

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIYIRCIK (*Daphne gnidioides*) ve SIRIMBAĞI (*Daphne pontica*)
BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Tevfik Hasan CAN

**Danışman Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Jüri Üyesi Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU
Jüri Üyesi Doç. Dr. Songül GÜREL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Tevfik Hasan CAN tarafından hazırlanan "Sıyircık (*Daphne gnidioides*) ve Sırımbağı (*Daphne pontica*) Bitki Ekstraktlarının Biyolojik Etkinliğinin İncelenmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Kastamonu Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU
Kastamonu Üniversitesi

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Songül GÜREL
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

05/08/2019

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI

TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza



Tevfik Hasan CAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SIYIRCIK (*Daphne gnidioides*) ve SIRIMBAĞI (*Daphne pontica*) BİTKİ EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Tevfik Hasan CAN
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU

Thymelaeaceae (Serçedilgiller) familyasına ait olan *Daphne pontica* ve *Daphne gnidioides* halk arasında sırasıyla sırimbağı ve sıyircık olarak bilinmektedirler. Ülkemizin kuzeyi ile kıyı kesimlerinde yetişmektedirler. Geleneksel tıpta bitkisel tedaviden süs bitkisine kadar birçok kullanım alanına sahiptirler. Bu çalışma ile sırimbağı ve sıyircık bitkilerinin çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal, DNA koruma, antikanser özellikleri ile kanser hücrelerini hangi programlı hücre ölümü modeline götürdüğünün belirlenmesi ve bu bitkilere ait içerik analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan analizlerde, sıyircık bitkisinin yaprak özütü MIC deneyi sonucunda Gram pozitif olan *Alfa streptococcus haemolyticus* bakterisinde 31,25µg'a kadar etki ettiği, sırimbağı bitkisinin yaprak özütünün ise çalıştığımız Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin tümüne etki ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Sırimbağı ve sıyircık bitkilerinin DNA koruma aktivitelerinin ise olmadığı görülmüştür. IC50 değerinin 86,16 µg olarak bulunduğu sıyircık bitkisinin gövde özütünün HeLa (serviks) kanser hattında en düşük değerde en yüksek etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışma ile sırimbağı ve sıyircık bitkilerinin biyolojik etkinliği hakkında ön bilgiler elde edilmiş olup, bu bitkilerin antimikrobiyal veya antioksidant olarak kullanımı için de yeni bir alan sağlanmıştır. Böylece sentetik ve yan etkileri bulunan kanser ilaçlarının aksine, doğal ve sadece kanser hücrelerine etki eden bir ilaç olma potansiyelinin de değerlendirilmesine imkân verilmiş olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antikanser, Thymelaeaceae, Bitki ekstraktları, DNA koruma, Antimikrobiyal

2019, 116 sayfa
Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

Examination of Biological Activities of Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) and Sırımbağı (*Daphne pontica*) Plant Extracts

Tevfik Hasan CAN
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU

Abstract: *Daphne pontica* and *Daphne gnidioides*, which belong to the Thymelaeaceae family, are commonly known as sırımbağı and sıyırıcık, respectively. They grow in the north and coastal areas of our country. They have many uses in traditional medicine, from herbal treatment to ornamental plants. In this study, it was aimed to determine the antimicrobial, DNA protection, anticancer properties and to determine which programmed cell death model leads cancer cells to death and to carry out content analysis of these plant extracts obtained from various plant parts. As a result of the MIC experiment, the leaf extract of the *Daphne gnidioides* was effective in 31.25µg on the Gram-positive *Alfa streptococcus haemolyticus* bacteria. DNA protection activities were not found for these two plants. It was concluded that the body extract of *Daphne gnidioides* plant had the maximum effect on the HeLa (cervix) cancer line in the lowest concentration with the IC50 value of 86.16 µg.

This study provides preliminary information about the biological efficacy of *Daphne pontica* and *Daphne gnidioides* plants and provides a new field for the use of these plants as antimicrobial or antioxidant agent. In this way, it will be possible to evaluate the potential of being a natural drug that only affects cancer cells, in contrast to cancer drugs with synthetic and side effects.

Keywords: Anticancer, Thymelaeaceae, Plant extracts, DNA protection, Antimicrobial

2019, 116 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, önerileri ile beni yönlendiren, manevi olarak desteğini hiç esirgemeyen başta Danışmanım Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU'na, deneylerimin tüm aşamalarında bana yardımcı olan Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU'na, tez çalışmalarım sırasında bana her zaman destek ve yardımcı olan laboratuvardaki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca her zaman yanımda olup bana her türlü desteğini veren canım ailem olan anneme, babama ve kardeşlerime, ayrıca her zaman bilgisi, yardımı ve sevgisiyle yanımda olan değerli Şule Şahin'e en içten duygularıyla sonsuz teşekkür ederim.

Tevfik Hasan CAN
Kastamonu, Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.Sıyircık (<i>Daphne gnidioides</i>) Hakkında Genel Bilgiler.....	2
1.2.Sıyircık (<i>Daphne gnidioides</i>) Bitkisinin Fiziksel Özellikleri.....	3
1.3.Sıyircık (<i>Daphne gnidioides</i>) Bitkisinin Kimyasal İçerikleri	3
1.4.Sıyircık (<i>Daphne gnidioides</i>) Bitkisinin Biyolojik Aktivitesi	4
1.5.Sıyircık (<i>Daphne gnidioides</i>) Bitkisinin Tıbbi Kullanım Alanları	4
2.1.Sırımbağı (<i>Daphne pontica</i>) Hakkında Genel Bilgiler	5
2.2.Sırımbağı (<i>Daphne pontica</i>) Bitkisinin Fiziksel Özellikleri	5
2.3.Sırımbağı (<i>Daphne pontica</i>) Bitkisinin Kimyasal İçerikleri	5
2.4.Sırımbağı (<i>Daphne pontica</i>) Bitkisinin Biyolojik Aktivitesi	6
2.5.Sırımbağı (<i>Daphne pontica</i>) Bitkisinin Tıbbi Kullanım Alanları	7
2.TEORİK ÇERÇEVE.....	8
3.MATERYAL VE METOT	18
3.1.MATERYAL	18
3.1.1.Bitki Materyali	18
3.1.2.Bitki Kimyasalları	18
3.1.3.Kullanılan Malzemeler.....	18
3.2.METOT.....	20
3.2.1.Bitki Ekstraktının Hazırlanışı.....	20
3.2.2.Bitki Kimyasallarının İçeriklerinin Analizi	20
3.2.3.Antimikrobiyal Aktivite Deneyi	21
3.2.4.DNA Koruma Aktivite Deneyi	22
3.2.5.Sitotoksik Aktivite Deneyi.....	22
3.2.6.Gerçek Zamanlı PZR Analizleri	23
4. BULGULAR.....	27

Bitki Ekstraktlarının Bileşimi	27
Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi.....	55
DNA Koruma Aktivitesinin Belirlenmesi.....	69
Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi	72
Gen İfadesinin Belirlenmesi.....	97
5. TARTIŞMA	101
KAYNAKLAR	107
EKLER.....	113
EK1 <i>D. pontica</i> gövde ekstraktı kimyasal içerik analizi.....	113
EK2 <i>D. pontica</i> yaprak ekstraktı kimyasal içerik analizi.....	113
EK3 <i>D. pontica</i> kök ekstraktı kimyasal içerik analizi.....	113
EK4 <i>D. gnidioides</i> yaprak ekstraktı kimyasal içerik analizi	114
EK5 <i>D. gnidioides</i> kök ekstraktı kimyasal içerik analizi.....	114
EK6 <i>D. gnidioides</i> gövde ekstraktı kimyasal içerik analizi	114
EK7 Gerçek zamanlı pzt ifadesi eğri grafiği.....	115
ÖZGEÇMİŞ	116

KISALTMALAR DİZİNİ

CM	Santimetre
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbon dioksit
DMBA	Deseret Mutual Benefit Administrators
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EtOAc	Etil asetat
FBS	Fetal Bovine Serum
GC	Gaz Kromatografi
IC50	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
IR	İnfrared
KG	Kilogram
LC	Sıvı Kromatografisi
M	Metre
MeOH	Methanol
MG	Miligram
MIC	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MS	Kütle Spektrometresi
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
nM	Nano molar
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
RNA	Ribo Nükleik Asit

SDS	Sodyum dodesil Sülfat
T1	<i>Daphne pontica</i> yaprak
T2	<i>Daphne pontica</i> gövde
T3	<i>Daphne pontica</i> kök
T4	<i>Daphne gnidioides</i> yaprak
T5	<i>Daphne gnidioides</i> kök
T6	<i>Daphne gnidioides</i> gövde
UV	Ultra viole
µm	Mikro metre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>Daphne pontica</i> Yaprak Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizi Disk Döfüzyon.....	57
Şekil 4.2. <i>Daphne pontica</i> Yaprak Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizi Disk Döfüzyon Deneyi Sonucu.....	57
Şekil 4.3. <i>Daphne pontica</i> Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Yaprak)	59
Şekil 4.4. <i>Daphne pontica</i> Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Gövde)	61
Şekil 4.5. <i>Daphne pontica</i> Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Kök)....	62
Şekil 4.6. <i>Daphne gnidioides</i> Gövde özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizleri Disk Döfüzyon.....	63
Şekil 4.7. <i>Daphne gnidioides</i> Kök Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizleri Disk Döfüzyon.....	64
Şekil 4.8. <i>Daphne gnidioides</i> Gövde Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizleri Disk Döfüzyon.....	65
Şekil 4.9. <i>Daphne gnidioides</i> Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Yaprak).....	67
Şekil 4.10. <i>Daphne gnidioides</i> Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test- Kök)	68
Şekil 4.11. <i>Daphne gnidioides</i> Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Gövde).....	69
Şekil 4.12. <i>Daphne pontica</i> Ekstrakt 5mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü)	69
Şekil 4.13. <i>Daphne pontica</i> Ekstrakt 10 mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü).....	70
Şekil 4.14. <i>Daphne gnidioides</i> Ekstrakt 5 mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü).....	71
Şekil 4.15. <i>Daphne gnidioides</i> Ekstrakt 10 mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü).....	72
Şekil 4.16. <i>Daphne pontica</i> Yaprak MDA-MB 231 24h Hücre Hattı.....	73
Şekil 4.17. <i>Daphne pontica</i> Yaprak MDA-MB 231 48h Hücre Hattı.....	74
Şekil 4.18. <i>Daphne pontica</i> Gövde MDA-MB 231 24h Hücre Hattı.....	75
Şekil 4.19. <i>Daphne pontica</i> Gövde MDA-MB 231 48h Hücre Hattı.....	76
Şekil 4.20. <i>Daphne pontica</i> Kök MDA-MB 231 24h Hücre Hattı.....	77
Şekil 4.21. <i>Daphne pontica</i> Kök MDA-MB 231 48h Hücre Hattı.....	78
Şekil 4.22. <i>Daphne pontica</i> Yaprak HeLa 24h Hücre Hattı.....	79
Şekil 4.23. <i>Daphne pontica</i> Yaprak HeLa 48h Hücre Hattı.....	80
Şekil 4.24. <i>Daphne pontica</i> Gövde HeLa 24h Hücre Hattı.....	81
Şekil 4.25. <i>Daphne pontica</i> Gövde HeLa 48h Hücre Hattı.....	82
Şekil 4.26. <i>Daphne pontica</i> Kök HeLa 24h Hücre Hattı.....	83
Şekil 4.27. <i>Daphne pontica</i> Kök HeLa 48h Hücre Hattı.....	84
Şekil 4.28. <i>Daphne gnidioides</i> Yaprak MDA-MB 231 24h Hücre Hattı.....	86
Şekil 4.29. <i>Daphne gnidioides</i> Yaprak MDA-MB 231 48h Hücre Hattı.....	87
Şekil 4.30. <i>Daphne gnidioides</i> Kök MDA-MB 231 24h Hücre Hattı.....	88
Şekil 4.31. <i>Daphne gnidioides</i> Kök MDA-MB 231 48h Hücre Hattı.....	89

Şekil 4.32. <i>Daphne gnostioides</i> Gövde MDA-MB 231 24h Hücre Hattı.....	90
Şekil 4.33. <i>Daphne gnostioides</i> Gövde MDA-MB 231 48h Hücre Hattı.....	91
Şekil 4.34. <i>Daphne gnostioides</i> Yaprak HeLa 24h Hücre Hattı.....	92
Şekil 4.35. <i>Daphne gnostioides</i> Yaprak HeLa 48h Hücre Hattı.....	93
Şekil 4.36. <i>Daphne gnostioides</i> Kök HeLa 24h Hücre Hattı.....	94
Şekil 4.37. <i>Daphne gnostioides</i> Kök HeLa 48h Hücre Hattı.....	95
Şekil 4.38. <i>Daphne gnostioides</i> Gövde HeLa 24h Hücre Hattı.....	96
Şekil 4.39. <i>Daphne gnostioides</i> Gövde HeLa 48h Hücre Hattı.....	97

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli bileşenler....	24
Tablo 3.2. Cihaz çalışma basamakları.....	25
Tablo 3.3. Kullanılan primerler.....	25
Tablo 4.1. <i>Daphne pontica</i> 'nın analiz edilen ekstraktlarında bulunan bileşiklerin karakterizasyon.....	30
Tablo 4.2. <i>Daphne gnidioides</i> ' in analiz edilen ekstraktlarında bulunan bileşiklerin karakterizasyonu.....	45
Tablo 4.3. Kullanılan Bakteriler.....	55
Tablo 4.4. <i>Daphne pontica</i> Yaprak Ekstraktı İnhibisyon zonu.....	56
Tablo 4.5. <i>Daphne pontica</i> Yaprak Ekstraktı MIC Sonucu.....	57
Tablo 4.6. <i>Daphne pontica</i> Gövde Ekstraktının MIC Sonucu.....	60
Tablo 4.7. <i>Daphne pontica</i> Kök Ekstraktının MIC Sonucu.....	61
Tablo 4.8. <i>Daphne gnidioides</i> Bitkisi Yaprak Ekstraktının İnhibisyon Zonu.....	63
Tablo 4.9. <i>Daphne gnidioides</i> Bitkisi Kök Ekstraktının İnhibisyon Zonu.....	64
Tablo 4.10. <i>Daphne gnidioides</i> Bitkisi Gövde Ekstraktının İnhibisyon Zonu.....	65
Tablo 4.11. <i>Daphne gnidioides</i> Bitkisi Yaprak Ekstraktının MIC Sonucu.....	66
Tablo 4.12. <i>Daphne gnidioides</i> Bitkisi Kök Ekstraktı MIC Sonucu.....	67
Tablo 4.13. <i>Daphne gnidioides</i> Bitkisi Gövde Ekstraktı MIC Sonucu.....	68
Tablo 4.14. <i>Daphne pontica</i> DNA Koruma Oranları (5 mg).....	69
Tablo 4.15. <i>Daphne pontica</i> DNA Koruma Oranları (10 mg).....	70
Tablo 4.16. <i>Daphne gnidioides</i> DNA Koruma Oranları (5 mg).....	71
Tablo 4.17. <i>Daphne gnidioides</i> DNA Koruma Oranları (10 mg).....	72
Tablo 4.18. <i>Daphne pontica</i> Yaprak 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	73
Tablo 4.19. <i>Daphne pontica</i> Yaprak 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	74
Tablo 4.20. <i>Daphne pontica</i> Gövde 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	75
Tablo 4.21. <i>Daphne pontica</i> Gövde 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	76
Tablo 4.22. <i>Daphne pontica</i> Kök 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	77
Tablo 4.23. <i>Daphne pontica</i> Kök 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	78
Tablo 4.24. <i>Daphne pontica</i> Yaprak 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzde.....	79
Tablo 4.25. <i>Daphne pontica</i> Yaprak 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	80
Tablo 4.26. <i>Daphne pontica</i> Gövde 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	81
Tablo 4.27. <i>Daphne pontica</i> Gövde 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	82
Tablo 4.28. <i>Daphne pontica</i> Kök 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	83
Tablo 4.29. <i>Daphne pontica</i> Kök 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	84
Tablo 4.30. <i>Daphne gnidioides</i> Yaprak 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	85
Tablo 4.31. <i>Daphne gnidioides</i> Yaprak 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	86
Tablo 4.32. <i>Daphne gnidioides</i> Kök 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	87

Tablo 4.33. <i>Daphne gnidioides</i> Kök 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	88
Tablo 4.34. <i>Daphne gnidioides</i> Gövde 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	89
Tablo 4.35. <i>Daphne gnidioides</i> Gövde 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	90
Tablo 4.36. <i>Daphne gnidioides</i> Yaprak 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi....	91
Tablo 4.37. <i>Daphne gnidioides</i> Yaprak 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi....	92
Tablo 4.38. <i>Daphne gnidioides</i> Kök 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	93
Tablo 4.39. <i>Daphne gnidioides</i> Kök 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi.....	94
Tablo 4.40. <i>Daphne gnidioides</i> Gövde 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi....	95
Tablo 4.41. <i>Daphne gnidioides</i> Gövde 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi....	96
Tablo 4.42. <i>Daphne pontica</i> HeLa 48h IC50 Sonucu.....	98
Tablo 4.43. <i>Daphne gnidioides</i> HeLa 48h IC50 Sonucu.....	98
Tablo 4.44. BCL Geni İfade Seviyesi.....	99
Tablo 4.45. BECLIN Geni İfade Seviyesi.....	99
Tablo 4.46. LC3 Geni İfade Seviyesi.....	100
Tablo 4.47. BAX Geni İfade Seviyesi.....	100

1.GİRİŞ

Yaşadığımız dünya üzerinde 417 familya ve 14.647 cins'e ait 955.791 tohumlu bitki türü isimlendirilmiştir. İsimlendirilmiş olan bu bitkiler için 242 ülke içerisinde, en zengin bitkisel tür zenginliğine sahip ülke 59.851 bitki türü ile Brezilya'dır. Türkiye ise barındırdığı 9996 bitki türü ile dünya üzerinde 22. sırada yer alırken, Avrupa'da ise en zengin bitkisel tür çeşitliliğine sahip olan ülke konumundadır. Bunun yanı sıra ülkemiz endemik bitki türleri bakımından da çeşitlilik göstermektedir. Avrupa'daki 3500 endemik bitki türüne karşılık, sadece Türkiye'de 3649 endemik tür bulunmaktadır. Endemik bitki çeşitliliği bakımından Türkiye'yi Yunanistan, İtalya ve İspanya takip etmektedir (Eminağaoğlu, Beğen ve Aksu, 2015).

İnsanlığın var oluşundan bu yana gerek görünümleri gerekse faydaları sebebiyle kullanımlarını günümüze değin sürdürmüş olan bitkiler, yüzyıllardır araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Winston, 1999). Günümüzde hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan sentetik içerikli ve kimyasal tabanlı ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla tıbbi bitkilerin kullanım alanları artış göstermektedir (Bayramoğlu vd., 2009). Ülkemizde de tüm dünyada olduğu gibi çeşitli bitkiler yıllardan beri halk arasında hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Tıbbi bitkiler hastalıkların tedavisinin yanı sıra baharat, ilaç sanayi, gıda sanayi, kozmetik, temizlik ve ağız bakım ürünleri gibi birçok alanda kullanıma sahip olması sebebiyle geçmişten günümüze değin tıbbi bitkilere olan talebin artış gösterdiği bilinmektedir (Tan, 1992). Nitekim 19. yüzyıl başlarında 13.000 civarında olduğu bilinen tıbbi bitki miktarı sayısının, 20. yüzyıla gelindiğinde Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı bir araştırma neticesinde 20.000'e yükseldiği görülmüştür (Kalaycıoğlu ve Öner, 1994).

Ülkemizde tıbbi aromatik bitkilerin çeşitliliği göz önüne alındığında son yıllarda özellikle tıbbi bitkisel ilaç hammaddeleri üzerinde yapılan çalışmalar da büyük önem kazanmıştır. Bu bitkilerin başında Türkiye florasında yer alan halk arasında da kullanılan Thymelaeaceae familyasına ait *Daphne* bitkisinin doğal olarak yetişen yedi türü (*Daphne gnidioides* Jaub. Spach, *Daphnoglomerata* Lam., *Daphnemezereum* L., *Daphne mucronata* Royle, *Daphne oleoides* Schreber, *Daphne pontica* L., *Daphne*

sericea Vahl) bulunmaktadır (Baytop, 1984). Bu tez çalışmasında, *Daphne* cinsine ait *Daphne gnidioides* ve *Daphne pontica* türlerinin kök, gövde ve yaprak ekstraktlarının kimyasal içerik analizi, *in vitro* antikanser, antimikrobiyal ve DNA koruma özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Böylece doğal bir ürün olarak *Daphne* cinsine ait sıyırıcık ve sırimbağı bitkilerinin yaprak, kök veya gövde ekstraktlarının ilaç etken maddesi olma potansiyeli değerlendirilmiş olacaktır. Kullanılan türlerin, çeşitli sektörlerde ham madde kaynağı olarak kullanılıp kullanılmayacağı ortaya çıkarılacaktır.

1.1.Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) Hakkında Genel Bilgiler

Thymelaeaceae (Serçedilgiller) ailesine ait olan Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) cinsi ilk kez De Jussieu tarafından 1789 yılında tanımlanmıştır. Serçedilgiller familyasında yaklaşık olarak 500 tür ve 44 cins yer almaktadır. Bu türlerin bir kısmı, 1997'den başlayarak bir dizi makalede Josef Halda tarafından alt türlere sınıflandırılmıştır (Çorbacı ve Yazgan, 2017).

Daphne gnidioides bitkisi, ılıman iklim tipinin dünyada doğal olarak görüldüğü alanlar olan, 40°-55° kuzey paralelleri ile kıtaların iç ve doğu sahillerinde yayılış göstermektedir. Çok sayıda tür ve alttürlerin varlığı sebebiyle oldukça kompleks bir taksonomiye sahip *Daphne gnidioides* bitkisinin gen merkezi Çin'dir (Çorbacı ve Yazgan, 2017).

Deniz etkisine açık alanlarda, sıcaklık ve nem isteği fazla olan *Daphne gnidioides* ülkemizde Kuzeydoğu Akdeniz kesimlerinde yetişmektedir. Kışın soğuk ve kurak havalara karşı dayanıklı olan sıyırıcık bitkisi; kayalık, taşlı, çakıllı, kurak yamaçlarda, 1100-2100 m yükseklikte Eylül ayından Kasım ayına kadar çiçeklenmektedir. Her daim yeşil kalabilen kış aylarında ise yapraklarını döken çok yıllık bir bitkidir (Çorbacı ve Yazgan, 2017).

1.2.Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) Bitkisinin Fiziksel Özellikleri

Daphne gnidioides bitkisinin yaprakları almaşıklı ve seyrek olarak karşılıklıdır. Çiçekleri ise hermafrodit ve terminal halde, çiçeklerin görünümü boru şeklinde, yumurtalık üst durumudur. Meyveleri, üzüksü veya yarı derimsi yapıda, bir çekirdeklidir. Çalı görünümünde olup 0,5 ila 3,5 m yüksekliğe kadar büyüebilmektedirler. Yaprakları 0,4 ila 0,7 cm genişliğinde ve 2,5 ila 4 cm uzunluğunda değişmektedir. Geniş yapraklı ve beyaz çiçekli olan bitki 5-8 kişilik gruplar halinde büyümektedir (Güner, 2012).

1.3.Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) Bitkisinin Kimyasal İçerikleri

Daphne gnidioides bitkisinin dalları ve yaprakları havada kurutulma işlemine tabi tutularak, toz zerrecikleri haline getirilmesinin ardından etanol, hekzan ve kloroform ile çözdürülerek, etanollü ekstrenin sefadeks LH-20 kolonundan, kloroform: etanol (2:1) oranından itibaren başlayan ve kloroform oranı azaltılarak polaritesi artırılan bu solvan sistemi ile birlikte flonovoit olan luteolol-4'-glukozit, apigenol-7-glukozit, luteolol-7-glukozit, izoviteksin, kersetol-3-glukozit ve visenin-2 elde edilmiştir (Ulubelen ve Terem, 1986).

Daphne gnidioides bitkisi üzerinde yapılmış olan bir çalışmada, bitkinin yaprak ve gövdelerinden kumarin türevi olan dafnetol, eskuletol, dafnetol-8-glukozit, dafnoretin, demetildafnoretin, asetilumbelliferon ve dafnozit izole edilerek erime noktası tayini ve spektral analizlerle yapıları aydınlatılarak tanımlanmışlardır (Ulubelen ve Terem, 1986).

Daphne gnidioides kabukditerpen türevi olan dafnetoksin, *Daphne gnidioides*'ten de gövde ve yapraktan β -Sitosterol-3- β - glukozit gibi steroid ve β -amirenol (Baba ve Taniguchi, 1993) gibi triterpenik yapıda bileşiklerin izole edildiği bilinmektedir (Ulubelen ve Tan, 1990).

1.4.Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) Bitkisinin Biyolojik Aktivitesi

Sıyırıcık bitkisinin gövde, yaprak ve dallarında flovonoid, kumarin, diterpen ve triterpen türevleri bulunmakta ve flovonoid türevi apigenin ve luteolin antioksidan özellikleri içermektedir. Bunun yanı sıra antitümör etkisi ve antikanser özelliklerinin de bulunduğu bileşikler, hücreler arası iletişimi artırmakla ve omitin dekarboksilazi ve timidinin DNA'nın yapısına katılmasını inhibe etmek suretiyle hücre proliferasyonunu inhibe ederek etki gösterirler (Kahraman, Serteser ve Köken, 2002). Kumarin türevine ait dafnozit, dafnetoller ise sedatif ve antiinflamatuvar etkiye sahip bileşiklerdir. Ayrıca kan miktarını arttırdığı kılcal damar geçirgenliğini azaltıcı özelliği olduğu bilinmektedir (Şener ve Mutlugil, 1987). Diterpen türevine ait Dafnetoksintoksik ve kokarsinojenik aktiviteleri nedeniyle önemlidir. Triterpen türevine ait steroid ve β -amirenostereoid hormon reseptör proteinlere bağlanarak fizyolojik etkilerini gösterirler. Transkripsiyon ve hücre fonksiyonunda değişimlere neden olmaktadır (Bingöl, 1989).

Daphne gnidioides'ten elde edilen flavonoidler, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* ve *Klebsiella pneumoniae*'ya karşı önemsiz sayılabilecek antibakteriyel etki oluştururken, kumarinlerde antibakteriyel bir etki gözlenmemiştir (Ulubelen ve Terem, 1986).

1.5.Sıyırıcık (*Daphne gnidioides*) Bitkisinin Tıbbi Kullanım Alanları

Sıyırıcık bitkisinin tıbbi alanda salgı bezi adenomlarında, ezikler ve yaraların tedavisinde kullanıldığı belirtilmektedir. Çinliler tarafından yaygın olarak bilinen bitki çin halk ilacı olarak bilinmektedir. Başlıca ekspektoran, antikanser, diüretik ve antitussif olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra bitki purgatif olarak kullanılırken diğer tarafta bitkinin yaprakları ve kabukları ise deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavi sürecinde ise, güneş doğmadan bu bitkiden alınan bir dalın, hasta hayvanın göğüs derisinde açılan bir deliğe konulduğu, belli bir süre ardından, bu dal sokulan delikten sarı renkte bir sıvının akmaya başladığı ve bu işlemler sonucunda da hayvanın iyileşme belirtisi gösterdiği gözlemlenmiştir. İyileşme belirtisinin ise

kabuklarda bulunan tahriş edici bir reçine tarafından sağlandığı düşünülmüştür. Bitkinin Türkiye’de ise yaygın tıbbi kullanımı, sıtma ve romatizma tedavisi şeklinde olmakla birlikte halk ilacı olarak kullanıldığına dair kayıtlar da mevcuttur (Taninaka ve Takaishi, 1995).

2.1.Sırımbağı (*Daphne pontica*) Hakkında Genel Bilgiler

Thymelaeaceae (Serçedilgiller) familyasına ait olan sıırımbağı (*Daphne pontica*) cinsi ilk kez De Jussieu tarafından 1789 yılında tanımlanmıştır. Daha sonra 1997 yılından başlayarak Josef Halda tarafından alt türlere sınıflandırılmıştır (Çorbacı ve Yazgan, 2017).

Eşit miktarlarda kum, kil ve silt bulunduran nemli toprakları seven çok yıllık bir çalı türüdür. Yaygın olarak bol yağışlı sahil bölgelerinde görülen ikiz çiçekli olarak da bilinen *Daphne pontica* bitkisinin anavatanı Kuzey Trakya, Kuzey Anadolu ve Güney Kafkasya’dır. Ülkemizde Belgrad Ormanında meşe ve kayınlar arasında görülmektedir. Özellikle Kastamonu’da bulunan Ilgaz dağlarında 2000 metre yükseklikte dahi yetişebilmektedirler. Her mevsim yeşil kalabilen, nisan ve mayıs aylarında çiçek açan *Daphne pontica*, -23⁰C dereceye kadar dayanıklı olan bir süs bitkisidir (Aslan ve Sarıoğlu, 2011).

2.2.Sırımbağı (*Daphne pontica*) Bitkisinin Fiziksel Özellikleri

Yaprakları 8 cm uzunluğunda, entire, petiolat ve obovat şeklinde parlak, koyu yeşil; dal uçlarında sarı-yeşil renkli, küçük, güzel kokulu ve dört loblu çiçekleri bulunur. Boy uzunluğu 1 metre, gövde genişliği ise 1,5 metreyi bulan ve çiçeklerini genellikle siyah meyvelerin takip ettiği ufak bir çalıdır (Akıncı ve Özhatay, 2004).

2.3.Sırımbağı (*Daphne pontica*) Bitkisinin Kimyasal İçerikleri

Daphne pontica fitokimyasal açıdan sadece Türkiye’de yapılan çalışmalarla sınırlı kalmıştır. Bitkinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının metanollü ekstraktlarının dafenolik ve flovonoid içeriğinin yüksek olduğu bilinmektedir (Doğanca ve Apak, 1986).

Daphne pontica bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında kumarin türevi olan dafnetol dafnoretin, dafnozit ve umbelliferon izole edilebilmektedir. *Daphne pontica*'nın α -amireanol ve bunun asetil türevini taşıdığı bilinmektedir (Tosun, 1995).

Daphne pontica bitkisinin toprak üstü kısımlarında Asetil- α -amireanol, α -Amireanol triterpen bileşikleri bulunmakla birlikte bazı kısımlarında ise steroil yapıdaki bileşiklerden olan β -Sitosterol ekstralarında sitotoksik etki saptanmıştır (Takemoto ve Dunford, 1982).

Sırımbağı bitkisinde bulunan uçucu bileşiklerin içerikleri GC ve GC-MS analizi kullanılarak belirlenmiştir. Hidrodistilasyon yöntemi ile toplam 51 uçucu bileşik elde edilmiş olup ana bileşenleri şunlardır; heksahidrofarnesil aseton, karvarol, dihidroedulan II, (E) -geranil aseton ve timol dür. Mikro- damıtma yöntemiyle ise toplam 39 uçucu bileşik bulunmuş olup ana bileşenleri, carvacrol, timol, dihidroaktinidiolid, bisiklosil-sülfillandren ve (Z) -3-heksenaldır (Gürbüz ve Demirci, 2013).

2.4.Sırımbağı (*Daphne pontica*) Bitkisinin Biyolojik Aktivitesi

Sırımbağı bitkisinde bulunan steroid türevi olan β -Sitosterol, tek başına kullanıldığında kandaki kolesterol seviyesini indirir ve hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılır. Avrupa ülkelerinde ise prostat büyümesi tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir.

Daphne pontica bitkisi ile fareler üzerinde yapılan deneyler sonucunda çeşitli dozlarda verilen hekzanlı ekstraktların farelerin daha hızlı iyileşmesine neden olduğu, kontrol grubunun analizi ve istatistiksel yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Referans olarak antienflamatuvar etkiye sahip olan indometasin (10 mg/kg) ilacı kullanılmıştır. Bu sonucun çıkmasındaki en önemli sebebin kumarin türevi bileşiklerin yoğun miktarda özellikle yaprak ekstraktında bulunması olduğu görülmüştür (Pareek, 2014).

Daha önceki çalışmalarda yapılan antioksidan aktivite deneyi neticesinde serbest radikal temizleme aktivitesinin diğer *Daphne* türlerine kıyasla *Daphne pontica* türünde çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. *Daphne pontica* bitkisinin ticari olarak satılan standart antioksidanların aktivitelere yakın olduğu saptanmıştır. Bunun

nedeni ise flavonoid bileşiklerinin bitkinin yaprak ve gövde kısımlarında oldukça fazla bulunmasından kaynaklanmaktadır (Sanda ve Zengin, 2015).

Sırımbağı'nın kök ekstraktlarından elde edilen defnodorinlerin antitümör aktivitesinin olduğu ayrıca PGE2 ve IL-1 β -28 üretimini inhibe edici özelliğinin bulunduğu saptanmıştır (Kumar ve Bajwa, 2013).

2.5.Sırımbağı (*Daphne pontica*) Bitkisinin Tıbbi Kullanım Alanları

Daphne türlerinin MS 2. yüzyılın başından beri kanser önleyici etkinliğe sahip olduğu düşünülmektedir. Sırımbağı, romatizmal ağrı ve iltihaplı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Kumar ve Bajwa, 2013).

Sırımbağı bitkisinin halk arasında kullanımı daha yaygın olarak görülmektedir. Bunlar; romatizma ağrılarını giderici, pürgatif, terletici, diüretik, abortif, ekspektoran ve nematisidal etkilerinin yanında, aksak hayvanların tedavisinde kullanıldıklarına dair bilgilere de rastlanmaktadır. Ayrıca diş ağrılarında, sıtma ve lösemide, ülser tedavisinde, deri hastalıklarında kullanımları da literatürde mevcuttur (Taninaka ve Takaishi, 1995).

2. KURAMSAL ÇERÇEVE

Geleneksel tıp, hastalıkları tedavi etmek veya engellemek için tek başına ya da başka tedavilerle birlikte yapılan; bitki, hayvan ve mineral kaynaklı ilaçlar, ruhsal tedaviler, manuel teknikler ve egzersizler gibi farklı yöntemleri kapsayan sağlık ile ilgili uygulamalara verilen genel addır.

Geleneksel Çin tıbbı, günümüzden tahmini 3.000 yıl öncesine dayanmasına rağmen, tanı ve tedavi yöntemlerinin hızla güncelliğini yitirdiği ve yerini yeni keşfedilen, teknik ve ilaçlara bıraktığı modern tıp içerisinde kendisine yer sağlayabilmektedir. Geleneksel Çin tıbbında ilaç yapımında kullanılan bazı bitki ailelerinden biri Thymelaeaceae familyasıdır. Çalıştığımız bitkiler ise bu aileye ait defne cinsi olan bitki türleridir. Son yıllarda bazı bilimsel çalışmalarda defne cinsine ait kanser analizleri, antimikrobiyal aktiviteleri, kimyasal içerik analizleri ve hücre ölüm yolaklarına etkileri üzerine örneklere rastlanılmıştır.

Kanser Analizleri

Neredeyse yarım asırdır yapılan çalışmalar ışığında kanser önleme, erken tanı koyma ve tedavi yöntemleri adına herhangi bir ilerleme kaydedilememiştir. Kanser türleri arasında özellikle akciğer kanseri, ölüm riski en yüksek olanıdır. Sırf bu sebepten dolayı bile akciğer kanseri tedavisine yönelik özel stratejiler geliştirilmesi gereklidir.

Jo ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yürütülen çalışmada kullanılan *Daphne genkwa* bitkisinin çiçeklerinden yalıtılan yeni Daphne diterpenoidleri, yuánhualine (YL), yuánhuahine (YH) ve yuánhuağine (YG) 'nin insan akciğerlerinin A549 hücreleri üzerinde etkili ve güçlü anti-proliferatif aktiviteler sergiledikleri görülmüştür (Jo vd., 2012).

Kanser önleme, erken tanı ve tedavi için büyük çaba sarf edilmesine rağmen, son kırk yılda kanser morbidite ve mortalitesi azaltılamamıştır. Özellikle akciğer kanseri, kanserle ilişkili insan ölümünde en üst sıralarda yer almaktadır. Bu nedenle, akciğer kanserinin yönetimi için etkili bir strateji kesinlikle gereklidir. Sinyal iletimi

moleküllerinin analizi neticesinde diterpenenoidlerinin insan akciğer kanseri hücrelerinde Akt, STAT3 ve Src'nin aktivasyonunu bastırıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca difanditerpenoidler, gemsitabine-dirençli A549, gefitinib, erlotinib-dirençli H292 hücreleri dâhil antikanser ilaca dirençli kanser hücrelerine karşı güçlü anti-proliferatif aktivite uygulamışlardır. Bu gözlemler hep birlikte düşünüldüğü takdirde elde edilen bulguların yeni *Daphne* diterpenoidlerinin, insan akciğer kanserleri için terapötik ajanların geliştirilmesinde öncü adaylar sağlayabileceklerini söylemek mümkün olacaktır (Jo vd., 2012).

Li ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yürütülen bir çalışma neticesinde ise; Flos Genkwa (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc, kekik) bitkisinin genellikle idrar söktürücü, antitusif, balgam söktürücü ve antikanser etkileri için kullanılan geleneksel şifalı bir Çin bitkisi olduğu bilinmekle birlikte, Flos Genkwa ve biyolojik etkinliği üzerine yapılan çalışmaların kapsamının sınırlı olduğu görülmüştür (Li ve diğerleri, 2013).

