H-3''); 1,24 (3H, *s*, H-2'')

PS-11 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu PS-5 kodlu (marmesin asetat) bileşiğin ^1H NMR spektrumuna çok benzemektedir. PS-11 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunda PS-5 kodlu bileşiğin spektrumunda δ 1,98 ppm'de görünen üç protonluk asetil metil sinyali bulunmamaktadır, ayrıca PS-5 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda δ 5,09 ppm'de görünen bir protonluk 2' konumundaki protonun sinyali PS-11 bileşiğinde δ 4,73 ppm'e kaymış bu da PS-5 bileşiğinin marmesin olduğunu göstermektedir. PS-11 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu marmesinin literatürdeki ^1H NMR spektrum verileri ile uyumlu olması bu bileşiğin marmesin olduğunu kanıtlamaktadır [153,174-179].

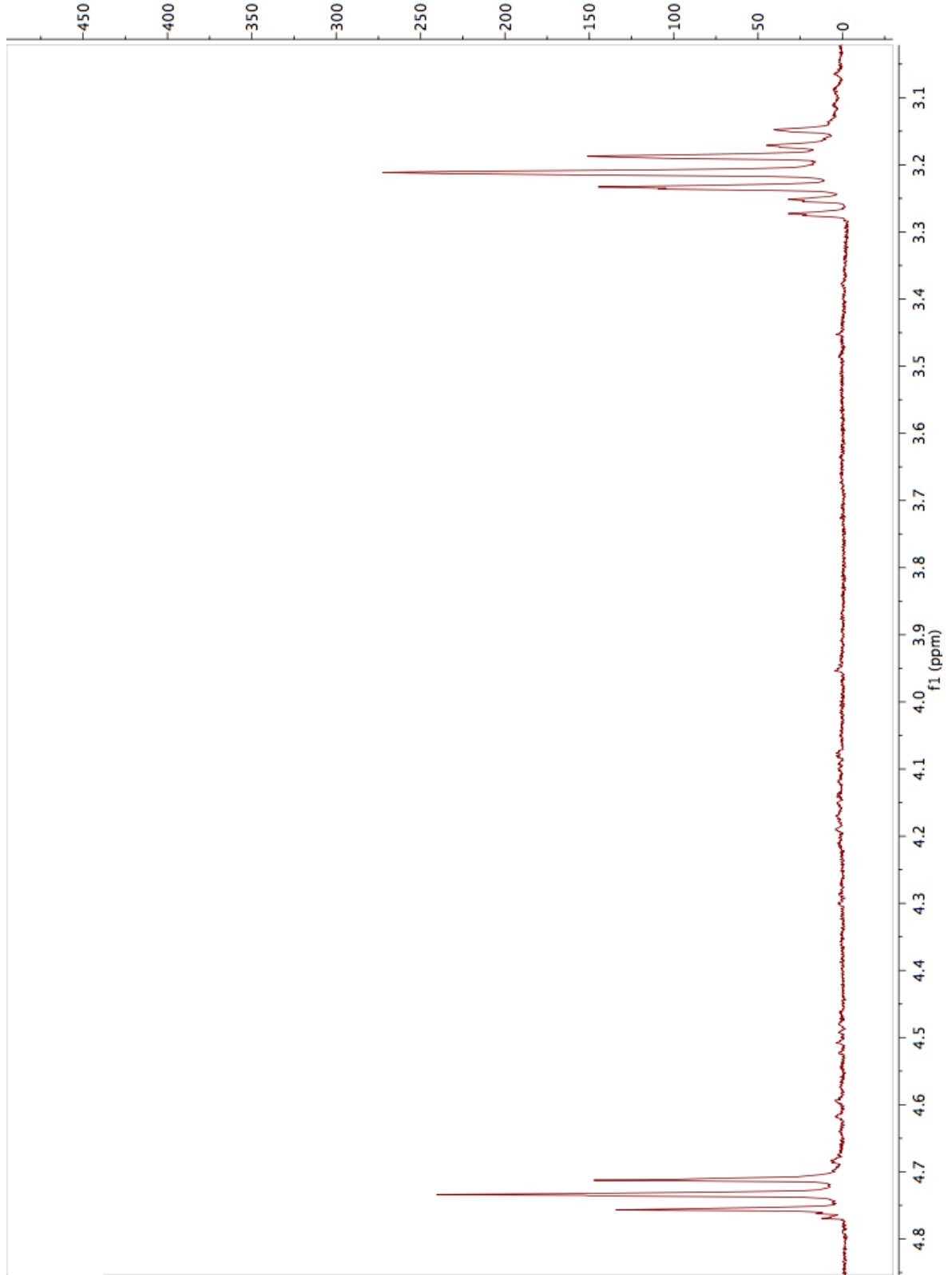


Şekil 4.15. PS-11 kodlu bileşik: Marmesin

Resim 4.30. PS-11 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.31. PS-11 kodlu bileşimin kumarin iskeletine ait H-4, H-8, H-5 ve H-3 protonları piklerini içeren alt alan (düşük alan) genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

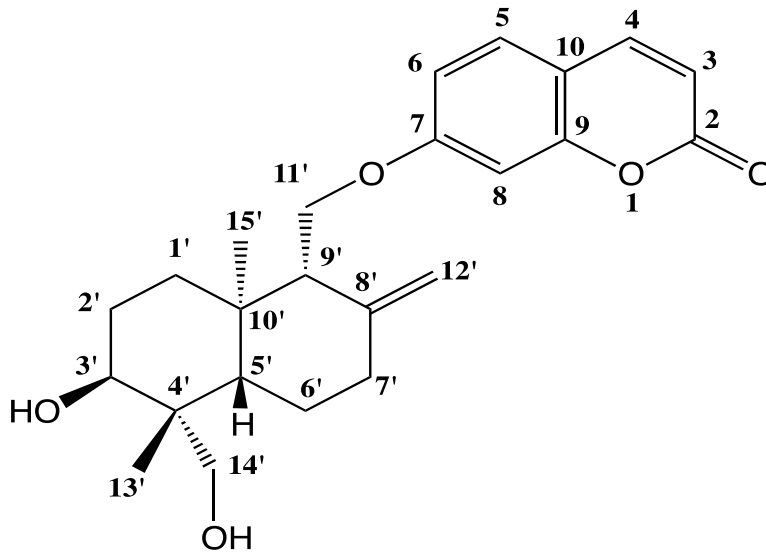


Resım 4.32. PS-11 kodlu bileşimin orta alanda bulunan H-2' ve H-3'-a ve b protonlarına ait pikleri içeren genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

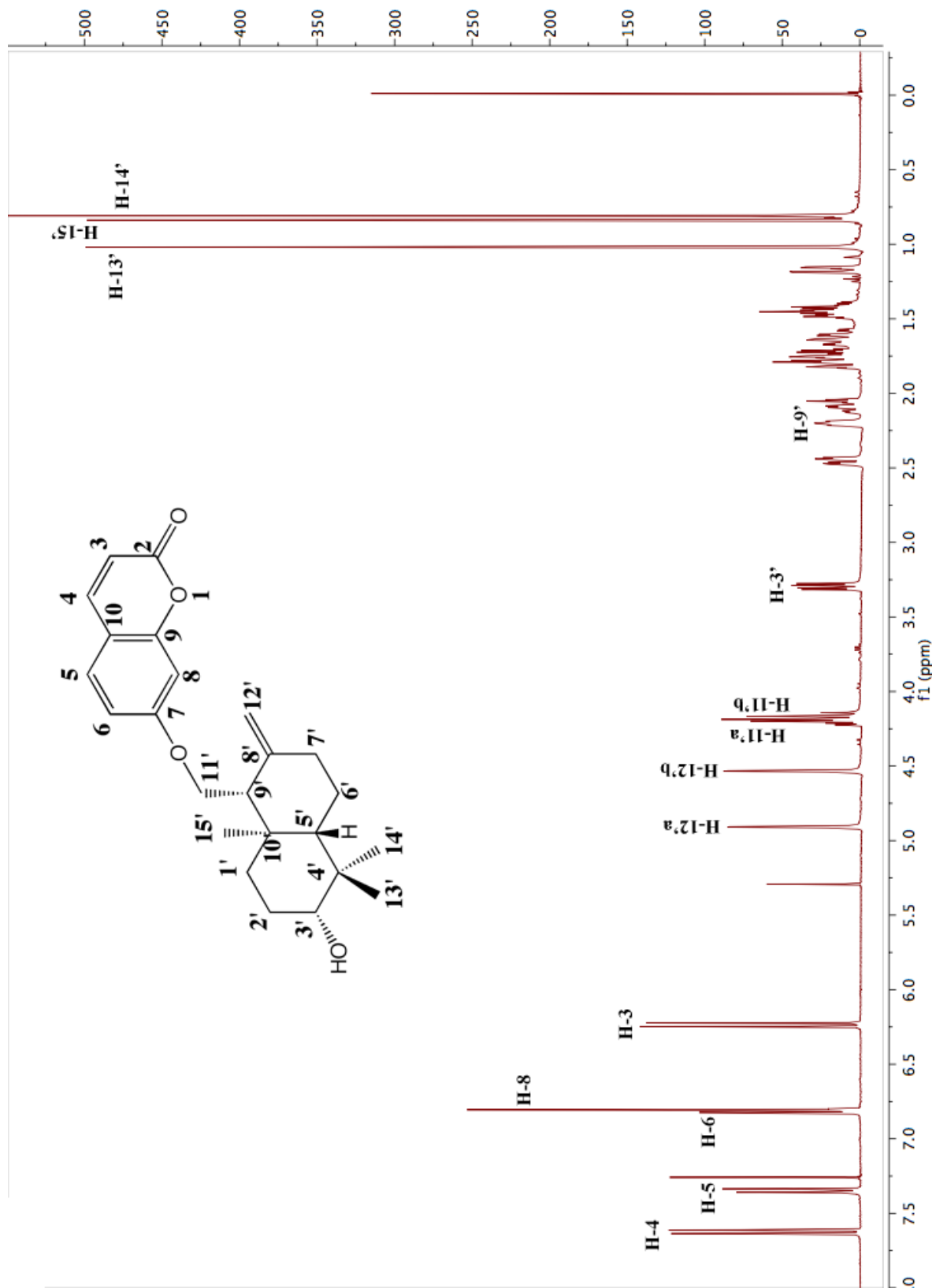
4.2.12. PS-12 kodlu bileşiğe ait bulgular (14'-hidroksi-badrakemin)

