

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İKİ ENDEMİK SİDERİTİS TÜRÜNDE FITOKİMYASAL VE
BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

DOKTORA TEZİ

Rümeysa YÜCER

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

TEMMUZ 2022

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İKİ ENDEMİK SİDERİTİS TÜRÜNDE FİTOKİMYASAL VE
BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

DOKTORA TEZİ

Rümeysa YÜCER
(140406113)

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı
Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Doktora Programı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

TEMMUZ 2022

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 140406113 numaralı Doktora Öğrencisi Rümeysa YÜCER, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “İKİ ENDEMİK SİDERİTİS TÜRÜNDE FİTOKİMYASAL VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Murat Kartal**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Evrim Kepekçi
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Leyla Bitiş
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet Ceyhan Gören
Gebze Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 5 Ağustos 2022
Savunma Tarihi : 5 Temmuz 2022



Aileme;

ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarım boyunca desteğini ve samimiyetini yakinen hissettiğim, alanındaki tecrübesi ve bilgisi ile önümü aydınlatan danışman hocam, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya teşekkür ederim.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Fitoterapi Merkezinde engin birikiminden yararlandığım ve bana sektöre yönelik pratik tecrübe kazandıran hocam Prof. Dr. Murat Kartal'a teşekkür ederim.

Bitki temini konusunda yardımcı olan Prof Dr Yüksel Kan'a, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesindeki asistan arkadaşlarıma ve beni destekleyen öğretim görevlisi hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora tezimin bir kısmını yurt dışındaki bir laboratuverda gerçekleştirmek için yazdığım projemi destekleyen TUBİTAK'a, Almanya'da geçirdiğim süre boyunca ufku ve vizyonu ile bir çok kez yolumu açan Johannes Gutenberg Üniversitesi, Farmasötik ve Biyomedikal Bilimler Enstitü müdürü Prof. Dr. Thomas Efferth'e teşekkür ederim.

Bu zor, meşakkatli ve uzun süren yolculuğumun her anında yanımda duran, her daim varlıklarını hissettiren sevgili ailemin her bir üyesine ve manevi erkek kardeşime teşekkür ederim.

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 12.2017/45 numaralı proje, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü TAGEM-15/Ar-ge-54 numaralı proje ve TUBİTAK 2214A burs programı kapsamında desteklenmiştir.

Haziran 2022

Rümeysa Yücer

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Rümeysa Yücer

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür Araştırması	2
1.2.1 Lamiaceae familyası	2
1.2.2 <i>Sideritis</i> cinsi.....	2
1.2.3 Fitokimyasal açıdan <i>Sideritis</i> türleri	3
1.2.4 Geleneksel kullanım	7
1.2.5 <i>Sideritis</i> cinsine ait moleküllerde farmakolojik aktivite	8
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
2.1 Ekstrelerin Hazırlanması	15
2.1.1 Maserasyon	15
2.1.2 Sıvı-sıvı ekstraksiyon.....	16
2.2 Saflaştırma.....	16
2.2.1 Kolon kromatografisi teknikleri.....	16
2.2.2 İnce tabaka ve preparatif ince tabaka kromatografisi (İTK ve p-İTK)	17
2.2.3 Nükleer manyetik rezonans (NMR).....	18
2.2.4 <i>Sideritis congesta</i> diklorometan ekstresinin saflaştırılması.....	18
3.2.2 <i>Sideritis stricta</i> butanol ekstresinin saflaştırılması	19
2.3 LC-HRMS Tayini.....	21
2.3.1 HPLC şartları	21