Zhang ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yürütülen bir çalışma ile iki yeni defne diterpen esteri Yuanhuajine (2) ve Yuanhuagine (4), bilinen üç *Daphne* diterpen esteri yuanhuacine (1), yuanhuadine (3) ve yuanhuapine (5) geleneksel bir Çin tıbbi olan *Daphne genkwa*'dan izole edilerek teşhis edilmiştir. Yapıları, UV, IR, MS ve NMR (1H NMR, 13C NMR, HSQC ve HMBC) spektrumlarının bir kombinasyonu ile aydınlatılmıştır. Bileşikler üzerindeki gözlemler neticesinde agaroz jel elektroforezi deneyleri, orto ester *Daphne* diterpen ester grubunun, DNA topol'e karşı inhibe edici aktivite için gerekli olduğunu ve DNA topol'e karşı inhibisyonun muhtemelen *Daphne* diterpen esterlerinin anti-tümör mekanizmalarından biri olduğunu göstermiştir (Zhang vd., 2006).

Hong ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yürütülen bir çalışmada, iki yeni *Daphne* tipi diterpen ester, yuanhuahine (1) ve yuanhualine (2), bilinen üç diterpen ester, yuanhuacine (3), yuanhuadine (4) ve yuanhuin (5) ile birlikte *Daphne genkwa* (Thymelaeaceae) çiçeklerinden izole edilmiştir. Yapıları, korelasyon spektroskopisi (COSY), heteronükleer çoklu kuantum korelasyonu (HMQC), heteronükleer çoklu bağ korelasyonu (HMBC), dönen çerçeve Overhauser arttırma spektroskopisi (ROESY) sekansları ve kütlesi dahil 1D ve 2D NMR deneylerinin bir kombinasyonu

ile belirlenmiştir. Tüm bileşikler, izole edilmesinin ardından A549 insan akciğer kanseri hücreleri ve MRC-5 insan normal akciğer epitel hücrelerine karşı test edilmişlerdir. Bileşiklerin (1-5), IC50 değerleri 12-53 nM olan A549 akciğer kanseri hücrelerine karşı güçlü anti-proliferatif etkiler sergiledikleri görülmesine karşın bu bileşiklerin MRC-5 normal akciğer epitel hücrelerine karşı nispeten sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir (Hong vd., 2010).

Daphne altaica Pall. (Thymelaeaceae), geleneksel Kazak Tıbbında uzun zamandır kanser ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmış tıbbi bir bitkidir. Potansiyelini sistematik olarak değerlendirmek için antikanser aktivitesi, altı farklı polarite ekstraktı yani; sulu, n-bütanol, etil asetat, kloroform, petrol eteri ve etanol ekstraktlarının bitkiden elde edilmesinin ardından dört insan kanseri hücre dizisi üzerindeki antiproliferatif etkileri açısından test edilmiştir. Proliferasyon testinden elde edilen sonuçlar, sulu ekstrakt hariç bütün ekstraktların, tüm kanser hücre hatları üzerinde doza bağlı bir büyüme inhibe edici etki sergilediğini göstermiştir. Bu ekstraktlardan etanol ekstraktının bölünmesinden elde edilen iki fraksiyon; kloroform ekstraktı ve etil asetat ekstraktı, potansiyel bir antikanser bileşik kaynağı olarak dikkate alınmıştır. Ancak bu sonuçlara rağmen aktif ilkelerin tanımlanabilmesi ve kimyasal karakterizasyonlarının yapılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalar gereklidir (Kizaibek vd., 2011).

Huang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yürütülen çalışmada, akutilobinler A-G adlı daha önce bildirilmemiş yedi *Daphne* tipi diterpen ester, bilinenler ile birlikte *Daphne acutiloba* Rehd bitkisinin EtOAc özünden izole edilmiştir. Bu dafenan tipi diterpen esterlerinin sitotoksik ve anti-HIV-1 aktiviteleri biyo-tahlillerle değerlendirilmiştir. İzolatların dördü, beş insan tümör hücre hattı olan HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 ve SW480'e karşı kesin sitotoksik aktivite sergilemiştir. Ek olarak, anti-HIV-1 aktiviteleri, 13 dafenan tipi diterpen esterde gözlenmiştir. Bunlar arasında, akutilobinler A-G, EC50 ile 1.5 nM'nin altında ve SI, 10.000'in üzerinde önemli anti-HIV-1 aktiviteleri göstermiştir. Özellikle genkwanine VIII, EC50 0.17 nM ve SI 187.010 ile en güçlü aktiviteyi gösteren olmuştur (Huang vd., 2012).

Daphne genkwa Sieb.et Zucc. iyi bilinen bir şifalı bitkidir. Çalışmada, *D. genkwa*'daki (TFDG) total flavonoidlerin antikanser etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. TFGG'nin antikanser aktivitesini araştırmak için HT-29 ve SW-480 insan kolorektal kanser hücrelerinin kültürlenmesine ek olarak, ApcMin/+ fare modeli *in vivo* deneyde uygulanmıştır. Hücre deneyinin sonuçları, TFDG'nin HT-29 ve SW-480 insan kolorektal kanser hücreleri üzerinde önemli inhibe edici etkilere sahip olduğunu göstermiştir (her ikisi de $p < 0,01$). Ayrıca *in vivo* verileri, TFDG ile tedaviden sonra yaşam süresinde önemli bir artış olduğunu (her iki $p < 0,01$) ve kolondaki tümör sayısının azaldığını (her iki $p < 0,01$) tümör verileri tarafından desteklendiğini göstermiştir. Sonuçlar ayrıca, bağırsak dokusunda interleükin (IL) -1 α , IL-1 β , IL-6, granülosit koloni-uyarıcı faktör ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ifadelerinin, TFDG ve bağışıklık sitokin salgıları ile azaldığını göstermiştir. Elde edilen bulgular birlikte ele alındığında, TFDG' nin kolorektal kanser terapötikleri üzerinde potansiyel bir klinik faydaya sahip olduğunu ve TFDG'nin etkisinin, bağışıklık fonksiyonunu düzenleme ve inflamatuvar sitokinlerin üretimini önleme kabiliyetiyle bağlantılı olduğu ortaya çıkmıştır (Du vd., 2016).

Bir alkol ekstraktının (EtOH: H2O1: 1h/h) *Daphne mucronata*'nın (Thymelaeaceae) meme tümörü taşıyan sıçan grubuna oral olarak art arda 20 gün boyunca verilmesi, tümörün çapını önemli ölçüde azaltarak ortadan kaldırmıştır. Tamamen tedaviye ise uzun süre devam edildiği takdirde ulaşılabilecektir. Meme tümörleri, sıçanlarda haftada iki kez ve art arda 4 hafta boyunca DMBA uygulaması (doz başına 5 mg) ile indüklenmiştir. Veriler, bitkilerin Taxol gibi çeşitli dozlarda ekstrakt edilmesinin, kültürlenmiş monositlerin TNF-a salgılanmasını hafifçe arttırdığını göstermiştir. Hem Taxol hem de bitki özü, TNF-a reseptörlerini zamana bağlı bir şekilde aşağı regüle etmiştir. İki saatten az bir sürede, uyarıcıların etkisi altında (*Daphne mucronata* özü veya Taxol), TNF-a reseptörlerinin sayısı, 125 I-TNF-a bağlanma deneyi kullanılarak saptanamayan bir seviyeye indirilmiştir. Bu veriler muhtemelen TNF-a reseptörlerinin *Daphne mucronata* ekstraktının Taxol'e benzer bir mekanizma ile aşağı regülasyonunu desteklemekte olduğu düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Hedayati vd., 2003).

Bitkiler çeşitli tedavi yöntemleri arasında kanser kemoterapisinde önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Literatürde bulunan veriler neticesinde değişik kekik

familyası türlerinin antikanser ajanları açısından önemli kaynaklar olduğu tespit edilmiştir. İran tıbbi bitkisi olan *Daphne mucronata*'nın (Thymeleaceae) antikanser özelliklerini değerlendirmek için bir araştırma yapılmıştır. Araştırmalar sonucunda farklı tümör hücre hatlarında antiproliferatif ve anti-metastatik etkilerle *Daphne mucronata*'dan saflaştırılan yeni bir diterpen ester bileşiği olan gnidilatimonoeinin, ikili apoptotik ve farklılaşma etkilerine dayanarak yeni antikanser ajanının lösemi kemoterapisi için güçlü bir aday olduğu sonucuna varılmıştır (Yazdanparast vd., 2010).

Sadeghi ve arkadaşları tarafından yürütülen antikanser şifalı bitkiler araştırmasında, *Daphne mucronata* (Thymelaeaceae) metanol ekstraktının antiproliferatif aktivitesi, insan miyeloid lösemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Sadeghi vd., 2003).

Huang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan çalışmada, şifalı bir bitki olan *Daphne acutiloba* Rehd' in fenolik izolatlarının fitokimyasal özelliklerinin ve anti-HIV aktivitesinin çalışılması anlatılmaktadır (Huang vd., 2012).

Chaouki ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yürütülen çalışmada kanserle ilgili etnobotanik kullanımı olan tanınmış bir Fas bitkisi olan *Daphne gnidium* L. ele alınmıştır. Meme kanserindeki potansiyel aktivitesini sistematik olarak değerlendirmek için, farklı polaritelere sahip bu bitkiden dört ekstrakt, MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri açısından test edilmiştir. Elde edilen bulgular, *Daphne gnidium* L.'nin potansiyel kemopreventif ilgi çekebileceğini düşündürmektedir. Antiproliferatif etkiden sorumlu olan aktif ajanları izole etmek için başka çalışmalar da mevcuttur (Chaouki vd., 2009).

Hedayati ve diğerleri tarafından 2011 yılında ele alınan çalışmada, *Daphne mucronata* bitkisinin sıçanlarda meme adenokarsinomu boyutu üzerinde azalan bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmada, *Daphne mucronata*'nın saflaştırılmış diterpeninin, insan monositlerinin ve iki insan lösemi hücre hattının (K562, CCRF-CEM) ortak kültürü üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her hücre hattı tek katmanlı kültür, log faz büyümesinde, 10 ila 160 μ L ekstrakt (1 g/ml bırakma tozu) ve saflaştırılmış bileşik (0,94 nM) ile muamele edilmiştir. Sonuç olarak ise *Daphne*

mucronata özü ve artırılmış diterpenin, artan monositler TNF-a salımı yoluyla lösemi hücre hattını potansiyel olarak inhibe ettiği görülmüştür (Hedayati vd., 2011).

Yazdanparast'ın 2003'te yürütmüş olduğu çalışmada *Daphne mucronata* ekstraktının ve aktif saflaştırılmış bileşenlerinden birinin sitotoksikite değerlendirmesi, yedi farklı kanserli hücre hattı kullanılarak bitkinin güçlü antiproliferatif aktivitesini ortaya çıkardığı görülmüştür. Akış sitometrisi tekniği kullanılarak, en tepkili hücrelerin (K562) bitki özü veya aktif bileşen ile muamelesinin, hücrelerin G1 fazı boyunca ilerlemesini, muamele edilmemiş hücrelere kıyasla yaklaşık %15 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. Sırasıyla, [3H]-timidin ve [3H]-üridin'in DNA ve RNA'ya dâhil edilmesine dayanarak, *D. mucronata*'nın başlıca metabolik etkilerinin esas olarak DNA üzerinde ve daha az miktarda RNA sentezi üzerinde olduğu bulunmuştur. Bu veriler akış sitometrisi gözlemini kuvvetle destekler ve *D. mucronata* 'nın antiproliferatif aktivitesi için bir mekanizma sağlamaktadır (Yazdanparast vd., 2003).

Park ve diğerleri tarafından 2007 yılında ele alınan çalışmada, *Daphne genkwa* bitkisinin genkwa daphnin (1) ve yuanhuacine (2) çiçek tomurcuklarından izole edilen iki Daphnediterpen esteri, insan promyelositik HL-60 hücrelerinde apoptotik aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Hem 1 hem de 2'nin DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve alt glhipodiploidi dâhil olmak üzere apoptotik süreci aktive ettiği gösterilmiştir. Elde edilen bulgular neticesinde bileşik 1 ve 2'nin *Daphne genkwa*'nın güçlü apoptotik bileşenleri olduğunu ve anti-tümörük ajanlar olarak güçlü olabileceğini göstermektedir (Park vd., 2007).

Daphne gnidium L. bitkisinin ekstraktlarının K562 hücreleri üzerindeki antiproliferatif potansiyeli değerlendirilerek bu ekstraktların K562 hücrelerinin hücre döngüsünü bozma ve insan P-glikoproteini inhibe etme kapasitesi değerlendirilmiştir. Test edilen tüm ekstraktlar, belirgin anti-proliferatif etkiler göstermiştir. Bu bulgular, *D. gnidium* yapraklarından elde edilenlerin antilösemi etkili olduğunu göstermektedir (Chaabane vd., 2014).

Sun tarafından 2016 yılında yapılan araştırmada, üç yeni prenilen edilmiş flavon (1-3), bilinen üç analogu (4-6), *Daphne giraldii*'nin kök ve kök kabuğundan izole edilerek

yapıları, kapsamlı NMR ve HRMS spektroskopik veri analizleri ile belirlenmiştir. Bileşik 2 ve 3'ün mutlak konfüğürasyonları, optik rotasyon karşılaştırması, CD ve [Rh₂ (OCOCF₃)₄] kaynaklı CD spektral metotları ile atanmıştır. Beş kanser hücresi hattını (U251, A549, HepG2, MCF-7 ve Bcap37) içeren *in vitro* sitotoksisite deneyleri, ikisinin 4,26 ila 20,82 µM arasında değişen IC₅₀ değerleriyle test edilen tüm hücrelerin çoğalmasını belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Bu flavonların ön yapı-aktivite ilişkileri tartışılmıştır. Ek olarak, bileşik 2'nin bir akış sitometri analizine göre HepG2 hücrelerinde apoptozu etkin bir şekilde indüklediği bulgusuna varılmıştır (Sun vd., 2016).

Chaabane ve diğerleri tarafından 2013 yılında yürütülen çalışmada, *Daphne gnidium*'un yapraklarından elde edilen etil asetat ekstraktından izole edilen bir triterpen olan etil asetat, toplam oligomer flavonoid (TOF), sulu ekstraktlar ve beta amyrin asetat inhibitör kapasitesi fare melanomunda (B16-F0 ve B16) araştırılmıştır. Bu ürünlerin döngü fazlarında hücre dağılımının yüzdesi ve melanogenez üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Hücre canlılığı, 3- (4, 5 - dimetiltiyazol -2 - il) -2,5 - difeniltetrazolyum bromür deneyi kullanılarak belirlenmiş ve test edilen bileşiklerin hücre döngüsü boyunca ilerlemedeki etkilerini analiz etmek için akış sitometrisi kullanılmıştır. Ek olarak, melanin ve tirozinaz miktarları, 475 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Etil asetat, TOF ve sulu ekstraktlar, iki tip tümör cilt hücresi B16-F0 ve B16-F10 ile inkübasyondan sonra önemli bir anti-proliferatif aktivite sergilemiştir. Ayrıca, hücre döngüsü analizi, etil asetat ve TOF özütleri ile muamele edilmiş hücrelerin ağırlıklı olarak G2-M fazında tutuklandığını ortaya çıkarmıştır. Etil asetat ekstraktı ayrıca B16-F0 melanom hücrelerinin melanogenezini ve tirozinaz aktivitesini geliştirme kabiliyetine sahiptir (Chaabane vd., 2013).

Chaabane ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yürütülen çalışmanın amacı, farelerde bulunan melanom tümöründe *Daphne gnidium* ekstraktın sulu ekstraktının antitümör ve immünomodülatör etkilerini değerlendirmektir. Balb/C fareleri B16-F10 hücreleriyle deri altından implante edilerek 21 gün boyunca 200 mg/Kg b.w' de sulu ekstrakt ile periton içine uygulanmıştır. 22. günde ötanizasyondan sonra, tümörler tartılmıştır. Lenfosit proliferasyonu, sitotoksik T lenfosit (CTL) ve doğal öldürücü (NK) hücre aktiviteleri MTT tahlili kullanılarak değerlendirilmiştir. Makrofaj

fagositozu lizozomal aktivite ölçülerek çalışılmıştır. Transplantabl tümörün büyümesini inhibe etme potansiyelinin yanı sıra, sulu ekstrakt, splenosit proliferasyonunu ve tümör taşıyan farelerde hem NK hem de CTL aktivitelerini belirgin şekilde indüklemiştir. Sulu ekstraktın konukçu makrofajların lizozomal aktivitesini arttırdığı da görülmüştür (Chaabane vd., 2016).

Kimyasal İçerik Analizleri

Daphne altaica Pall. bitkisi, Orta Asya'ya özgü, yaprak döken bir çalıdır. Bitki uzun süredir geleneksel Kazak Tıbbında, farklı kanser türleri, romatizma, soğuk algınlığı ve boğaz ağrısı gibi rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada, *Daphne altaica* kök kabuğu ekstraktlarının insan özofagus kuamöz hücreli karsinom, mide karsinomu, hepatom ve servikal karsinom hücrelerinde antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Kizaibek ve arkadaşlarının yürüttüğü mevcut araştırmada ise *Daphne altaica* kök kabuğu, n-heksan, diklorometan (CH₂Cl₂) ve metanol ile ardışık özütlemeye sunulmuş ve ekstraktlar, insan CCRF-CEM lösemi ve MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde antiproliferatif aktivite açısından test edilmiştir. En aktif CH₂Cl₂ özü, pozitif modda LC-DAD-MSn ve LC-DAD-HRESIMS ile analiz edilmiştir. Tüm bileşikler ilk kez *Daphne altaica*'da tanımlanmıştır. Daphnan tipi diterpenortoesterleri, Thymelaceae familyasının karakteristik özelliğidir. Defnetoksin, gnidisin, ekosekariatoksin ve bazı geçici olarak tanımlanmış diterpenortoesterleri için antikanser aktivitesi tanımlanmıştır. 1,2-dihidrodafnetoksinin CCRF-CEM ve MDA-MB-231 hücrelerinde orta derecede aktif olduğu görülmüştür. Ayrıca, daphnoretinin, *in vitro* antikanser etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle tanımlanan bileşenlerin, *Daphne altaica* CH₂Cl₂ özütünün antiproliferatif aktivitesi ile yüksek derecede alakalı olduğu varsayılabilir (Kizaibek vd., 2015).

Geleneksel Tibet tıbbında kullanılan *Daphne tangutica*, etanolde çözünür bir ekstraktının fitokimyasal bir araştırması, sekiz daphnan diterpen, dokuz kumarin, altı ligan, beş fenilpropanoid türevi dâhil olmak üzere 30 bileşiğin izole edilmesine yol açmıştır. Bu izolatlardan iki bileşik yeni defne diterpen analoglarıdır ve yapıları 1,2 α -dihidro-5--hidroksi-6 α , 7 α -epoksi-resiniferonol-14-benzonat ve 1,2 β -dihidro-5 β -

hidroksi olarak oluşturulmuştur. Ek olarak bilinen 13 geleneksel bileşik, Tibet şifalı bitkisinden izole edilmiş ve ilk kez tanımlanmıştır (Pan vd., 2010).

Daphne giraldii Nitsche, Çin halk hekimliğinde ağrı ve romatizma tedavisinde kullanılan bir bitkidir. Bitki, Çin halk hekimleri tarafından Shaanxi, Gansu ve Qinghai bölgelerinde yaygın olarak dağıtılmaktadır. Farmakolojik testler bitkinin anti-inflamatuar, analjezik ve antikanser aktivitelerine sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, kimyasal bileşenler ve *D. giraldii*' de eşzamanlı belirleme içeriği için yöntem hakkında hala yeterli sistemik araştırma yoktur. Bu nedenle, bu bitkinin kök kısımlarından bileşiklerin izolasyonu ve karakterizasyonu rapor edilmiştir. Ayrıca, HPLC-DAD kullanarak eş zamanlı belirlenmeleri için kolay, doğru ve güvenilir bir yöntem geliştirilerek doğrulanmıştır (Dong vd., 2016).

Antioksidan ve Antimikrobiyal Analizleri

Sovrlíć ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada ele alınan *Daphne alpina* bitkisi yaprağının ve dallarının kuru kloroform ve metanol ekstraktları analiz için kullanılmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, belirlenmiş prosedürlerle saptanmıştır. Antioksidan potansiyeli çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal özellikleri mikrodilüsyon metodu ile elde edilmiştir. *D. alpina* özütlerinde mevcut olan en bol metabolitlerin tanımlanması için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Ekstraktların fenolik bileşiklerden dolayı orta derecede antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sovrlíć vd., 2015).

Balkan ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yürütülen çalışmanın amacı, *Daphne oleoides Schreber* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrakt/alt-ekstraktların in vitro anti-inflamatuar (nitrik oksit inhibitör etkileri), antioksidan (DPPH, ABTS + + ve FRAP testleri) ve antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmalı olarak incelemektir. Toz haline getirilmiş hava kısımları önce metanol ile ekstre edilerek solvik ekstraksiyonları ile beş alt ekstrakt [(n-heksan, diklorometan (CH₂Cl₂), etil asetat (EtOAC), n-bütanol ve kalan su] ayrılmıştır. Ekstraktların kimyasal bileşimleri, toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ve yağ asidi bileşimleri

açısından karşılaştırılmıştır. CH₂Cl₂ ve n-heksan ekstraktları, NO üretimi üzerinde en yüksek engelleyici etkiye yol açmıştır. N-heksan ekstraktının yağ asidi analizi, heksadekanoik asit ve 9,15-oktodekadienoik asitlerin ana bileşenler olduğunu ortaya çıkarmıştır. N-heksan ve CH₂Cl₂ alt ekstraktları, en yüksek antimikrobiyal potansiyeli kullanmıştır (Balkan vd., 2017).

Grubešić ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yürütülen çalışmada, biyolojik olarak aktif fenolik bileşiklerin (toplam polifenoller, tanenler, flavonoidler ve fenolik asitler) içeriği, Thymelaeaceae (*Daphne alpina*, *Daphne cneorum*, *Daphne laureola* ve *Daphne mezereum*) familyasında bulunan dört yabancı Hırvat *Daphne* L. türünde spektrofotometri kullanılarak belirlenmiştir. *Daphne alpina*, *Daphne laureola*' da maksimum konsantrasyonların bulunduğu flavonoidler hariç, en yüksek miktarda polifenol içermiştir. Ayrıca yaprak ve kök ekstraktlarının antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Analiz edilen tüm ekstraktlar, *Daphne alpina*' nın yaprak ekstraktlarında en yüksek konsantrasyona sahip yüksek serbest radikal temizleme aktivitesi göstermiştir. *Daphne cneorumun* yaprak özleri, β-karoten ağartma testinde en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir (Grubešić vd., 2012).

Bu tez çalışması kapsamında sırimbağı ve sıyırıcık bitkilerine ait yaprak, kök ve gövde örneklerinin farklı dozlarda metanol ekstraktlarının *in vitro* antikanser, antimikrobiyal ve DNA koruma özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece doğal bir ürün olarak *Daphne* cinsine ait sırimbağı ve sıyırıcık bitkilerinin yaprak, kök veya gövde ekstraktlarının ilaç etken maddesi olma potansiyeli değerlendirilmiş olacaktır.

3.MATERYAL VE METOT

3.1.MATERYAL

3.1.1.Bitki Materyali

Çalışmada kullanılacak olan *Daphne pontica* ve *Daphne gnidioides* bitkileri 2011 yılında çiçeklenme döneminde toplandı. Bitkiler Muş Alparslan Üniversitesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Murad Aydın ŞANDA tarafından tanımlanmıştır.

3.1.2.Bitki Kimyasalları

Agaroz (Applichem, Almanya)

Askorbik Asit (Sigma-Aldrich, Almanya)

DMSO (Sigma-Aldrich, Almanya)

DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, ABD)

EDTA (Applichem, Almanya)

FeCl₃ (Sigma-Aldrich, Almanya)

H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Almanya)

iScript cDNAsynthesis kit (Bio-Rad, ABD)

Metanol (Sigma-Aldrich, Almanya)

Nucleic Acid Staining Solution-Jel Boyası (İntron Biotechnology)

PZR reaksiyon tüpü (Greinerbio-one, ABD)

iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, ABD)

Thermo Fisher MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Kit

RNA izolasyon Kit (Thermo Fischer, ABD)

3.1.3.Kullanılan Malzemeler

-20 Derin Dondurucu/ Arçelik

-80 C Derin Dondurucu/ Nuaire NU 9668E

AxioObserver Z1 Inverted Microscope

Buz Makinası/ Scotsman
CO₂ inkübatörü/ Nuair
Çekerocak/ Esco
Hassas terazi/ Precise
Isı Kontrollü İnkübatör/ Thermo
Jel Görüntüleme/ Thermo
Manyetik karıştırıcı/ Wise Stir
Mikrosantrüfuj/ Hettich
NanoDrop/ Thermo
Otoklav/ WiseCave
pH Metre/ MettlerToledo
pH metre/ Thermoscientific
Real Time PCR/ Qiagen Rotor Gene
Saf su cihazı/ Human Corporation Zeneerpower
Soğutmalı santrüfuj/ Hettich Mikro220R
Thermalcyclers/ Thermo
VortexMixer/ Velp

3.2.METOT

3.2.1.Bitki Ekstraktının Hazırlanışı

Bitkilerin uygun şartlarda kurutma işlemleri tamamlanmış ve bitkilerin yaprak, gövde ve kök kısımları değirmende toz haline getirilmiştir. Örnekler Sokslet cihazında 6 saat boyunca metanol ekstraksiyonuna tabii tutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar Whatman mavi band filtre kâğıdında süzülerek ve çözücüyü uzaklaştırmak için 40 °C’de evapore edilmiştir.

3.2.2.Bitki Kimyasallarının İçeriklerinin Analizi

Kimyasallar ve Tepkimeler

Tüm reaktifler ve standartlar analitik reaktif dereceliydi. Tüm standartları Sigma-Aldrich' ten (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır ve etanolde (HPLC dereceli; Sigma) bireysel stok çözeltileri hazırlandı. HPLC-DAD-MS analizleri için ise LC-MS dereceli asetonitril (CH₃CN, %99; Sigma) ve ultra saf su (Milli-Q Waters arıtma sistemi; Millipore: Milford, MA, ABD) kullanılmıştır.

Kromatografik Koşullar

HPLC analizi için, 5mg kurutulmuş özü (DE), 1 Ml metanolde yeniden eritilmiştir, 0.45 um PTFE membran filtrelerden süzülüp 10 µl enjekte edilmiştir. 150 x 3.0 mm ve 5 µm partikül boyutuna sahip LunaOmega Polar C18 analitik kolonu ve 4 x 3.0 mm (Phenomenex) Polar C18 Güvenlik Muhafaza kartuşu kullanılmıştır. HPLC sistemi, negatif iyon modunda çalışan bir elektrosprey arayüzü ile donatılmış bir iyon tuzağı kütle spektrometresine (Esquire 6000, BrukerDaltonics) bağlanmıştır. HPLC-MS koşulları daha önce rapor edilmiştir (Llorent-Martínez vd., 2018).

Polifenollerin Miktar Tayini

Aşağıdaki analitik standartları kullanarak kalibrasyon eğrileri (metanolde 0.5-100 ug mL-1) hazırlanmıştır: apigenin, klorojenik asit, esculetin, gallik asit, kaempferol,

luteolin, kersetin ve vicenin-2. Kromatogramlargallik asit için 280 nm'de, caffeoylquinic asitler için 320 nm'de ve flavonoidler ve kumarinler için 350 nm'de kaydedilmiştir. Her bir analitik standart, karşılık gelen türevlerin (yarı) miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Toplam bireysel fenolik içerik (TIPC), ölçülen tüm fenolik bileşiklerin toplamı olarak tanımlanmıştır.

HPLC-ESI-MSⁿ

Fitokimyasalların karakterizasyonunu, fenolik bileşikler için pozitif moddan daha yüksek hassasiyet ve bilgi sağlayan negatif iyon modunu kullanarak, HPLC-ESI-MSⁿ ile gerçekleştirilmiştir. *Daphne gnidiodes*'in farklı kısımlarının baz pik kromatogramları ve alıkonma sürelerine dayanan bileşikler için aynı numaralandırmayı sürdürmektedir. Tespit edilen bileşiklerin karakterizasyonu için apigenin, gallik asit, esculetin, kaempferol, luteolin, quercetin ve vicenin-2 kullanıldı. Analitik standartların yokluğunda, deneysel spektrumları bilimsel literatürdeki verilerle karşılaştırıldı.

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite Deneyi

Bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımlarından elde edilen özütler, metanolde çözülmüştür. İçerisinde Mueller Hinton Agar bulunan petri kaplarına test bakterileri ekilmiştir. Beş ve 50 mg metanolde çözülmüş olan bitki ekstraktları ile muamele edilen diskler, agarın yüzeyine yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları, cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Disk difüzyon testinde, metanol ekstraktına duyarlı olarak belirlenen mikroorganizmalar için minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri de çalışılmıştır. Mikroorganizmaların 12 saatlik kültürlerinden hazırlanan süspansiyonlar 0.5 McFarland standart türbiditeye ayarlanmıştır. İlk önce test edilecek en yüksek konsantrasyona (500 g/ml) seyreltilmiştir ve daha sonra Nutrient broth içeren 10 ml steril test tüplerinde 15.5-500 g/ml'lik bir konsantrasyon aralığında seri iki katlı dilüsyonlar yapılmıştır. Bakteriye suşlara karşı özütlerin MIC ve minimal bakterisit konsantrasyonu (MBC) değerleri mikro-kuyucuk seyreltme yöntemine göre belirlenmiştir. 96 gözlü plakalar, her bir göze 95 ul Nutrient broth dağıtılarak hazırlanmış ve 24 saat boyunca uygun

sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Mikrobiyal büyüme, MultiscanGo cihazında (Thermo) 600 nm'de absorbansı okunarak belirlenmiştir.

3.2.4.DNA Koruma Aktivite Deneyi

Bitki özütleri hazırlanmıştır. 0,01g bitki tartılarak 1ml çözücüde (DMSO, MeOH) çözülmüştür (10mg stok için). Beş mg konsantrasyonlar için stoktan 250µl alınıp 250µl çözücüler eklenerek toplamda 500µl ye tamamlanmıştır. Bu şekilde 5mg konsantrasyon hazırlanmıştır. Fenton (DNA'ya zarar veren kimyasal) hazırlanmıştır. 0,03 ml H₂O₂, 0,088 g Askorbik Asit ve 0,12976 g FeCl₂ tartılarak hepsi 10ml suda çözdürülmüştür. Ependorflar hazırlanmış ve son hacmi 20µl olacak şekilde su, fenton, bitki özütü ve bakteriden izole ettiğimiz plazmid konulmuştur. Örnekler hazırlandıktan sonra 30dk 37 °C' de inkübe edilmiştir. Agoroz jel hazırlanmıştır. 50ml 1x buffer, 0,4g agar eklenmiş ve mikrodalga fırında agar eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Daha sonra 2,5 µl DNA boyası (Redsafe, Thermo Scientific) eklenmiş ve donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra örnekler 4µl jel yükleme boyası eklenmiştir. Örneklerin tamamı jele yüklenmiştir. Kırkbeş dk yürütülmüştür. Daha sonra jel, UV ışık altında incelenmiştir.

3.2.5.Sitotoksik Aktivite Deneyi

Öncelikle MDA-MB231 meme kanseri hücreleri, 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ sağlayan inkübatörde %10 FBS, %1 penicilin/streptomycin, %1 NEAA (Non-essential Aminoacid), 0,01 mg/ml humaninsulini içeren 1X DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyeri içinde çoğaltılmıştır. Stok kültürler 75 cm² steril corning flasklarda, deney kültürleri ise 60 mm x 15 mm steril petri kaplarında ve 96 kuyucuklu tabaklarda çoğaltılmıştır. Hücre pasajı genellikle hücreler logaritmik fazda iken (~%80 yoğunlukta) gerçekleştirilmiştir. Hücreler 10 ml %0,25'lik PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml %0,25 tripsin flasklara ilave edilmiştir. Hücreler yeni besiyeri ile seyreltilerek yeni flasklara ekilmiştir. Hücre pasajı her 3 günde bir periyodik olarak gerçekleştirilmiştir. Ardından MDA-MB231 hücre kültürü, 96 kuyucuklu tabak içinde, 37 °C, %5 CO₂'de logaritmik faza ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Logaritmik fazdaki hücreler sırimbağı ve sıyırıcık örneklerinin MeOH ekstraktlarının farklı konsantrasyonları ile (0.01 µg, 0.1 µg, 1 µg, 10 µg, 100 µg ve 1 mg) muamele edilerek

inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyeri aspire edilmiştir. Her petriye, 0.5 µg/µl MTT ve %0,5 FBS içeren besiyeri konulmuştur. Petrilerin etrafı alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde sarılarak inkübatörde 4 saat inkübe edilmiştir. Dört saatin sonunda petrillerdeki MTT'li besiyeri aspire edilmiştir. Her petriye %3 SDS eklenip 5 dakika çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 40 mM HCl/izopropanol konulup 15 dakika daha karıştırılmıştır. Pipetleyerek hücreler homojenize edilmiştir. %3 SDS + 40 mM HCl/izopropanol ile seyreltilmiştir (1/10 seyreltme). Örneklerin spektrofotometrede 570 nm dalga boyundaki absorbans değeri ölçülmüştür.

3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR Analizleri

PZR analizi yapılabilmesi için ilk önce inhibe edici özelliği olduğu bilirlenen özütlerimizin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değerini yani IC50 değerlerinin hesaplanması gerçekleştirilmiştir. Sitotoksik aktivite deneyimizde kullandığımız MTT assay tekniği ile spektrofotometrede 570 nm dalga boyundaki absorbans değerleri alınmıştır. Ardından oranlama yapılmış, bulunan değerler GraphPad Prism hesaplama programına aktarılmıştır. X-Y formatında bir sayfa açılmış daha doğru bir yaklaşım için değerleri, standart sapmalarını ve tekrar sayısını girebileceğiniz şekilde bir veri giriş sayfası oluşturulmuştur. Y değeri olarak ölçüm, standart sapma ve tekrar değerlerini, X olarak da hücrelere verilen özüt miktarları girildikten sonra "Analyze" ikonuna, ardından Non-linear Regression"a tıklanmıştır. Açılan pencerede (Dose Response Special'ın altında) IC50 shift seçeneği bulunup seçilmiştir. "OK"e tıklandıktan sonra açılan sayfadaki logIC50 Control'ün karşısında yazılan değer aranılan derişim değerini vermiştir. Değerlerimizi elde ettikten sonra kanser hattı hücrelerimiz petriye ekilmiştir. Gerekli çoğalma sağlandıktan sonra IC50 değerindeki özüt miktarları verilmiş 24h ve 48h beklenmiştir. Daha sonra hücreler toplanmış olup -80 °C'de 2 gün bekletilmiştir. Ardından RNA izolasyon Kit (Thermo Fischer, ABD) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon basamağı kısaca özetlenecek olursa; falkon içine toplamış olduğumuz hücrelere 600 µl liziz eklenmiş pipetaj yapılmıştır. Sonra 360 µl %90 ethanol eklenmiş olup toplama kabına alınmıştır. 13000 G 'de oda sıcaklığında 1 dk santrifüj yapılmıştır. Alt kısım atılmış, üst kısma sırası ile 700 µl yıkama solüsyonu 1 eklenmiş 13000 G 'de 1 dk santrifüj, 600 µl yıkama solüsyonu 2 eklenmiş 13000 G' de 1 dk santrifüj yapılmıştır.

En son olarak üst kısma 70 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ayrı bir toplama kabına alınıp 13000 G' de 1 dk santrifüj yapılmıştır. MultiScanGo cihazı yardımı ile RNA ölçümü gerçekleştirilmiştir. İstedığımız değerler elde edildiğinde DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, ABD) kiti kullanılarak DNA'lar uzaklaştırılmış ve saf RNA elde edilmiştir. iScript cDNAsynthesis kiti (Bio-Rad, ABD) ile de komplementer çift zincir DNA elde edilmiştir. DNase işleminde elde edilen saf RNA karışımından 1 µg alınmıştır. Ardından 1 µl iScript ters transkriptaz eklenmiş, 4 µl 5x iScript reaksiyon karışımı ile birlikte bir tüpe eklenmiş ve nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Sırası ile 5 dakika 25 °C, 20 dakika 46 °C, 1 dakika 95 °C sıcaklık döngüleri uygulanmış olup cDNA elde edilmiştir. cDNA örnekleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için Qiagen Rotor Gene 6000 "Real-Time" PZR cihazı kullanılmıştır. Reaksiyon için, sıcaklığı optimize edilmiş primerler ve iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. cDNA örneklerinden ise 3 biyolojik, 3 teknik olmak üzere 6 tekrar kullanılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdaki Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli bileşenler

Bileşenler	Miktar
SYBR Green Supermix	10 µl
F (ileri primer)	1 µl
R (geri primer)	1 µl
cDNA	2 µl
dH ₂ O	6 µl

Her örnek için 6 tekrar hazırlandıktan sonra her tüp mikro-santrifüjde kısa süreli döndürülerek karışımın tüpün dibine toplanması sağlanmış ve tüpler cihaza dikkatlice yerleştirilmiştir. Ardından primerler için optimizasyon yapılmış, sıcaklık değeri ve döngü için gerekli olan ayarlar yapıldıktan sonra toplam 45 döngü olarak hazırlanan cihaz çalıştırılmıştır.