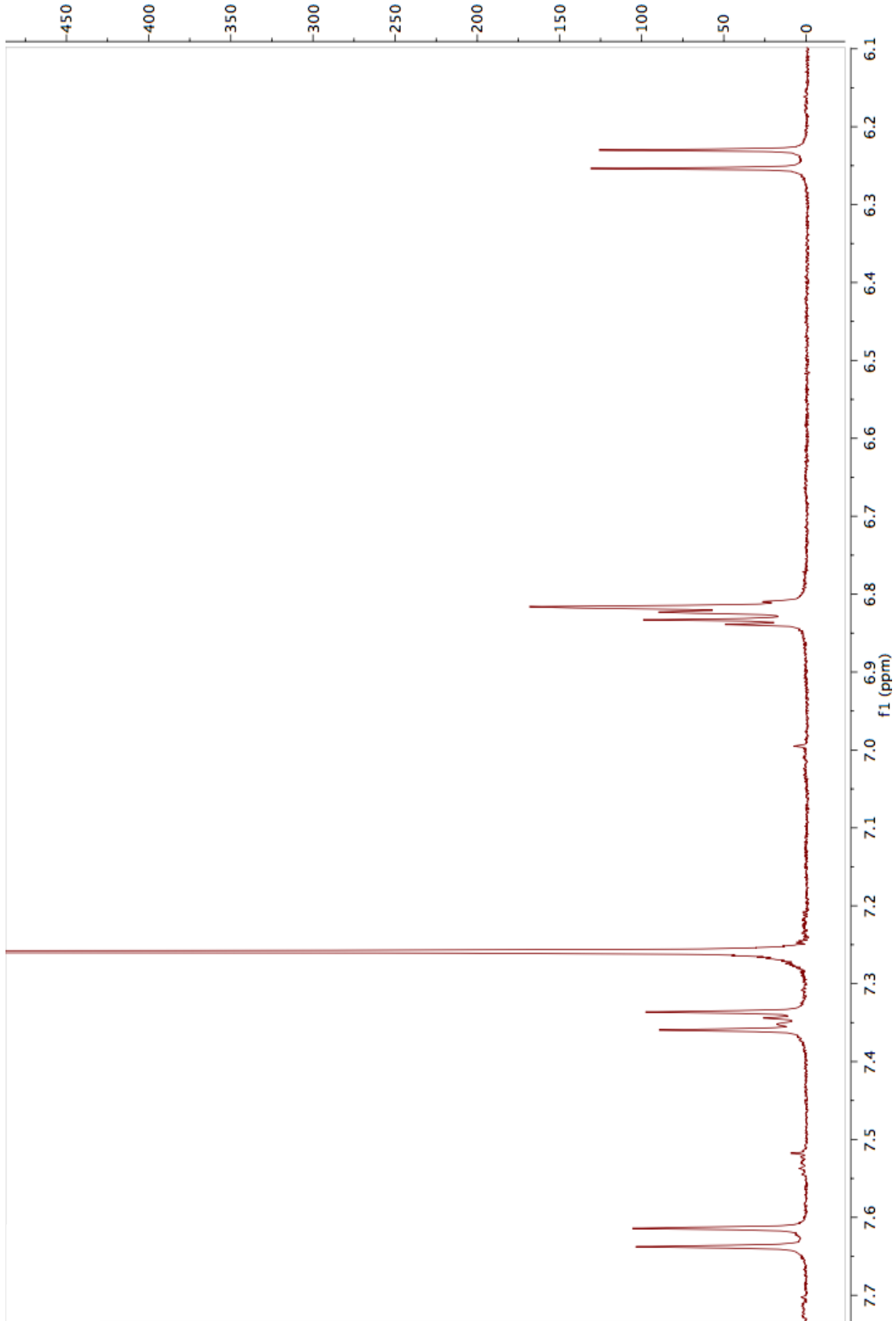
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3). δ ppm: 7,62 (1 H, *d*, $J=9,8$ Hz, H-4); 7,35 (1 H, *d*, H-5); 6,8 (1 H, *dd*, $J=7,2$ Hz ve $J=2,6$ Hz, H-6); 6,8 (1 H, *s*, H-8); 6,24 (1H, *d*, $J=9,8$ Hz, H-3); 4,90 (1H, *brs*, H-12'-a); 4,54 (1H, *brs*, H-12'-b); 4,22 (1H, *dd*, $J=4,1$ Hz ve $J=9,7$ Hz, H-11'a); 4,16 (1H, *dd*, $J=8,7$ Hz ve $J=9,7$ Hz, H-11'b); 3,94 (1H, *brm*, H-3'); 3,75 (1H, *d*, $J=11,2$ Hz, H-14'a); 3,53 (1H, *d*, $J=11,2$ Hz, H-14'b); 2,2 (1H, *btr*, $J=4,4$ Hz ve $J=7,7$ Hz, H-9'); 1,00 (3H, *s*, H-13'); 0.80 (3H, *s*, H-15').

PS-12 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu PS-10 (14'-asetoksi-badrakemin) kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumuna çok benzemektedir, aralarındaki fark PS-12 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumunda PS-10'un spektrumunda δ 2,05 ppm'de gözlemlenen üç protonluk asetat grubunun metil singletinin olamaması. İlâveten PS-12 bileşiğinin ^1H NMR spektrumunda 14' konumundaki protonların PS-10'dakine nazaran yaklaşık 0.5 ppm daha üst alana kaymış olması PS-10 bileşiğinde 14' konumundaki hidroksimetilen grubuna bağlı olan asetat ester grubunun PS-12 bileşiğinde olmadığını göstermektedir. Bu veriler PS-12 bileşiğinin PS-10 bileşiğinin dezasetil türevi yani 14'-hidroksi-badrakemin olduğunu belirtmektedir. Literatür taramasında bu bileşiğin daha önce izole edilmediği anlaşılmıştır. Bileşik miktarı çok az olduğundan (0,2 mg) kanıtlayıcı diğer spektroskopik yöntemler uygulanamamıştır. Bileşiğin yeniden ve daha fazla miktarda elde edilerek gerekli spektroskopik yöntemlerin uygulanabilmesi için çalışmaya devam edilmektedir.

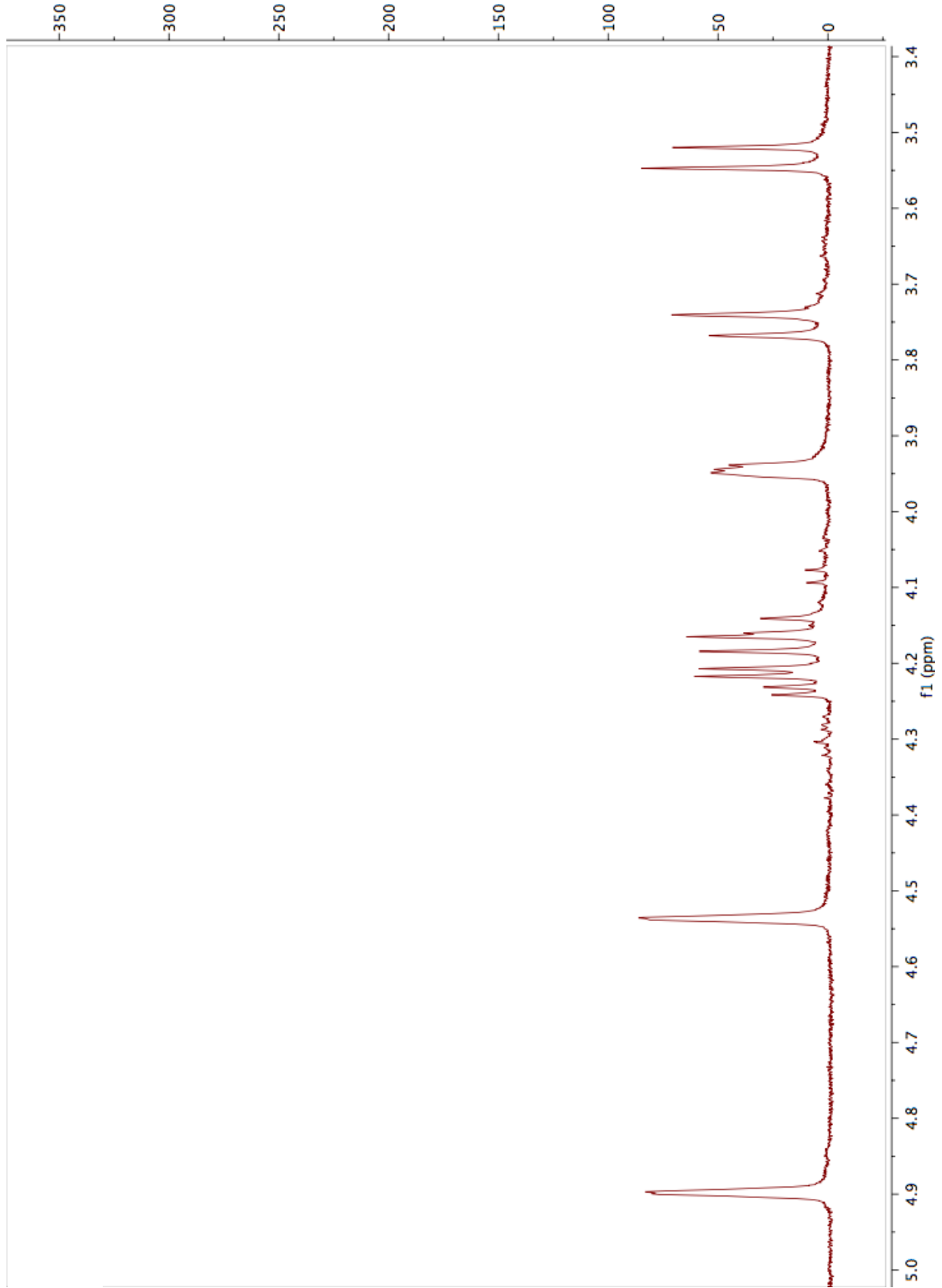


Şekil 4.16. PS-12 kodlu bileşik: 14'-hidroksi-badrakemin

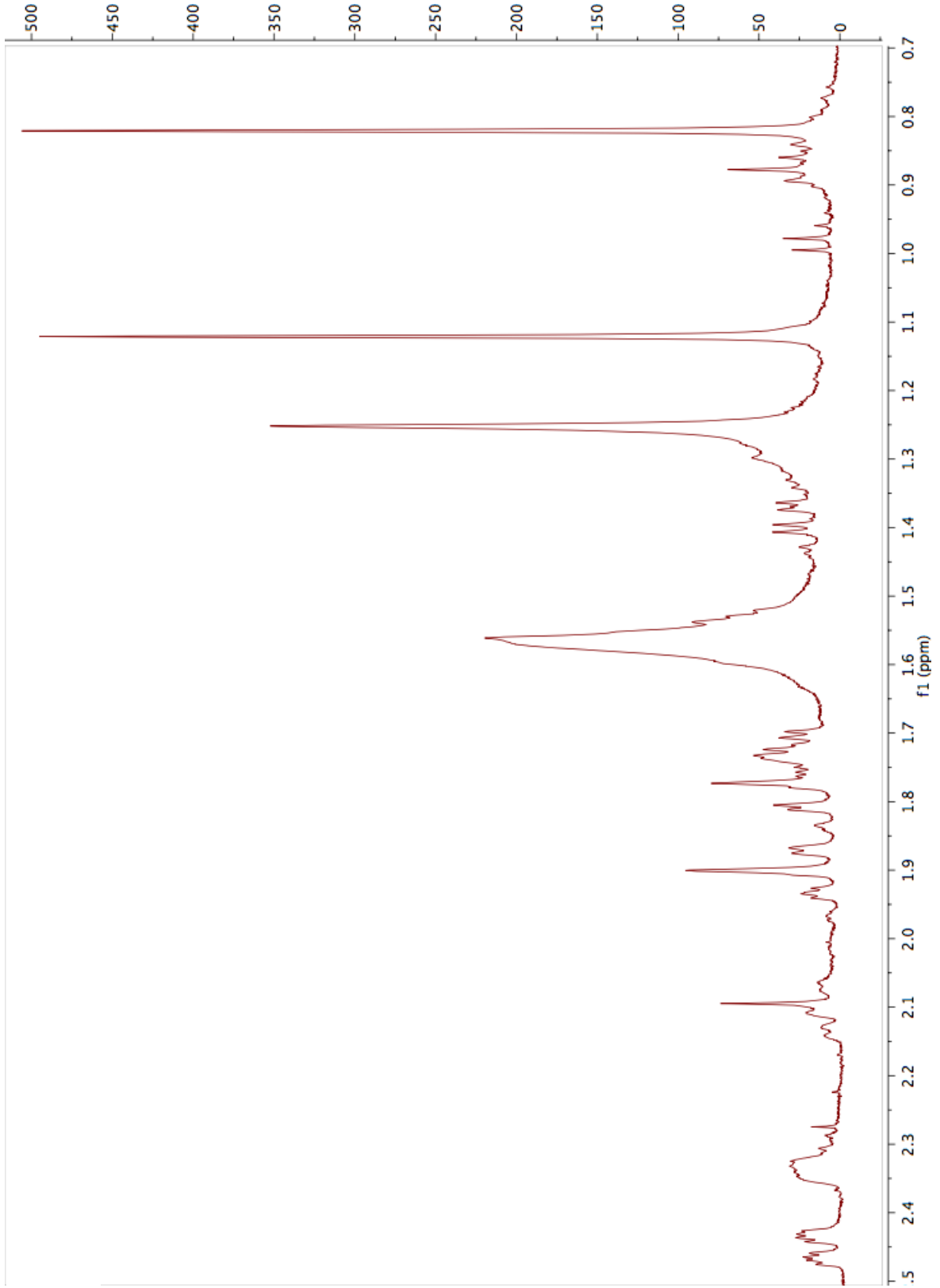
Resim 4.33. PS-12 kodlu bileşiğin ^1H NMR spektrumu



Resim 4.34. PS-12 kodlu bileşğin H-4, H-5, H-6, H-8 ve H-3 protonlarına ait sinyalleri ile CDCl_3 sinyalini içeren genişletilmiş ^1H NMR alt alan spektrumu



Resim 4.35. PS-12 kodlu bileşğin H-12'-a ve b, H-11'-a ve b, H-3', H-14'-a ve b protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR orta alan spektrumu



Resim 4.36. PS-12 kodlu bileşğin H-9', H-7', H-6', H-2', H-1' ve H-5' protonlarına ait sinyalleri içeren genişletilmiş ^1H NMR üst alan spektrumu



5. TARTIŞMA

Petroedmondia syriaca bitkisinin köklerinden hazırlanan petrol eteri, diklorometan, metanol ve etil asetat ekstrelerinden biyoaktivite yönlendirme fraksiyonlandırma sonucu en yüksek aktivite gösteren B,C,D,E,F ve G fraksiyonlardan kumarin türevi 13 bileşik (PS1-PS12) izole edilmiştir. Spektroskopik çalışmalar sonucu bu bileşikler 3'- α -isobutiriloksi-marmesin asetat, 3'- α -angeloiloksi-deltoin, smyrnioridin (3'-angeloiloksi-marmesin asetat), deltoin (marmesin angelat), marmesin asetat, skoparon (6,7-dimetoksi-2H-kromen-2-on), bergapten, psoralen, dezasetil-smyrnioridin, kolladonin, 14'-asetoksi-badrakemin, marmesin ve 14'-hidroksi-badrakemin tanımlanmıştır.

İzole ettiğimiz 3'-iso butiril marmesin asetat, smyrnioridin, marmesin asetat ve 14'-asetoksi badrakemin ile ilgili aktivite çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır. Diğer bileşiklerin literatürde çeşitli biyolojik aktiviteleri kayıtlı ise de *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. bitkisinin köklerinden izole ettiğimiz skoparonun akut akciğer hasarı koruyucu etkisi [110], PC12 hücrelerinde nevrit büyümesi üzerine etkisi [111], antiadiapojenik etkisi [130], dopamin salınımı üzerinde etkisi [138], fitoaleksinin [157], antiosteoporatik etki [142], antialerjik aktivitesi [144], hepatoprotektif etkisi [145,149,150,151], antioksidan [147], antienflamatuvar [137], antiasmatik [152], sitokrom P450 üzerine etkisi [128]; marmesinin linear kumarinlerin sentezinde önemli bir basamak olduğu [27], antifungal aktivitesi [158], fitoaleksinin [61], sitotoksik [119], antianjiojenik aktivitesi [140], antitüberküloz aktivitesi [90], UVA filtresi [153] olduğu; deltoinin NO inhibitörü [113] ve hepatoprotektif etkisi olduğu [148]; bergaptenin, antimikrobiyal [146], sitotoksik [118,146], fototoksik [160], antitüberküloz [90], kuvvetli antiplatelet agregasyon aktivitesi [52], antifungal [118], antibakteriyel [118], sitotoksik [118], dolaşım sistemi üzerine etkisi [25], PUVA tedavisinde fotokemoterapide kullanıldığı [4,160]; Psoralenin, antifungal [22,62,118,], antibakteriyel [118,62], antitüberküloz [22], fototoksik [160] ve yüksek dozda mutajenik olduğu [25]; kolladonin sitotoksik aktivitesi [78] bilinmekle birlikte sitotoksik etkileri ile ilgili veriler bulunmamaktadır.

İzole ettiğimiz 3'-iso butiril marmesin asetat, smyrnioridin, marmesin asetat ve 14'-asetoksi badrakemin ile ilgili aktivite çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır.

Tez çalışmamız kapsamında MTT yönetimi ile MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksik aktivite çalışmasında 50 µg/ml konsantrasyonlarında deltoin %100,26 oranında, kollodonin % 100,21 oranında, 14'asetoksi badrakemin %76,76 oranında inhibe etmiştir.