Tablo 3.2. Cihaz çalışma basamakları

PZR basamakları		Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon		95 °C	5 dk	1
Amplifikasyon	Denatürasyon	95 °C	5sn	1
	Bağlanma ve uzama	60 °C	40sn	5
Erime eğrisi (Melting Curve)		50-95 °C	5sn	1

Çoğalan cDNA'ler, cihazın 530 nm'de verdiği ışımının ölçülmesiyle analiz edilmiştir. Ek olarak erime eğrisi analizi de yapılmıştır. Erime eğrisi analizi için cDNA örnekleri, 95°C'de denatüre edilip 65°C'de bekletilmiştir. Floresan sinyalleri, 530 nm'de 65°C'den 95°C'ye kadar her bir 0,5°C'de her saniyede alınarak toplanmıştır.

Sonuç olarak her gen için örneklerimize ait pikler elde edilmiştir. Pikler göz önüne alınarak Ct (Cycle Threshold) değerleri elde edilmiştir. Gerçek zamanlı PZR analizinde normalizasyon için çeşitli koşullarda ekspresyonunun değişmediği bilinen ya da en az etkilenen bir referans gen kullanılmaktadır. Çalışmada referans gen olarak GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) kullanılmıştır. Çalıştığımız genler ve kullandığımız primerlerimiz Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan primerler

Primer Adı	İleri Primer	Geri Primer
GAPDH	5' AACATGTAAACCATGTAGTTG AGGT-3'	5'- GGAAGGTGAAGGTCGGAG TC-3'
LC3-II	5'- GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG- 3'	5'- GTGTCCGTTACCAACAGG AAG-3'
Beclin-1	5'-GGCTGAGAGACTGGATCAGG- 3'	5'- CTGCGTCTGGGCATAACG- 3'
Bax	5'- CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3'	5'- GGCTGAGAGACTGGATCA GG-3'

Tablo 3.3. Devamı

Bcl2	5'- GGTGGGGTCATGTGTGTGG- 3'	5'- CGGTTTCAGGTAAGTCAGTCATCC- 3'
------	-----------------------------------	--

Bu verilerden yola çıkarak ΔCT ($\Delta CT = CT_{\text{örnek}} - CT_{\text{referans}}$) ve $\Delta\Delta CT$ ($\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{stres}} - \Delta CT_{\text{kontrol}}$) gen ifadesi seviyesindeki farklılık $2^{\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanmış ve ekspresyon profillerine ait grafikler çizilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

4. BULGULAR

Bitki Ekstraktlarının Bileşimi

Daphne pontica için yapılan içerik analizi sonuçlarına göre;

Fenolik Asitler

Bileşik 5- sadece yaprak özlerinde gözlenmiştir ve gallik aside karşılık gelmiştir (tipik 169 → 125 parçalanma). Analiz edilen ekstrakta birkaç gallik asit türevi olduğu görülmüştür. Bileşik 3, m / z 191'de kinik asit sergilemiş ve galloilkinik asit olarak tanımlanmıştır. Bileşik 4, galloilheksoz ile uyumlu olan m/z 169'da gallik asit verecek şekilde 162 Da (heksosid) nötr kaybı geçirmiştir. Bileşik 8, galloil-shikimik aside karşılık gelmiştir. Bileşik 11 ve 15 ayrıca parçalanmalarında gallik asit de sergilenmiş ve türev olarak nitelendirmişlerdir. Bileşik 17, 15 Da'nın nötr kaybını göstermiştir ve metil-gallat olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 7, m/z 153'de daha fazla dekarboksilasyona maruz kalan (44 Da) bir fragman iyonu verecek şekilde 162 Da nötr kaybı geçirmiştir. Bu parçalanma paterni dihidroksi benzoik asit heksosid ile uyum içinde olduğu saptanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 9 ve 18, analitik standartlarla karşılaştırıldığında sırasıyla 5-0 ve 3-0-caffeoilquinic asit olarak tanımlanmıştır. Bileşik 36, bibliyografik bilgilere dayanan 1,5-dikaffeoilkinik asit olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 39, [M-H] 'yi m/z 499'da gösterilmiştir. Koumaroilkinik asitlerin karakteristiği olan m/z 337, 191 ve 163'de fragman iyonları sunmuştur. Bibliyografik veriler göz önüne alındığında, bu bir koumaroil-caffeoilkinik asit olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Flavonoidler

Bileşik 19, flavan-3-ol kateşine karşılık gelmiştir (analitik bir standartla karşılaştırılmıştır). Bileşik 21, ayrıca bir analitik standart kullanılarak apigenin-6,8-diglukozit (vicenin-2) olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Üç mirisetin glikoziti (bileşik 23, 25 ve 30) tanımlanmıştır. 152 Da (galloil), 146 Da (deoksiheksosid) ve 162 Da (heksosid) nötr kayıplarına maruz kalışlardır ve m/z 317'de aglikon verilmiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 24, [M-H] - m/z 581'de, m/z 419'da bir fragman iyonu verecek şekilde 162 Da nötr kaybı yaşamıştır. Bu fragman iyonu, iki sekanslı 15 I (metil grubu) kaybı yaşanmıştır. Dolayısıyla, geçici olarak metillenmiş bir flavonoid-heksosid olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Dört quercetin glikozit tespit edilmiştir; bunların hepsi, nötr galloil, deoksiheksosid, heksosid veya pentosit (132 Da) grubunun kaybindan sonra m/z 301'de aglikonquercetin vermiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 52, likitirigenin olarak tanımlanmıştır. Bileşik 48, m/z 417'de ayrıştırılmış moleküler iyon sergilemiş ve 162 Da'nın nötr kaybindan sonra, m / z 255'te (m/z 153, 135 ve 119'da fragman iyonları) liquiritigenin vermiştir; Bileşik 29, 42 ve 44, MS2'de likitirigenin elde etmek için nötr 294 Da kaybı; m/z 417'deki parça iyonu (132 Da kaybı) bu bileşiklerin liquiritigenin-pentosilheksosid izomerleri olduğunu göstermiştir. Bileşikler 49 ve 56, ilave bir deoksiheksosid kısmı (146 Da) sunarken, bileşik 50, liquiritigenin-pentosilheksositten ziyade ilave bir glukuronid kısmına (176 Da) sahip olduğu görülmüştür. Tüm liquiritigenin türevleri saplarda ve bir tanesi köklerde tespit edilmiştir, ancak hiçbiri yapraklarda gözlenmemiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 40, m/z 267'de aglikon verecek şekilde nötr 294 Da (heksosid + pentosit) kaybına maruz kalmıştır. Aglikon, m/z 252 ve 223'te formononetin'e karşılık gelen fragman iyonları vermiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 47 ve 51, m/z 283'te (m/z 268'de ana fragman iyonu) aglikon sergilemiştir. Aglikonun parçalanma hem akasetin hem de glisidine karşılık geldiği, bu nedenle bu bileşiklerin tam yapısı aydınlatılamamıştır. Bileşik 47, bir türev olarak tanımlanırken, 51, ayrıştırılmış moleküler iyondan 308 Da'nın nötr kaybı nedeniyle bir rutinosit olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Diğer Bileşikler

İki disakarit (bileşik 1 ve 13) karakterize edilmiştir. Her ikisi de [M-H]⁻ m/z 341'de sunmuş ve m/z 179'daki fragman iyonu heksosit kısımlarına karşılık gelmiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

M/z 339'da ayrıştırılmış moleküler iyonu olan Bileşik 12, m/z 177'de esculetin verecek şekilde heksosit parçasının kaybına uğramıştır. Kumarin glikozit eskülin olarak karakterize edilmiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

[M-H]⁻ m/z 577'de Bileşik 16, iki (epi) kateşin birimi tarafından oluşturulan, prosiyanidindimer tip B'nin tipik bir fragmentasyon modelini sergilemiştir. Bu bileşik sadece kök ekstraktlarında tespit edilmiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 33, [M-H]⁻ m/z 519' da, m/z 357'de pinoresinol verecek şekilde bir heksosid kısmı kaybetmiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 34, syringaresinol elde etmek için 162 Da 'nın nötr kaybı yaşadığı, bu yüzden heksositi olarak nitelendirilmiştir (EK 1, EK 2, EK 3).

Bileşik 43, 146 Da'nın nötr kaybı ve m/z 285'teki aglikon nedeniyle (analitik bir standartla kıyaslandığında) kaempferol-O-deoksiheksosid olarak tanımlanmıştır (EK 1, EK 2, EK 3).

Tablo 4.1. *Daphne pontica*'nın analiz edilen ekstraktlarında bulunan bileşiklerin karakterizasyon

No.	t _R (min)	[M-H] ⁻ m/z	m/z (% basepeak)	Kimlik	Gövde	Yaprak	Kök	Kaynak
1	1.7	341	MS ² [341]: 179 (100) MS ³ [341→179]: 143 (52), 131 (23), 113 (100)	Disaccharide	✓	✓	✓	
2	2.7	389	MS ² [389]: 227 (89), 191 (100) MS ³ [389→191]: 147 (100)	Unknown			✓	
3	2.8	343	MS ² [343]: 191 (100), 169 (9) MS ³ [343→191]: 127 (100)	Galloylquinicacid	✓	✓	✓	
4	2.9	331	MS ² [331]: 313 (100), 271 (21), 169 (45), 125 (11)	Galloylhexose	✓			
5	3.3	169	MS ² [169]: 125 (100)	Gallicacid*		✓		
6	3.6	403	MS ² [403]: 241 (100) MS ³ [403→241]: 127 (100)	Unknown	✓		✓	
7	3.7	315	MS ² [315]: 153 (100) MS ³ [315→153]: 109 (100)	Dihydroxybenzoicacidhexoside		✓		

Tablo 4.1. Devamı

8	4.3	325	MS ² [325]: 169(100), 125 (7)	Galloyl-shikimicacid	✓	✓		
9	4.4	353	MS ² [353]: 191 (100), 135 (3)	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*	✓			
10	5.2	405	MS ² [405]: 243 (100) MS ³ [405→243]: 225 (24), 123 (32), 101 (100)	Unknown			✓	
11	5.9	357	MS ² [357]: 169 (100), 125 (11)	Gallicacidderivative		✓		
12	6.7	339	MS ² [339]: 177 (100), 133 (1)	Esculin	✓	✓	✓	Fraxinus
13	6.7	387	MS ² [387]: 341 (100), 179 (84) MS ³ [387→341]: 179 (100), 161 (12)	Disaccharide (formate)	✓			
14	7.6	515	MS ² [515]: 469 (93), 161 (100)	Unknown		✓		
15	8.0	423	MS ² [423]: 313 (100), 169 (49) MS ³ [423→313]: 169 (100), 125 (10)	Gallicacidderivative		✓		
16	8.0	577	MS ² [577]: 451 (15), 425 (100), 407 (60), 289 (15), 287 (11)	Procyanidin B			✓	

Tablo 4.1. Devamı

17	8.6	183	MS ² [183]: 168 (100), 124 (83)	Methyl-gallate		✓		[4]
18	8.9	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (3), 135 (2)	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*	✓	✓		
19	8.9	289	MS ² [289]: 245 (100), 205 (36), 203 (19)	Catechin*		✓	✓	
20	11.6	633	MS ² [633]: 301 (100)	Unknown		✓		
21	12.6	593	MS ² [593]: 503 (37), 473 (100), 383 (25), 353 (38)	Vicenin-2*	✓	✓		
22	13.4	477	MS ² [477]: 307 (21), 289 (100), 263 (48) MS ³ [477→289]: 151 (12), 137 (100)	Unknown		✓		
23	14.7	631	MS ² [631]: 479 (100) MS ³ [631→479]: 317 (100) MS ⁴ [631→479→317]: 271 (100), 179 (63), 151 (15)	Myricetin-galloylhexoside		✓		

Tablo 4.1. Devamı

24	15.9	581	MS ² [581]: 419 (100) MS ³ [581→419]: 404 (100), 389 (17), 373 (36) MS ⁴ [581→419→404]: 389 (71), 373 (100), 359 (36)	Methylatedflavonoid- <i>O</i> -hexoside	✓		✓	
25	16.5	479	MS ² [479]: 317 (100), 316 (95) MS ³ [479→317]: 271 (91), 179 (100), 151 (42)	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	✓	✓		
26	16.5	523	MS ² [523]: 361 (100), 359 (15), 329 (33)	Unknown	✓			
27	18.2	615	MS ² [615]: 463 (100) MS ³ [615→463]: 301 (100) MS ⁴ [615→463→301]: 271 (33), 179 (100), 151 (70)	Quercetin-galloylhexoside		✓		

Tablo 4.1. Devamı

28	18.7	565	MS ² [565]: 550 (100), 419 (60), 405 (21), 233 (42) MS ³ [565→550]: 519 (25), 405 (100), 371 (31)	Unknown	✓		✓	
29	19.2	549	MS ² [549]: 429 (43), 417 (4), 255 (100) MS ³ [549→255]: 153 (24), 135 (100), 119 (24) MS ⁴ [549→255→135]: 153 (100)	Liquiritigenin- <i>O</i> -pentosylhexoside	✓			
30	19.7	463	MS ² [463]: 317 (100), 271 (6), 179 (13), 151 (4)	Myricetin- <i>O</i> -deoxyhexoside	✓	✓	✓	
31	20.3	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 179 (100), 151 (50)	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	✓	✓		
32	20.3	467	MS ² [467]: 321 (200) MS ³ [467→321]: 277 (100), 233 (36)	Unknown	✓	✓		

Tablo 4.1. Devamı

33	21.6	519	MS ² [519]: 357 (100) MS ³ [519→357]: 342 (1), 327 (5), 151 (100), 136 (33) MS ⁴ [519→357→151]: 136 (100)	Pinoresinol- <i>O</i> -hexoside	✓	✓	✓	[8]
34	22.5	579	MS ² [579]: 417 (100) MS ³ [579→417]: 402 (20), 181 (100), 166 (47), 151 (12)	Syringaresinol- <i>O</i> -hexoside	✓	✓	✓	Fraxinus
35	23.0	433	MS ² [433]: 301 (100) MS ³ [433→301]: 179 (100), 151 (95)	Quercetin- <i>O</i> -pentoside		✓		
36	24.2	515	MS ² [515]: 353 (100), 191 (26) MS ³ [515→353]: 191 (100), 179 (11), 135 (3)	1,5-dicaffeoylquinic acid	✓		✓	
37	24.4	447	MS ² [447]: 301 (100) MS ³ [447→301]: 271 (31), 179 (100), 151 (67)	Quercetin- <i>O</i> -deoxyhexoside		✓		

Tablo 4.1. Devamı

38	26.2	565	MS ² [565]: 401 (100) MS ³ [565→401]: 386 (69), 371 (100), 356 (49), 235 (47)	Unknown	✓		✓	
39	26.2	499	MS ² [499]: 337 (100) MS ³ [499→337]: 337 (100), 265 (22), 191 (22) MS ⁴ [499→337→191]: 163 (100)	Coumaroyl-caffeoylquinicacid			✓	
40	26.6	561	MS ² [561]: 267 (100) MS ³ [561→267]: 253 (24), 252 (100) MS ⁴ [561→267→252]: 223 (100)	Formononetinhexoside-pentoside	✓			
41	27.3	533	MS ² [533]: 371 (100) MS ³ [533→371]: 353 (48), 327 (100), 312 (86)	Unknown	✓	✓		

Tablo 4.1. Devamı

42	27.9	549	MS ² [549]: 417 (10), 255 (100) MS ³ [549→255]: 153 (3), 135 (100), 119 (13)	Liquiritigenin-pentosylhexoside	✓		✓	[10]
43	28.6	431	MS ² [431]: 285 (100) MS ³ [431→285]: 255 (100)	Kaempferol- <i>O</i> -deoxyhexoside		✓		
44	28.9	549	MS ² [549]: 429 (29), 417 (6), 255 (100) MS ³ [549→255]: 135 (100), 119 (13)	Liquiritigenin-pentosylhexoside	✓			[10]
45	29.2	559	MS ² [559]: 351 (100) MS ³ [559→351]: 336 (100) MS ⁴ [559→351→336]: 191 (100), 163 (66)	Unknown	✓	✓		
46	29.5	541	MS ² [541]: 447 (100), 455 (19), 151 (19) MS ³ [541→447]: 447 (100), 355 (10), 340 (31), 311 (30), 205 (15)	Unknown			✓	

Tablo 4.1. Devamı

47	29.8	783	MS ² [783]: 737 (100) MS ³ [783→737]: 283 (100), 268 (49)	Acacetinorglyciteinderivative	✓				
48	30.2	417	MS ² [417]: 255 (100) MS ³ [417→255]: 153 (6), 135 (100), 119 (4)	(iso)liquiritin	✓				
49	31.6	695	MS ² [695]: 549 (100), 531 (64), 255 (33) MS ³ [695→549]: 417 (9), 255 (100) MS ⁴ [695→549→255]: 135 (100)	Liquiritigenin-deoxyhexoside-pentoxyhexoside	✓				
50	31.6	725	MS ² [725]: 549 (100), 531 (79), 255 (69) MS ³ [725→549]: 417 (24), 271 (20), 255 (100) MS ⁴ [725→549→255]: 135 (100)	Liquiritigenin-glucuronide-pentoxyhexoside	✓				

Tablo 4.1. Devamı

51	32.9	637	MS ² [637]: 591 (100), 283 (82) MS ³ [637→591]: 283 (100), 268 (10)	Acacetinorglyciteinrutinoside (formateadduct)	✓	✓	✓	
52	32.9	255	MS ² [255]: 135 (100)	Liquiritigenin	✓			
53	33.7	643	MS ² [643]: 437 (23), 481 (100) MS ³ [643→481]: 437 (100), 393 (14), 161 (38)	Unknown			✓	
54	35.5	657	MS ² [657]: 351 (100) MS ³ [657→351]: 336 (100) MS ⁴ [657→351→336]: 191 (100), 163 (66)	Unknown	✓	✓	✓	
55	37.8	557	MS ² [557]: 421 (100), 323 (25) MS ³ [557→421]: 255 (100) MS ⁴ [557→421→255]: 227 (85)	Unknown	✓		✓	

Tablo 4.1. Devamı

56	37.8	695	<p>MS² [695]: 549 (100), 531 (76), 255 (61) MS³ [695→549]: 429 (13), 417 (14), 255 (100) MS⁴ [695→549→255]: 135 (100)</p>	Liquiritigenin-deoxyhexoside-pentoxylhexoside	✓			
----	------	-----	--	---	---	--	--	--

Daphne gnidioides için yapılan içerik analizi sonucuna göre;

Kumarinler

Daphne türlerinde kumarinlerin varlığı olan gnidioidlar (Ulubelen ve diğerleri, 1986), daha önce bildirilmiştir. Analiz edilen ekstraktlarda, yedi esculetin türevi tespit edilmiştir [m/z 177 ve 133'te tipik fragmanlar (Zhou vd., 2008)]. Bileşik 2, 9 ve 14, m/z 177'de esculetin verecek şekilde bir heksosid kısmının (162 Da) nötr kaybına uğradığı; dolayısıyla, esculetin-heksosid izomerleri olarak tanımlanmışlardır. Bileşik 5, geçici olarak esculetin-heksosidin bir türevi olarak karakterize edilmiştir. Bileşik 4 ve 10, esculetin-rutinosideizomere karşılık gelen 308 Da kayıp göstermiştir. Son olarak, bileşik 34 nötr glukuronid (176 Da) ve heksosid kısımları kaybetmiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

Fenolik Asitler

Analiz edilen ekstraktlarda üç gallik asit türevi tespit edilmiştir. [MH] - m/z 343'te Bileşik 3, m/z 191'de kuinik asit (m/z 173, 127 ve 109'da parça iyonları, kuinikte tipik olan iyonik iyonlar) vererek, 152'lik (galloil kısım) nötr kaybı yaşamıştır. Bileşik 6 ve 8, gallik asidin karakteristiği olan m/z 169 ve 125'de MS2 fragmanları sergilemiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

[MH] ile Bileşik 11 - m/z 417'de ve m / z 209 ve 194'teki fragman iyonları, daha önce *Daphne* türlerinde en iyi şekilde rapor edilmemiş olan salvianolik asit D (Wang vd., 2012) olarak tanımlanmıştır (EK 4, EK 5, EK 6).

M/z 353'te parçalanmış bir moleküler iyon ve m/z 191'de baz tepe noktası olan bileşik 12, geçici olarak bir caffeoilkinik asit olarak tanımlanmıştır. Bileşik 18, dikaffeoilkinik asitlerin tipik olduğu bir 515 → 353 fragmentasyonu sergilemiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 13, [M-H] - m/z 457'de, m/z 163'de (m / z 119'da ana fragman iyonu) sumumik asit verecek şekilde 132 Da (pentosit) ve 162 Da (heksosid) kayıpları yaşanmıştır. Dolayısıyla, kumarik asit-pentosilheksosid olarak nitelendirilmiştir. Bileşik 38, ayrıca, kaynakçaya göre bir kumarik asit türevi (3-0-p-koumaroil, 5-0-caffeoilkinik asit) olarak tanımlanmıştır (Clifford vd., 2006). Bileşik 43, bileşik 38'e benzer şekilde, m/z 499 ve 337'de fragman iyonları sergilediği, bu yüzden onu geçici olarak bir koumaroil-caffeoilkinik asit türevi olarak nitelendirilmiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

Flavonoidler

Apigenin ve quercetin flavonoidleri daha önce başka Daphne türlerinde rapor edilmiştir (Ulubelen vd., 1986), fakat burada tanımlanan diğer flavonoidler hakkında bilgi mevcut değildir (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 54, analitik bir standartla karşılaştırılarak apigenin olarak tanımlanmıştır. Bileşik 16, vinenin-2'ye karşılık gelmiştir (apigenin-6,8-diglucoside). Bileşik 26, [M-H-18]- fragman iyonu (6-C izomerinde mevcut) tespit edilemediğinden, apigenin-8-C-heksosid olarak tanımlanmıştır (Ferrer vd., 2003). Bileşik 19, önemli [M-H-18]- ve [M-H-60]- fragman iyonlarını sunmuş, bu yüzden apigenin-6-C-pentosid-8-C-heksosid olarak tanımlanmıştır (Ferrer vd., 2003). Son olarak, bileşik 25, tipik olarak apigenin olan 269 → 225 parçalanma nedeniyle bir apigenin türevi olarak nitelendirilmiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 22 ve 24, [M-H]- m/z 521'de, geçici olarak 162 Da (heksosid) ve 15 Da'nın (metil grupları) nötr kayıpları nedeniyle metillenmiş flavonoidler olarak tanımlanmıştır (EK 4, EK 5, EK 6).

[MH]- m/z 463'te Bileşik 27, m / z 317'de (m/z 271, 179 ve 151'deki karakteristik fragman iyonları) m/z 317'de mirisetin-O-deoxyhexoside nötr kaybedilmiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşikler 28 ve 36, sırasıyla kersetin-O-heksosid ve kersetin-O-deoksiheksosid olarak tanımlanmıştır. Her iki durumda da aglikonquereketin, m/z 301'de gözlenmiş ve m/z

179 ve 151'de fragman iyonları göstermiştir (analitik standart ile karşılaştırıldığında) (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 29 ve 37, m/z 285'teki aglikoneluteolinden dolayı luteolin-O-heksosid izomerleri olarak tanımlanmıştır, m/z 243'te karakteristik fragman iyonunu sergilemiştir (analitik bir standart ile karşılaştırıldı). Benzer şekilde, bileşikler 35 ve 48, m/z 285'teki aglikon ve m/z 255 ve 151'teki fragman iyonları nedeniyle sırasıyla kaempferol-O-heksosid ve kaempferol-O-rutinosid olarak tanımlanmıştır (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 45, m/z 591'de akasetin-O-rutinoside ayrıştırılmış moleküler iyon sergilediği görülmüştür (EK 4, EK 5, EK 6).

Diğer Bileşikler

Analiz edilen tüm ekstrelerde bulunan Bileşik 1, disakkaritlerin karakteristik bir fragmentasyon modelini sergilemiştir (Verardo vd., 2009). Bileşik 51 tam olarak karakterize edilememiştir, fakat aynı zamanda bir heksosid parçasına özgü olan bir MS3 [581 → 179] fragmentasyon modeli sergilemiştir (EK 4, EK 5, EK 6).

İncelenen ekstraktlarda, lariciresinol, pinoresinol ve syringaresinolliganlarının daha önce *Daphne* türlerinde rapor edildiği bibliyografik verilere göre farklı liganlar tanımlanmıştır (Su vd., 2008). Lignanpinoresinolün iki glikozidi, *Daphne gnidioides*'lerin analiz edilen tüm kısımlarında (bileşik 17 ve 30) tespit edilmiştir. Bunlar, m/z 357'de (m/z de fragman iyonları) pinoresinol verecek şekilde nötr heksosid kısımlarının (162 Da) kaybı ile karakterize edilmiştir (Ye vd., 2005). Bileşik 21 ve 33, m/z 549'da [MH] sergilemiştir ve 162 Da kaybindan sonra, m/z 417'de (m/z 181, 166 ve 151'deki fragman iyonları) (Steingass vd., 2015). Bileşik 40, bibliyografik verilerle karşılaştırılarak lariciresinol olarak tanımlanmıştır (Eklund vd., 2007). Bileşik 44, nortrachelogenin'e benzer bir fragmentasyonpaterni sunmuştur (Eklund vd., 2007). Bu nedenle, sadece bir lignan olarak nitelendirilmiştir. Aynı şekilde, 53 bileşiğininin lignan olduğu düşünülmüştür (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 23, bibliyografik bilgi ile karşılaştırılarak, geçici olarak 3 - demethoksi α 9 α - hidroksilpiperitol - O - diglukozit olarak tanımlanmıştır (Ye vd., 2005) (EK 4, EK 5, EK 6).

Bileşik 52, göre vano-dihidroksi-oktadekenoik asit olarak tanımlanmıştır (Van Hoyweghen vd., 2014) (EK 4, EK 5, EK 6).

Tablo 4.2. *Daphne gnidioides*' in analiz edilen ekstraktlarında bulunan bileşiklerin karakterizasyonu

No.	t _R (min)	[M-H] ⁻ m/z	m/z (% basepeak)	Kimlik	Gövde	Yaprak	Kök
1	1.7	341	MS ² [341]: 179 (100), 161 (40), 149 (34), 119 (10), 113 (80), 101 (12)	Disaccharide	✓	✓	✓
2	2.1	339	MS ² [339]: 177 (100), 133 (1)	Esculetin hexoside	✓	✓	✓
3	2.9	343	MS ² [343]: 191 (100) MS ³ [343→191]: 127 (100), 173 (50) MS ⁴ [343→191→127]: 109 (100)	Galloylquinicacid		✓	
4	3.3	485	MS ² [485]: 177 (100), 133 (1)	Esculetinrutinoside	✓		
5	4.3	419	MS ² [419]: 339 (58), 241 (26), 177 (100) MS ³ [419→177]: 133 (100)	Esculetinhexosidederivative	✓		
6	4.4	325	MS ² [325]: 169 (100), 125 (12)	Gallicacidderivative		✓	

Tablo 4.2. Devamı

7	5.9	579	MS ² [579]: 533 (53), 323 (100) MS ³ [579→323]: 263 (30), 221 (61), 179 (100), 161 (32) MS ⁴ [579→323→179]: 161 (100), 143 (73), 131 (15), 119 (10), 113 (13), 101 (62)	Unknown		✓	✓
8	5.9	357	MS ² [357]: 169 (100), 125 (16)	Gallicacidderivative		✓	
9	7.0	339	MS ² [339]: 177 (100) MS ³ [339→177]: 133 (100)	Esculetinhexoside	✓	✓	✓
10	7.8	485	MS ² [485]: 177 (100), 133 (2)	Esculetinrutinoside	✓	✓	
11	7.9	417	MS ² [417]: 209 (100) MS ³ [417→209]: 194 (100)	Salvianolicacid D		✓	✓
12	8.6	353	MS ² [353]: 191 (100)	Caffeoylquinicacid	✓	✓	✓
13	9.3	457	MS ² [457]: 325 (6), 163 (100) MS ³ [457→163]: 119 (100)	Coumaricacid-pentosylhexoside	✓		

Tablo 4.2. Devamı

14	9.6	339	MS ² [339]: 177 (100), 133 (1)	Esculetinhexoside	✓	✓	✓
15	11.7	521	MS ² [521]: 359 (100) MS ³ [521→359]: 344 (100), 313 (20)	Unknown		✓	✓
16	12.5	593	MS ² [593]: 503 (44), 473 (100), 383 (30), 353 (62)	Vicenin-2*	✓	✓	✓
17	13.5	681	MS ² [681]: 519 (100), 357 (18) MS ³ [681→519]: 357 (100) MS ⁴ [681→519→357]: 151 (100), 136 (16)	Pinoresinoldihexoside	✓	✓	✓
18	14.6	515	MS ² [515]: 353 (100)	Dicaffeoylquinicacid	✓		
19	14.6	563	MS ² [563]: 545 (31), 503 (70), 473 (100), 443 (89), 383 (43), 353 (83)	Apigenin-6-C-pentoside-8-C-hexoside	✓		
20	15.3	611	MS ² [611]: 431 (100), 251 (52) MS ³ [611→431]: 251 (100)	Unknown	✓		

Tablo 4.2. Devamı

21	15.6	579	MS ² [579]: 417 (100) MS ³ [579→417]: 402 (10), 387 (4), 181 (100), 166 (33), 151 (8)	Syringaresinol- <i>O</i> -hexoside	✓	✓	✓
22	16.7	521	MS ² [521]: 359 (100), 329 (90) MS ³ [521→359]: 344 (13), 329 (100)	Methylatedflavonoid		✓	✓
23	17.6	665	MS ² [665]: 503 (100) MS ³ [665→503]: 341 (16), 323 (100)	3-Demethoxy-9 α -hydroxylpiperitol- <i>O</i> -diglucoside	✓		
24	18.4	521	MS ² [521]: 359 (100), 329 (61) MS ³ [521→359]: 344 (22), 329 (100)	Methylatedflavonoid		✓	✓
25	18.8	449	MS ² [449]: 269 (100) MS ³ [449→269]: 225 (100)	Apigeninderivative	✓	✓	
26	19.7	431	MS ² [431]: 341 (19), 311 (100) MS ³ [431→311]: 285 (44), 283 (95)	Apigenin-8- <i>C</i> -hexoside	✓		

Tablo 4.2. Devamı

27	19.7	463	MS ² [463]: 317 (100) MS ³ [463→317]: 271 (100), 179 (71), 151 (44)	Myricetin- <i>O</i> -deoxyhexoside		✓	
28	20.9	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 271 (52), 179 (100), 151 (83)	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	✓	✓	
29	20.9	447	MS ² [447]: 285 (100) MS ³ [447→285]: 243 (82), 241 (100)	Luteolin- <i>O</i> -hexoside			✓
30	21.7	519	MS ² [519]: 357 (100) MS ³ [519→357]: 151 (100), 136 (21)	Pinoresinol- <i>O</i> -hexoside	✓	✓	✓
31	22.1	453	MS ² [453]: 241 (100)	Unknown	✓		
32	22.5	434	MS ² [434]: 308 (12), 151 (100)	Unknown	✓		
33	22.5	579	MS ² [579]: 417 (100) MS ³ [579→417]: 181 (100), 166 (32), 151 (23)	Syringaresinolhexoside		✓	✓

Tablo 4.2. Devamı

34	23.4	515	MS ² [515]: 353 (45), 339 (100), 177 (86) MS ³ [515→339]: 177 (100), 133 (5)	Esculetin-glucuronide-hexoside	✓	✓	✓
35	24.3	447	MS ² [447]: 285 (100) MS ³ [447→285]: 255 (100), 241 (11), 227 (30)	Kaempferol- <i>O</i> -hexoside	✓		✓
36	24.4	447	MS ² [447]: 301 (100) MS ³ [447→301]: 179 (100), 151 (56)	Quercetin- <i>O</i> -deoxyhexoside		✓	
37	24.9	447	MS ² [447]: 285 (100) MS ³ [447→285]: 243 (100)	Luteolin- <i>O</i> -hexoside	✓		✓
38	26.1	499	MS ² [499]: 337 (100) MS ³ [499→337]: 337 (100), 163 (23)	3- <i>O</i> - <i>p</i> -coumaroyl, 5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	✓	✓	✓
39	27.4	533	MS ² [533]: 371 (100) MS ³ [533→371]: 353 (66), 327 (100), 312 (15)	Unknown	✓		

Tablo 4.2. Devamı

40	27.7	359	MS ² [359]: 329 (100) MS ³ [359→329]: 299 (37), 284 (11), 292 (30), 178 (100), 160 (27) MS ⁴ [359→329→178]: 160 (100)	Lariciresinol		✓	✓
41	29.3	559	MS ² [559]: 351 (100) MS ³ [559→351]: 336 (100) MS ⁴ [559→351→336]: 191 (100), 163 (61)	Unknown	✓		✓
42	29.5	541	MS ² [541]: 497 (29), 447 (100) MS ³ [541→447]: 447 (100), 340 (16), 311 (15), 298 (26)	Unknown		✓	✓
43	31.6	643	MS ² [643]: 541 (18), 499 (100), 337 (40)	Coumaroyl-caffeoylquinicacidderivative			✓

Tablo 4.2. Devamı

44	32.2	373	MS ² [373]: 355 (100), 327 (47), 249 (27), 235 (21), 223 (85) MS ³ [373→355]: 340 (84), 311 (100) MS ⁴ [373→355→311]: 296 (100), 281 (16), 269 (24), 173 (20), 160 (10)	Lignan		✓	✓
45	33.0	591	MS ² [591]: 283 (100) MS ³ [591→283]: 268 (100)	Acacetin- <i>O</i> -rutinoside		✓	
46	33.6	643	MS ² [643]: 481 (100), 437 (20) MS ³ [643→481]: 437 (100), 393 (9), 161 (48)	Unknown	✓	✓	✓
47	35.6	657	MS ² [657]: 351 (100) MS ³ [657→351]: 336 (100) MS ⁴ [657→351→336]: 191 (100), 163 (72)	Unknown	✓	✓	✓

Tablo 4.2. Devamı

48	36.9	593	MS ² [593]: 285 (100) MS ³ [593→285]: 151 (100)	Kaempferol- <i>O</i> -rutinoside	✓		✓
49	37.3	541	MS ² [541]: 497 (26), 455 (22), 447 (100) MS ³ [541→447]: 340 (51), 311 (100)	Unknown		✓	✓
50	38.2	571	MS ² [571]: 539 (100) MS ³ [571→539]: 432 (100), 389 (25) MS ⁴ [571→539→432]: 338 (100)	Unknown		✓	✓
51	38.6	581	MS ² [581]: 535 (58), 475 (43), 179 (100) MS ³ [581→179]: 161 (45), 143 (100), 131 (44), 119 (71)	Hexosederivative	✓		
52	39.2	327	MS ² [327]: 229 (100), 211 (68), 209 (32), 171 (64)	Oxo-dihydroxy-octadecenoicacid	✓		✓

Tablo 4.2. Devamı

53	39.3	357	MS ² [357]: 313 (35), 298 (26), 209 (49), 147 (100)	Lignan		✓	✓
54	39.9	269	MS ² [269]: 225 (100), 151 (32)	Apigenin*	✓		
55	39.9	525	MS ² [525]: 431 (100), 151 (23) MS ³ [525→431]: 325 (13), 311 (100)	Unknown		✓	✓

Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite deneyleri için Disk difüzyon ve MIC (Minimal İnhibitör Konsantrasyon) seçilmiştir. Kalitatif (Disk Difüzyon) olarak ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi saptanmış ve daha sonra kantitatif (MIC) olarak bitki ekstraktlarının kaç mg veya µg düzeyinde etki ettiği tespitinin yapılmıştır.