Kök petrol eteri ekstresinin aktivitesi en fazla olan ve 25 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığını inhibe eden fraksiyonundan majör bileşik olarak izole ettiğimiz kolladonin, deltoin ve 14'-asetoksi-badrakemin sitotoksik aktiviteden sorumlu bileşik olarak belirlenmiştir.

Literatür bilgileri incelendiğinde kollodoninin sitotoksik aktivite gösterdiği, hazırlanan hücre hattında bu etkinin artmış olduğu ve bu nedenle üzerinde meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere ilaç geliştirme çalışmaları yapılabileceğinin belirtildiği görülmektedir [78].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Şanlıurfa ili Siverek ilçesi Karacadağ yöresinden Haziran 2013 tarihinde toplanan *Petroedmondia syriaca* bitkisinin kökü ve meyveleri sitotoksik aktivite yönünden incelenmiş ve aktiviteden sorumlu bileşik/bileşikler araştırılmıştır.

Bitkinin kökünden artan polaritede çözücüler kullanarak hazırlanan ekstrelerden petrol eteri ve diklorometan ekstresi 25 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla %77,22 ve %77,12 oranında inhibisyon gösterdiği için aktiviteden sorumlu bileşik/bileşiklerin belirlenebilmesi için çalışmaya petrol eteri ve diklorometan ekstresi üzerinden devam edilmiştir. Etil asetat ekstresinde 100 µg/ml, metanol ekstresinde ise 250 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı inhibisyonu görülmüştür. Meyve materyalinin petrol eteri ve diklorometan ekstresi 250 µg/ml konsantrasyonda hücre canlılığı inhibisyonu gösterdiği için bu ekstreler üzerinde izolasyon çalışması yapılmamıştır.

Kök petrol eteri ve diklorometan ekstresinin kolon kromatografisi fraksiyonlarından en yüksek aktivitenin görüldüğü C ve F fraksiyonundaki bileşiklerin izole edilerek aktivitelerinin saptanması için izolasyon çalışmaları yapılmış ancak bunun yanı sıra bitki üzerinde şimdiye kadar yapılmış olan herhangi bir fitokimyasal çalışmaya rastlamadığımız için 100 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını % 50 ve daha yüksek oranlarda inhibe etmiş olan B, D, E ve G fraksiyonları üzerinde de izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Kök petrol eteri ve diklorometan ekstresi fraksiyonlarından kolon kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanılarak elde edilen ve saflaştırılan bileşikler spektral özelliklerinden yararlanılarak marmesin, marmesin asetat, 3'-isobutiroiloksi-marmesin-asetat, 14'-asetoksi-badrakemin, 14'-hidroksi-badrakemin, kolladonin, skoparon, psoralen, bergapten, deltoin, smyrnioridin, PS-2 (3'-α-angeloiloksi-deltoin) ve PS-8 olarak teşhis edilmiştir. PS-2 ve PS-8 kodu verdiğimiz bileşikler ve 14'-hidroksi-badrakemin'in daha önce elde edilmiş olduğuna dair bir literatür bilgisine rastlamadık dolayısıyla bu bileşikler ilk kez tarafımızdan izole edilmiş ve literatüre kazandırılmıştır.

Bitkiden elde edilen ekstrelerin, ekstre fraksiyonlarının ve aktif fraksiyonlardan elde edilen bileşiklerin sitotoksik aktivitesi MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid] yöntemiyle MCF-7 (meme kanseri hücresi) hücre hattı üzerinde tayin edilmiştir.

Aktif olan kök petrol eteri ve diklorometan ekstresinin %75,55 oranında inhibisyon gösteren C kodlu fraksiyondan 2 bileşik (PS-3, PS-4) izole edilmiştir. Bu iki bileşik aktif kök ekstresinden birbirlerine yakın miktarlarda elde edilmiş olan en yüksek miktardaki bileşiklerdir. %88,23 oranında inhibisyon gösteren F kodlu fraksiyondan ise 3 bileşik (PS-9, PS-10, PS-11) izole edilmiştir. Bu üç bileşikten ikisi (PS-9, PS-10) sırasıyla 29,37 ve 27,91 μM IC_{50} değerleri ile kök ekstresinin en yüksek etkiyi göstermiş olan bileşikleridir. Fraksiyon miktarlarına baktığımızda C fraksiyonunun aktivite görülen fraksiyonlar içindeki oranı % 45,92, F fraksiyonununki ise % 3,38'dir. F fraksiyonu miktarı az olmakla birlikte en yüksek aktiviteyi gösteren bileşikler taşımaktadır. C fraksiyonundan elde edilen PS-4 kodlu bileşik ise 50 μM konsantrasyonda %100,26 oranında inhibisyon göstermiş olup IC_{50} değeri 88,93 μM dır. Dolayısıyla bitkinin sitotoksik aktivitesinden sorumlu olan bileşikler PS-4 (deltoin), PS-9 (kolladonin) ve PS-10 (14'-asetoksi-badrakemin) dur.

Daha önce üzerinde fitokimyasal ve biyoaktivite yönünden çalışma yapılmış olduğuna dair bir literatür bilgisine rastlamadığımız *Petroedmondia syriaca* bitkisi ilk kez tarafımızdan sitotoksik aktivitesi ve fitokimyası yönünden araştırılmıştır. Ayrıca 3 yeni bileşik (PS-2, PS-8 ve PS-12) izole edilerek literatüre kazandırılmıştır.

MCF-7 hücre hattı üzerinde oldukça yüksek aktivite gösteren bileşikler taşıyor olması nedeniyle bitkinin farklı hücre hatları üzerinde göstereceği sitotoksik aktivitenin de araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Rechinger, K.H. (1987). *Flora of Iranica*, p. 167, Graz.
2. Stevens, P.F. (1972). *Smyrniopsis Boiss.* In Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol 4, pp. 340-342, Edinburgh University Press, Edinburgh.
3. Murray, R.D.H., Mendez, J., ve Brown, S.A. (1982). *The Natural Coumarins*. John Wiley and Sons Ltd. New York
4. Bruneton, J. (1995). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 229, Technique & Documentation-Lavoisier, Paris
5. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., ve Williamson, E. M. (2004). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 73, Churchill Livingstone, London.
6. Robbers, J. E., Speedie, M.K., ve Tyler, V.E. (1996). *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, 135, Williams & Wilkins, Baltimore.
7. Gliszczynska, A., ve Brodelius, P.E. (2012). Sesquiterpene coumarins. *Phytochem Rev*, 11:77–96.
8. Roskopf, F., Kraus, J., ve Franz, G. (1992). Immunological and Antitumor Effects of Coumarin and Some Derivatives. *Pharmazie*, 47, 139-42.
9. Nazari, Z.E., ve Iranshahi, M. (2011). Biologically Active Sesquiterpene Coumarins from *Ferula* Species. *Phytother. Res.* 25: 315–323.
10. Dzhafarov, Z. R., Kuliev, A. A., Kuliev, Z. A., Malikov, V. M., Ismailov, N. M., ve Kirov S. M. (1988). A New Dihydrofurocoumarin from *Smyrniopsis aucheri*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, No. 5, pp. 754-755.
11. Faridi P., Ghasemi Y., Gholami A., Mehregan, I., ve Mohagheg Hzadeh, A.(2008). Antimicrobial Essential Oil from *Smyrniopsis aucheri*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 44, No. 1.
12. Dzhafarov, Z. R., Kuliev, Z.A., Vdovin, A. D., Kuliev, A. A., Malikov, Z. R V. M., ve Ismailov, N. M. (1992). Coumarins of *Smyrniopsis aucheri*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, No. I, pp. 36-40.
13. Tashkhodzhaev, B., Kuliev, Z. A., ve Dzhafarov, Z. R. (1992). Crystal and Molecular Structures of Two Polymorphs of A Furanocoumarin - Smyrindiol from *Smyrniopsis aucheri*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, No. 6, pp. 627-632.
14. Savina, A. A., Nikonov, G. K., ve Perel'son, M. E. (1969). Smirniorin-A New Coumarin from the Roots of *Smirniopsis aucheri*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, Vol. 5, No. 6, pp. 592-593, 1969.
15. Savina, A. A., Perel'son, M. E., ve Nikonov, G. K. (1970). The Structure of *Smyrnioridin*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, Vol. 6, No. 2, pp. 185-190.

16. Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans Pharmacognosy*, Elsevier Ltd., 16th edition.
17. Herrstadt, I., ve Heyn, C.C (1972). Prangos Lindl. In P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press,4, pp. 387-388.
18. Özhatay, F.N., Kültür, Ş., ve Gürdal, M.B. (2011). Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey V. *Turkish Journal of Botany*, 35 (5), 589-624.
19. Baytop, A. (1983). *Farmasötik Botanik*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları.
20. Tanker, N., Koyuncu, M., ve Coşkun, M. (1998). *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları No:78. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi.
21. Egan, D., O’Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., ve Thornes, R. D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metabolism Reviews*, vol. 22, no. 5, pp. 503–529.
22. Venugopala, K. N., Rashmi V., ve Odhav B. (2013). Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 963248, 14
23. Atta-ur-Rahman, M., Shabbir, S., Sultani Z., Jabbar A., ve Choudhary M. I. (1997). Cinnamates and coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*. *Phytochemistry*, vol. 44, no. 4, pp. 683–685.
24. Choi J., Lee K. T., Ka, H., Jung, W. T., Jung, H. J., ve Park H. J. (2001). Constituents of the essential oil of the *Cinnamomum cassia* stem bark and the biological properties. *Archives of Pharmacal Research*, vol. 24, no. 5, pp. 418–423.
25. Waksmundzka-Hajnos, M., ve Hawry, M.A.. (2008). *Chromatographic Science Series Volume 99: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* 366-397.
26. Lozhkin, A.V., ve Skanyan, E.I. (2006). Structure of Chemical Compounds, Methods of Analysis and Process Control. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, Vol.40, No.6, 337-346.
27. Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., ve Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem Rev* 5:293–308.
28. Sahoo, S.S., Shukla, S., Nandy, S., ve Sahoo, H.B. (2012). Synthesis of novel coumarin derivatives and its biological evaluations. *European Journal of Experimental Biology*, 2 (4):899-908.
29. Piller, N. B. (1975). A comparison of the effectiveness of some anti inflammatory drugs on thermal oedema. *British Journal of Experimental Pathology*, vol. 56, no. 6, pp. 554–560.

30. Huang, G. J., Deng, J. S., ve Liao, J. C. (2012). Inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 participate in antiinflammatory activity of imperatorin from *Glehnia littoralis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 7, pp. 1673–1681.
31. Marquez, N., Sancho, R., Ballero, M., Bremmer, P., Appendino, G., ve Fiebich, B.L. (2004). Imperatorin inhibits T-cell proliferation by targeting the transcription factor NFAT. *Planta Medica*, 70, 1-6.
32. Moon, L., Ha, Y.M., Jang, H.J., Kim, H.S., Jun, M.S., Kim, Y.M., Lee, Y.S., Lee, D.H., Son, K.H., Kim, H.J., Seo, H.G., Lee, J.H., Kim, Y.S., ve Chang, K.C. (2011). Isoimperatorin, cimicidine E and 23-O-acetylshengmanol-3-xyloside from *Cimicifugae rhizome* inhibit TNF- α -induced VCAM-1 expression in human endothelial cells: involvement of PPAR- γ upregulation and PI3K, ERK1/2, and PKC signal pathways. *J Ethnopharmacol.* 27;133(2):336-44.
33. Lino, C. S., Taveira, M. L., Viana, G. S. B., ve Matos, F. J. A. (1997). Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research*, 11 (3), 211-215.
34. Witacenis, L., Seito, N., ve Di Stasi, L. C. (2010). Intestinal antiinflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chemico- Biological Interactions*, vol. 186, no. 2, pp. 211–218.
35. Kwon, O. S., Choi, J. S., ve Islam, M. N. (2011). Inhibition of 5- lipoxygenase and skin inflammation by the aerial parts of *Artemisia capillaris* and its constituents. *Archives of Pharmacal Research*, vol. 34, no. 9, pp. 1561–1569.
36. Hoult, J.R., Forder, R.A., Heras, B., Lobo, I.B, ve Payá, M. (1994) Inhibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation. *Agents Actions.* Aug;42(1-2):44-9.
37. Tandan, S. K., Chandra, S., Tripathi, H. C., ve Lal, J. (1990). Pharmacological actions of seselin, a coumarin from *Seseli indicum* seeds. *Fitoterapia* Vol.61 No.4 pp.360-363.
38. Liao, P.C., Chien, S.C., Ho, C.L., Wang, E.I., Lee, S.C., Kuo, Y.H., Jeyashoke, N., Chen, J., Dong, W.C., Chao, L.K., ve Hua, K.F. (2010). Osthole regulates inflammatory mediator expression through modulating NF- κ B, mitogen-activated protein kinases, protein kinase C, and reactive oxygen species. *J Agric Food Chem.* Oct 13;58(19):10445-51.
39. Jang, S., Kim, Y.J., Lee, W.Y., Kwak, K.C., Baek, S.H., Kwak, G.B., Yun, Y.G., Kwon, T.O., Chung, H.T., ve Chai, K.Y. (2005). Scoparon from *Artemisia capillaris* Inhibits the Release of Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Cells upon Stimulation Cells by- γ Interferon Plus LPS. *Arch Pharm Res* Vol 28, No 2, 203-208, 2005.
40. Wang, C.C., Lai, J.E., Chen, L.G., Yen, K.Y., ve Yang, L.L. (2000). Inducible Nitric Oxide Synthase of Chinese Herbs. Part:2 Naturally Occuring Furanocoumarins *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8, 2701-2707.

41. Hirsh, J., Dalen, J. E., ve Anderson, D. R. (2001). Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*, vol. 119, no. 1, supplement, pp. 8S–21S.
41. Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W., ve Roepstorff, P. (1974). Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 71, no. 7, pp. 2730–2733.
43. Whitlon, D. S., Sadowski, J. A., ve Suttie, J. W. (1978). Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*, vol. 17, no. 8, pp. 1371–1377.
44. Fasco, M. J., Hildebrandt, E. F., ve Suttie, J. W. (1982). Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 19, pp. 11210–11212.
45. Choonara, I.A., Malia, R. G., ve Haynes B. P. (1988). The relationship between inhibition of vitamin K1 2,3-epoxide reductase and reduction of clotting factor activity with warfarin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 25, no. 1, pp. 1–7.
46. Malhotra, O. P., Nesheim, M. E., ve Mann, K. G. (1985). The kinetics of activation of normal and γ -carboxyglutamic acid-deficient prothrombins. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, no.1, pp. 279–287.
47. Nelsestuen, G. L. (1976). Role of γ carboxyglutamic acid. An unusual protein transition required for the calcium dependent binding of prothrombin to phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 251, no. 18, pp. 5648–5656.
48. Prendergast, F. G., ve Mann, K. G. (1977). Differentiation of metal ion induced transitions of prothrombin fragment 1. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, no. 3, pp. 840–850.
49. Borowski, M., Furie, B. C., Bauminger, S., ve Furie, B. (1986). Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation-specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 32, pp. 14969–14975.
50. Rosselli, S., Maggio, A., Bellone, G., Formisano, C., Basile, A., Cicala, C., Alfieri, A., Mascolo, N., ve Bruno, M. (2007). Antibacterial and anticoagulant activities of coumarins isolated from the flowers of *Magydaris tomentosa*. *Planta Med.* Feb;73(2):116-20.
51. Golfakhrabadi, F., Abdollahi, M., Ardakani, M.R., Saeidnia, S., Akbarzadeh, T., Ahmadabadi, A.N., Ebrahimi, A., Yousefbeyk, F., Hassanzadeh, A., ve Khanavi, M. (2014). Anticoagulant activity of isolated coumarins (suberosin and suberenol) and toxicity evaluation of *Ferulago carduchorum* in rats. *Pharm Biol.* Oct;52(10):1335-40.
52. Chen, I.S., Chang, C.T., Sheen, W.S., Teng, C.M., Tsai, I.L., Duh, C.Y., ve Ko, F.N.(1996). Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry*. Feb;41 (2): 525-30

53. Basile, A., Sorbo, S., ve Spadaro V. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*, vol. 14, no. 3, pp. 939–952
54. Kiplimo, J.J., ve Koorbanally, N.A. (2012). Antibacterial activity of an epoxidised prenylated cinnamaldehyde derivative from *Vepris glomerata*. *Phytochemistry Letters* 5, 438-442.
55. Gellert, M., O’Dea, M. H., Itoh, T., ve Tomizawa, J. I. (1976). Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, no. 12, pp. 4474–4478.
56. Shahverdi, A.R., Iranshahi, M., Mirjani, R., Jamalifar, H., Amin, G., ve Shafiee, A. (2005). Bioassay-Guided Isolation and Identification of an Antibacterial Compound From *Ferula Persica* Var. *Persica* Roots. *DARU* Volume 13, No. 1.
57. Fazly Bazzaz, B.S., Du, A.R., Iranshahi, M., Naderinasab, M., ve Khajeh, K.M. (2009). Evaluating the Potentiating Effect of Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* on three common antibiotics against resistant hospital isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3): 217-221.
58. Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Zarrini, G., Dehghan, G., ve Iranshahi, M. (2007) Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalixin against *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* Sep;30(9):1805-7.
59. Widelski, J., Popova, M., Graikou, K., Glowniak, K., ve Chinou, I. (2009). Coumarins from *Angelica lucida* L. antibacterial activities. *Molecules*, 14(8), 2729-2734.
60. Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Miceticha, R.G., Nishibe, S., ve Daneshtalab, M. (1999). Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 7, Issue 9, September Pages 1933–1940.
61. Afek A., Orenstein J, Carmeli S., ve Aharoni N. (2002). Marmesin, a new phytoalexin associated with resistance of parsley to pathogens after harvesting. *Postharvest Biology and Technology* 24 89–92.
62. Siva, G., Sivakumar, S., Kumar, G. P., Vigneswaran, M., Vinoth, S., Selvan, A.,M., Ahamed, A.P., Manivannan,K., Kumar, R.R., Thajuddin,N., Kumar,T.S., ve Jayabalan,N. (2015). Optimization of elicitation condition with Jasmonic Acid, characterization and antimicrobial activity of Psoralen from direct regenerated plants of *Psoralea corylifolia* L. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4 ,624–631.
63. Chebrolu, K.K., Jayaprakaska, G.K., Jifon, J., ve Patil, B.S.(2013). Purification of coumarins, including meranzin and pranferin, from grapefruit by solvent partitioning and a hyphenated chromatography. *Seperation and Purification Technology* 116, 137-144.
64. Teng, C.M., Lin, C. H., Ko, F.N., Wu, T. S., ve Huang, T. F. (1994) . The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea-pig trachea. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, vol. 349, no. 2, pp. 202–208.