İlk önce, Daphne cinsine ait sırimbağı bitkisinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Tablo 6'da yer alan bakterilerle yapılan MIC ve Disk Dufüzyon testleri ile elde edilen sonuçlara göre ;

Tablo 4.3. Kullanılan Bakteriler

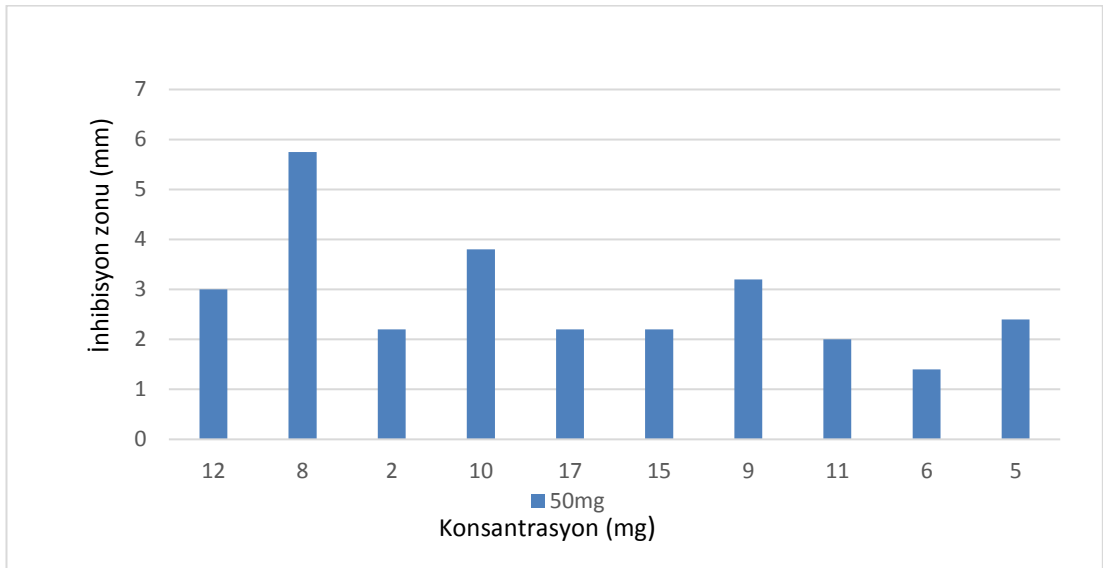
Bakteri	Gram
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	(-)
<i>Salmonella kentucky</i> (15)	(-)
<i>Enterococcus durans</i> (14)	(+)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	(-)
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	(+)
<i>Alfa streptococcus haemolyticus</i> (9)	(+)
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	(+)
<i>Serratia marrescens</i> (6)	(-)

Tablo 4.3. Devamı

<i>Esherichia coli</i> (5)	(-)
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	(-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	(+)

Disk difüzyon testinde sırimbağı bitkisinin yaprak ekstraktının 50 mg'ı için *Staphylococcus epidermis*'de 5,75 mm inhibisyon zonu gözlenirken, *Enterococcus faecium*'de ise 3,8 mm inhibisyon zonunun oluştuğu görülmüştür. Buna göre sırimbağı bitkisi yaprak ekstraktının Gram (+) bakteriler üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *Daphne pontica* Yaprak Ekstraktı İnhibisyon zonu





Şekil 4.1. *Daphne pontica* Yaprak Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizi Disk Döfüzyon Deneyi Sonucu



Şekil 4.2. *Daphne pontica* Yaprak Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizi Disk Döfüzyon Deneyi Sonucu

İncelenen bakterinin %99,9' unu öldüren ekstraktın en düşük konsantrasyonu (mg/L veya $\mu\text{g/ml}$) MBC olarak adlandırılmıştır. MIC değeri ise ekstraktın bakterinin üremesine mani olan en düşük yoğunluğuna denilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda ve daha hassas veriler elde edebilmek amacıyla antimikrobiyal analizlerin ikinci kısmı olan MIC testi sonucumuz ise;

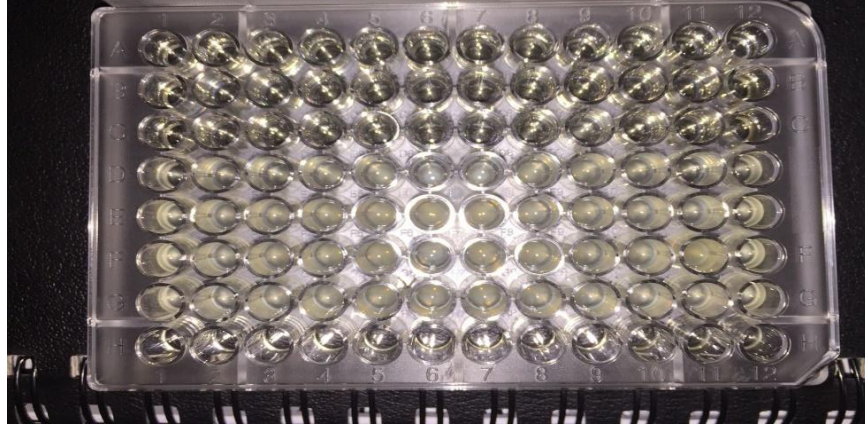
Tablo 4.5. *Daphne pontica* Yaprak Eksrakıtı MIC Sonucu

Mikroorganizma	Methanol ekstrakt MBC	Methanol ekstrakt MIC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	250	125

Tablo 4.5. Devamı

<i>Salmonella kentucky</i> (15)	250	125
<i>Enterococcus durans</i> (14)	250	125
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	250	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	250	125
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	250	125
<i>Alfa streptococcus haemolyticus</i> (9)	250	125
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	250	125
<i>Serratia marrescens</i> (6)	250	125
<i>Esherichia coli</i> (5)	250	125
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	250	125
MBC: minimum bakterisidal konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$); MIC: minimum inhibitör konsantrasyon($\mu\text{g/ml}$)		

Sırımbağı bitkisinin yaprak ekstraktı seçtiğimiz 6 Gram (+) 6 Gram (-) test mikroorganizmalarının hepsine düşük konsantrasyonda da (125 $\mu\text{g/ml}$) etki ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.3) (Tablo 4.5).

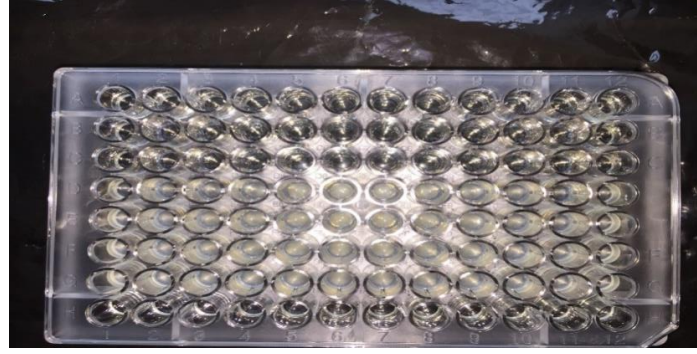


Şekil 4.3. *Daphne pontica* Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Yaprak)

Sırımbağı bitkisinin gövde ekstraktı seçtiğimiz 6 Gram (+) 6 Gram (-) test mikroorganizmalarımızın hepsine düşük konsantrasyonda da (125 µg/ml) etki ettiği gözlenmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *Daphne pontica* Gövde Ekstraktının MIC Sonucu

Mikroorganizma	Methanol ekstrakt MBC	Methanol ekstrakt MIC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	250	125
<i>Salmonella kentucky</i> (15)	250	125
<i>Enterococcus durans</i> (14)	250	125
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	250	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	250	125
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	250	125
<i>Alfa streptococcus haemolyticus</i> (9)	250	125
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	250	125
<i>Serratia marrescens</i> (6)	250	125
<i>Esherichia coli</i> (5)	250	125
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	250	125
MBC: minimum bakterisidal konsantrasyon (µg/ml); MIC: minimum inhibitör konsantrasyon(µg/ml)		

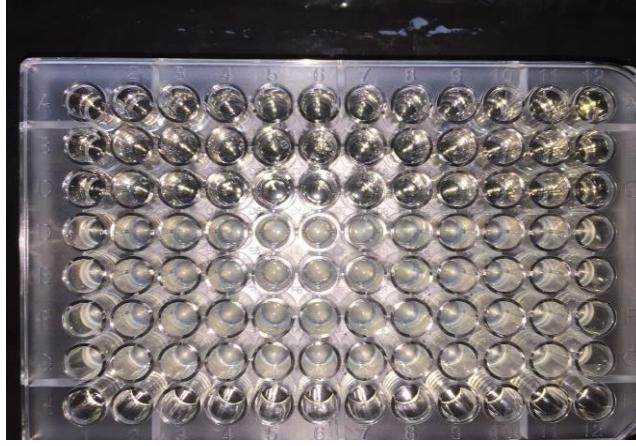


Şekil 4.4. *Daphne pontica* Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Gövde)

Tablo 4.7. *Daphne pontica* Kök Ekstraktının MIC Sonucu

Mikroorganizma	Methanol ekstrakt MBC	Methanol ekstrakt MIC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	250	125
<i>Salmonella kentucky</i> (15)	500	250
<i>Enterococcus durans</i> (14)	500	250
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	500	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	500	250
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	500	250
<i>Alfa streptococcus</i> <i>haemolyticus</i> (9)	500	250
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	500	250
<i>Serratia marrescens</i> (6)	500	250
<i>Esherichia coli</i> (5)	500	250
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	250	125
MBC: minimum bakterisidal konsantrasyon (µg/ml); MIC: minimum inhibitör konsantrasyon(µg/ml)		

Sırımbağı bitkisinin kök ekstraktı, seçilen 6 Gram (+) 6 Gram (-) test mikroorganizmalarından *Proteus vulgaris* (-), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (+) ve *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 (-) de düşük konsantrasyonda da (125 µg/ml) etki ettiği gözlenmiştir (Tablo 4.7).



Şekil 4.5. *Daphne pontica* Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test-Kök)

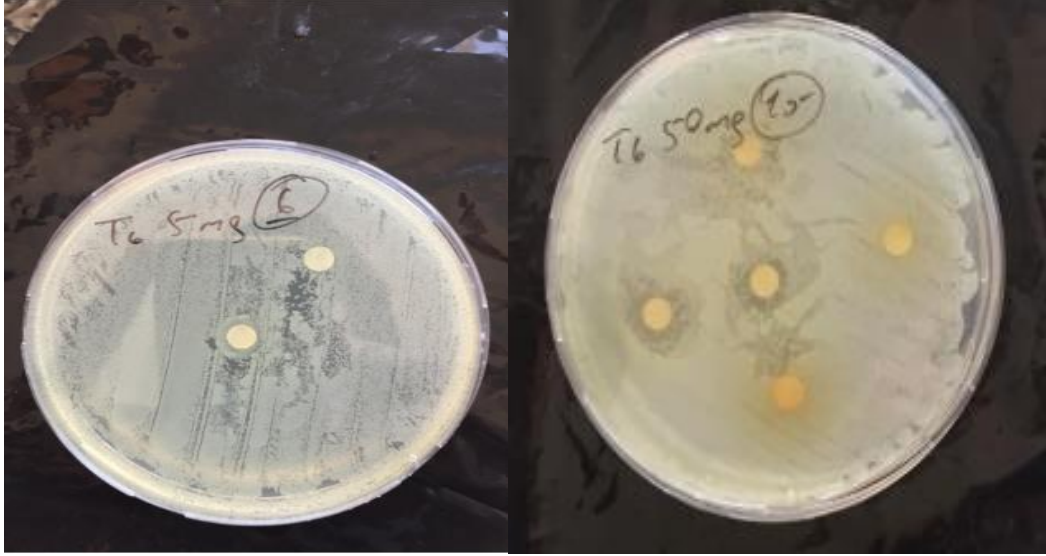
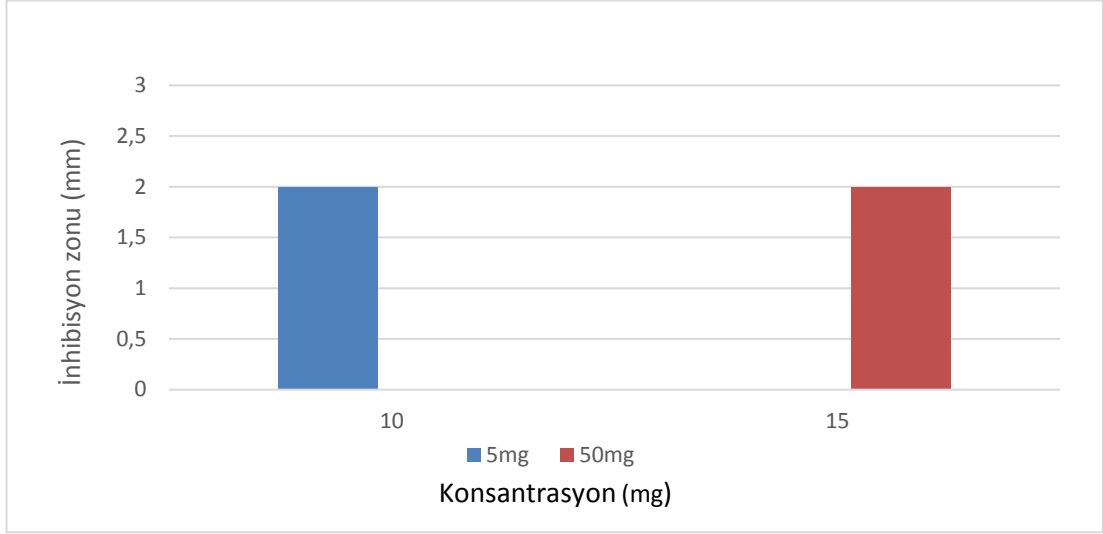
Sonuç olarak yapılan antimikrobiyal testler ile sırimbağı bitkisine ait yaprak ve gövde örneklerinin metanol ekstraktları, düşük konsantrasyonlarda (125 µg/ml) incelenen tüm test bakterilerinde etkili olmuştur.

Bununla birlikte, 125 ug/ml'lik kök ekstraktı konsantrasyonu, sadece *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ve *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 türlerini inhibe etmiştir.

Daha sonra *Daphne* cinsine ait sıyircık (*Daphne gnidioides*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Tablo 4.3 de yer alan bakterilerle yapılan MIC ve Disk Döfüzyon testleri ile elde edilen sonuçlara göre ;

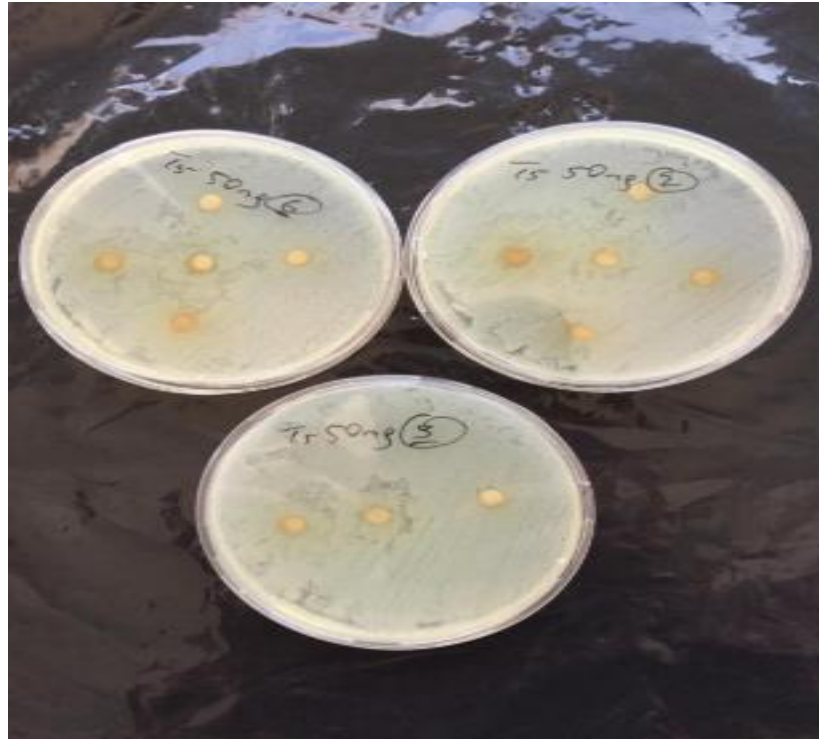
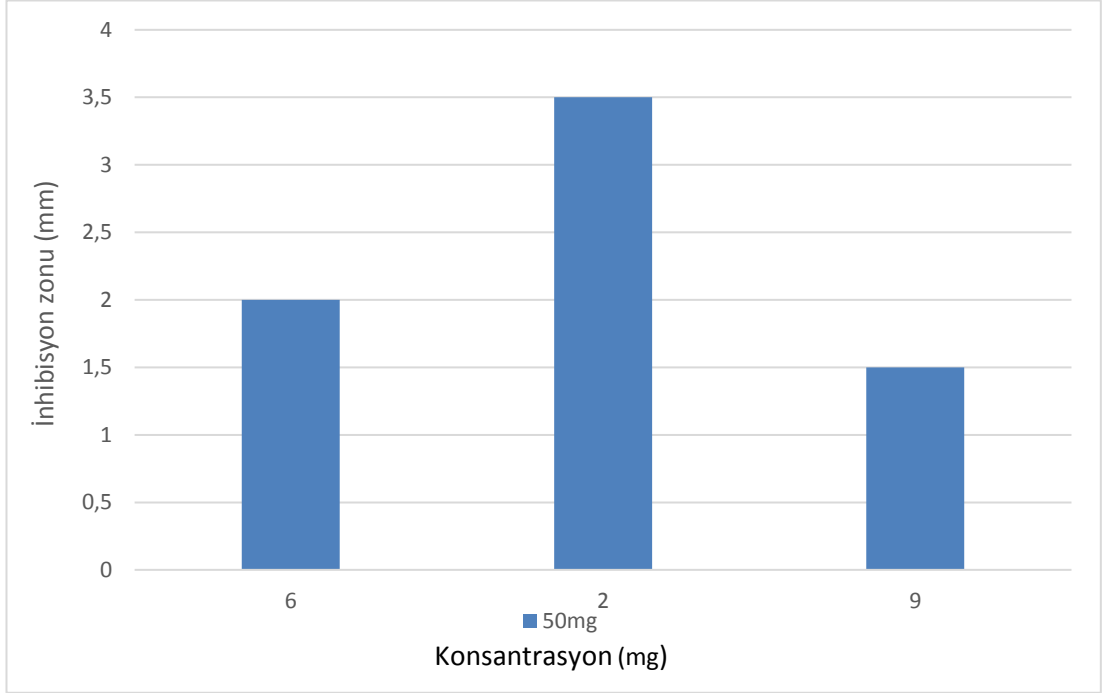
Disk Döfüzyon testinde sıyircık bitkisinin kök ekstraktının 50 mg'ı için *Staphylococcus aureus*'da (ATCC 25923) 3,5 mm inhibisyon zonu gözlenirken, gövde özütünün 50 mg'ı için *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ve *Salmonella kentucky*'de ise sırasıyla 3 mm, 3 mm ve 6 mm inhibisyon zonunun oluştuğu görölmüştür. Buna göre sıyircık bitki özütlerinin Gram (-) bakteriler üzerinde daha etkili olduğu söylenebilir.

Tablo 4.8. *Daphne gnidioides* Bitkisi Yaprak Eksraktının İnhibisyon Zonu



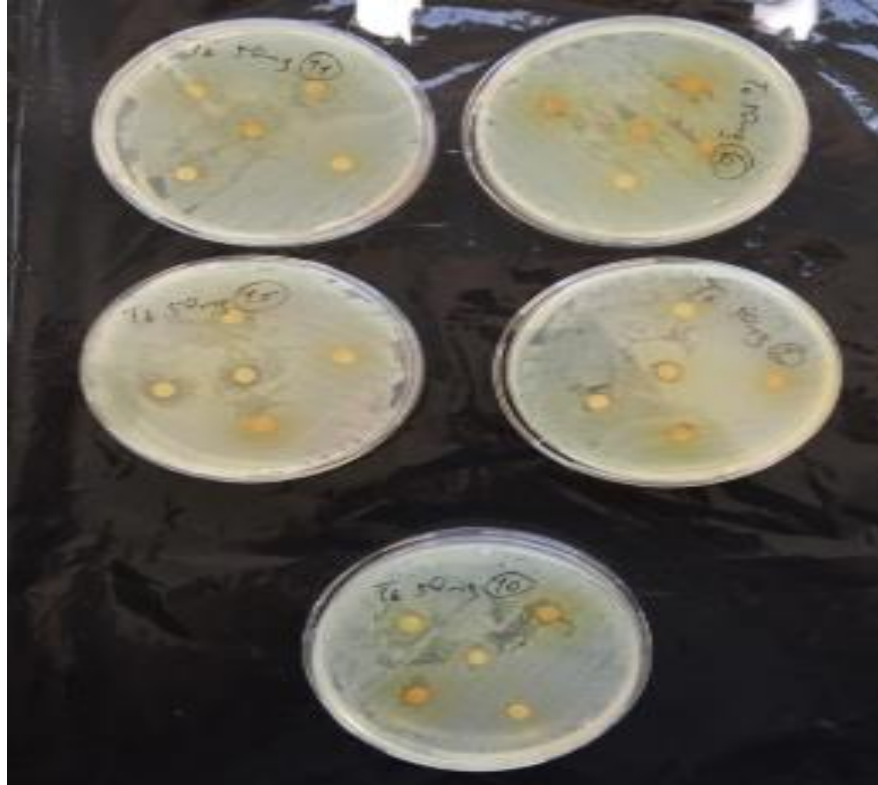
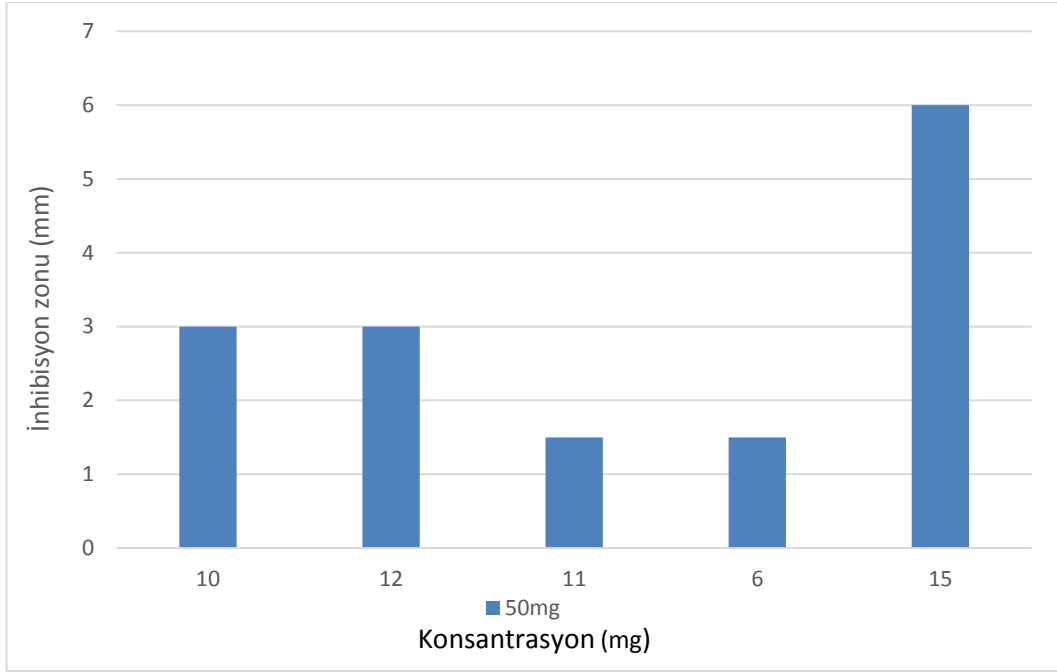
Şekil 4.6. *Daphne gnidioides* Gövde özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizleri Disk Döfüzyon Deneyi Sonucu

Tablo 4.9. *Daphne gnidioides* Bitkisi Kök Ekstraktının İnhibisyon Zonu



Şekil 4.7. *Daphne gnidioides* Kök Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizleri Disk Döfüzyon Deneyi Sonucu

Tablo 4.10. *Daphne gnidioides* Bitkisi Gövde Ekstraktının İnhibisyon Zonu



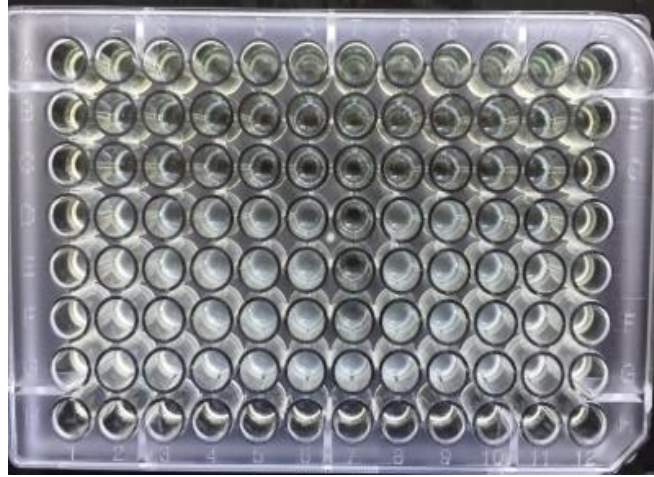
Şekil 4.8. *Daphne gnidioides* Gövde Özütü Antimikrobiyal Aktivite Analizleri Disk Döfüzyon Deneyi Sonucu

Daha düşük konsantrasyonlarda ve daha hassas veriler elde edebilmek amacıyla antimikrobiyal analizlerin ikinci kısmı olan MIC testi sonucu ise;

Tablo 4.11. *Daphne gnidioides* Bitkisi Yaprak Ekstraktının MIC Sonucu

Mikroorganizma	Methanol ekstrakt MBC	Methanol ekstrakt MIC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	500	125
<i>Salmonella kentucky</i> (15)	500	125
<i>Enterococcus durans</i> (14)	500	125
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	250	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	500	125
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	500	125
<i>Alfa streptococcus</i> <i>haemolyticus</i> (9)	500	31,25
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	250	125
<i>Serratia marrescens</i> (6)	500	125
<i>Esherichia coli</i> (5)	250	125
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	250	125
MBC: minimum bakterisidal konsantrasyon (µg/ml); MIC: minimum inhibitör konsantrasyon (µg/ml)		

Daphne gnidioides bitkisinin yaprak özütü MIC deneyi sonucunda Gram pozitif olan Alfa *Streptococcus haemolyticus* (9) bakterisinde 31,25µg'a kadar etkili olduğu saptanmıştır (Tablo 4.11).

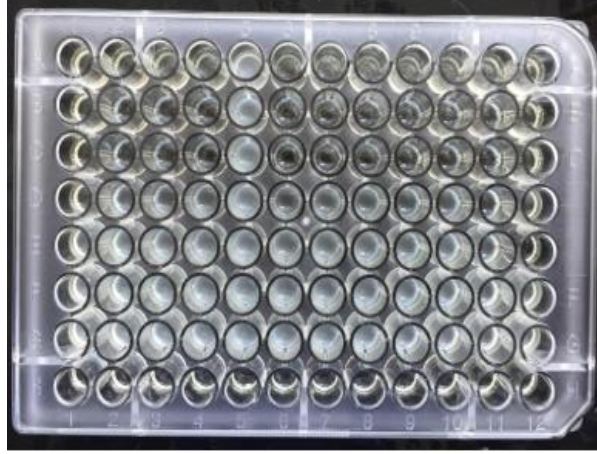


Şekil 4.9. *Daphne gnidioides* Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test- Yaprak)

Tablo 4.12. *Daphne gnidioides* Bitkisi Kök Ekstraktı MIC Sonucu

Mikroorganizma	Methanol ekstrakt MBC	Methanol ekstrakt MIC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	500	125
<i>Salmonella kentucky</i> (15)	500	125
<i>Enterococcus durans</i> (14)	500	125
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	250	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	etki yok	etki yok
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	500	125
<i>Alfa streptococcus</i> <i>haemolyticus</i> (9)	500	125
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	250	125
<i>Serratia marrescens</i> (6)	250	125
<i>Esherichia coli</i> (5)	500	125
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	250	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	250	125
MBC: minimum bakterisidal konsantrasyon (µg/ml); MIC: minimum inhibitör konsantrasyon (µg/ml)		

Daphne gnidioides bitkisinin kök özütü MIC deneyi sonucunda, Gram negatif olan *Pseudomonas aeruginosa* (11) bakterisinde etki gözlenmemiştir. Diğer çalışılan Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde ise 125µg'a kadar etkili olduğu saptanmıştır (Tablo 4.12).

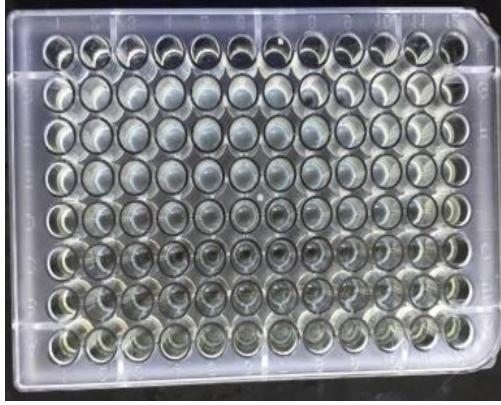


Şekil 4.10. *Daphne gnidioides* Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test- Kök)

Tablo 4.13. *Daphne gnidioides* Bitkisi Gövde Ekstraktı MIC Sonucu

Mikroorganizma	Methanol ekstrakt MBC	Methanol ekstrakt MIC
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 (17)	500	250
<i>Salmonella kentucky</i> (15)	500	500
<i>Enterococcus durans</i> (14)	500	500
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (12)	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)	500	500
<i>Enterococcus faecium</i> (10)	500	500
<i>Alfa streptococcus</i> <i>haemolyticus</i> (9)	500	500
<i>Staphylococcus epidermis</i> (8)	500	500
<i>Serratia marrescens</i> (6)	500	500
<i>Esherichia coli</i> (5)	500	500
<i>Proteus vulgaris</i> (4)	500	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (2)	500	250
MBC: minimal bactericidal concentration (µg/ml); MIC: minimal inhibition concentration (µg/ml)		

Daphne gnidioides bitkisinin gövde özütü MIC deneyi sonucunda diğer iki bitki özütleri olan yaprak ve köke göre etkisinin daha az olduğu ve genellikle 500 µg için antimikrobiyal aktivitesinin olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 4.13).

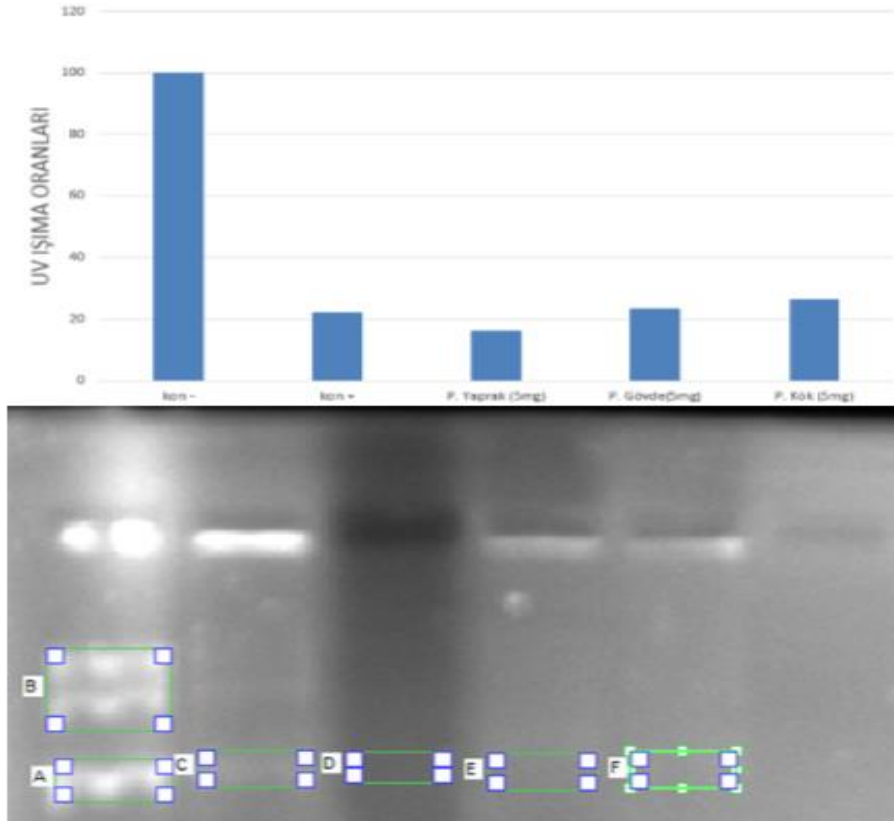


Şekil 4.11. *Daphne gnidioides* Antimikrobiyal Aktivite Analizleri (MIC Test- Gövde)

DNA Koruma Aktivitesinin Belirlenmesi

Daphne pontica bitkisinin DNA koruma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda;

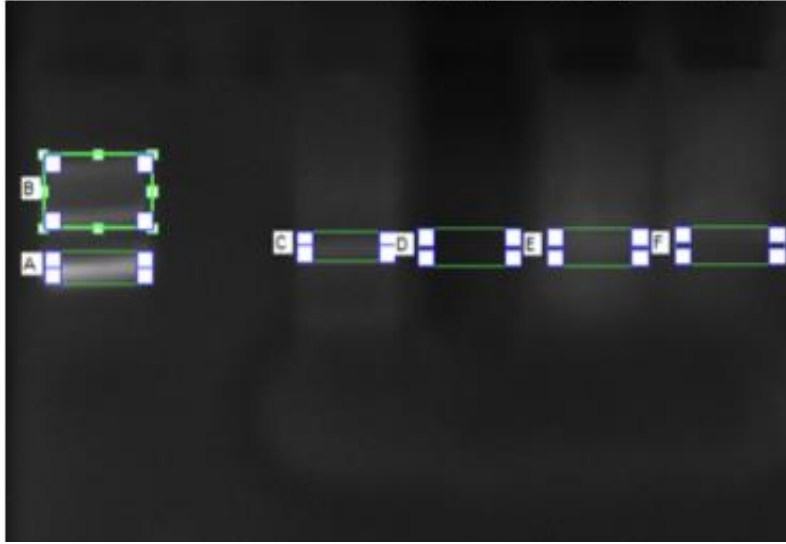
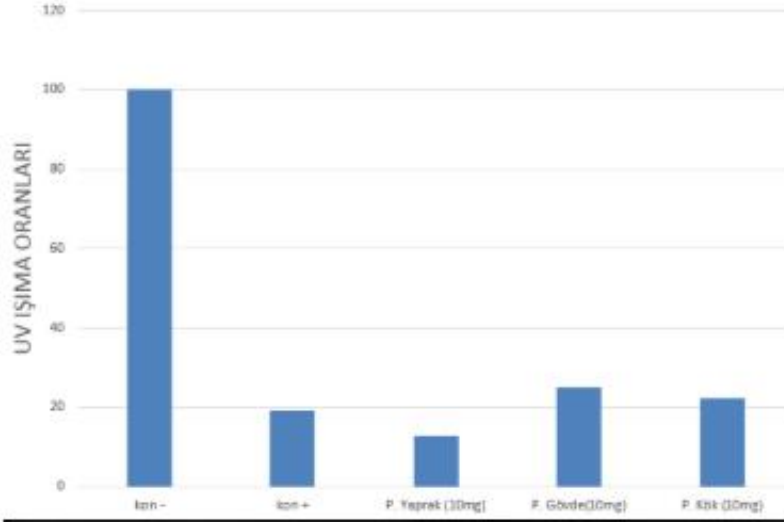
Tablo 4.14. *Daphne pontica* DNA Koruma Oranları (5 mg)



Şekil 4.12. *Daphne pontica* Ekstrakt 5mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü)

Sırımbağı bitkisinin sırasıyla 5mg yaprak, gövde ve kök ekstraktlarından herhangi birisinde DNA koruma aktivitesi görülmemiştir (Şekil 4.12).

Tablo 4.15. *Daphne pontica* DNA Koruma Oranları (10 mg)

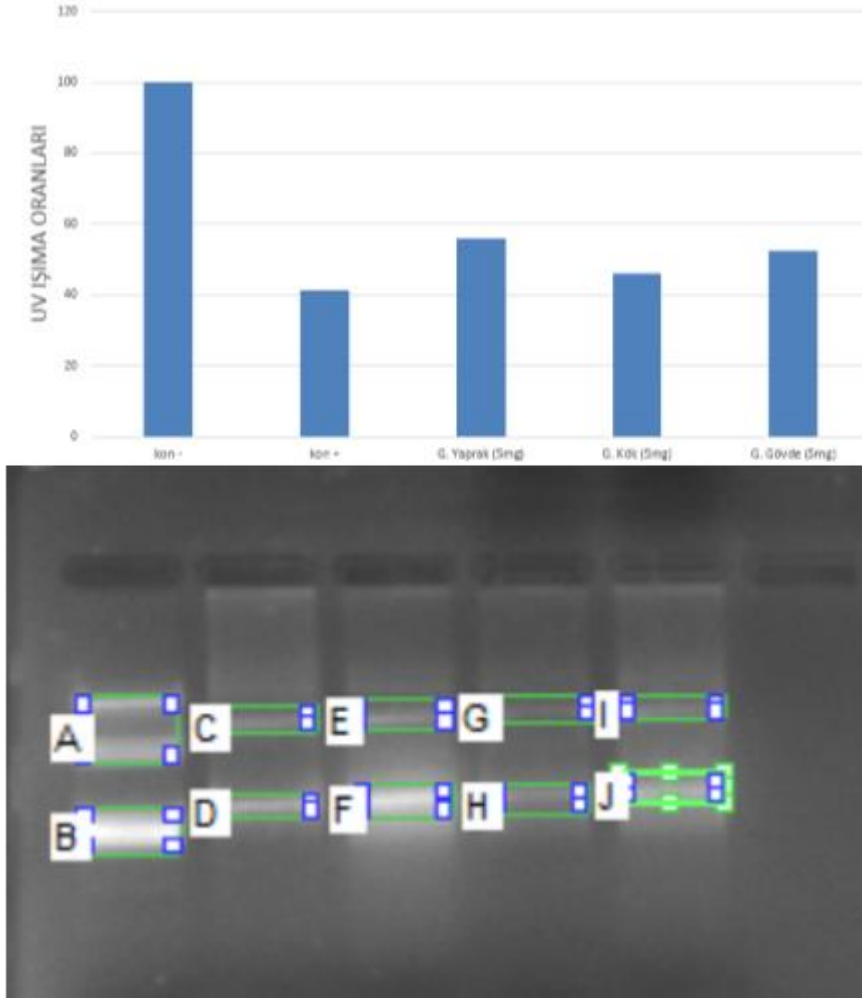


Şekil 4.13. *Daphne pontica* Ekstrakt 10 mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü)

Sırımbağı bitkisinin sırasıyla 10mg yaprak, gövde ve kök ekstraktlarından herhangi birisinde DNA koruma aktivitesi görülmemiştir (Şekil 4.13).