65. Patil, A. D., Freyer, A. J., ve Eggleston, D. S. (1993). The inophyllums, novel inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from the Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 36, no. 26, pp. 4131–4138.
66. Kashman, Y., Gustafson, K. R., ve Fuller R. W. (1992). The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 35, no. 15, pp. 2735–2743.
67. Newman, R. A., Chen, W., ve Madden, T. L. (1998). Pharmaceutical properties of related calanolide compounds with activity against human immunodeficiency virus. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 87, no. 9, pp. 1077–1080.
68. Spino, C., Dodier, M., ve Sotheeswaran, S. (1998). Anti-HIV coumarins from calophyllum seed oil. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 8, no. 24, pp. 3475–3478.
69. McKee, T. C., Fuller, R. W., ve Covington C. D. (1996). New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. *Journal of Natural Products*, vol. 59, no. 8, pp. 754–758
70. Sancho, R., M´arquez, N., ve G´omez-Gonzalo, M. (2004). Imperatorin inhibits HIV-1 replication through an Sp1-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 36, pp. 37349– 37359.
71. Ghannadi, A., Khadijeh, F., Shokoohinia, Y., Behbahani, M., ve Shahnoush, A. (2014). Anti-viral Evaluation of Sesquiterpene Coumarins from *Ferula assa-foetida* against HSV-1. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2):523-530.
72. Emami, S., ve Dadashpour, S. (2015). Current developments of coumarin-based anti-cancer agents in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry* 102 611-630.
73. Lacy, A., ve Kennedy, R.O. (2004). Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 3797-3811.
74. Chou, S.Y., Hsu, C. S., Wang, K. T., Wang, M.C., ve Wang, C.C. (2007). Antitumor effects of osthol from *Cnidium monnieri*: an *in vitro* and *in vivo* study. *Phytotherapy Research*, vol. 21, no. 3, pp. 226– 230.
75. Arsenyan, P., Vasiljeva, J., Shestakova, I., Domracheva, I., Jaschenko, E., Romanchikova, N., Leonchiks, A., Rudevica, Z., ve Belyakov, S. (2015). Selenophenol [3,2]-and [2,3-c]coumarins: Synthesis, cytotoxicity, angiogenesis inhibition, and antioxidant properties. *C.R.Chimie* 18, 399-409.
76. Lee, C.L., Chiang, L.C., Cheng, L.H., Liaw, C.C., Abd El-Razek, M.H., Chang F.R., ve Wu, Y.C. (2009). Influenza A (H₁N₁) Antiviral and Cytotoxic Agents from *Ferula assa-foetida*. *J Nat Prod*. Sep;72(9):1568-72.

77. BeHzaad, S., Pirani, A., ve Mosaddegh, M. (2014). Cytotoxic Activity of Some Medicinal Plants from Hamedan District of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13:199-205.
78. Li, G., Li, X., Cao, L., Zhang, L., Shen, L., Zhu, J., Wang, J., ve Si, J. (2015). Sesquiterpene coumarins from seeds of *Ferula sinkiangensis*. *Fitoterapia* 103 222–226.
79. Lopez-Gonzalez, J. S., Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Molina-Guarneros, J.A., Morales-Fuentes, J., ve Mandoki, J. J. (2004). Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 43, 275—283.
80. Thornes, R. D., Daly, L., Lynch, G., Breslin, B., Browne, H., ve Browne, H.Y. (1994). Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*;120(Suppl):S32—4.
81. Marshall, M. E., Mohler, J. L., Edmonds, K., Williams, B., Butler, K., ve Ryles, M. (1994). An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *J Cancer Res Clin Oncol* 120(Suppl):S39—42.
82. Mohler, J.L., Williams, B.T., Thompson, I.M., ve Marshall, M.E. (1994). Coumarin (1,2-benzopyrone) for the treatment of prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*;120(Suppl):S35— 8.
83. Von Angerer, E., Kager, M., ve Maucher, A. (1994). Anti-tumour activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J Cancer Res Clin Oncol*;120 (Suppl):S14—6.
84. Lake, B. G. (1999). Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol* 37:423—53.
85. Marshall, M.E., Kervin, K., Benefield, C., Umerani, A., Albainy-Jenei, J., ve Zhao, Q. (1994). Growth-inhibitory effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin on human malignant cell lines *in vitro*. *J Cancer Res Clin Oncol*;120(Suppl):S3—S10.
86. Myers, R.B., Parker, M., ve Grizzle, W.E. (1994). The effects of coumarin and suramin on the growth of malignant renal and prostatic cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*;120(Suppl):S11—3.
87. Thakur, A., Singla, R., ve Jaitak, V. (2015). Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 101 476-495.
88. Marshall, M. E., Mohler, J. L., ve Edmonds, K. (1994). An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 120, supplement, pp. S39– S42.
89. Whang, W. K., Park, H. S., ve Ham, I. (2005). Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress. *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 37, no. 5, pp. 436–446.

90. Aoyama, Y., Katayama, T., Yamamoto, M., Tanaka, H., ve Kon, K. (1992). A new antitumor antibiotic product, demethylchartreusin. Isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, vol. 45, no. 6, pp. 875–878.
91. Yun, E. S., Park, S. S., ve Shin, H. C. p38 MAPK activation is required for esculetin-induced inhibition of vascular smooth muscle cells proliferation. *Toxicology in Vitro*, vol. 25, no. 7, pp. 1335–1342, 2011.
92. Lee, C. R., Shin, E. J., ve Kim, H. C. Esculetin inhibits Nmethyl-D-aspartate neurotoxicity via glutathione preservation in primary cortical cultures. *Laboratory Animal Research*, vol. 27, no. 3, pp. 259–263, 2011.
93. Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P.A., ve Morin, D. (2007). Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 30;355(1):252-7.
94. Barthomeuf, C., Lim, S., Iranshahi, M., ve Chollet, P. (2008). Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. *Phytomedicine* Jan;15(1-2):103-11.
95. Shahverdi, A.R., Saadat, F., Khorramizadeh, M.R., Iranshahi, M., ve Khoshayand, M.R. (2006). Two matrix metalloproteinases inhibitors from *Ferula persica* var. *persica*. *Phytomedicine*. Nov;13(9-10):712-7.
96. Jarzab, A., Grabarska, A., Kiełbus, M., Jeleniewicz, W., Dmoszyńska-Graniczka, M., Skalicka-Woźniak, K., Sieniawska, E., Polberg, K., ve Stepulak, A. (2014). Osthole induces apoptosis, suppresses cell-cycle progression and proliferation of cancer cells. *Anticancer Res*. Nov;34(11):6473-80.
97. Shokoohinia, Y., Hosseinzadeh, L., Alipour, M., Mostafaie, A., ve Mohammadi-Motlagh, H.R. (2014). Comparative Evaluation of Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Several Coumarins on Human Cancer Cell Lines: Osthole Induces Apoptosis in p53-Deficient H1299 Cells. *Advances in Pharmacological Sciences* Volume 2014, Article ID 847574.
98. You, L., An, R., Wang, X., ve Li, Y. (2010). Discovery of novel osthole derivatives as potential anti-breast cancer treatment. *Bioorg Med Chem Lett*. Dec 15;20(24):7426-8.
99. Jakubowicz-Gil, J., Paduch, R., Ulz, Z., Badziul, D., Głowniak, K., ve Gawron, A. (2012). Cell death in HeLa cells upon imperatorin and cisplatin treatment. *Folia Histochem Cytobiol*;50(3):381-391.
100. Luo, K., Sun, J., Chan, J.Y., Yang, L., Wu, S., Fung, K., ve Liu, F. (2011) Anticancer Effects of Imperatorin Isolated from *Angelica dahurica*: Induction of Apoptosis in HepG2 Cells through both Death-Receptor and Mitochondria-Mediated Pathways. *Chemotherapy* 57: 449-459.
101. Bądziul, D., Jakubowicz-Gil, J., Langner, E., Rzeski, W., Głowniak, K., ve Gawron, A. (2014). The effect of quercetin and imperatorin on programmed cell death induction in T98G cells *in vitro*. *Pharmacol Rep*. 2014 Apr;66(2):292-300.