Daphne gnidioides bitkisinin DNA koruma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda;

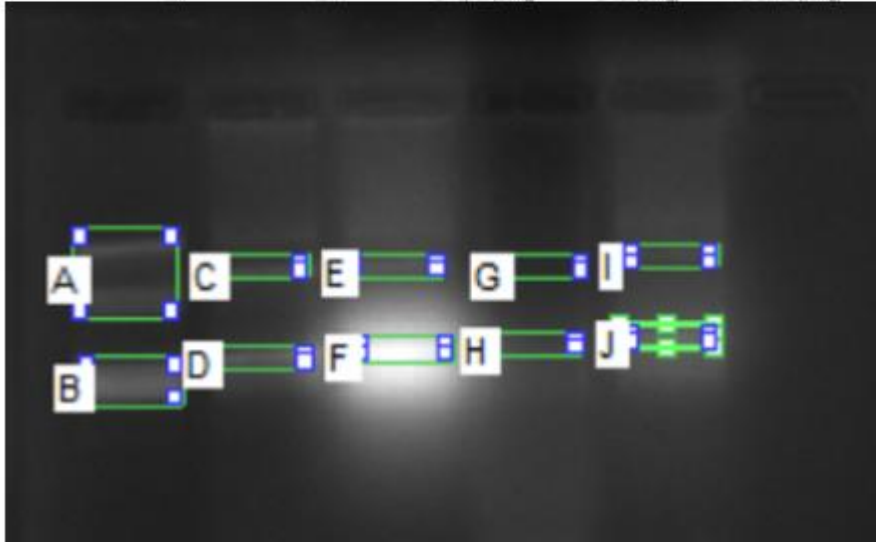
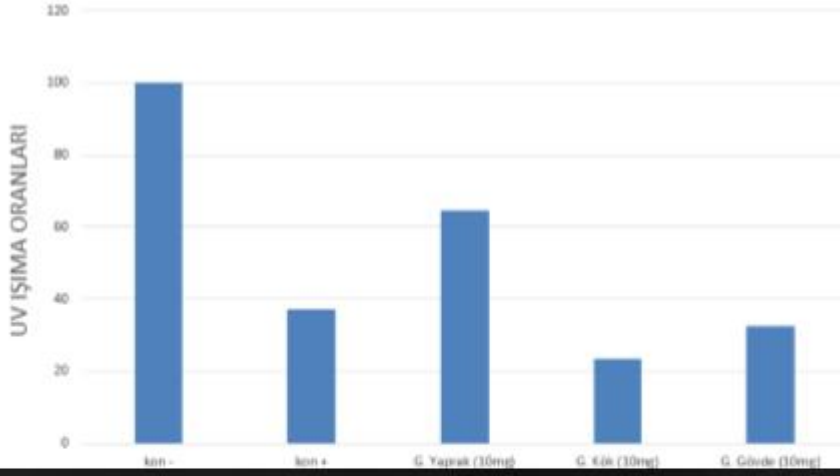
Tablo 4.16. *Daphne gnidioides* DNA Koruma Oranları (5 mg)



Şekil 4.14. *Daphne gnidioides* Ekstrakt 5 mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü)

Sıyircık bitkisinin sırasıyla 5mg yaprak, gövde ve kök ekstraktlarından herhangi birisinde DNA koruma aktivitesi görülmemiştir (Şekil 4.14).

Tablo 4.17. *Daphne gnidioides* DNA Koruma Oranları (10 mg)



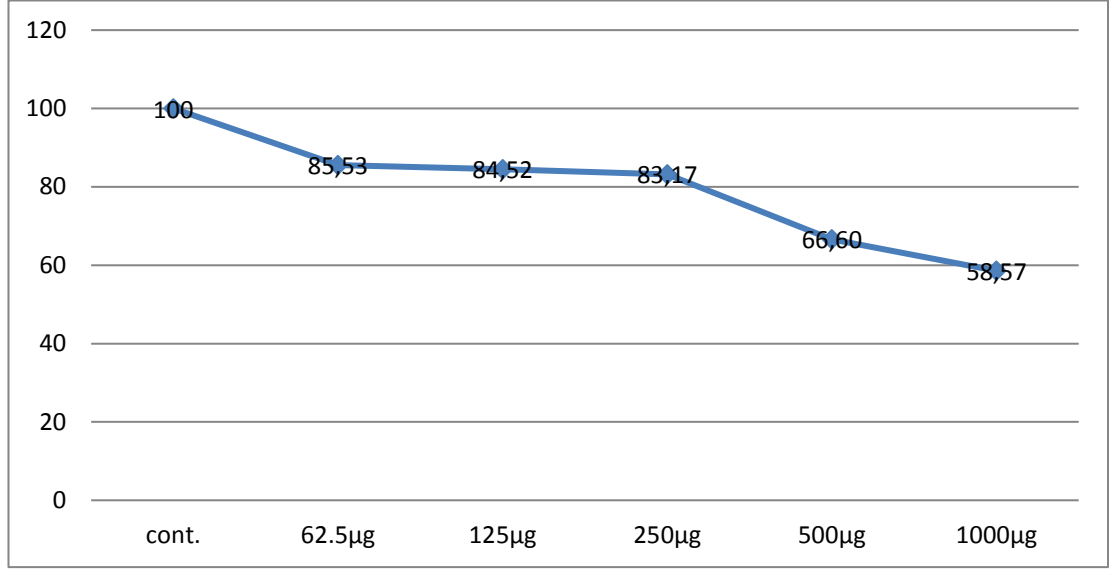
Şekil 4.15. *Daphne gnidioides* Ekstrakt 10 mg DNA Koruma Analizi (UV Jel Görüntüsü)

Sıyircık bitkisinin sırasıyla 10mg yaprak, gövde ve kök ekstraktlarından herhangi birisinde DNA koruma aktivitesi görülmemiştir (Şekil 4.15).

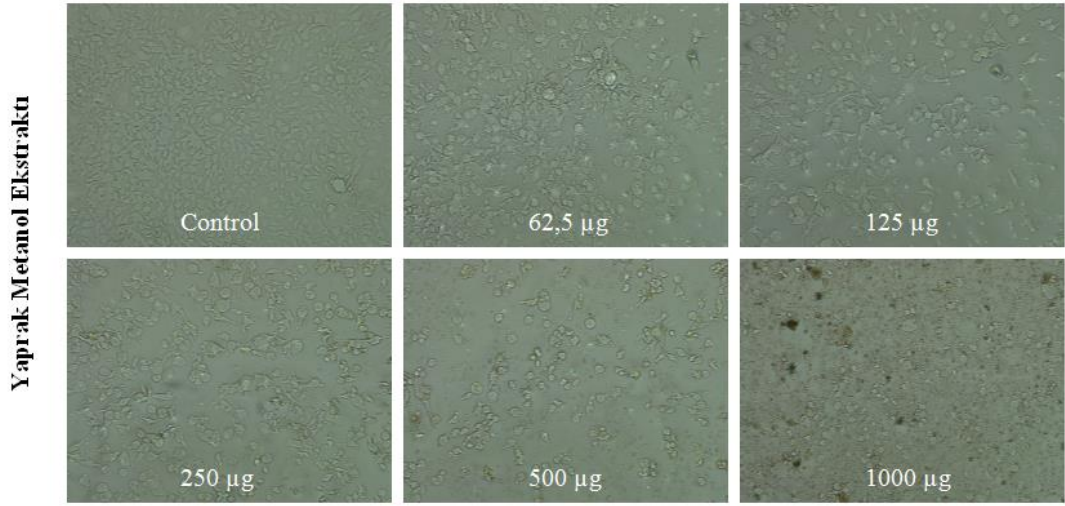
Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

Daphne cinsine ait sıyrımbağı bitkisinin antikanser özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kök, gövde ve yaprak ekstraktları belirli dozlarda (1000µg, 500µg, 250µg, 125µg, 62,5µg) verilmiş olup ardından ise 24. ve 48. saatlerde MDA-MB 231 (meme) ve HeLa (serviks) kanser hücre hattı üzerindeki gözlemlere dayanılarak hücre canlılık testi (MTT) gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.18. *Daphne pontica* Yaprak 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

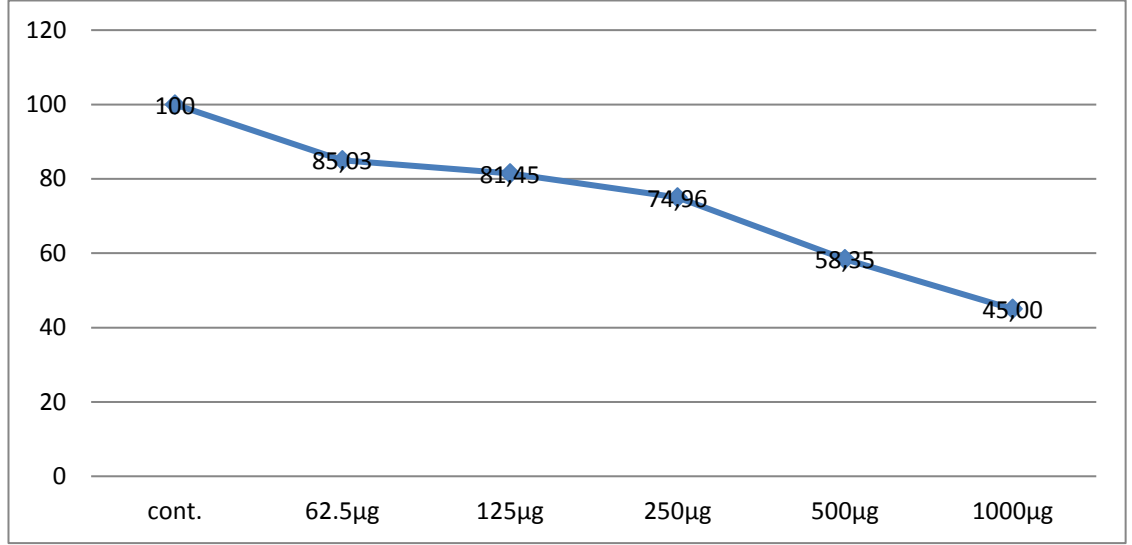


Daphne pontica bitkisinin yaprak ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg'da %58,57'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.16 'da ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.18).

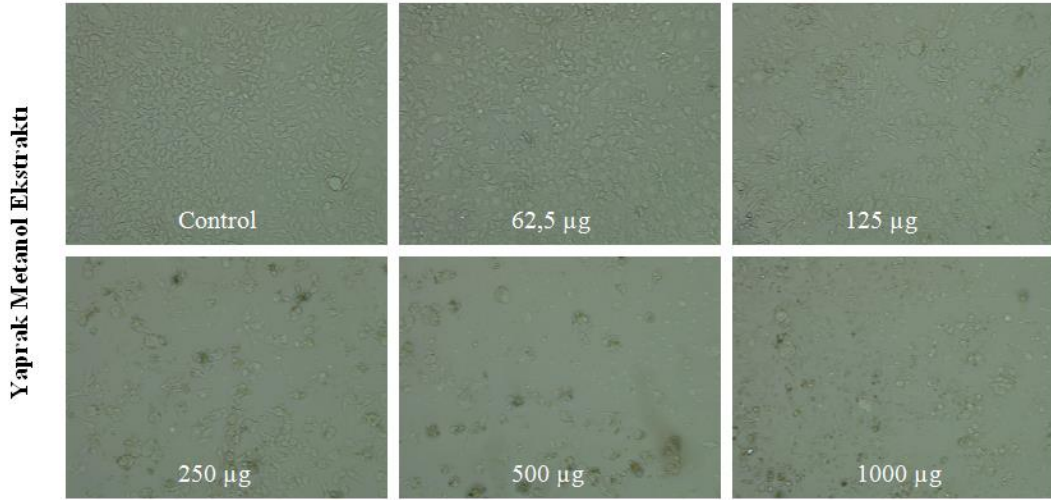


Şekil 4.16. *Daphne pontica* Yaprak MDA-MB 231 24h Hücre Hattı

Tablo 4.19. *Daphne pontica* Yaprak 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

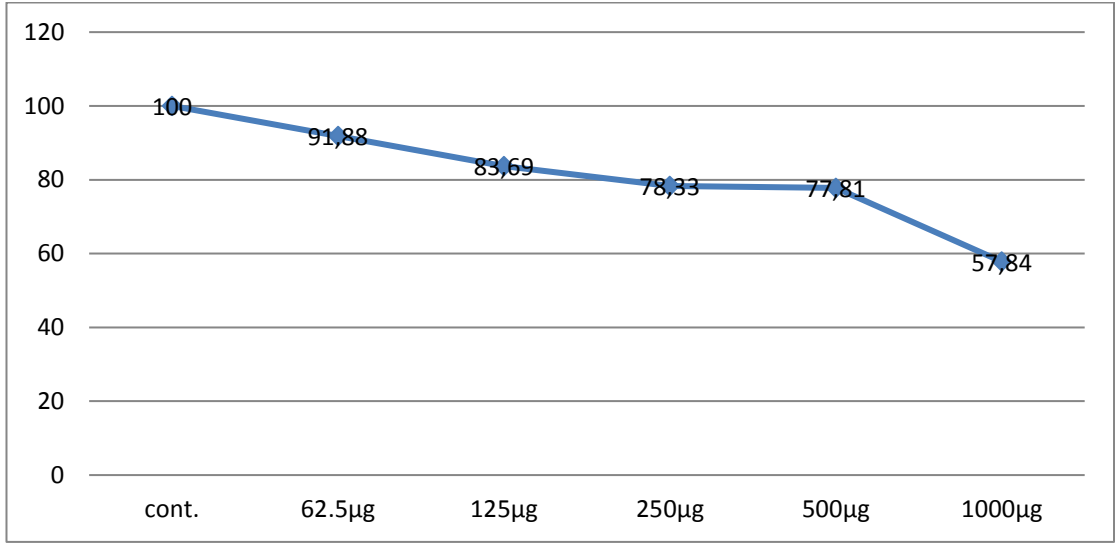


Daphne pontica bitkisinin yaprak ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %45'inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.17 'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.19).

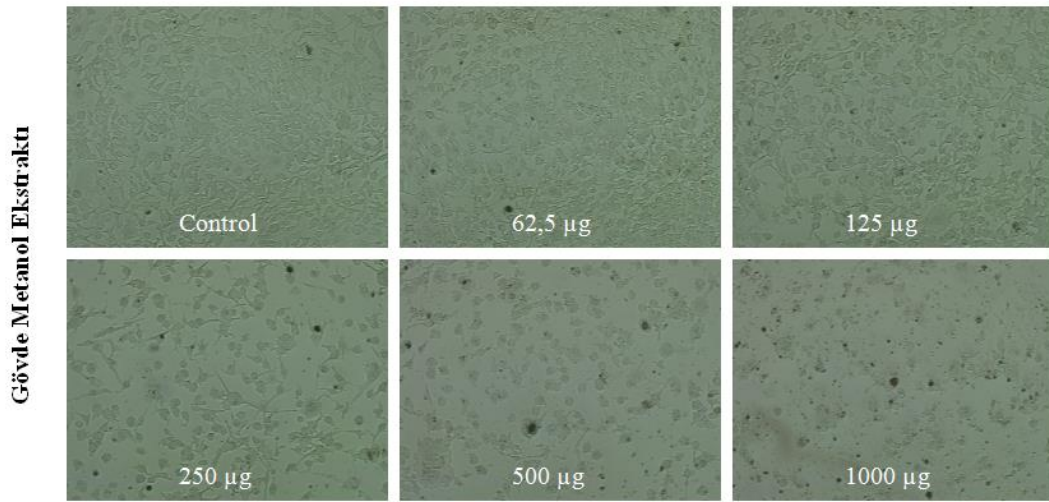


Şekil 4.17. *Daphne pontica* Yaprak MDA-MB 231 48h Hücre Hattı

Tablo 4.20. *Daphne pontica* Gövde 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

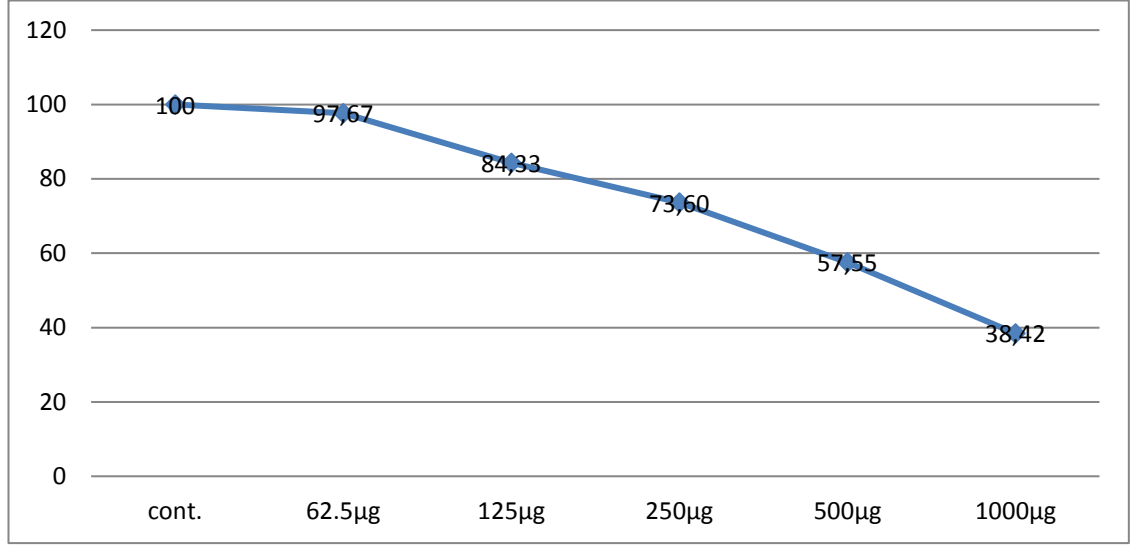


Daphne pontica bitkisinin gövde ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %57,84'ünün canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.18'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.20).

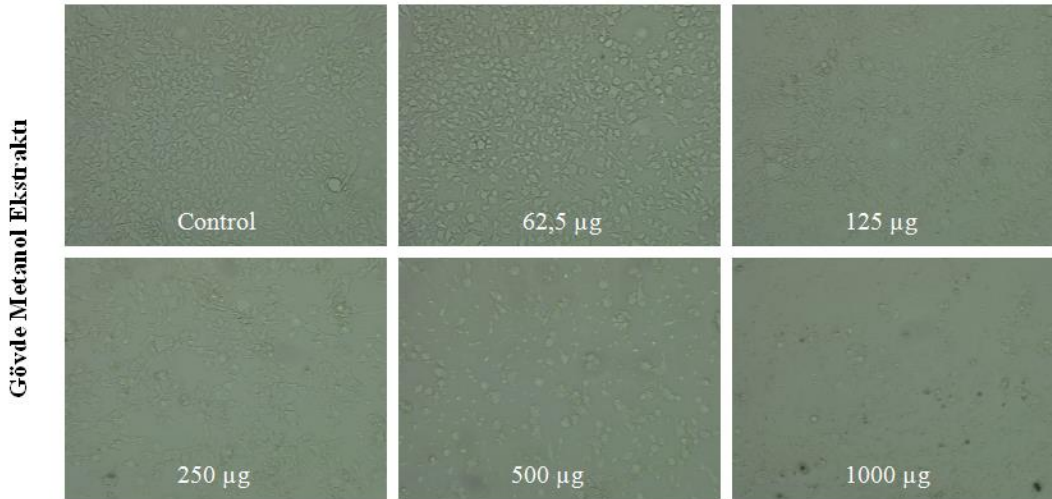


Şekil 4.18. *Daphne pontica* Gövde MDA-MB 231 24h Hücre Hattı

Tablo 4.21. *Daphne pontica* Gövde 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

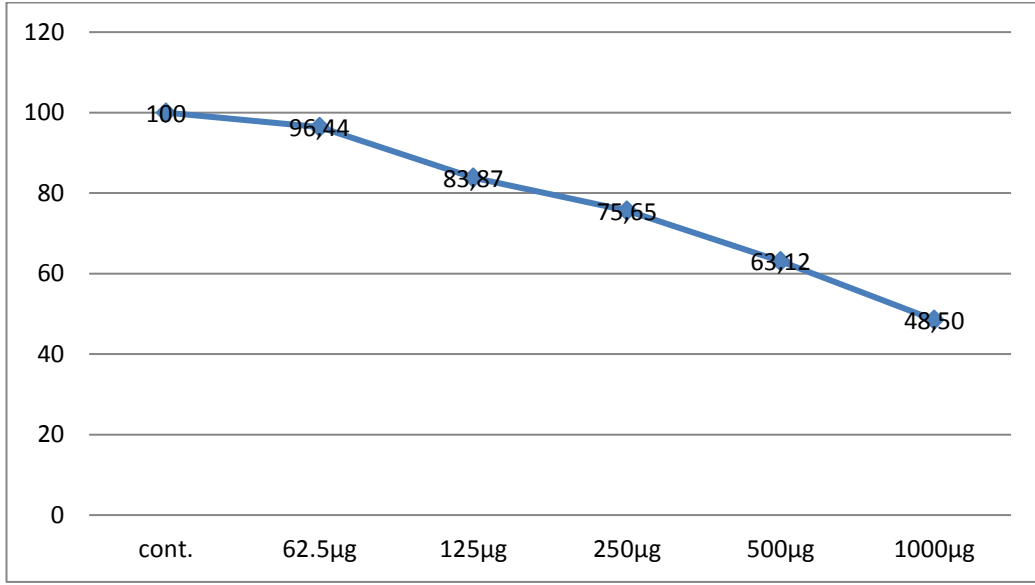


Daphne pontica bitkisinin gövde ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg’da %38,42’sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.19’da ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.21).

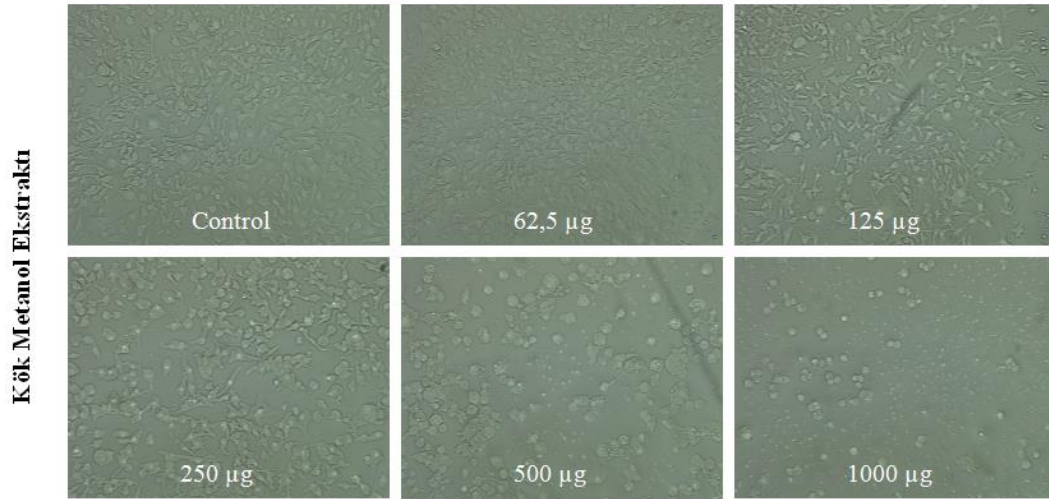


Şekil 4.19. *Daphne pontica* Gövde MDA-MB 231 48h Hücre Hattı

Tablo 4.22. *Daphne pontica* Kök 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

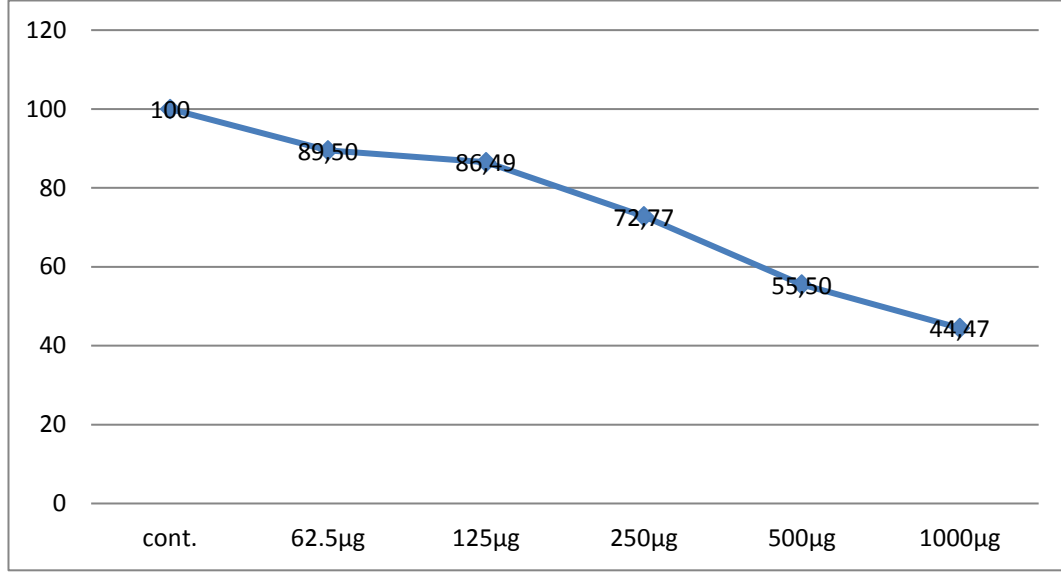


Daphne pontica bitkisinin kök ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg'da %48,50'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.20'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.22).

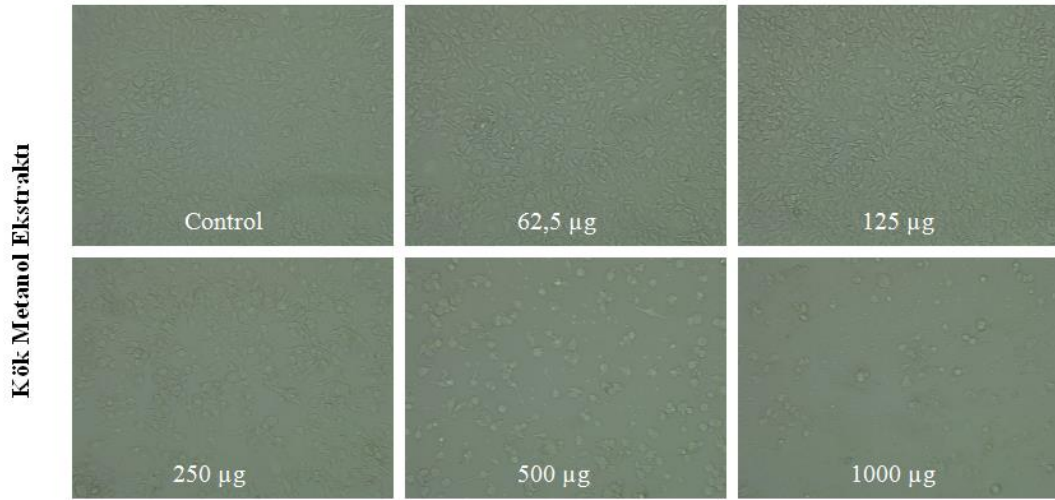


Şekil 4.20. *Daphne pontica* Kök MDA-MB 231 24h Hücre Hattı

Tablo 4.23. *Daphne pontica* Kök 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi



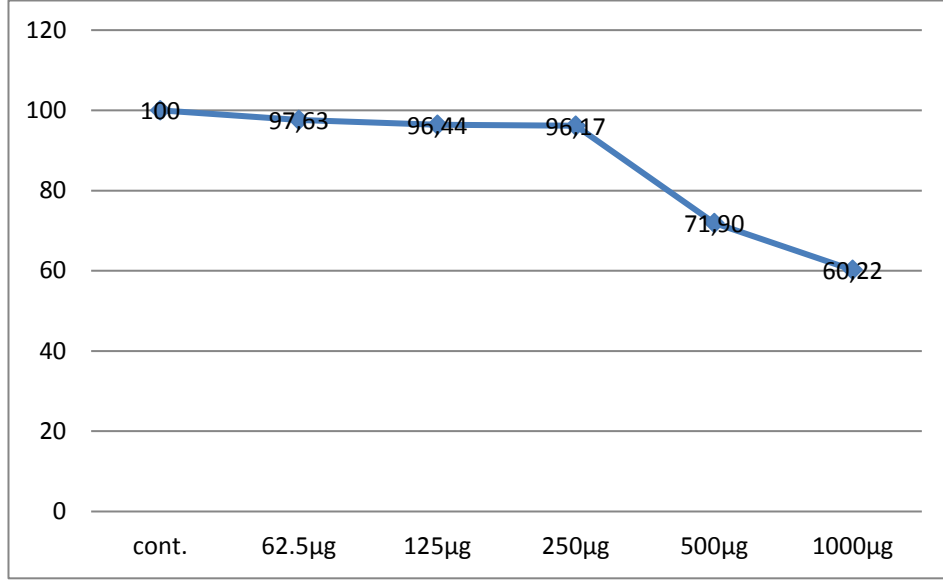
Daphne pontica bitkisinin kök ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg'da %44,47'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.21'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.23).



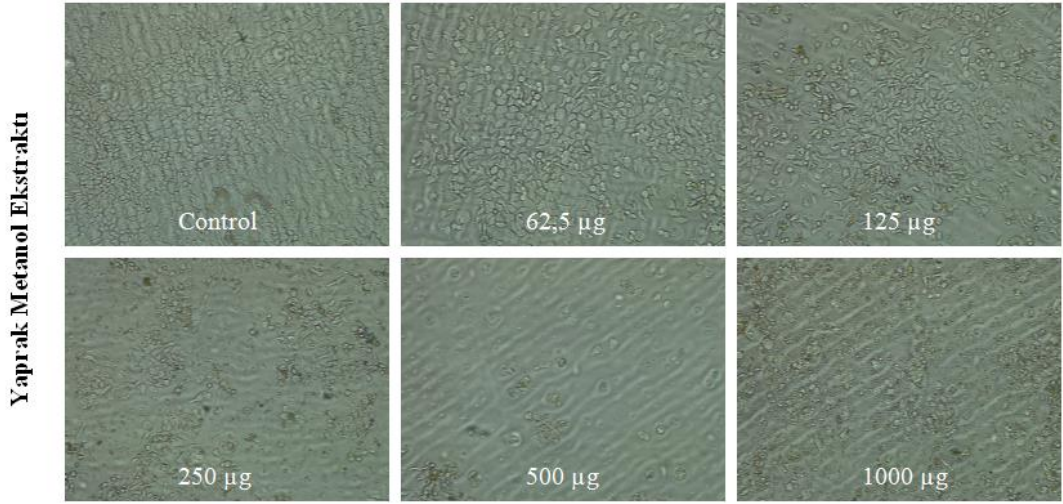
Şekil 4.21. *Daphne pontica* Kök MDA-MB 231 48h Hücre Hattı

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ve görseller sonucunda bitki özütlerinin daha çok 48. saatte etki ettiği, *Daphne pontica* bitkisinin gövde ekstraktı 48. saatte MDA-MB 231 kanser hücresi hattına 1000µg'da en fazla etki ettiği görülmüştür.

Tablo 4.24. *Daphne pontica* Yaprak 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

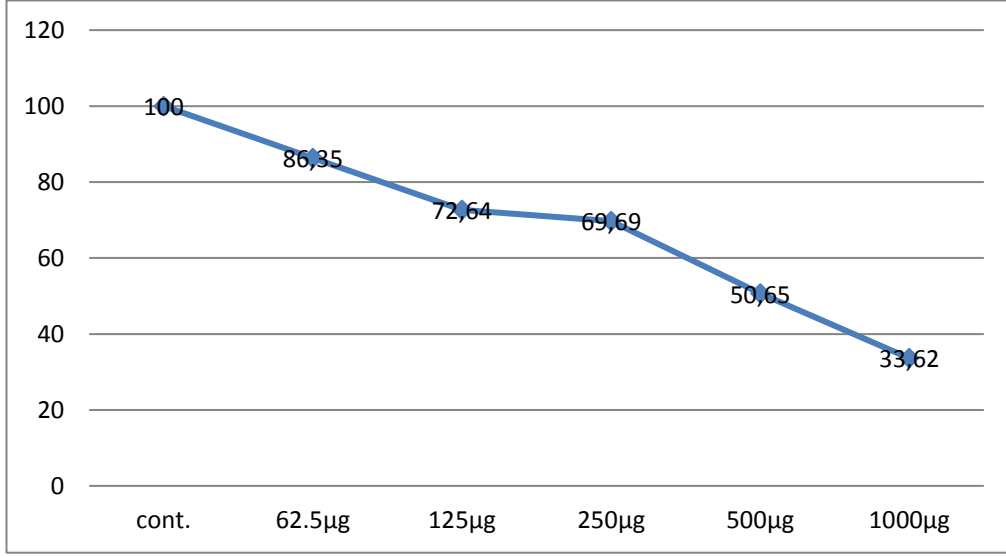


Daphne pontica bitkisinin yaprak ekstraktının HeLa serviks kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %60,22' sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.22'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.24).

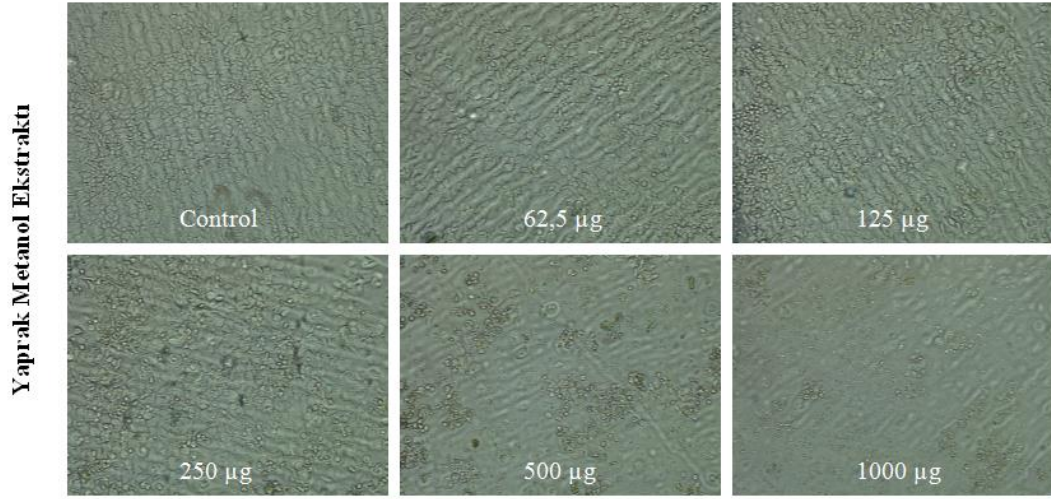


Şekil 4.22. *Daphne pontica* Yaprak HeLa 24h Hücre Hattı

Tablo 4.25. *Daphne pontica* Yaprak 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

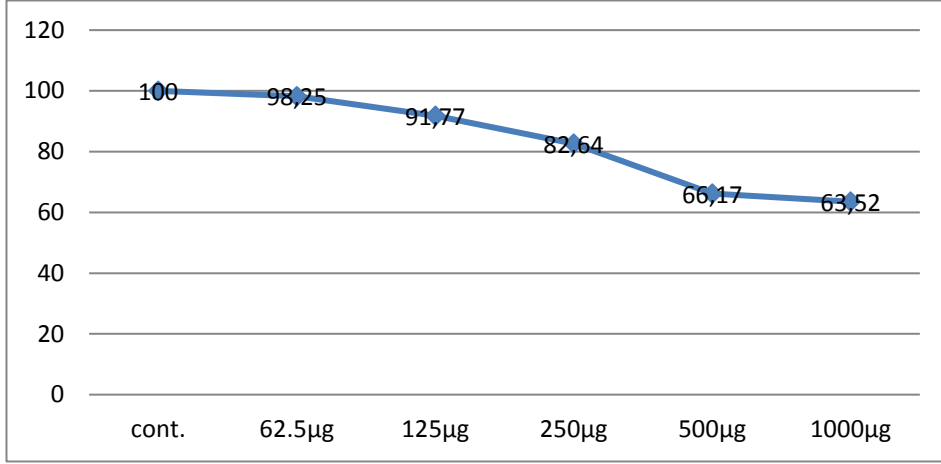


Daphne pontica bitkisinin yaprak ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %32,62'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.23 'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.25).

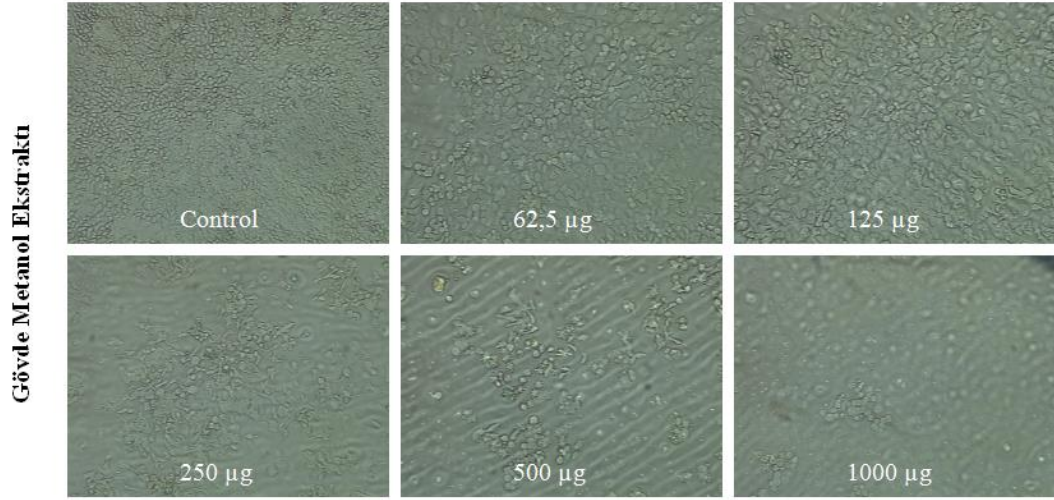


Şekil 4.23. *Daphne pontica* Yaprak HeLa 48h Hücre Hattı

Tablo 4.26. *Daphne pontica* Gövde 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

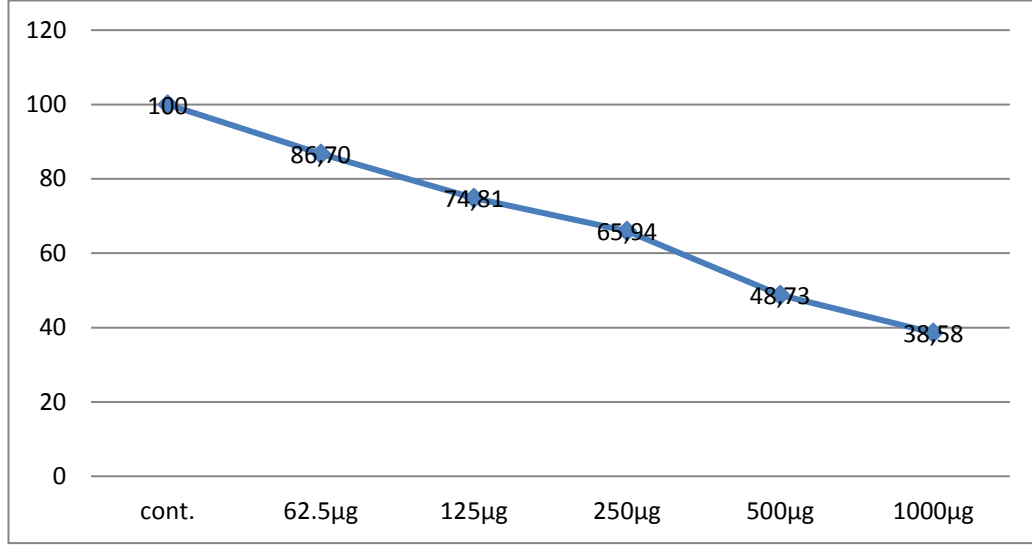


Daphne pontica bitkisinin gövde ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg'da %63,52'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.24 'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.26).

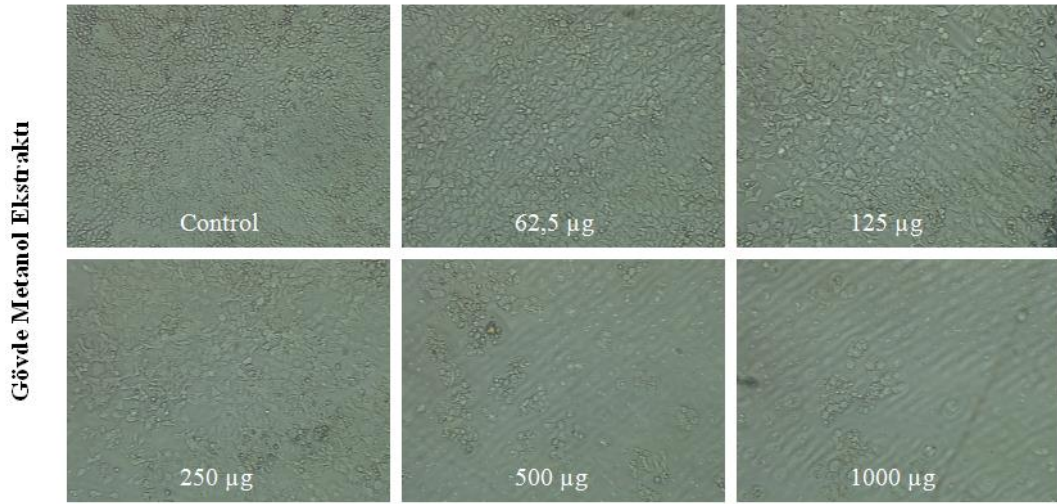


Şekil 4.24. *Daphne pontica* Gövde HeLa 24h Hücre Hattı

Tablo 4.27. *Daphne pontica* Gövde 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

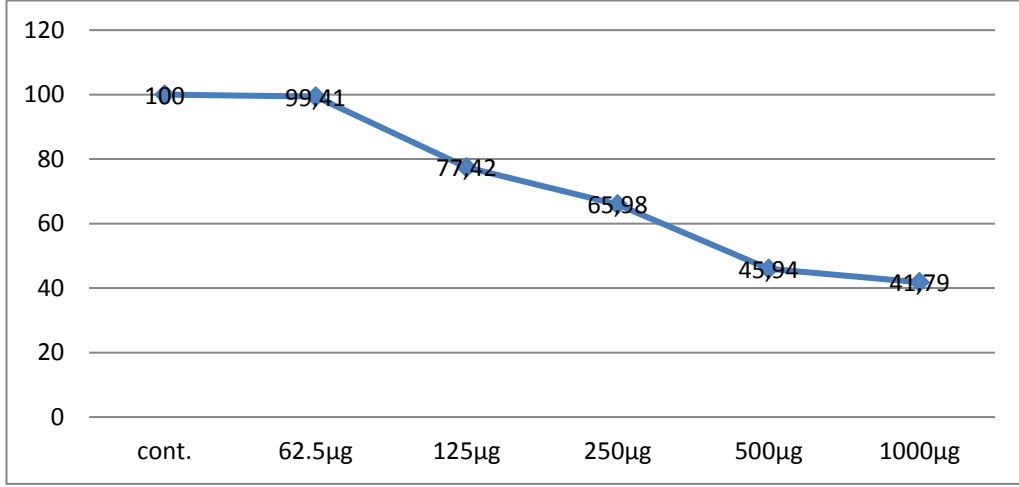


Daphne pontica bitkisinin gövde ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %38,68'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.25'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.27).

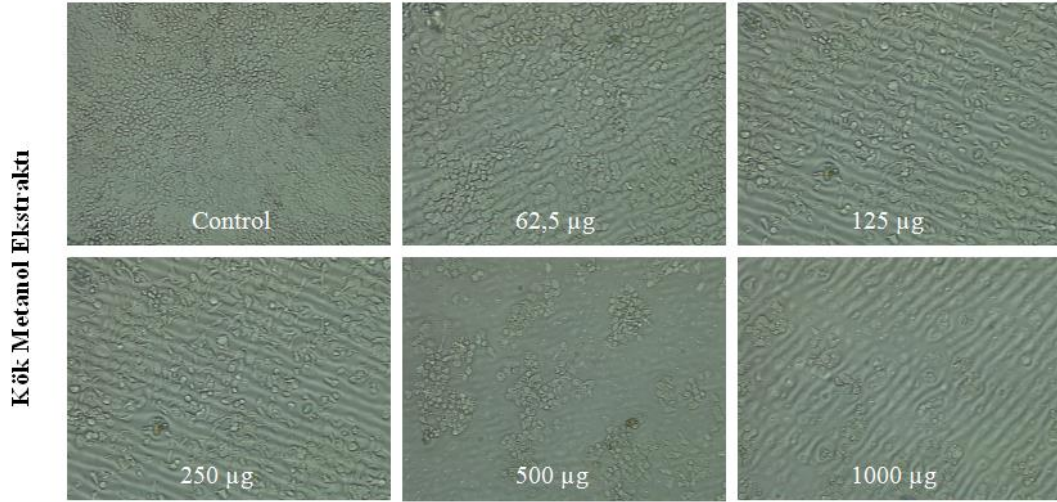


Şekil 4.25. *Daphne pontica* Gövde HeLa 48h Hücre Hattı

Tablo 4.28. *Daphne pontica* Kök 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

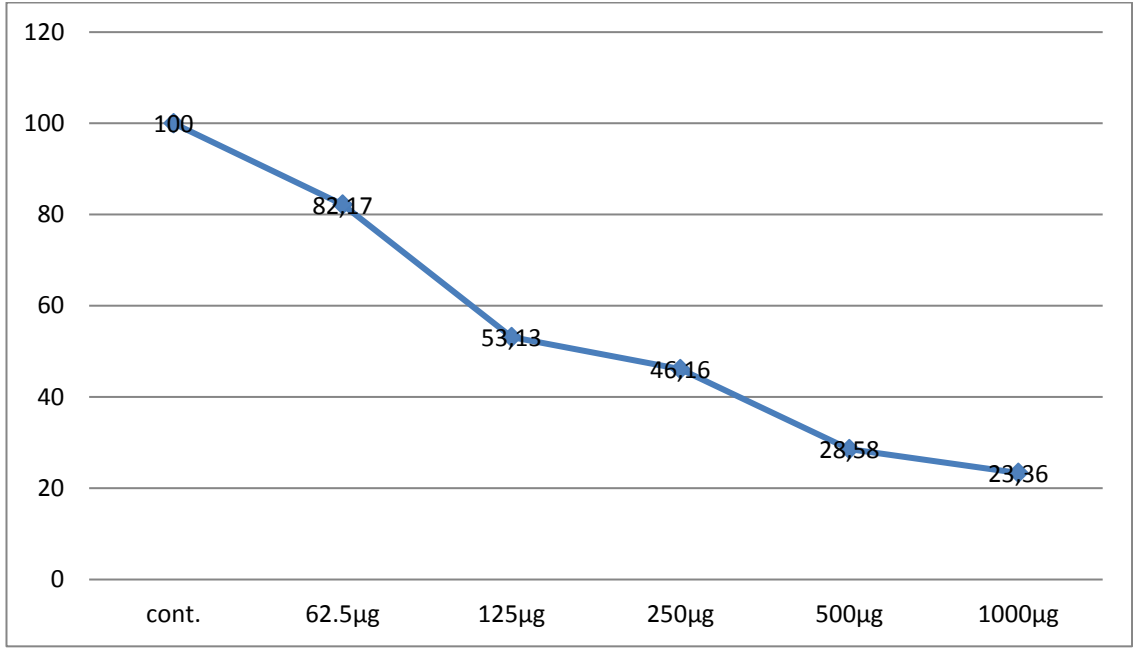


Daphne pontica bitkisinin kök ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %41,79'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.26 'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.28).

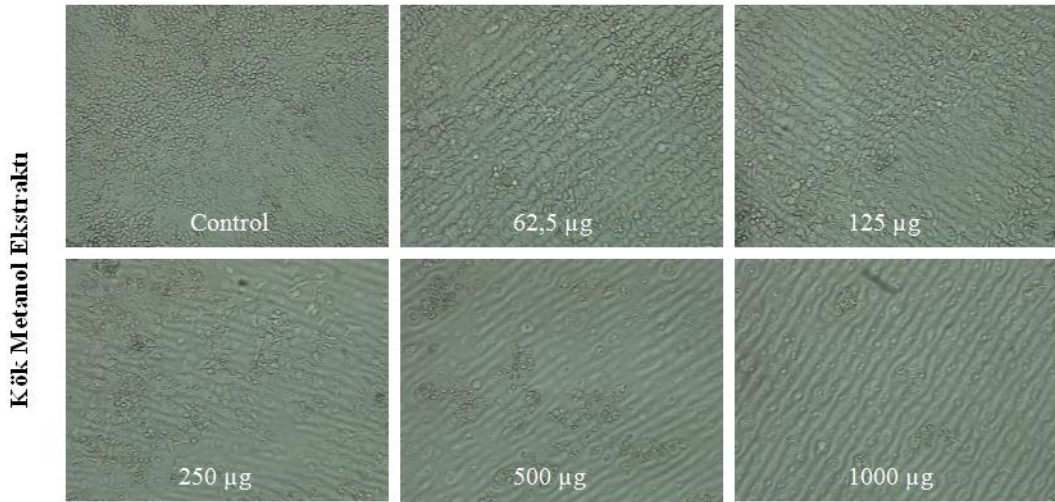


Şekil 4.26. *Daphne pontica* Kök HeLa 24h Hücre Hattı

Tablo 4.29. *Daphne pontica* Kök 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi



Daphne pontica bitkisinin kök ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde uygulanması muamele sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg'da %23,36'sının canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.27 'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.29).

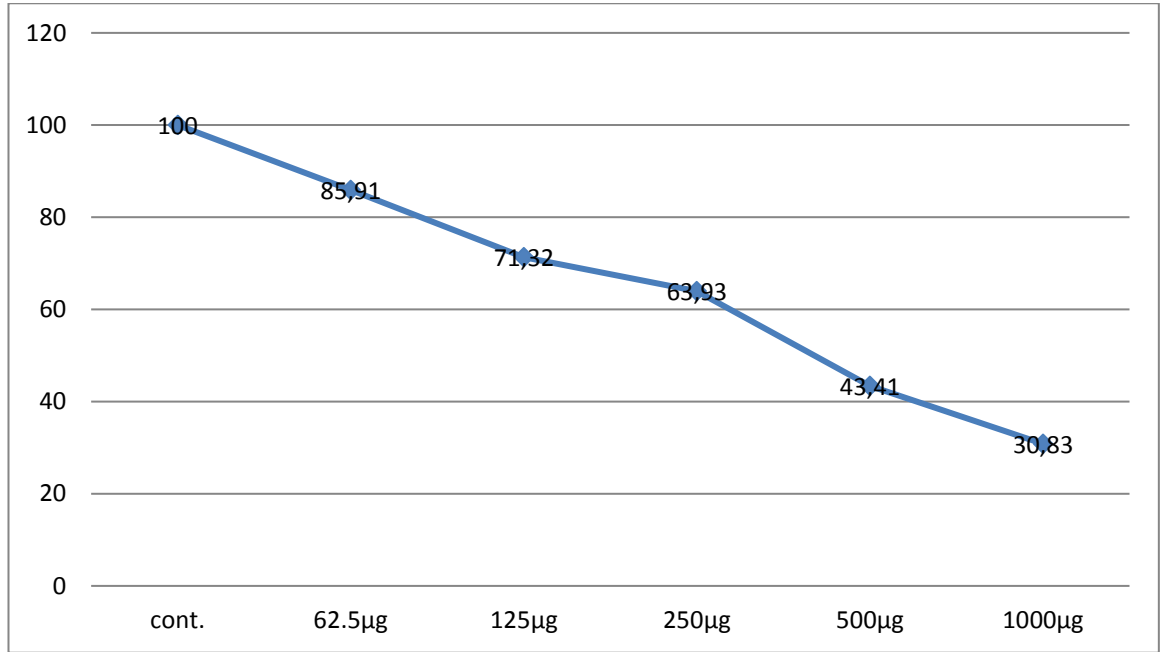


Şekil 4.27. *Daphne pontica* Kök HeLa 48h Hücre Hattı

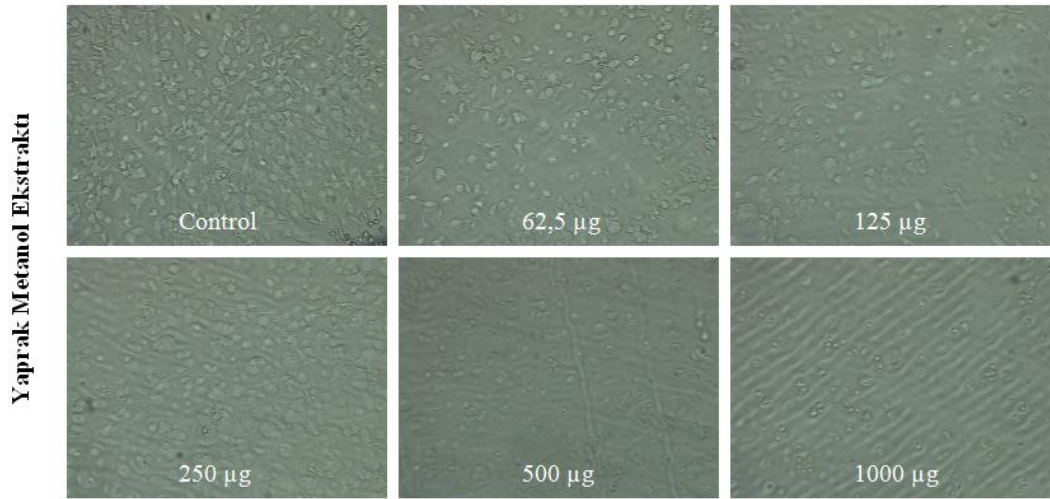
Elde edilen veriler ve sonucunda bitki özütlerinin daha çok 48. saatte etki ettiği, *Daphne pontica* bitkisinin kök ekstraktı 48. saatte HeLa hücre hattına 1000µg da en fazla etki ettiği görülmüştür.

Daphne cinsine ait sıyrıcık bitkisinin (*Daphne gnidioides*) antikanser özelliklerinin belirlenmesi amacıyla kök, gövde ve yaprak ekstraktları belirli dozlarda (1000µg, 500µg, 250µg, 125µg, 62,5µg) verilmiş olup ardından ise 24. ve 48. saatlerde MDA-MB 231 ve HeLa hücre hatları üzerindeki gözlemlere dayanılarak hücre canlılık testi (MTT) gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.30. *Daphne gnidioides* Yaprak 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

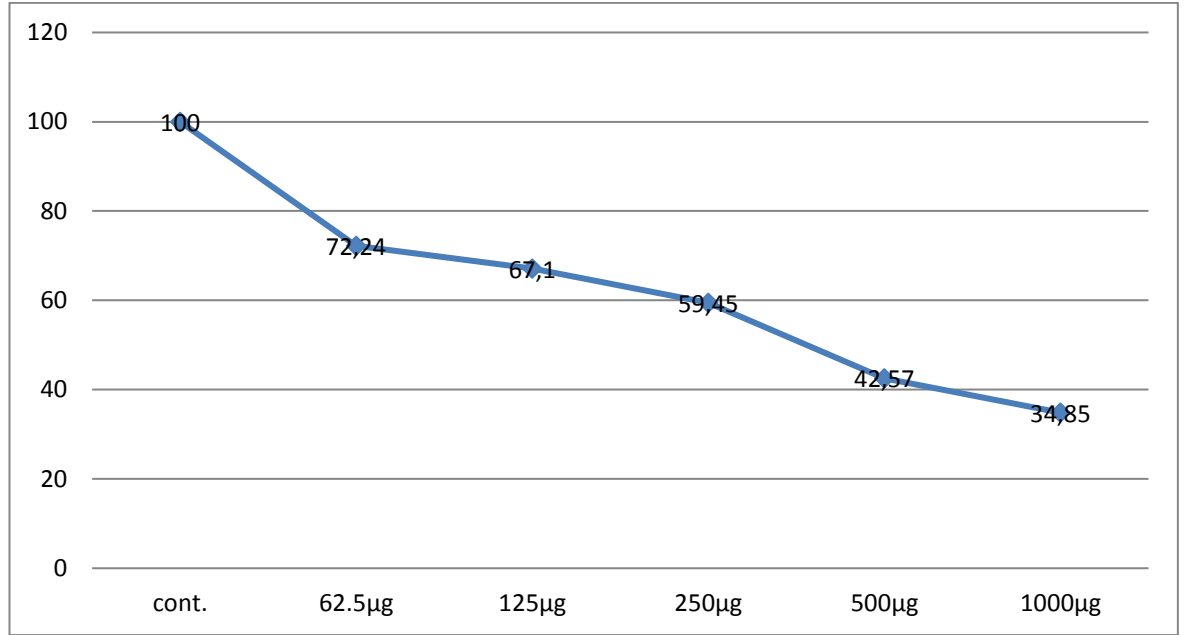


Daphne gnidioides bitkisinin yaprak ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde uygulanması sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %30,83'ünün canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.28'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.30).

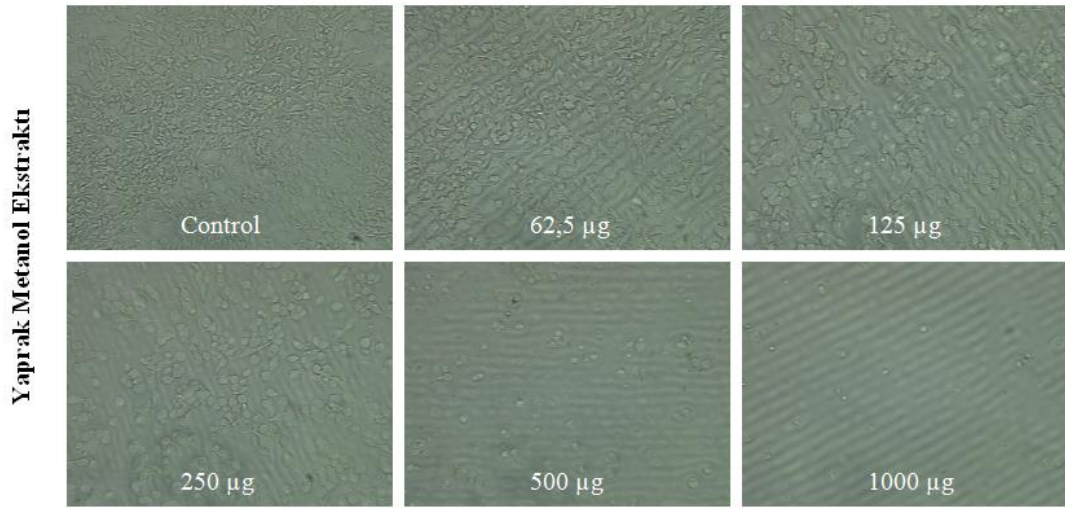


Şekil 4.28. *Daphne gnidioides* Yaprak MDA-MB 231 24h Hücre Hattı

Tablo 4.31. *Daphne gnidioides* Yaprak 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

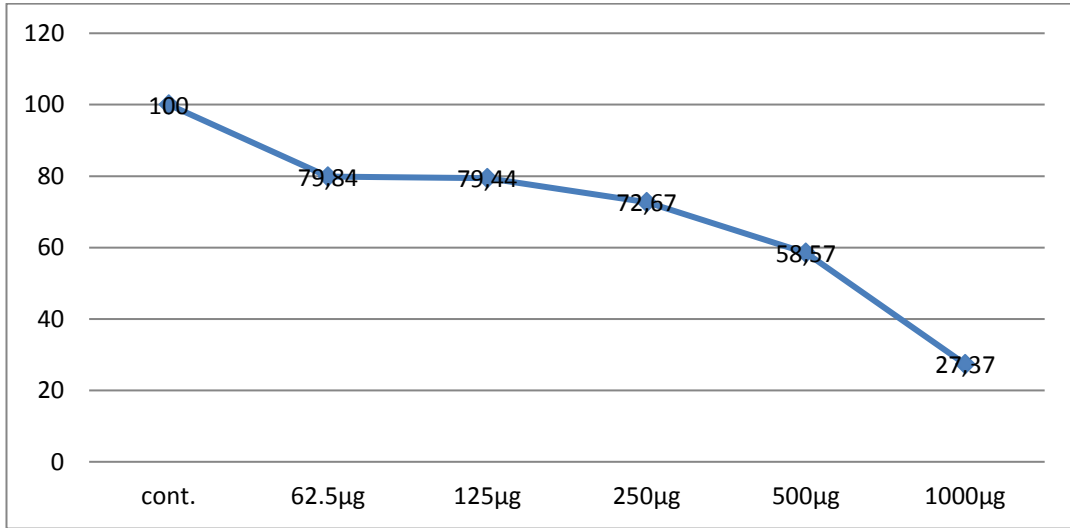


Daphne gnidioides bitkisinin yaprak ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan muamele sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %34,85'inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.29 'da ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.31).

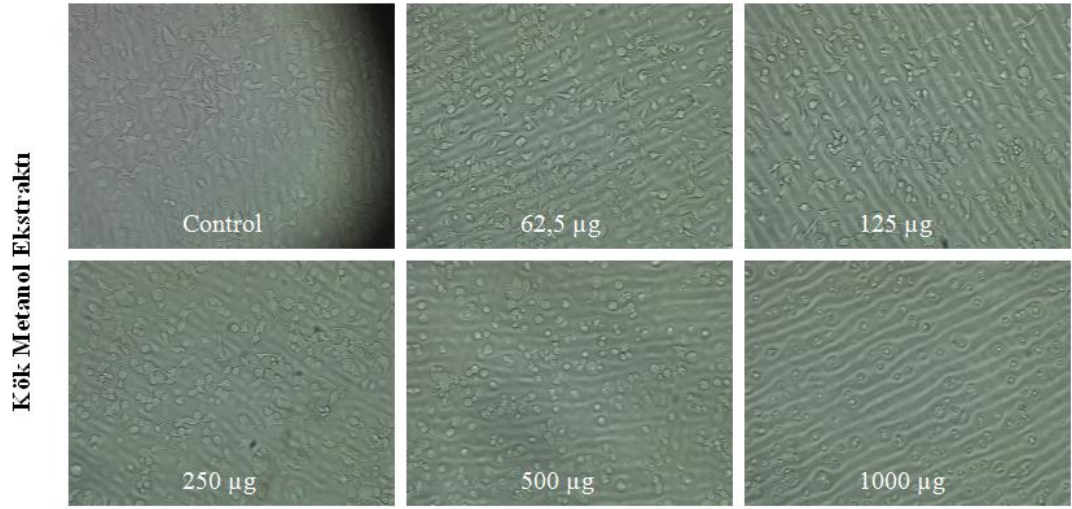


Şekil 4.29. *Daphne gnidioides* Yaprak MDA-MB 231 48h Hücre Hattı

Tablo 4.32. *Daphne gnidioides* Kök 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

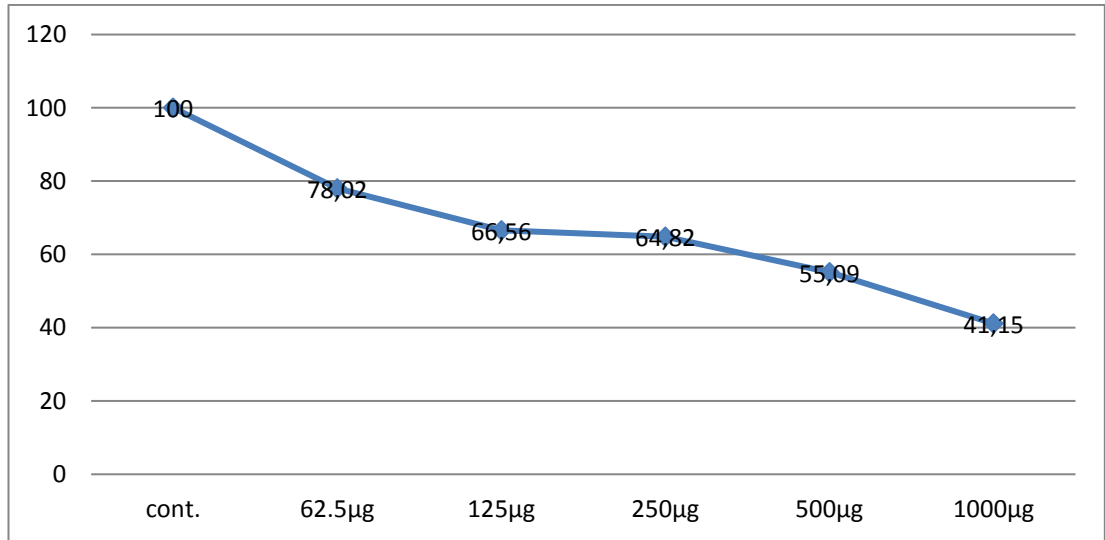


Daphne gnidioides bitkisinin kök ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg'da %27,87'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.30 'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.32).

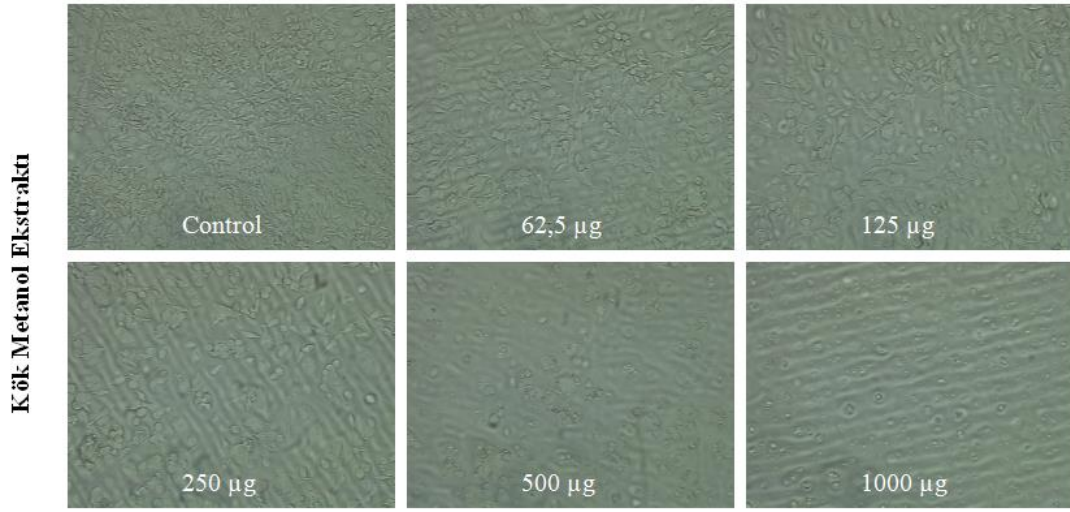


Şekil 4.30. *Daphne gnidioides* Kök MDA-MB 231 24h Hücre Hattı

Tablo 4.33. *Daphne gnidioides* Kök 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

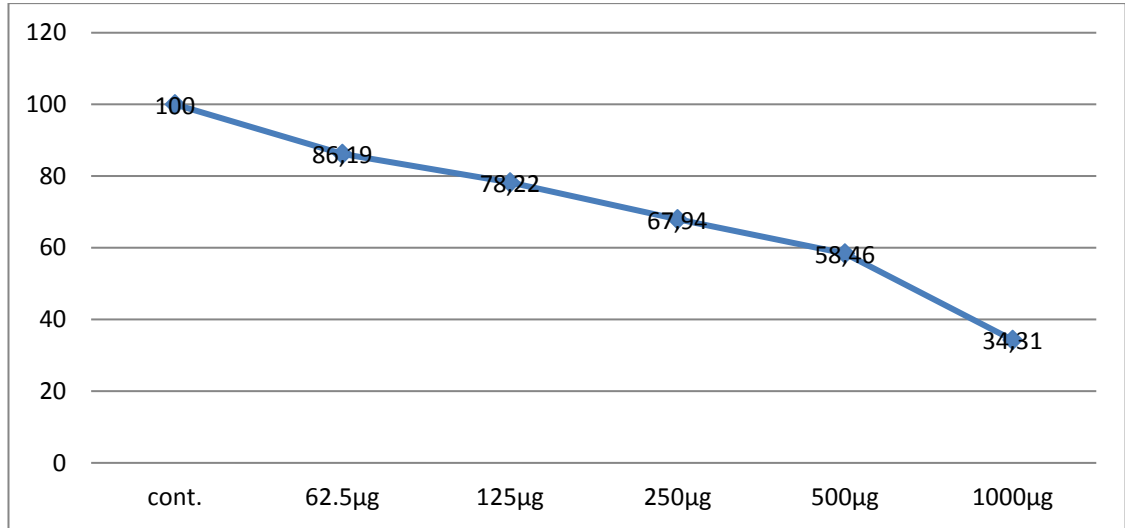


Daphne gnidioides bitkisinin gövde ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %41,15'inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.31 'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.33).

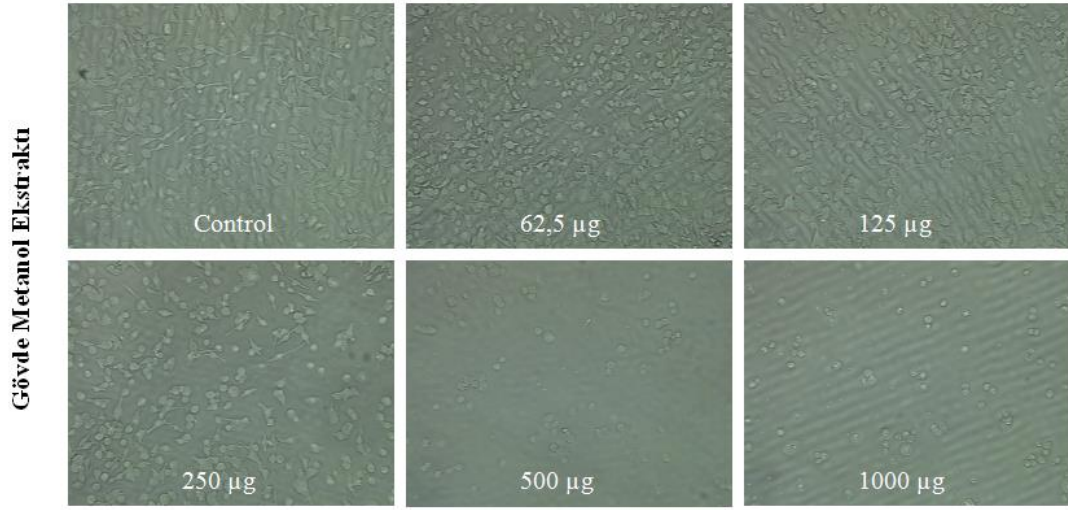


Şekil 4.31. *Daphne gnidioides* Kök MDA-MB 231 48h Hücre Hattı

Tablo 4.34. *Daphne gnidioides* Gövde 24h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

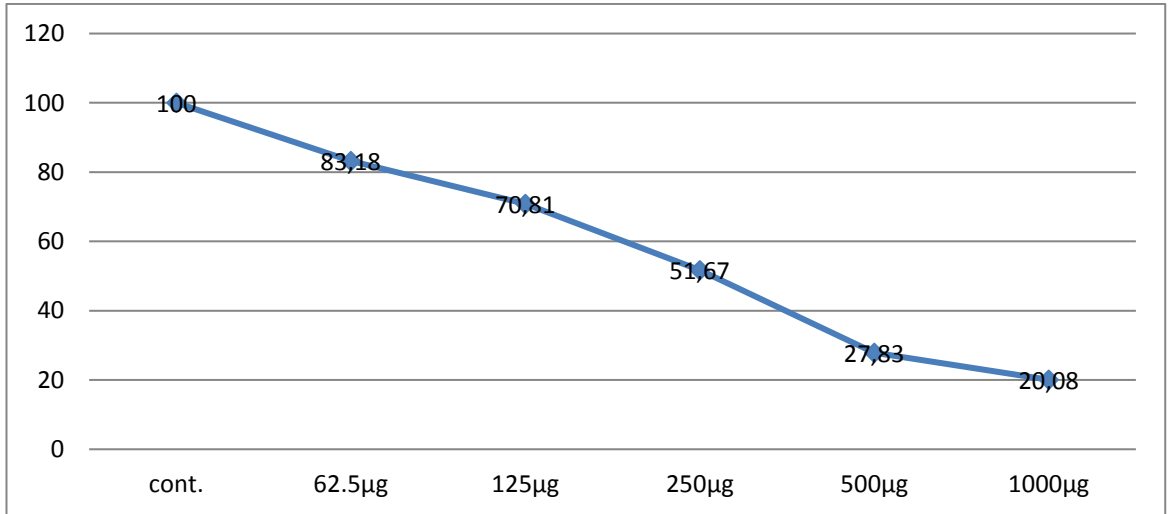


Daphne gnidioides bitkisinin kök ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %34,31'inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.32 'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.34).

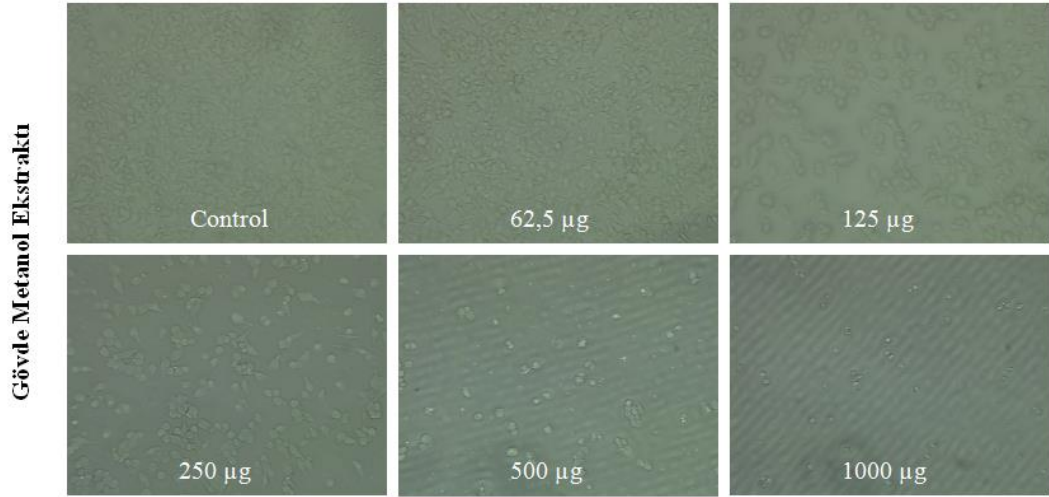


Şekil 4.32. *Daphne gnidioides* Gövde MDA-MB 231 24h Hücre Hattı

Tablo 4.35. *Daphne gnidioides* Gövde 48h MDA-MB 231 Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi



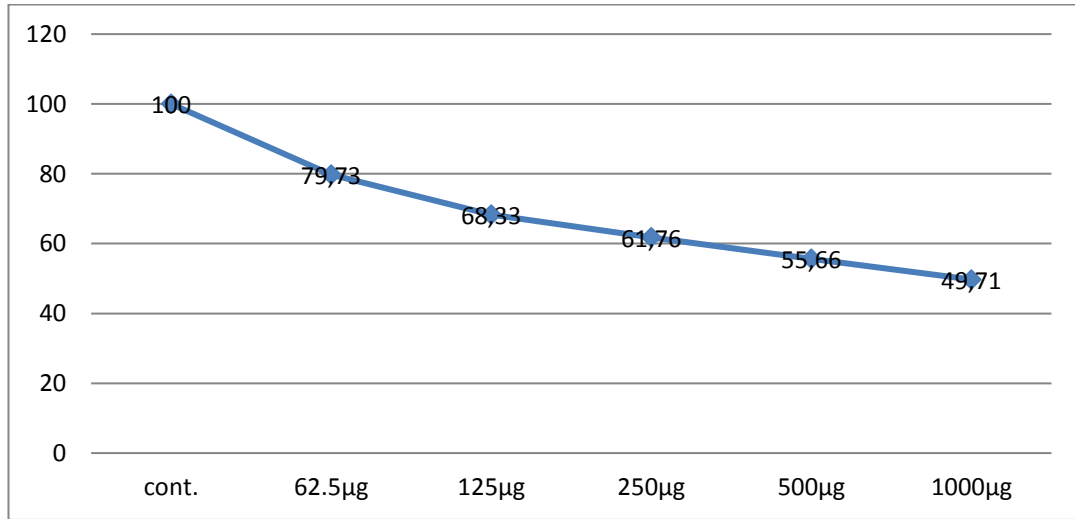
Daphne gnidioides bitkisinin gövde ekstraktının MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %20,08'inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.33'te ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.35).