102. Pae, H.O., Oh, H., Yun, Y.G., Oh, G.S., Jang, S.I., Hwang, K.M., Kwon, T.O., Lee, H.S., ve Chung, H.T. (2002). Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 Cells. *Pharmacol Toxicol.* 2002 Jul;91(1):40-8.
103. Li, X., Zeng, X., Sun, J., Li, H., Wu, P., Fung, K.P., ve Liu, F. (2014). Imperatorin induces Mcl-1 degradation to cooperatively trigger Bax translocation and Bak activation to suppress drug-resistant human hepatoma. *Cancer Lett.* Jun 28;348(1-2):146-55.
104. Kang, T.J., Lee, S.Y., Singh, R.P., Agarwal, R., ve Yim, D.S. (2009). Anti-tumor activity of oxypeucedanin from *Ostericum koreanum* against human prostate carcinoma DU145 cells. *Acta Oncol.* 2009;48(6):895-900.
105. Yang, L.L., Wang, M.C., Chen, L.G., ve Wang, C.C. (2003). Cytotoxic Activity of Coumarins from the Fruits of *Cnidium monnieri* on Leukemia Cell Lines. *Planta Medica*, 69(12), 1091-1095.
106. Yang, D., Gu, T., Wang, T., Tang, Q., ve Ma, C. (2010). Effects of Osthole on Migration and Invasion in Breast Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74:7, 1430-1434.
107. Hung, C.M., Kuo, D.H., Chou, C.H., Su, Y.C., Ho, C.T., ve Way, T.D. (2011). Osthole suppresses hepatocyte growth factor (HGF)-induced epithelial-mesenchymal transition via repression of the c-Met/Akt/mTOR pathway in human breast cancer cells. *J Agric Food Chem.* Sep 14; 59 (17): 9683-90.
108. Zhang, L., Jiang, G., Yao, F., He, Y., Liang, G., Zhang, Y., Hu, B., Wu, Y., Li, Y., ve Liu, H. (2012). Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Osthole, A Natural Coumarin, in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 7(5): e37865.
109. Shokoohinia, Y., Sajjadi, S.E., Gholamzadeh, S., Fattahi, A., ve Behbahani, M.(2014). Antiviral and cytotoxic evaluation of coumarins from *Prangos ferulacea*. *Pharm Biol.* Dec;52(12):1543-9.
110. Niu, N., Li, B., Hu, Y., Li, X., Li, J., ve Zhang, H. (2014). Protective effects of scoparone against lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *International Immunopharmacology* 23 (2014) 127–133.
111. Yang, Y.J., Lee, H.J., Choi, D.H., Huanga, H.S., Lima, S.C., ve Leea, M.K. (2008). Effect of scoparone on neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 440, 14–18.
112. Finn, G.J., Creaven, B.S., ve Egan, D.A. (2004) A study of the role of cell cycle events mediating the action of coumarin derivatives in human malignant melanoma cells. *Cancer Letters*, 214, 43–54.
113. Wang, C.C., Chen, L.G., ve Yang, L.L. (1999) Inducible nitric oxide synthase inhibitor of the Chinese herb I. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. *Cancer Letters* 145,151–157

114. Khan, N., Sharma, S., ve Sultana, S. (2004). Amelioration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal oxidative stress and tumor promotion response by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats. *Cancer Letters* 210 17–26.
115. Okuyama, T., Takata, M., Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J., ve Iwashima, A. (1990). Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substances. II. Inhibition of tumor-promoter-enhanced phospholipid metabolism by umbelliferous materials. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). Apr;38(4):1084-6.
116. Darmawan, A., Kosela, S., Kardono, L.B.S., ve Syah, Y.M. (2012). Scopoletin, a coumarin derivative compound isolated from *Macaranga gigantifolia* Merr. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol.2(12),pp.175-177.
117. Thanh, P.N., Jin, W.Y., Song, G.Y., Bae, K., ve Kang, S. (2004). Cytotoxic Coumarins from the Root of *Angelica dahurica*. *Arch Pharm Res* Vol 27, No 12, 1211-1215.
118. Heinke, R., Franke, K., Porzel, A., Wessjohann, L.A., ve Ali, N.A.A. (2011). Furanocoumarins from *Dorstenia foetida*. *Phytochemistry* 72, 929-934.
119. Uwaifo, A.O., ve Heidelberger, C. (1983) Photobiological Activity of Marmesin (5-B-Hydroxyisopropyl-4-5 Dihydrofurocoumarin) in Chinese Hamster V79 Cells. *Photochemistry and Photobiology*. Volume 38, Issue 4. Pages 395–398.
120. Jang, S., Kim, Y.J., Kim, H.J., Lee, J.C., Kim, H.Y., Kim, Y.C., Yun, Y., Yu, H.H., ve You, Y.O. (2006). Scoparone inhibits PMA-induced IL-8 and MCP-1 production through suppression of NF- κ B activation in U937 cells. *Life Sciences* 78, 2937 – 2943.
121. Farley, C.M., Dibwe, D.F., Ueda, J., Hall, E.A., Awale, S., ve Magolan, J. (2016). Evaluation of synthetic coumarins for antiausterity cytotoxicity against pancreatic cancers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.01.054>
122. Schwalbe, C. H. ve Waterman, P. G. (1983). Structure of 5, 7- dihydroxy-8-(2-methylbutyryl)-4-n-pentyl-3, 4-dihydrocoumarin (dihydromammea C/OB), C19H26O5. *Acta Crystallographica* Section C, vol. 39, no. 4, pp. 499–502.
123. Nguelefack-Mbuyo, P. E., Nguelefack, T. B. ve Dongmo, A. B. (2008). Anti-hypertensive effects of the methanol/methylene chloride stem bark extract of *Mammea africana* in l-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 117, no. 3, pp. 446–450.
124. Tchamadeu, M. C., Dzeufiet, P. D. D., ve Nougua, C. C. K. (2010). Hypoglycaemic effects of *Mammea africana* (Guttiferae) in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 127, no. 2, pp. 368–372.
125. Łuszczki, J.J., Andres-Mach, M., Gleńsk, M., ve Skalicka-Woźniak, K. (2010) Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study. *Pharmacol Rep*. Nov-Dec;62(6):1231-6.

126. Luszczyki, J.J., Andres-Mach, M., Cisowski, W., Mazol, I., Glowniak, K., ve Czuczwar, S.J. (2009). Osthole suppresses seizures in the mouse maximal electroshock seizure model. *Eur J Pharmacol.* Apr 1;607(1-3):107-9.
127. Luszczyki, J.J., Wojda, E., ve Andres-Mach, M. (2009). Anticonvulsant and acute neurotoxic effects of imperatorin, osthole and valproate in the maximal electroshock seizure and chimney tests in mice: a comparative study. *Epilepsy Research*, vol. 85, no. 2-3, pp. 293–299.
128. Meyer, R.P., Hagemeyer, C.E., Knoth, R., Kurz, G. ve Volk, B. (2001). Oxidative Hydrolysis of Scoparone by Cytochrome P450 CYP2C9 Reveals a Novel Metabolite. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 32–39.
129. Chen, X., Pi, R., Zou, Y., Liu, M., Ma, X., Jiang, Y., Mao, X. ve Hu, X..(2010) Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice by osthole, a natural coumarin. *European Journal of Pharmacology*, 629 (1), 40–46.
130. Noh, J.R., Kim, Y.H., Hwan Hwang, J., Gang, G.T., Yeo, S.H., Kim, K.S., Oh, W.K., Ly, S.Y., Lee, I.K., ve Lee, C.H. (2013); Scoparone inhibits adipocyte differentiation through down-regulation of peroxisome proliferators-activated receptor γ in 3T3-L1 preadipocytes; *Food Chemistry* 141 (2013) 723–730.
131. Kharasch, E. D., Hankins, D. C., ve Taraday, J. K. (2000). Single-dose methoxsalen effects on human cytochrome P-450 2A6 activity. *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 28, no. 1, pp. 28–33.
132. Fort, D. M., Rao, K., Jolad, S. D., Luo, J., Carlson, T. J. ve King, S. R. (2000). Antihyperglycemic activity of *Teramnus labialis* (Fabaceae). *Phytomedicine*, vol. 6, no. 6, pp. 465–467.
133. Whang, W. K., Park, H. S., ve Ham, I. (2005). Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress. *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 37, no. 5, pp. 436–446.
134. Kim, S. H., Kang, K. A., ve Zhang, R. (2008). Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 29, no. 11, pp. 1319–1326.
135. Hirsch, A. M. Longeon, A. ve Guyot, M. (2002). Fraxin and esculin: two coumarins specific to *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* (kiwifruit). *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 30, no. 1, pp. 55–60.
136. Witaičenis, A., Seito, L.N., Chagas, A.S., Almeida Junior, L.D., Luchini, A.C., Rodrigues-Orsi, P., Cestari, S.H., ve Stasi, L.C. (2014). Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*, 21, 240–246.
137. Wang, C., Pei, A., ve Chen, J. (2012). A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/ reperfusion injury in mice. *Journal of Neurochemistry*, vol. 121, no. 6, pp. 1007–1013.

138. Yang, Y.J., Lee, H.J., Lee, B.K., Lim, S.C., Lee, C.K., ve Lee, M.K. (2010) Effects of scoparone on dopamine release in PC12 cells. *Fitoterapia* 81 497–502.
139. Mogana, R., Teng-Jin, K., ve Wiart, C. (2013) Anti-inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Article ID 734824, 7 pages.
140. Kim, J.H., Kim, J.K., Ahn, E.K., Ko, H.J., Cho, Y.R., Lee, C.H., Kim, Y.K., Bae, G.U., Oh, J.S., ve Seo, D.W. (2015) Marmesin is a novel angiogenesis inhibitor: Regulatory effect and molecular mechanism on endothelial cell fate and angiogenesis. *Cancer Letters* 369, 323–330.
141. Sangshetti, J.N., Khan, F.A.K., Kulkarni, A.A., Patil, R.H., Pachpinde, A.M., Lohar, K.S., ve Shinde, D.B. (2016). Antileishmanial activity of novel indolyl-coumarin hybrids: Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking study and in silico ADME prediction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 829–835.
142. Lee, S.H., ve Jang, H.D. (2015) ; Scoparone attenuates RANKL-induced osteoclastic differentiation through controlling reactive oxygen species production and scavenging.; *Experimental Cell Research* 331, 267–277.
143. Matsuda, H., Tomohiro, N., Ido, Y., ve Kubo, M. (2002). Anti-allergic effects of *Cnidium monnieri* fructus (dried fruits of *Cnidium monnieri*) and its major component, osthol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25 (6), 809–812.
144. Choi, Y.H., ve Yan, G.H. (2009). Anti-allergic effects of scoparone on mast cell-mediated allergy model. *Phytomedicine* 16 1089–1094
145. Kang, J.W., Kim, D.W., Choi, J.S., Kim, Y.S., ve Lee, S. M. (2013). Scoparone attenuates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure through inhibition of toll-like receptor 4 signaling in mice. *Food and Chemical Toxicology* 57, 132–139.
146. Yin, Q., Sun, H., Zhang, A., ve Wang, X. (2012) Pharmacokinetics and tissue distribution study of scoparone in rats by ultraperformance liquid-chromatography with tandem high-definition mass spectrometry. *Fitoterapia* 83 (2012) 795–800.
147. Cho, H.R., Choi, D.H., Ko, B.K., Nam, C.W., Park, K.M., Lee, Y.J., Lee, S.G., Lee, J.S., Lee, K.A., Lee, E.A., Ju, S.A., ve Kim, B.S. (2000) Cold Preservation of Rat Cultured Hepatocytes: The Scoparone Effect. *Transplantation Proceedings*, 32, 2325–2327.
148. Bahadır, O., Çitoğlu, G.S., Özbek, H., Dall'Acqua, S., Hošek, J., ve Šmejkal, K. (2011). Hepatoprotective and TNF- α inhibitory activity of *Zosima absinthifolia* extracts and coumarins. *Fitoterapia* 82 454–459.
149. Atmaca, A., Bilgin, H.M., Obay, B. D., Diken, H., Kelle, M., ve Kale, E. (2011). The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivatives on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats. *J Physiol Biochem* 67:569–576.