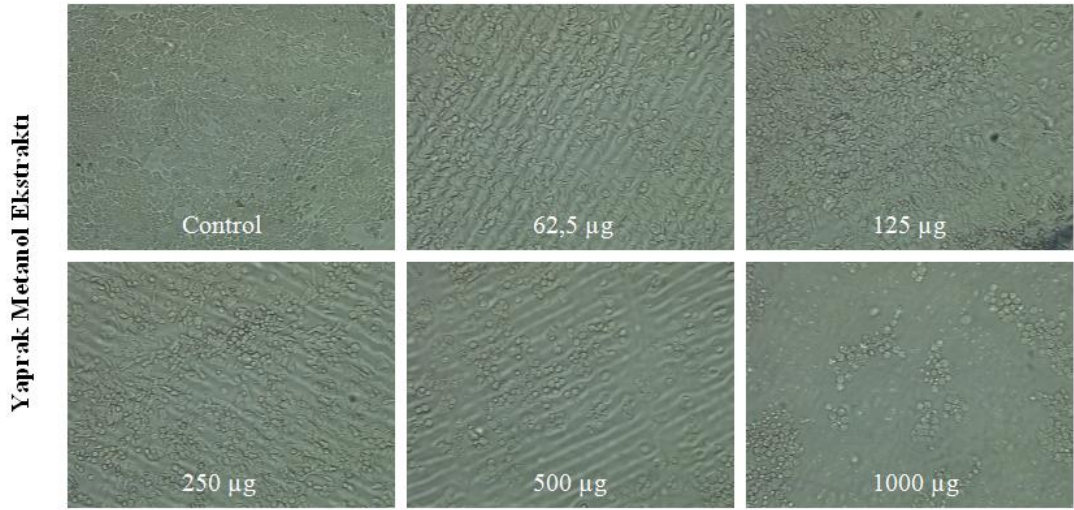
Şekil 4.33. *Daphne gnidioides* Gövde MDA-MB 231 48h Hücre Hattı

Elde edilen veriler sonucunda bitki özütlerinin daha çok 48. saatte etki ettiği, *Daphne gnidioides* bitkisinin gövde ekstrektı 48. saatte MDA-MB 231 kanser hücresi hattına 1000µg'da en fazla etki ettiği görülmüştür.

Tablo 4.36. *Daphne gnidioides* Yaprak 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

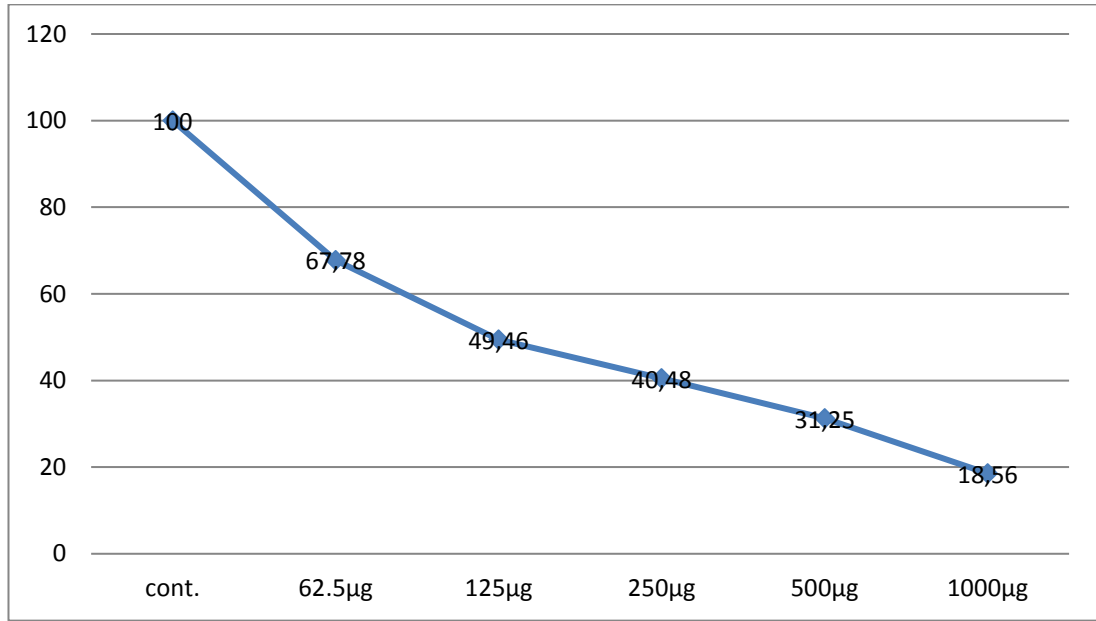


Daphne gnidioides bitkisinin yaprak ekstrektının HeLa hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %49,71'inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.34'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.36).

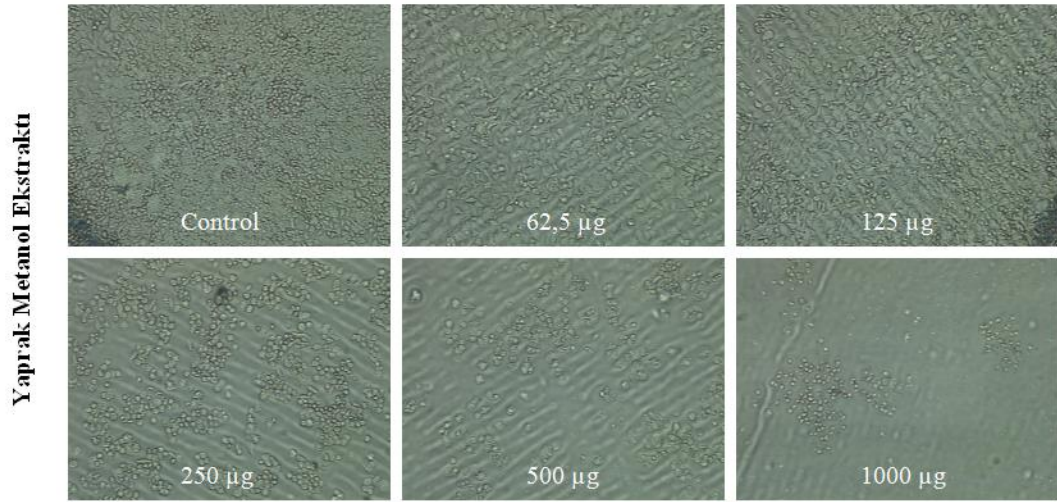


Şekil 4.34. *Daphne gnidioides* Yaprak HeLa 24h Hücre Hattı

Tablo 4.37. *Daphne gnidioides* Yaprak 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

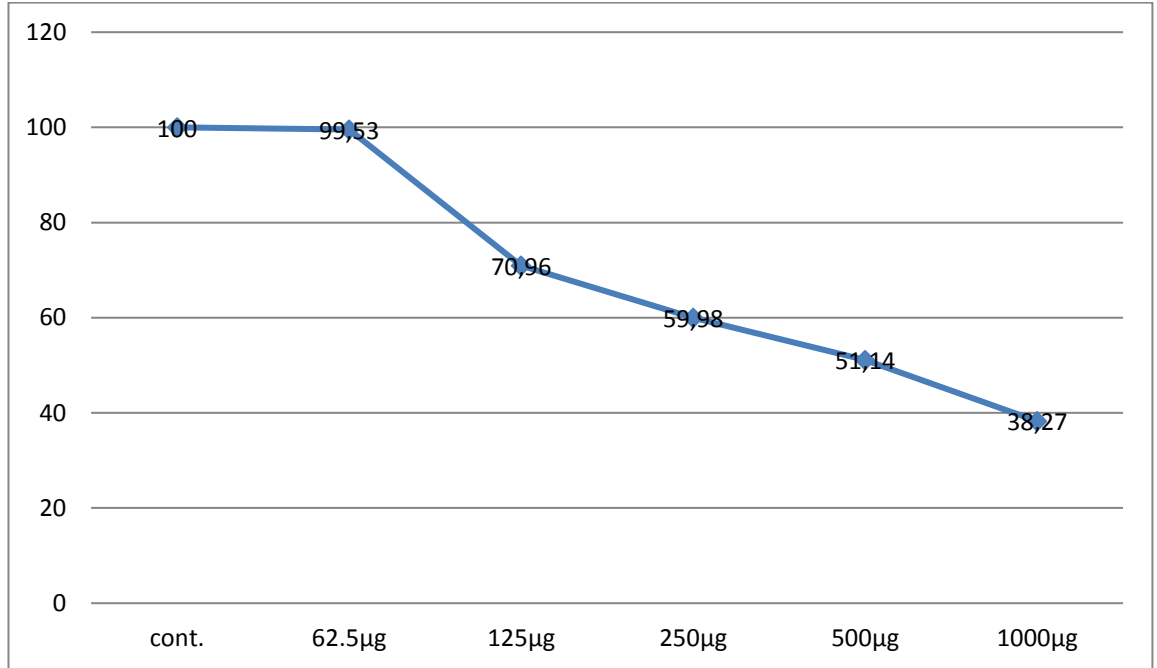


Daphne gnidioides bitkisinin yaprak ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda, kanser hücrelerinin 1000µg de %18,56' inin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.35'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.37).

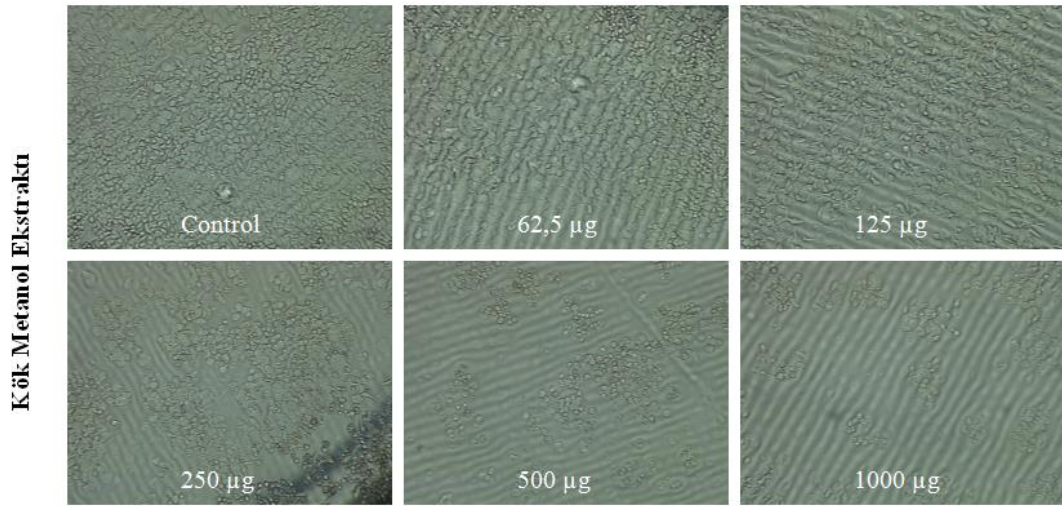


Şekil 4.35. *Daphne gnidioides* Yaprak HeLa 48h Hücre Hattı

Tablo 4.38. *Daphne gnidioides* Kök 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

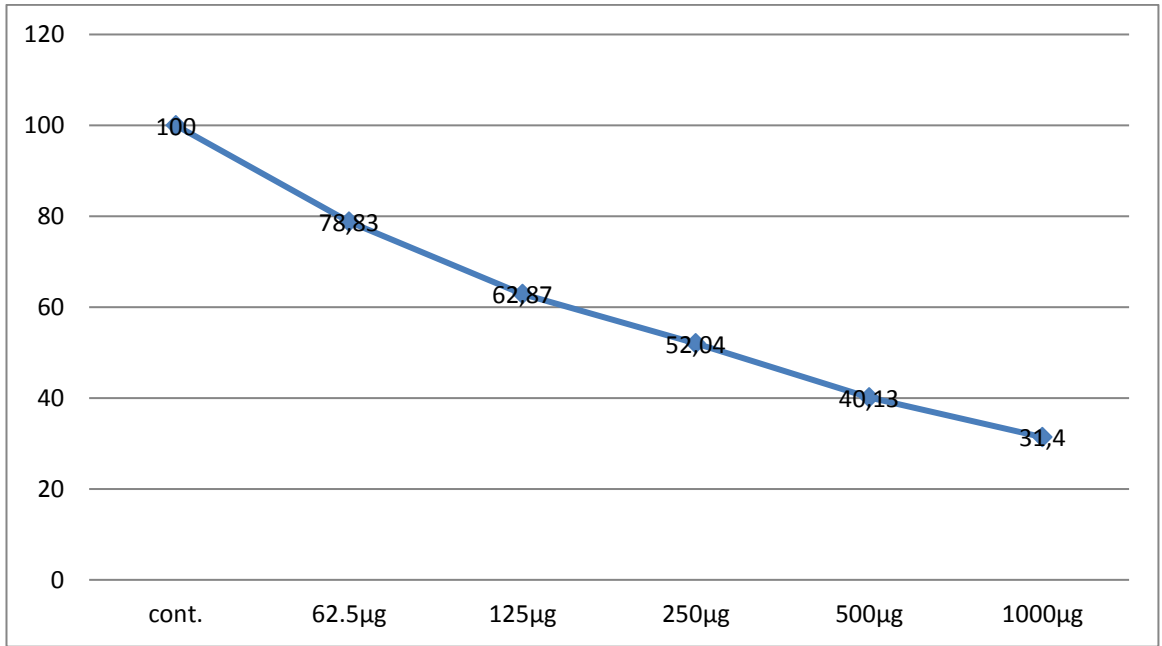


Daphne gnidioides bitkisinin kök ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %38,27'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.36'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.38).

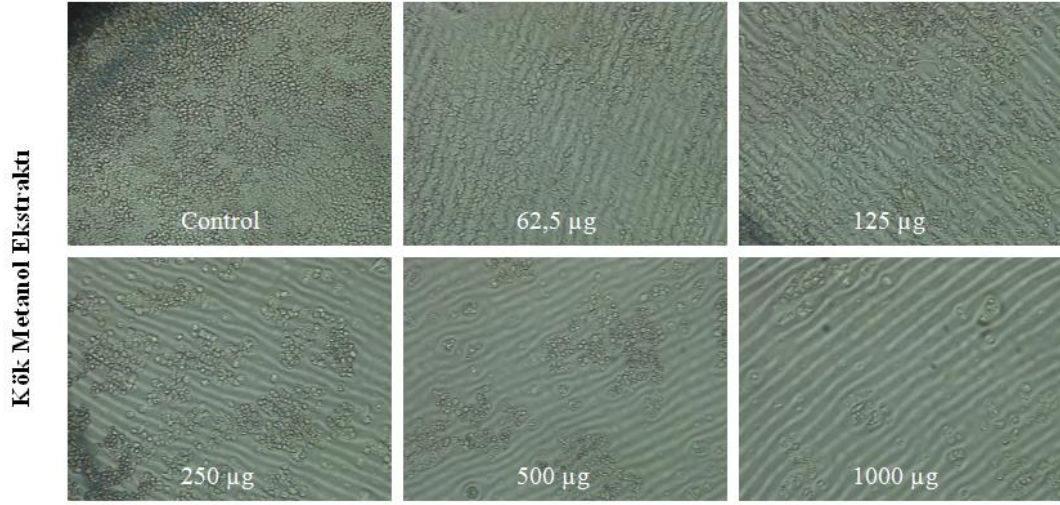


Şekil 4.36. *Daphne gnidioides* Kök HeLa 24h Hücre Hattı

Tablo 4.39. *Daphne gnidioides* Kök 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

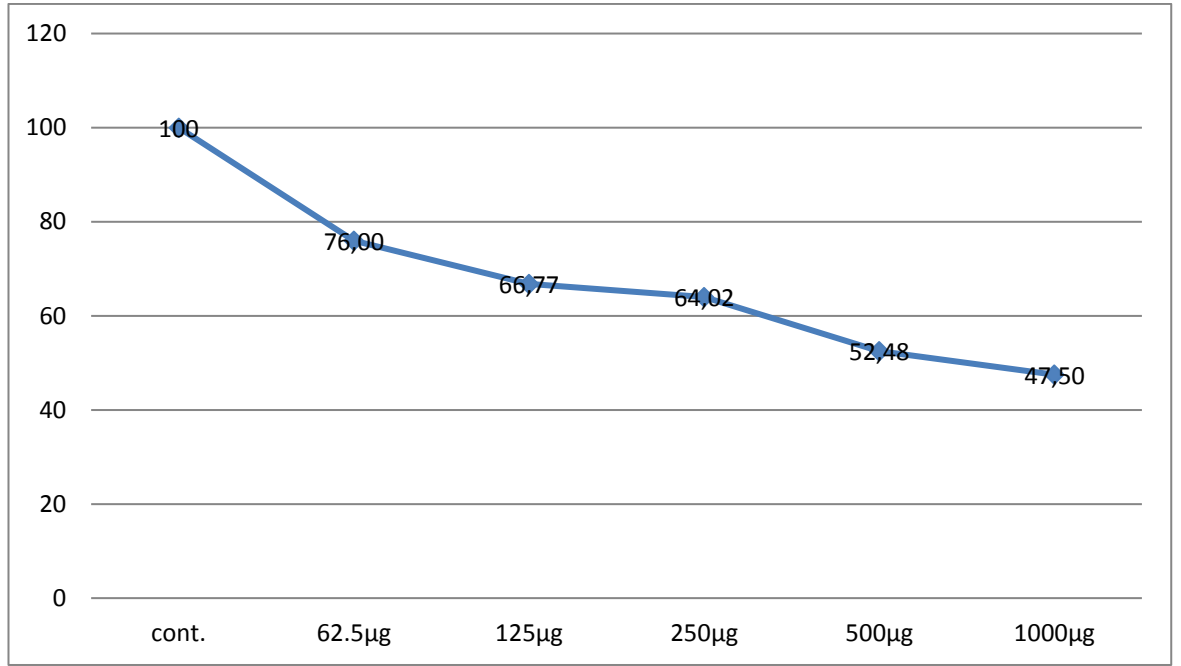


Daphne gnidioides bitkisinin kök ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %31,40'ının canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.37'de ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.39).

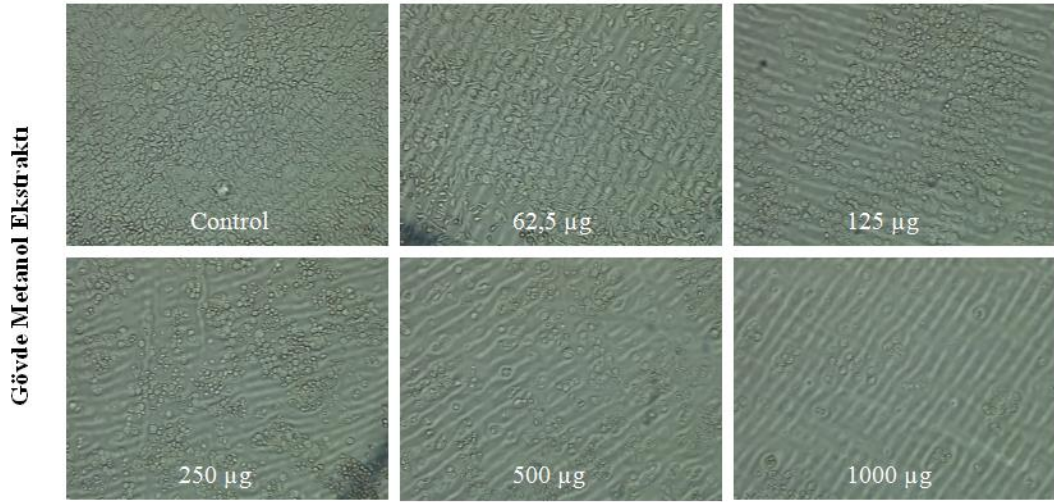


Şekil 4.37. *Daphne gnidioides* Kök HeLa 48h Hücre Hattı

Tablo 4.40. *Daphne gnidioides* Gövde 24h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi

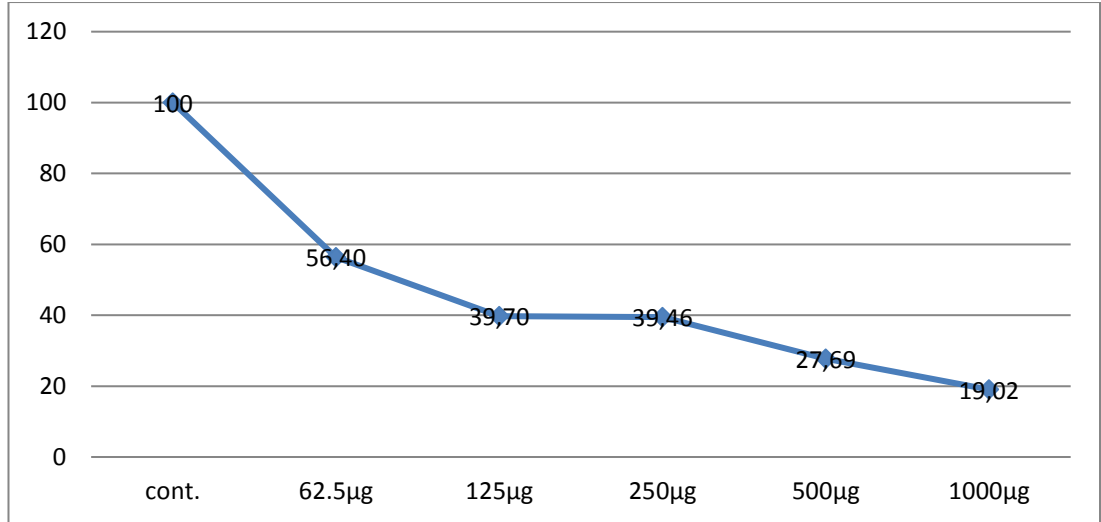


Daphne gnidioides bitkisinin gövde ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde yapılan muamelesi sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg de %47,50'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.38 'de ise 24. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.40).

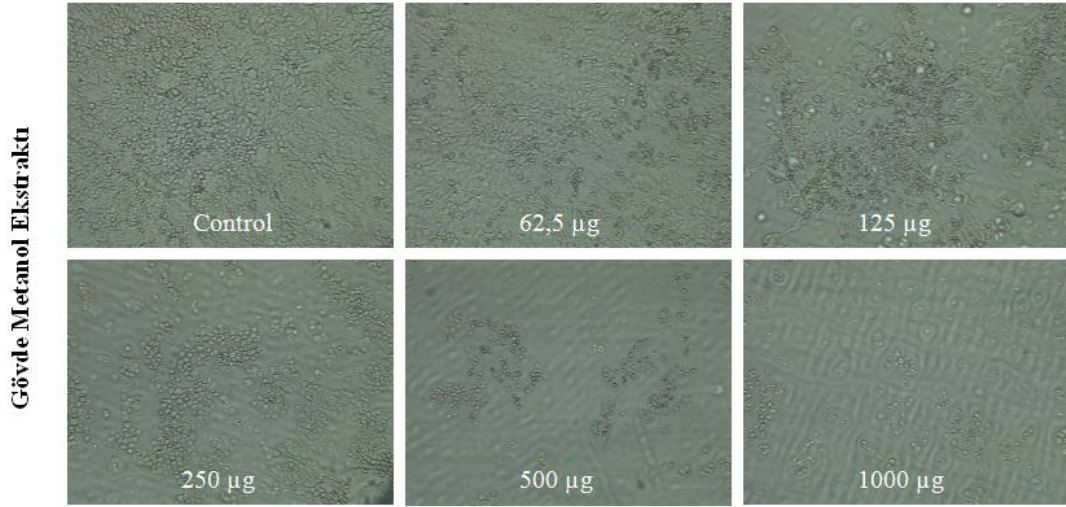


Şekil 4.38. *Daphne gnidioides* Gövde HeLa 24h Hücre Hattı

Tablo 4.41. *Daphne gnidioides* Gövde 48h HeLa Hücre Hattı Canlılık Yüzdesi



Daphne gnidioides bitkisinin gövde ekstraktının HeLa hücre hattı üzerinde yapılan muamele sonucunda kanser hücrelerinin 1000µg'da %19,02'sinin canlı kaldığı saptanmıştır. Şekil 4.39'da ise 48. saatteki hücre hattı görseline yer verilmiştir (Tablo 4.41).



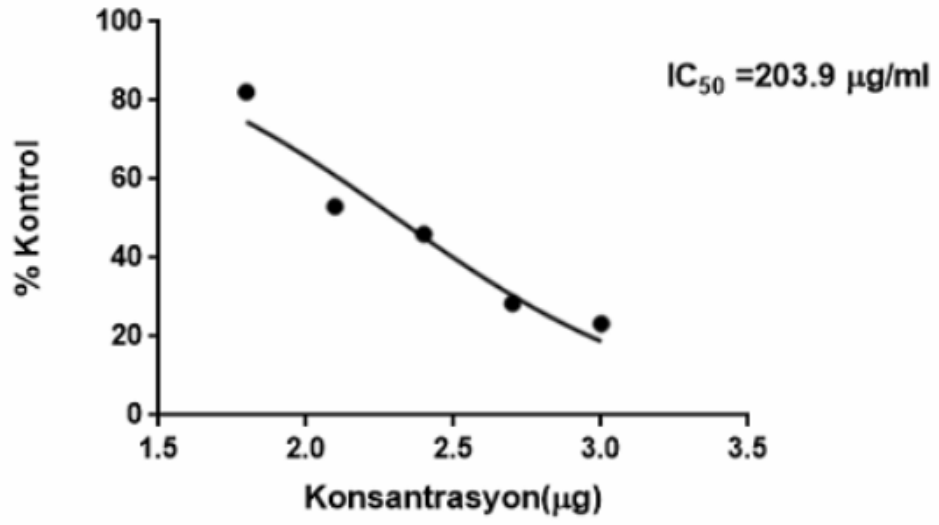
Şekil 4.39. *Daphne gnidioides* Gövde HeLa 48h Hücre Hattı

Elde edilen veriler sonucunda bitki özütlerinin daha çok 48. saatte etki ettiği, *Daphne gnidioides* bitkisinin gövde ekstraktı 48. saatte HeLa kanser hücresi hattına 1000µg'da en fazla etki ettiği görülmüştür.

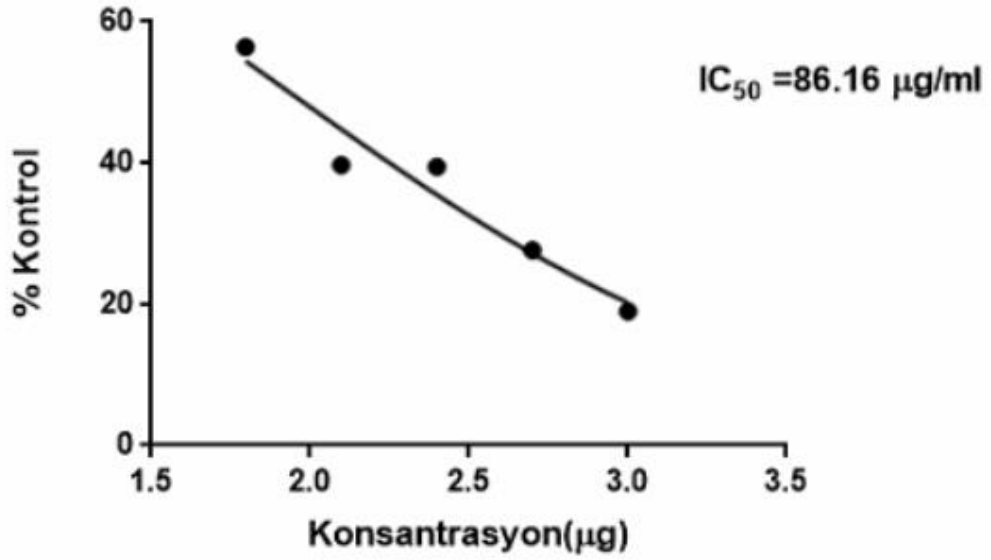
Gen İfadesinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının, kanser hücre hatlarındaki gen ifadesine etkilerini belirlemek için ilk önce IC50 değerleri hesaplanmıştır. Kanserli hücrelerin %50'sini öldürmesi için verilmesi gereken bitki ekstraktı miktarını öğrenmek için yapılan hesaplamalar sonucunda, MDA-MB 231 meme kanser hattı hücrelerinde istenilen değerlere ulaşamamış olup, ancak HeLa serviks kanseri hücre hattında sıyrımbağı bitkisinin 48.saat t3(kök) özütünde 203,9 µg ve sıyrımcık bitkisinin 48.saat t6(gövde) özütünde 86,16 µg olduğu bulunmuştur. Ardından bulunan miktarlar ile HeLa hücreleri muamele edilerek RNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve apoptoz veya otofaji yollarının hangisini tercih ettiğini görmek için PZR analizi yapılmıştır. IC50 değerlerinin grafik sonuçları verilmiştir (Tablo 4.42, Tablo 4.43).

Tablo 4.42. *Daphne pontica* HeLa 48h IC50 Sonucu

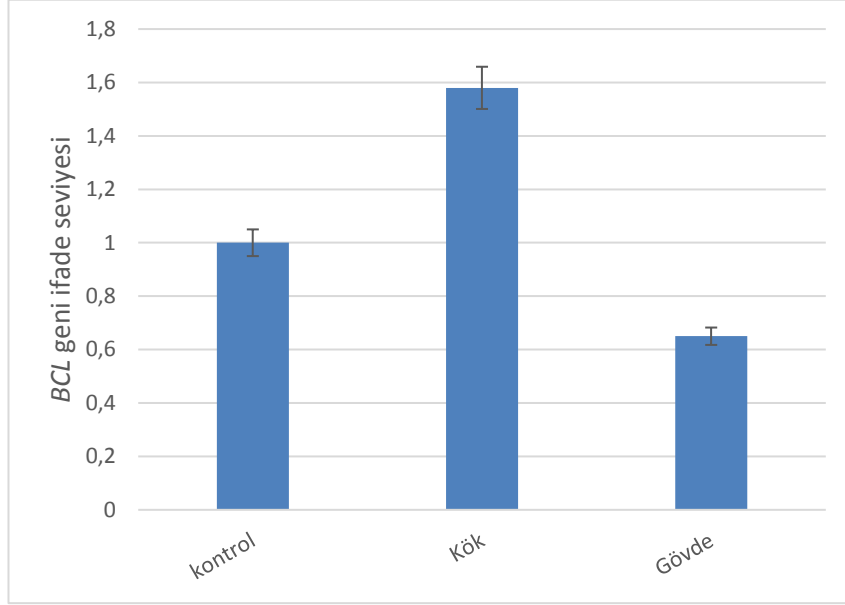


Tablo 4.43. *Daphne gnidioides* HeLa 48h IC50 Sonucu



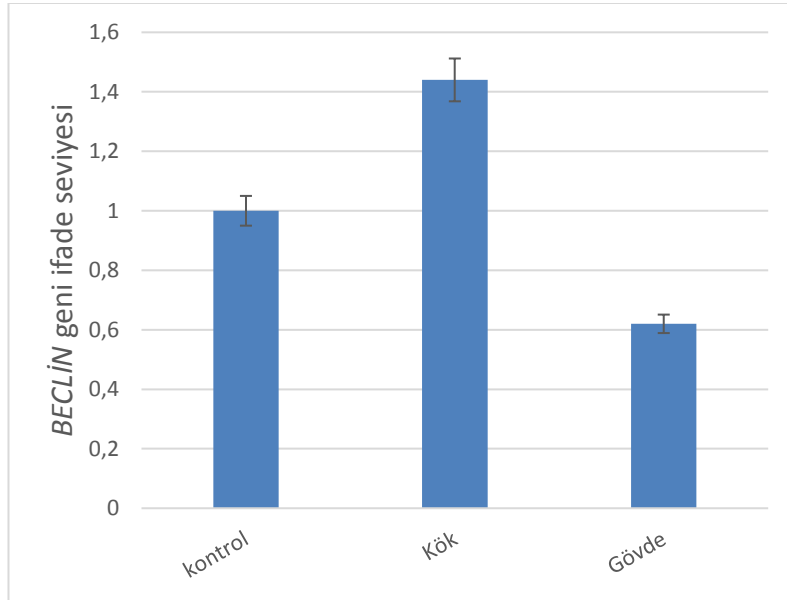
Elde ettiğimiz PZR analizi sonuçlarına göre;

Tablo 4.44. BCL Geni İfade Seviyesi



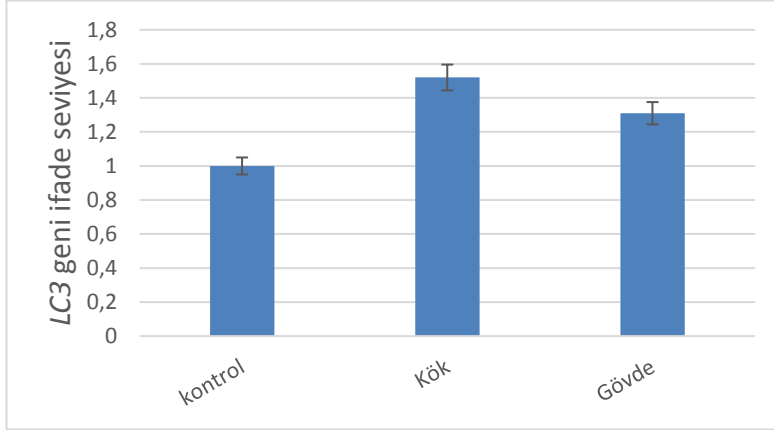
BCL geninin ifadesi, T3 (kök) özütünün verildiği hücrelerde artmıştır (Tablo 4.44, EK 7).

Tablo 4.45. BECLİN Geni İfade Seviyesi



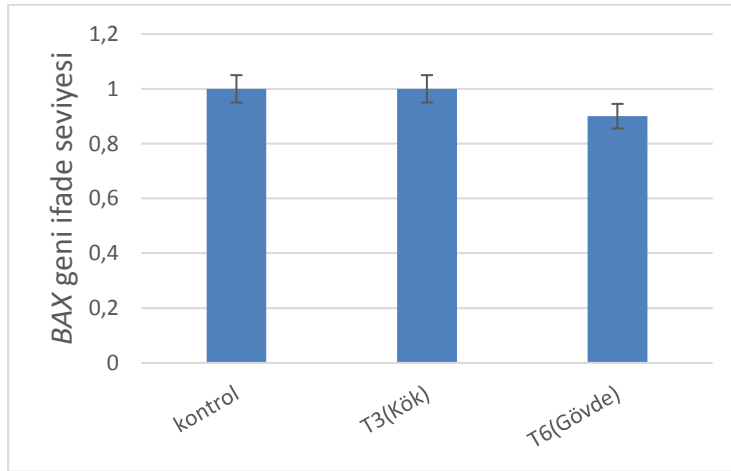
BECLIN geninin ifadesi T3 (kök) özütünün verildiği hücrelerde arttığı görülmüştür (Tablo 4.45, EK 7).

Tablo 4.46. LC3 Geni İfade Seviyesi



LC3 genin ifadesi T3 (kök) de en çok olduğunun yanı sıra T6 (gövde) özütünün verildiği hücrelerde de arttığı görülmüştür (Tablo 4.46, EK 7).

Tablo4.47. BAX Geni İfade Seviyesi



Bax geninin ifadesi T3 (kök) ve T6 (gövde) özütlerinin verildiği hücrelerde istenilen değişiklik olmadığı görülmüştür.

Gerçek zamanlı PZR sonuçlarında ifadesi artan genlerin otofaji ile alakalı olduğu bilinmektedir. Bu sonuçlara göre T3 (kök) bitki özütünün kanser hattı hücrelerini otofaji ölüm yolağına götürdüğü söylenebilir.

5. TARTIŞMA

Hücrelerin anormal bir şekilde büyümeleri ile tümörler oluşmaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanser çeşitlerinden bir tanesi de meme kanseridir. ABD’de kanser kaynaklı ölümlerin ikinci nedeni olan türdür. Meme kanseri görülme oranı dünyanın her yerinde her geçen gün artmaktadır. Bunun yanında serviks kanseri ise daha çok gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde en sık görülen bir türüdür. Her yıl dünyada sayısı hızla artmaktadır. Kadınlarda en çok görülen kanser sıralamasında meme kanseri ilk sırada yer almasına rağmen, yaşamı tehdit edici özelliği nedeniyle serviks kanseri, meme kanserinin önüne geçmektedir (Savran, 2014). Meme kanseri ve diğer kanser türlerine yönelik birçok kemoterapötik ajan geliştirilmiş olup, bu ajanların bazıları hücre içi sinyal iletim yolu inhibitörleri, bazıları anjiogenezis inhibitörleri, bazıları ise DNA sentez ve tamir inhibitörleri olarak görev yapmaktadır ve bazıları da mikrotübül oluşumuna engel olarak mitozu durdurmaktadır (Takemoto, 1998). Yapmış olduğumuz gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre *Daphne pontica* türünün kök ve *Daphne gnidioides* türünün gövde özütlерinin meme ve serviks kanser hücrelerini otofaji ölüm yolağına götürdüğü tahmin edilmektedir. *Daphne pontica* kök özütlünün kanserli hücreleri otofaji yolağına BECLİN, BCL ile ortak çalışarak götürdüğü için BCL gen ifadesi seviyesinin arttığı görülmüştür. Her iki bitki türünün de, LC3’ün otofaj yolundaki merkezi bir protein olduğu ve gen seviyesini artırdığı göz önüne alındığında otofaji ölüm yolağına götürdüğü düşünülmektedir.

Sırımbağı bitkisinde bulunun di hidrosibenzoik asiti bünyelerinde mevcut olan metaksi ve hidroksi gruplarının sayıları ve yerleşimlerine göre sınıflara ayrılmışlardır. Vanik asit, şiringik asit, protokateşvik asit, resarsisilik asit ve gallik asitin bu sınıfın üyeleri arasında olduğu saptanmıştır. Monohidroksi Beanzoatlar hidrosillenmeye ve hidrosil radikallerine karşı yüksek düzeyde reaksiyon gösterme eğiliminde oldukları için etkili hidrosil radikal süpürücüleri olduğu kanıtlanmıştır. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasına metilen grubu girmesiyle oluşan fenil asetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri antioksidan aktivite göstermişlerdir (Özenç, 2011). Yapmış olduğumuz antimikrobiyal aktivite deneylerinde de sıırımbağı bitkisinin yaprak ekstraktı güçlü bir aktivite göstermiştir. Galloyl-shikimic asit bitkilerde ve mikroorganizmalarda önemli bir biyokimyasal ara maddesi, sıırımbağı bitkisinin kök

ve yapraklarında bulunmuştur. Biyosentetik bir ara maddedir ve genellikle çok düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur. Grip ilacı yapımının hammaddesini oluşturmuştur. Bu nedenle sırimbağının ilaç olma potansiyeli artmış ve her iki kısmında da bulunduğu için hammadde arayışına alternatif olabilir. 5-O-caffeoylquinic asit sırimbağı bitkisinin kök kısmında bulunmuştur. Çok güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olan bileşik hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı oldukça iyi sonuç verdiği yapılan araştırmalarda görülmüştür (Bajko, 2016). Eskülin, sırimbağı bitkisinin her üç kısmında da bulunan bakteriyal enfeksiyonlar için kullanılan ilaçların hammaddesi olan bileşik olup, yaptığımız antimikrobiyal deneylerin sonucunun da bunu doğrular nitelikte olduğu görülmüştür. Procyanidin, hem saç gelişimi aksiyonunu hem de epitelyal hücre gelişimini destekleyici aktivitesini anagen fazına yönelten bir özelliğe sahip olduğu bu da procyanidin oligomerlerinin anagen özelliğinin etkilenmesine ve saç epitel hücre gelişimini sağladığı ve böylece de halk arasında kellik olarak bilinen androjenetik alopesi tedavisinde kullanılması düşünülmüştür. Sırimbağı bitkisinin kök kısmında bulunan bileşiğin sadece ilaç değil aynı zamanda tedavi amacıyla da hücre yenilenmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Sırimbağı bitkisi, kimyasal ve ilaçlara doğal bir alternatif olma konusunda, diğer Daphne türlerinde yapılan çalışmalara bakarak önemli bir aday konumundadır. Sıyırıcık bitkisinin kök ve gövde kısmında bulunan Apigenin, bir cilt kanseri kemokoruyucu ajanı olarak önemli vaadi olan bitki kökenli bir flavonoiddir. Apigenin, keratinosit farklılaşmasının bir belirteci olan inkucrin (hINV) ekspresyonunu inhibe eder, AP1 faktörü seviyesini ve AP1 faktörünün DNA elementlerine bağlanma oranını artıran bir protein kinaz Cdelta (PKCdelta), Ras, MEKK1 ve MEK3 kaskadı vasıtasıyla farklılaştırıcı ajanlarla arttırılmıştır. Yapılan gerçek zamanlı PZR analizleriyle kök ekstraktının serviks kanseri hücre hattını otofaji ölüm yolağına götürdüğü tahmin edilmektedir. Potansiyel kanser ilacı ve sentetik ilaçlara doğal bir alternatif olma konusunda çok güçlü bir adaydır. Liganlar, biyolojik aktivitelerde görev alan özellikle antioksidan aktivite, antitümör aktivite, antiviral aktivite, antibakteriyel olmak üzere birçok süreçte bulunan önemli kimyasallardır. Sıyırıcık bitkisinin gövde kısmında bulunan bileşik, yaptığımız antikanser deneyinde az miktarda en fazla kanser hücrelerine etki eden ekstrakttır. Çalışma yaptığımız her iki bitkide ve tüm bitki kısımlarında mevcut olan Pinoresinol, tıbbi bitkilerin genelinde bulunmuştur. Geleneksel tıpta, çürükler, kırıklar ve ödemler üzerine etki eden analjezik, antivirüs, antiinflamatuvar, homeostatik ve idrar söktürücü

ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Bir polifenolik bileşik olan Luteolin (3,4,5,7-tetrahidroksi flavon), flavonoidlerin alt sınıfındaki flavonlara aittir. Sıyırıcık bitkisinin gövde kısımlarında yoğunluklu olarak bulunan bileşik, özellikle kanserli hücreleri terapötik maddelere karşı hassaslaştırmıştır. Aynı zamanda kanserli hücreler için anti-tümör potansiyeli taşımaktadır. Kanserli hücreyi ölüm yolağına götürdüğü tahmin edilmektedir. Mevcut çalışmada yapılan gerçek zamanlı PZR deneyinde de gövde ekstraktının meme ve serviks kanseri hücrelerini ölüm yolağına taşıdığı görülmüştür. Sırımbağı bitkisinde yaprakta, sıyırıcık bitkisinde ise kökte bulunan Myricetin, antioksidan özelliği ile doğal olarak oluşan bir flavonoldür. İki benzen halkası A ve B'den oluşur. B halkası nükleotitle esnetme yapar ve bakteriyel DNA sentezini inhibe etmiştir. Myricetin, diyabetik sıçanlarda tert-butilhidroperoksit (t-BHP) tarafından üretilen oksidatif strese karşı koruyucu fonksiyon ortaya çıkarmış ve glutatyon peroksidaz (GPx) ve ksantin oksidaz (XO) enzim aktivitesini geliştirmiştir. Aynı zamanda, düşük yoğunluklu lipoprotein glikasyonunu azalttığı yapılan çalışmalar sonucunda gün yüzüne çıkartılmıştır (Geybels vd., 2013). Yapılan çalışmalar sonucunda Methylated flavonoid bileşiği verilen epilepsi hastası farelerin, epilepsi nöbetlerinde gözle görülür gerileme olduğu bildirilmiştir (Copmans, 2018). Methylated flavonoid ihtiva eden bitkiler içerisinde bulunan sıyırıcık ve sırımbağı bitkilerinin ilaç hammaddesi olma konusunda önemli bir adım atılmıştır. İleriki çalışmalarda epilepsi hastalığı üzerine gidilerek ilaç yapımında kullanılabilir olduğu düşünülmektedir. Liquiritigenin, mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve reaktif oksijen türlerinin üretimini artmasıyla SMM-721 kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği gösterilmiş bir flavanondur (Zhang vd.,2011). Çalışılmış olan bitkilerin her ikisinde de tüm kısımlarında bulunmuştur.

Daphne altaica Pall. (Thymelaeaceae), geleneksel Kazak Tıbbında uzun zamandır kanser ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanılmış tıbbi bir bitkidir. Potansiyelini sistematik olarak değerlendirmek için antikanser aktivitesi, altı farklı polarite ekstraktı yani: sulu, n-bütanol, etil asetat, kloroform, petrol eteri ve etanol ekstraktlarının bitkiden elde edilmesinin ardından dört insan kanseri hücre dizisi üzerindeki antiproliferatif etkileri açısından test edilmiştir. Proliferasyon testinden elde edilen sonuçlar, sulu ekstrakt hariç bütün ekstraktların, tüm kanser hücre hatları üzerinde doza bağlı bir büyüme inhibe edici etki sergilediğini göstermiştir (Kizaibek

vd., 2011). Bizim bitkilerimizin metanol özütlerinde de meme ve serviks kanser hattı üzerinde gözle görülür doza ve etki süresine bağlı olarak büyüme inhibe edici etkisi olduğu saptanmıştır. Chaouki ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yürütülen çalışmada kanserle ilgili etnobotanik kullanımı olan tanınmış bir Fas bitkisi olan *Daphne gnidium L.* ele alınmıştır. Meme kanserindeki potansiyel aktivitesini sistematik olarak değerlendirmek için, farklı polaritelere sahip bu bitkiden dört ekstrakt, MCF-7 hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri açısından test edilmiştir. Elde edilen bulgular, *Daphne gnidium L.*'nin potansiyel kemopreventif olarak ilgi çekebileceğini düşünülmektedir. Antiproliferatif etkiden sorumlu olan aktif ajanları izole etmek için başka çalışmalar da mevcuttur (Chaouki vd., 2009). Sırımbağı bitkisinin kök ve sıyrıcık bitkisinin gövde kısımlarının bir meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB 231 üzerinde 48. saatte antiproliferatif etkisinin olduğu görülmüş olup her iki bitkimiz için de antiproliferatif etkiden sorumlu olan ajanların izole edilebilmesi için çalışmalar yürütülebilme potansiyelinin olduğu saptanmıştır.

Sovrlić ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada ele alınan *Daphne alpina* bitkisi, yaprağının ve dallarının kuru kloroform ve metanol ekstraktları analiz için kullanılmıştır. Toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, belirlenmiş prosedürlerle saptanmıştır. Antioksidan potansiyeli çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal özellikleri mikrodilüsyon metodu ile elde edilmiştir. *D. alpina* özütlerinde mevcut olan en bol metabolitlerin tanımlanması için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmıştır. Ekstraktların fenolik bileşiklerden dolayı orta derecede antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sovrlić vd., 2015). Sırımbağı ve sıyrıcık bitkilerinin kimyasal içerik analizleri HPLC ile yapılmış olup her iki bitkide de bol miktarda metabolit saptanmıştır. Metabolitlerin yoğunluğu her kısma yayılmasına rağmen sırımbağı bitkisinin yaprak kısmında sıyrıcık bitkisinde ise gövdede biraz daha yoğun olduğu görülmüştür.

Balkan ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yürütülen çalışmanın amacı, *Daphne oleoides Schreber* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrakt/alt-ekstraktların in vitro anti-inflamatuar (nitrik oksit inhibitör etkileri), antioksidan (DPPH, ABTS + + ve FRAP testleri) ve antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştırmalı

olarak incelemektir. Toz haline getirilmiş hava kısımları önce metanol ile ekstre edilerek solvık ekstraksiyonları ile beş alt ekstrakt [(n-heksan, diklorometan (CH₂Cl₂), etil asetat (EtOAC), n-bütanol ve kalan su] ayrılmıştır. Ekstraktların kimyasal bileşimleri, toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ve yağ asidi bileşimleri açısından karşılaştırılmıştır. CH₂Cl₂ ve n-heksan ekstraktları, NO üretimi üzerinde en yüksek engelleyici etkiye yol açmıştır. N-heksan ekstraktının yağ asidi analizi, hegzadekanoik asit ve 9,15-oktodekadienoik asitlerin ana bileşenler olduğunu ortaya çıkarmıştır. N-heksan ve CH₂Cl₂ alt ekstraktları, en yüksek antimikrobiyal potansiyeli kullanmıştır (Balkan vd., 2017). İki bitkinin de flavonoid yönünden zengin maddeler içerdiği ve hegzadekanoik asit ve 9,15-oktodekadienoik asitlerin yoğun olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucu olarak iki bitkinin antimikrobiyal aktivitelerinin yüksek olması diğer çalışmalar ile uyumunu göstermiştir.

Oksidatif stres, asit, alkalın, UV ve ağır metaller gibi çeşitli stres faktörleri DNA'ya zarar verebilir. Hidroksil radikallerinin oluşturduğu ROS, karsinojenez, mutajenez ve sitotoksosite ile ilgili DNA iplikçik kopmasına neden olur (Golla ve Bhimathati, 2014). Mevcut çalışmada da, DNA hasarının Fenton reaksiyonunun aracılık ettiği oksidatif stres ile ölçülmesi hedeflenmiştir. Fenton ajanı ($Fe + 2 + H_2O_2 \rightarrow 3+ + OH^- + \cdot OH$), DNA, lipid ve protein gibi hücre bileşenlerine yüksek ölçüde hasar veren zararlı hidroksil radikalleri üretir. Özütlelimizin süpürücü etkisini ölçtüğümüzde ise iki farklı değerde (5mg-10mg) de DNA koruma aktivitelerinin olmadığı gözlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda yapılan gen ifadesi analizlerinde, sıyrıbağı bitkisinin kök özütünün aynı zamanda sıyrırcık bitkisinin gövde özütlerinin serviks kanser hattı hücrelerini otojafi ölüm yolağına yönelttiği görülmüştür. Her iki bitkinin kök, gövde ve yaprak özütleri meme ve serviks kanser hattı hücreleri üzerine yapılan MTT canlılık testinde 48. saatte en çok etki ettiği ve canlılıklarının en az olduğu saptanmıştır. Yapmış olduğumuz antimikrobiyal deneylerde ise sıyrırcık bitkisinin yaprak özütü MIC deneyi sonucunda Gram pozitif bir bakteri olan Alfa *Streptococcus haemolyticus* (9) bakterisinde 31,25µg'a kadar etki ettiği, sıyrıbağı bitkisinin yaprak özütünün ise çalıştığımız Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin tümüne etki ettiği sonucuna ulaşılmıştır. IC50 değerinin 86,16 µg olarak çıktığı sıyrırcık bitkisinin gövde özütünün en düşük değerde en yüksek etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Literatür taramamız sonucunda yapılan çalışmalar ile bizim yapmış olduğumuz çalışmalar arasında çok büyük benzer sonuçlar olduğu görülmektedir. Sırımbağı ve sıyircık bitkilerinde bulunan kimyasal içeriklerin birçoğu insanlar için yararlı ve yakın zamanda oluşan ve çok hızlı bir şekilde ilerleyen sentetik ilaçlarda kullanılmaktadır. Elde edilen biyolojik aktivite sonuçlarına göre mevcut çalışmadaki bitkilerin ilaç ham maddesi olma potansiyeli yüksektir. Bunun yanında bu bitkilerden kemoterapik ajan olarak doğal ve hiçbir yan etkisi olmadan kullanabilecek ilaçlar da üretilebilir. Mevcut çalışmanın yakın zamanda önemi daha çok açığa çıkan yerli ilaç üretimine de büyük katkılarının olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Baba, K., (1993) Taniguchi, M. & Kozawa, M. "A Third Spirobi flavonoid Genkwanol C from *Daphne genkwa*" *Phytochemistry*, 33, 913-916
- Balkan, İ., (2017) A., Taşkın, T., Doğan, H. T., Deniz, İ., Akaydın, G., & Yesilada, E. A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potentials of sub. extracts from the aerial parts of *Daphne oleoides* Schreb. *Industrialcropsandproducts*, 95, 695-703.
- Bajko, E., (2016) Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejszyk, L., & Lewandowski, W. 5-O-Caffeoylquinic acid: A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 471-479.
- Bayramoğlu, M. (2009) M., Toksoy, D., & Şen, G., Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti. Ormancılıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi 19-21 Şubat 2009, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Baytop, T., (1984), Türkiye’de Bitkiler Tedavi ile, Sanal Basımevi, İstanbul.
- Bingöl, F. (1989). Diterpenler ve Biyolojik Aktiviteleri. *FABAD J. Pharm. Sci*, 14, 94-104.
- Copmans, D., (2018) Orellana-Paucar, A. M., Steurs, G., Zhang, Y., Ny, A., Foubert, K., & Dehaen, W. Methylated flavonoids as anti-seizure agents: Naringenin 4', 7-dimethyl ether attenuates epileptic seizures in Zebra fish and mouse models. *Neurochemistry international*, 112, 124-133.
- Chaabane, F., (2014) Krifa, M., Matera, E., Loussaief, A., Dijoux-Franca, M. G., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. *In vitro* antileukaemic activity of Extracts from *Daphne gnidium* leaves against sensitive and multidrug resistant K562/R7 cells. *TumorBiology*, 35(9), 8991-8998.
- Chaabane, F., (2013) Pinon, A., Simon, A., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. Phytochemical potential of *Daphne gnidium* in inhibiting growth of Melanoma cell sanden hancing melano genesis of B16-F0 melanoma. *Cell biochemistryandfunction*, 31(6), 460-467.

- Chaouki, W., (2009) Leger, D. Y., Liagre, B., Cherrah, Y., Beneytout, J. L., & Hmamouchi, M. Roots of *Daphne genkwa* L. Inhibit cell proliferation and induce apoptosis in The human breast cancer cell line MCF-7. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(8), 542-546.
- Çorbacı, Ö. (2017) Yazgan, M.E. Özyavuz, & M. Kurakçıl Peyzaj (Xeriscape) ve Uygulamaları,
- Doğanca, S., (1986) & Apak, S., “*Daphne pontica* L. Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar” Mar. Üniv. Ecz. Der., 2, 157-160
- Dong, X., (2016) Yang, C., Xu, G., Cao, S., Fu, J., Lin, L., & Ni, J. Chemical Constituents from *Daphne genkwa* and their contents simultaneously determined by HPLC. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Du, W. J., (2016) Yang, X. L., Song, Z. J., Wang, J. Y., Zhang, W. J., He, X., & Wang, C. Z. Antitumor activity of total flavonoids from *Daphne genkwa* in colorectal cancer. *Phytotherapy research*, 30(2), 323-330.
- Eminağaoğlu, Ö., (2015) Akyıldırım Beğen, H., & Aksu, G. Artvin’in Flora ve Vejetasyon Yapısı, s 27-51. Şu eserde: Eminağaoğlu, Ö.(Ed.), Artvin’in Doğal Bitkileri. İstanbul: Promat.
- Geybels, M. S., (2013) Verhage, B. A., Arts, I. C., Van Schooten, F. J., Goldbohm, R. A., & Van Den Brandt, P. A. Dietary flavonoid intake, black tea consumption, and risk of overall and advanced stage prostate cancer. *American journal of epidemiology*, 177(12), 1388-1398.
- Güner, A. (2012) (ed.) Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), NGBB Yayınları, İstanbul,
- Gürbüz, İ., (2013) Demirci, B., Franz, G., Başer, K. H. C., Yeşilada, E., & Demirci, F. Comparison of the volatiles of *Daphne genkwa* L. and *D. oleoides schreber* subsp. *Oleoides* isolated by hydro- and micro distillation methods. *Turkish Journal of Biology*, 37(1), 114-121.
- Grubešić, R. J., (2012) Kremer, D., Končić, M. Z., Rodríguez, J. V., & Randić, M. Quantitative analysis of poly phenols and antioxidant activity in Four *Daphne* L. species. *Central European Journal of Biology*, 7(6), 1092-1100.

- Hedayati, M., (2003) Yazdanparast, R., Fasihi, H., & Azizi, F. Anti-tumor Activity of *Daphne mucronata* Extract and its Effects on TNF- α Receptors and TNF- α Release in Cultured Human Monocytes. *Pharmaceutical Biology*, 41(3), 194-198.
- Hedayati, M., (2011) Yazdanparast, R., Yeganeh, M. Z., Rad, L. H., & Azizi, F. A New diterpene extracted from *Daphne mucronata*, effects on human K562 and CCRF-CEM cell lines. *Journal of Cancer Therapy*, 2(01), 71.
- Hong, J. Y., (2010) Nam, J. W., Seo, E. K., & Lee, S. K. Daphne diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(2), 234 - 237.
- Huang, S. Z., (2012) Zhang, X. J., Li, X. Y., Jiang, H. Z., Ma, Q. Y., Wang, P. C., & Zhao, Y. X. Phenols with anti-HIV activity from *Daphne acutiloba*. *Plantamedica*, 78(02), 182-185.
- Huang, S. Z., (2012) Zhang, X. J., Li, X. Y., Kong, L. M., Jiang, H. Z., Ma, Q. Y., & Zhou, J. Daphne-type diterpene esters with cytotoxic and anti-HIV-activities from *Daphne acutiloba* Rehd. *Phytochemistry*, 75, 99-107.
- Jo, S. K., (2012) Hong, J. Y., Park, H. J., & Lee, S. K. Anti cancer activity of novel daphne diterpenoids from *Daphne genkwa* through cell-cycle arrest and suppression of Akt/STAT/Src signaling in human lung cancer cells. *Bio molecules & therapeutics*, 20(6), 513.
- Kahraman, A., (2002) Serteser, M., & KOKEN, T. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3(1).
- Kalaycıoğlu, A., (1994) & Öner, C. Bazı bitki ekstraktlarının antimutajenik etkilerinin Ames-Salmonella test sistemi ile araştırılması. *Tr. Botany*, 18, 117-122.
- Kizaibek, M., (2011) Daniar, M., Li, L., & Upur, H. Antiproliferative activity of different extracts from *Daphne altaica* Pall. on selected cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3448-3452.

- Kizaibek, M., (2015) Pferschy-Wenzig, E. M., Kretschmer, N., Hamburger, M., & Bauer, R. LC-MS-based phytochemical characterization of an antiproliferative *Daphne altaica* stem bark extract. *Planta Medica*, 81(16), PM_114.
- Kumar, S., (2013) Bajwa, B. S., Kuldeep, S., & Kalia, A. N. Anti-Inflammatory activity of herbal plants: a review. *Int J Adv Pharm Biol Chem*, 2(2), 272-281.
- Kupeli, E., (2007) Tosun, A., & Yesilada, E. Assessment of anti-inflammatory and Antinociceptive activities of *Daphne pontica* L. (Thymelaeaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 332-337.
- Li, S., (2013) Chou, G., Hseu, Y., Yang, H., Kwan, H., & Yu, Z. Isolation of anti cancer constituents from flos genkwa (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) through bioassay-guided procedures. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 159.
- Özenç, B. (2011). *Fumaria officinalis*' un antioksidan aktivitesinin Belirlenmesi (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Pan, L., (2010) Zhang, X. F., Deng, Y., Zhou, Y., Wang, H., & Ding, L. S. Chemical constituent investigation of *Daphne tangutica*. *Fitoterapia*, 81(1), 38-41.
- Pareek, R. K. (2014). Review article on anti-inflammatory activity of various herbal plants and various animal models. *Journal of Drug Discovery And Therapeutics*, 2(21).
- Park, B. Y., (2007) Min, B. S., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Joung, H., Bae, K. H., & Oh, S. R. *Daphne* diterpene esters isolated from flower buds of *Daphne genkwa* induce apoptosis in human myelocytic HL-60 cells and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma (LLC)-inoculated mouse model. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 496-503.
- Sadeghi, H., (2003) & Yazdanparast, R. Anti-tumor activity and cell cycle arrest of a new diterpene ester from *Daphne mucronata* using k562 cells. *Iranian Biomedical Journal*, 7(3), 127-131.
- Sanda, M. A., (2015) Zengin, G., Aktumsek, A., & Cakmak, Y. S. Evaluation of Antioxidant potential of two *Daphne* species (*D. gnidioides* and *D. Pontica*) from Turkey. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 4878- 494.

- Sovrlić, M., (2015) Vasiljević, P., Jušković, M., Mašković, P., &Manojlović, N. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial profiles of extracts of *Daphne alpina* (Thymelaeaceae) leaf and twig from Mt Kopaonik (Serbia). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(7), 1239-1248.
- Savran, B., (2014) A. Yerlikaya, E. Erdoğan & O. Genç "Anticancer agent ukrain and bortezomib combination is synergistic in 4T1 breast cancer cells." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 14(3): 466-472.
- Sun, Q., (2016) Wang, D., Li, F. F., Yao, G. D., Li, X., Li, L. Z., &Song, S. J. Cytotoxic prenylated flavones from the stem and root bark of *Daphne giraldii*. *Bioorganic&medicinal chemistry letters*, 26(16), 3968-3972.
- Şener, B., (1987) & Mutlugil, A. Doğal Kumarinler, Kimyasal Yapıları ve Biyolojik Aktiviteleri. *FABAD J. Pharm. Sci*, 12, 99-114.
- Takemoto, D.J., (1982) Dunford, C., Vaughn, D., Kramer, K.J., Smith, A., & Powell, R.G. "Guanylate Cyclase Activity in Human Leukemic and Normal Lymphocytes" *Enzyme*, 27, 179-188
- Tan, A., (1992) Türkiye’de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik Kaynakları, *Anadolu Journal of ARI*, 2, 50-64.
- Taninaka, H., (1995) Takaishi Y, Honda G, Imakura Y, Sezik E, & Yeşilada E. "Terpenoids and Aromatic Compounds from *Daphne oleoides* ssp. *oleoides*" *Phytochemistry*, 38, 1021-1022 The Flora of Keltepe Area;
- Tosun, A. (1995) "Daphne pontica Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" Yüksek Lisans Tezi, Ankara
- Takemoto, D.J., (1982) Dunford, C., Vaughn, D., Kramer, K.J., Smith, A., & Powell, R.G. "Guanylate Cyclase Activity in Human Leukemic and Normal Lymphocytes" *Enzyme*, 27, 179-188
- Ullah, N, (1999) Ahmed S, & Malik A. "A Dicoumarin Glycoside from *D. oleoides*" *Phytochemistry*, 51, 99-101.

Ulubelen, A., (1990) Tan, N., & Tuzlacı, E. "Constituents of *Daphne mucronata*" *Fitoterapia*, 61, 1281

Ulubelen, A., (1986) Terem, B., & Tuzlacı, E. "Coumarins and Flavonoids from *Daphne gnidioides*" *J. Nat. Prod.*, 49, 692-694

Winston, J. C., (1999) Health-promoting properties of common herbs, *American Journal of the Clinical Nutrition*, 70(Supplements), 491-499.

Yazdanparast, R., (2010) & Moosavi, M. A. Gnidilati monoein from *Daphne mucronata* induced differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 76-76.

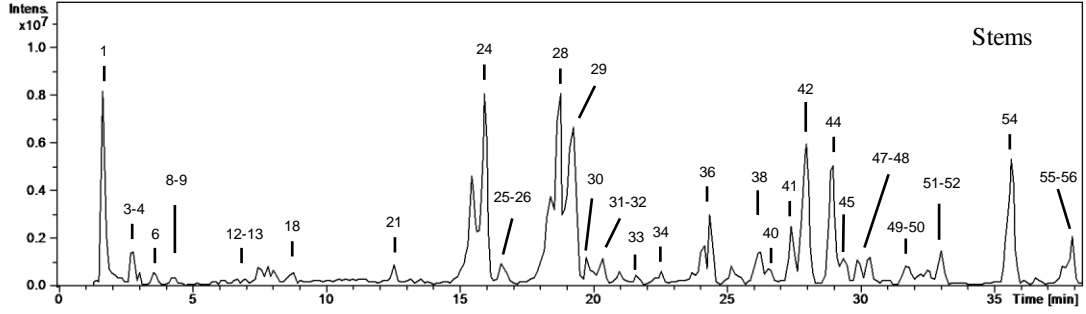
Yazdanparast, R., (2003) & Sadeghi, H. Antineoplastic effects of *Daphne mucronata* inhibition of DNA and RNA synthesis. *Acta Medica Iranica*, 202-206.

Zhang, S. P., (2009) Zhou, Y. J., Liu, Y., & Cai, Y. Q. Effect of liquiritigenin, a flavanone existed from *Radix glycyrrhizae* on pro-apoptotic in SMMC- 7721 cells. *Food and chemical toxicology*, 47(4), 693-701.

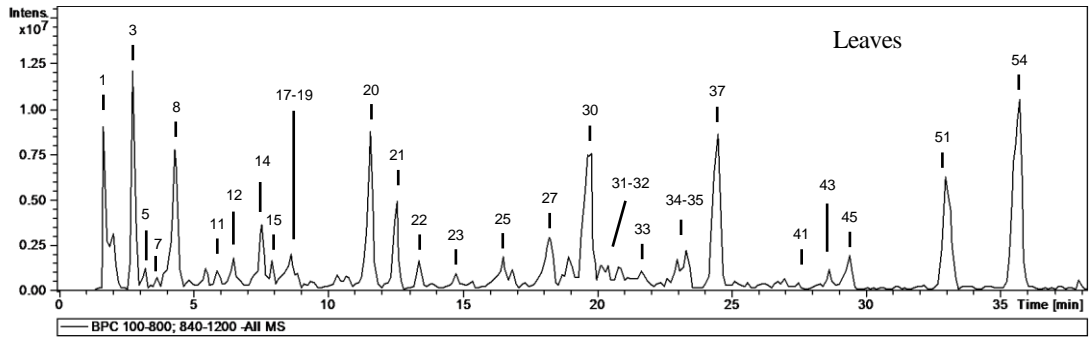
Zhang, S., (2006) Li, X., Zhang, F., Yang, P., Gao, X., & Song, Q. Preparation of yuanhu acine and relative *Daphne* diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure–activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(11), 3888- 3895.

EKLER

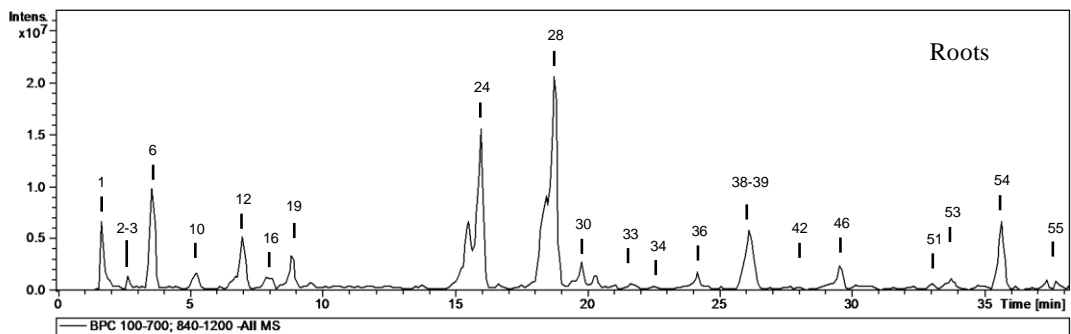
EK.1 *D. pontica* gövde ekstraktı kimyasal içerik analizi



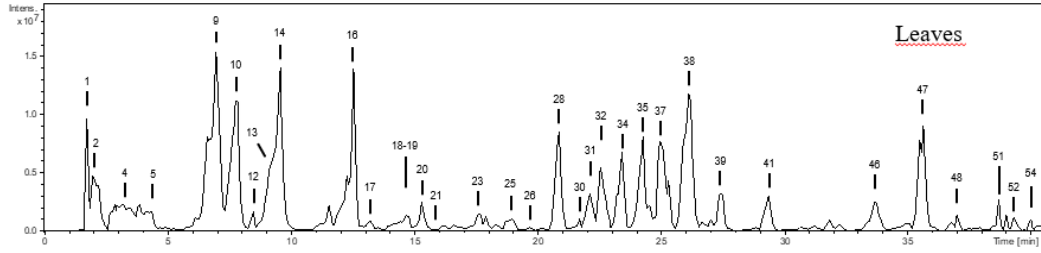
EK.2 *D. pontica* yaprak ekstraktı kimyasal içerik analizi



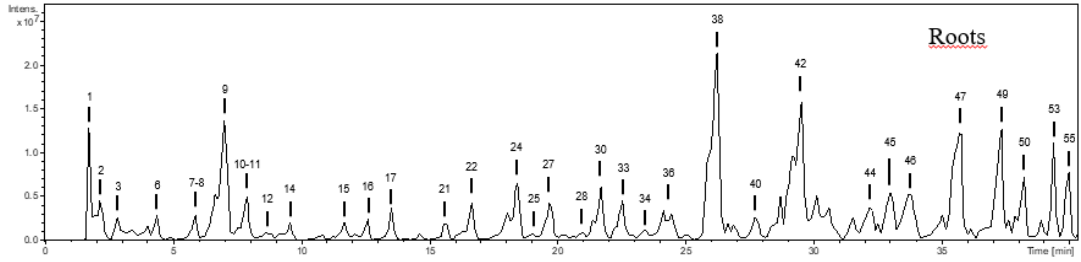
EK.3 *D. pontica* kök ekstraktı kimyasal içerik analizi



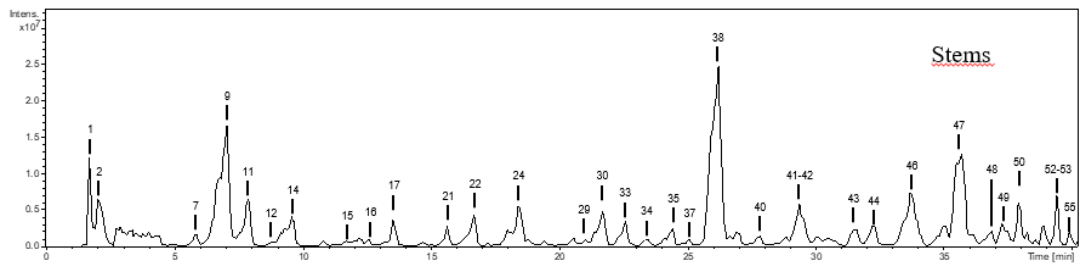
EK.4 *D. gnidioides* yaprak ekstraktı kimyasal içerik analizi



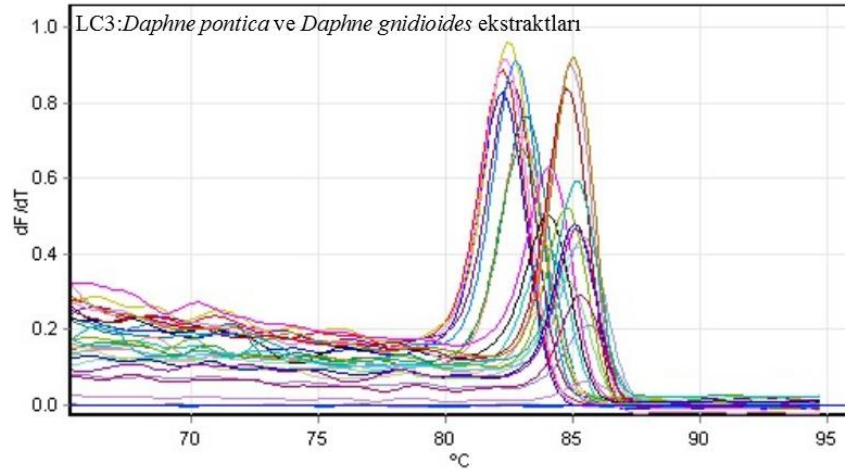
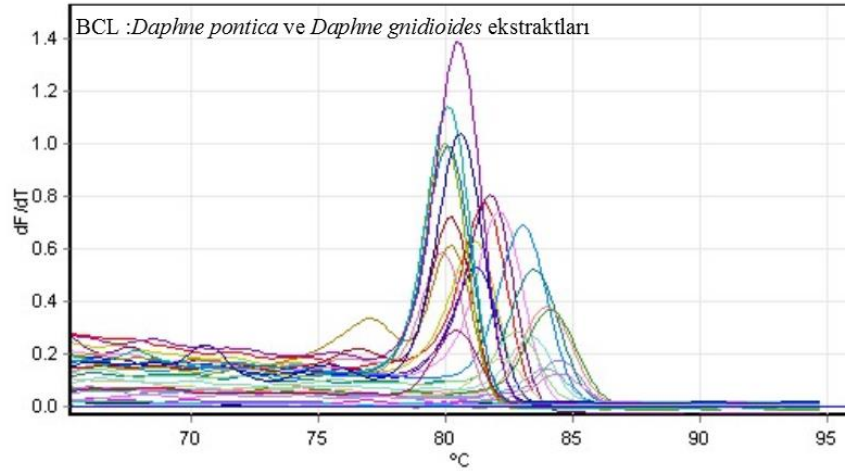
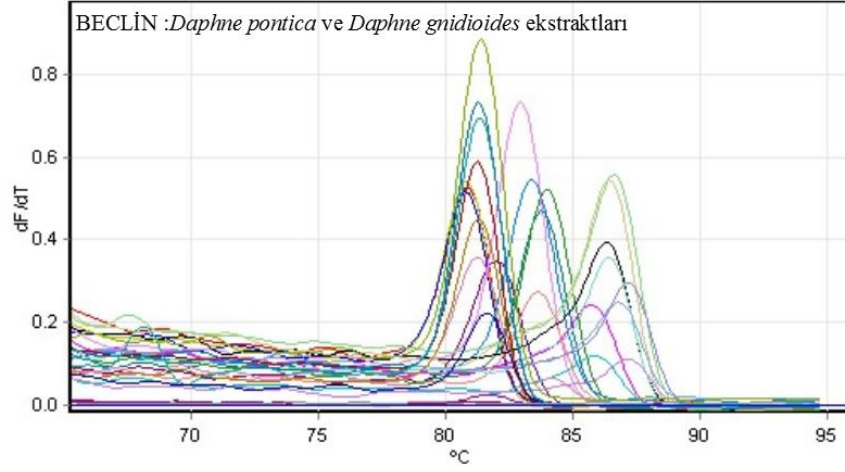
EK.5 *D. gnidioides* kök ekstraktı kimyasal içerik analizi



EK.6 *D. gnidioides* gövde ekstraktı kimyasal içerik analizi



EK.7 Gerçek zamanlı pzt ifadesi eğri grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tevfik Hasan CAN
Doğum Yeri ve Yılı : Manisa, 1995
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : hasantevfik.can@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Bodrum Hayırlı Sabancı Anadolu Lisesi (2009-2013)

Lisans : Kastamonu Üniversitesi / Genetik ve Biyomühendislik (2013-2017)