150. Bilgin, H.M., Atmaca, M., Obay, B.D., Özekinci, S., Taşdemir, E., ve Ketani, A. (2011). Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63, 325-330.
151. Noh, J.R., Kim, Y.H., Gang, G.T., Yang, K.J., Lee, H.S., Nguyen, P.H., Oh, W.K., Song, K.S., ve Lee, C.H.(2010). Chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract inhibits development of hepatic steatosis in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Food Chemistry* 121 (2010) 437–442.
152. Fang, Y., Li, Z., ve Watanabe, Y. Pharmacokinetics of a novel anti-asthmatic, scoparone, in the rabbit serum assessed by a simple HPLC method. *Journal of Ethnopharmacology* 86 (2003) 127–130.
153. Joo, S.H., Lee, S.C., ve Kim, S.K. (2004). UV Absorbent, Marmesin, from the Bark of Thanakha, *Hesperethusa crenulata* L. *Journal of Plant Biology*, 47(2) : 163-165.
154. Masuda, T., Takasug, M., ve Anetai, M. (1998). Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 1, pp. 13-16.
155. Mert-Türk, F. (2002). Phytoalexins: Defence or just a response to stress? *Journal of Cell and Molecular Biology* 1: 1-6.
156. Osbourn, A.E. (1999). Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal, Genet, Biol.*, 26, 163–168.
157. Ortuño, A., Díaz, L., Alvarez, N., Porras, I., García-Lidón, A., ve Del Río, J.A. (2010); Comparative study of flavonoid and scoparone accumulation in different Citrus species and their susceptibility to *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry* 125 (2011) 232–239
158. Afek, U., Aharoni, N., ve Carmeli, S. (1995). The Involvement of Marmesin in Celery Resistance to Pathogens During Storage and the Effect of Temperature on Its Concentration. *Phytopathology*, Vol.85, No.6, 711-714.
159. Gonçalo, M. (2010). *Phytotoxic and Photoallergic reactions. Author's Proof*. S.18.
160. Ojala, T. (2001) Biological Screening of Plant Coumarins. University of Helsinki, Department of Pharmacy, *Academic Disseratation*. S.25 ve 42. Helsinki.
161. Bernas, T., ve Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47 (4),236-242.
162. Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H. ve Schubert, D. (1997). Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5- Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry* 69,581-593.
163. Mosmann, T.(1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods*, 65,55-63.

164. Appendino, G., Bianchi, F., Bader, A., Campagnuolo, C., Fattorusso, E., Tagliapietra, S., Scafati, O., Blanco-Molina, M., Macho, A., Fiebich, B.L., Bremner, P., Heinrich, M., Ballero, M. ve Munoz, E. (2004). Coumarins from *Opopanax chironium*. New Dihydrofuranocoumarins and Differential Induction of Apoptosis by Imperatorin and Heraclenin. *J. Nat. Prod.*, 67, 532-536.
165. Salem, S.B., Jabrane, A., Harzallah-Skhiri, F., ve Jannet, H.B. (2013). New bioactive dihydrofuranocoumarins from the roots of the Tunisian *Ferula lutea* (Poi.) Maire. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23, 4248-4252.
166. İnternet: Pubchem. (2017). *Marmesin Acetate*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fpubchem.ncbi.nlm.nih.gov%2Fsubstance%2F252401619%23section%3DTop&date=2017-10-04>, Son erişim: 16.09.2017.
167. Olmo, L.R.V., Silva, M.F., Fo, E.R., Viera, P.C., Fernandes, J.B., Marsaioli, A.J., Pinhero, A.L., ve Vilela, E.F. (1995). Rearranged Limonoids from *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry*, Vol.42, No.3, pp.831-837.
168. Bergendorff, O., Dekermendjian, K., Nielsen, M., Shan, R., Witt, R., Ai, J., ve Sterner, O. (1997). Furanocoumarins with Affinity to Brain Benzodiazepine Receptors *in Vitro*. *Phytochemistry*, Vol.44, No.6, pp. 1121-1124.
169. Intekhab, J., ve Aslam, M. (2009). Constituents from *Feronia Limonia*. *Chimie*, vol 18 no2, pag. 95-101.
170. Pınar, M., ve Rodrigez, B. (1977). A New Coumarins from *Ferula Loscosii* and The Correct Structure of Colladonin. *Phytochemistry*, Vol.16, pp.1987-1989.
171. Saidhodzhaev, A.I., ve Nikonov, G.K. (1972). The Configuration of Badrakemin and Gummosin, and The Identity of Isobadrekemin, Colladonin, and Farnesiferol A. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, No.4, pp.490-493.
172. Abd El-Razeka, M.H., Ohtab, S., Ahmed, A. A., ve Hirataa, T. (2001). Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 58, 1289-1295
173. Appendino, G., Özen, H.Ç., Tagliapietra, S., ve Cisero, M. (1992). Coumarins from *Heptaptera anisoptera*. *Phytochemistry*, Vol.31, No.9, pp.3211-3213.
174. Trumble, J.T., ve Millar, J.G. (1996). Biological Activity of Marmesin and Demethylsuberosin against a Generalist Herbivore, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) *J. Agric. Food Chem.* 44, 2859-2864.
175. Jimenez, B., Grande, M. C., Anaya, J., Torres, P., ve Grande, M. (2000) Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba*. *Phytochemistry*, 53 1025-1031.
176. Savina, A.A., ve Perelson, M.E. (1971). The Dehydration of Marmesin with Phosphorus Pentoxide. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, No. 2, pp. 200-201.
177. Stanjek, V., Miksch, M. ve Boland, W. (1997). Stereoselective Syntheses of Deuterium Labelled Marmesins; Valuable Metabolic Probes for Mechanistic Studies in Furanocoumarin Biosynthesis. *Tetrahedron*. Vol. 53, No. 52, pp. 17699-17710.

178. S. Sagdullaev. Coumarins: Plants, Structures, Properties. (1998). *Chemistry of Natural Compounds*, Vol 34, No. 4
179. Jain, M., Trivedi, A., ve Mishra, S.H. (2010). TLC Determination of Marmesin, a Biologically Active Marker from *Feronia limonia L.* *American Journal of Plant Sciences*, 1,12-16.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Akalgan, Demet
 Uyuğu : T.C
 Doğum tarihi ve yeri : 24/08/1980 Edirne
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 531 387 80 26
 e-mail : demet.akalgan@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Farmakognozi ABD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Farmakognozi ABD/ Fitoterapi Programı	2011
Lisans	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2002
Lise	Lüleburgaz Süper Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2004-devam ediyor	Sağlık Bakanlığı- Ankara	Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce, Fransızca, İspanyolca, İtalyanca

Yayınlar

Tosun, F., Akalgan, D., ve Miski, M. (2017). Cytotoxic coumarins from the roots of *Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11-13th October, Ankara.

Tosun, F., Akalgan, D., ve Miski, M. (2017). *Effects of the root extracts of Petroedmondia syriaca* (Boiss.) Tamamsch. on the colon cancer cells, IX. Apiales Symposium, 31st July-2nd August 2017, Guangzhou-China.

Tosun, F., Akalgan, D., ve Miski, M. (2016). *Cytotoxic activity of the root extracts of petroedmondia syriaca (Boiss.) Tamamsch.*, The 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP-29) and the 9th International Conference on Biodiversity (ICOB-9), Sept. 24th-27th, İzmir-Turkey.

Akalgan, D. (2012). *Tanacetum argenteum (Lam.) Willd. Subsp. argenteum bitkisinin partenolit yönünden değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Orhan, I.E., Tosun,F., Gülpınar,A.R., Kartal,M., Duran, A., Mihoglugil,F., ve Akalgan,D. (2015). LC-MS quantification of parthenolide and cholinesterase inhibitory potetial of selected Tanacetum L. (Emend. Briq.) taxa. *Phytochemistry Letters*, 11, 347-352.

Hobiler

Dans, müzik, spor, tiyatro.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