2.3.2 MS şartları (Kütle Spektrometresi).....	22
2.4 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları	22
2.4.1 Resazurin testi.....	22
2.4.2 WST-1 testi.....	24
2.5 Şurup Formülasyonu	25
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	26
3.1 Ekstraksiyon	26
3.2 <i>Sideritis congesta</i> Bitkisinden Saflaştırılan Maddeler	26
3.2.1 7-Epicandicandiol	26
3.2.2 Foliol.....	28
3.2.3 Linearol.....	29
3.3 <i>Sideritis stricta</i> Bitkisinden Saflaştırılan Maddeler	31
3.3.1 4'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F1)	31
3.3.2 Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F2)	32
3.3.3 4'-O-methylisoscuteallarein-7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F3)	33
3.3.4 3'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F4)	34
3.4 LC-HRMS Sonuçları	37
3.5 Sitotoksik Aktivite Sonuçları	39
3.5.1 Resazurin testi sonuçları	39
3.5.2 WST-1 testi sonuçları	41
3.6 Şurup Formülasyonu	44
4. SONUÇ.....	46
KAYNAKÇA	49
EKLER.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	88

KISALTMALAR

¹H-NMR	: Hidrojen nükleer manyetik rezonans
¹³C-NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans
APT	: Bağlanmış proton testi
TMS	: Tetrametilsilan
HMQC	: Heteronükleer tek kuantum korelasyon spektroskopisi
HMBC	: Heteronükleer çoklu bağ korelasyon spektroskopisi
COSY	: Korelasyon spektroskopisi
MS	: Kütle spektrometresi
ESI-MS	: Elektron spray iyonlaşma kütle spektroskopisi
LC-HRMS	: Sıvı kromatografisi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
p-İTK	: Preparatif ince tabaka kromatografisi
KK	: Kolon kromatografisi
MeOH	: Metanol
BuOH	: Butanol
CHCl₃	: Kloroform
CDCl₃	: Dötero-kloroform
CD₃OD	: Dötero-metanol
DCM	: Diklorometan
EtOAc	: Etil Asetat
FBS	: Fetal bovin serum
SS	: <i>Sideritis stricta</i>
SC	: <i>Sideritis congesta</i>
SCD	: <i>Sideritis congesta</i> diklorometan
SSBu	: <i>Sideritis stricta</i> butanol
Sin	: Sinonim
VLC	: Vakum likit kromatografisi
g	: Gram
mg	: Miligram
U	: Ünite
nm	: Nanometre
dk	: Dakika
sa	: Saat
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µg	: Mikrogram

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
δ	: Kimyasal kayma
α	: Alfa
β	: Beta



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 : <i>S. congesta</i> 'dan izole edilmiş maddeler.....	6
Tablo 1.2 : <i>S. stricta</i> 'dan izole edilmiş maddeler.	7
Tablo 1.3 : <i>S. congesta</i> bitkisi üzerinde yapılmış aktivite çalışmaları.	12
Tablo 1.4 : <i>S. stricta</i> bitkisi üzerinde yapılmış aktivite çalışmaları.	13
Tablo 2.1 : Kolon gradient akış tablosu.	21
Tablo 3.1 : Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstre miktarları.	26
Tablo 3.2 : Foliole ve 7- Epicandicandiol moleküllerinin spektral verileri.	30
Tablo 3.3 : Saflaştırılan flavonoid glikozitlerinin ¹³ C-NMR spektrum verileri.....	35
Tablo 3.4 : Saflaştırılan flavonoid glikozitlerinin ¹ H-NMR spektrum verileri.....	36
Tablo 3.5 : <i>S. congesta</i> ekstralarında tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg ekstre).....	37
Tablo 3.6 : <i>S. stricta</i> ekstralarında tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg ekstre).....	38
Tablo 3.7 : Maddelerin Resazurin testi ile belirlenen IC ₅₀ değerleri.	41
Tablo 3.8 : Ekstrelerin ve maddelerin WST-1 testi ile belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	43

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Sideritis cinsi kütüphanesi. Literatürde var olan, Sideritis cinsinden izole edilip yapısı aydınlatılmış, sıvı veya gaz kromatografisi ile tespit edilmiş maddelerin sayısal olarak grafikte gösterimi	5
Şekil 2.1 : Ekstraksiyon şeması	15
Şekil 2.2 : S. congesta DCM ekstresi [27-28] fraksiyonun silika kolona uygulanması ile alınan İTK görseli ve linearol spotları	19
Şekil 2.3 : S. stricta BuOH ekstresi C18 kolondan alınan İTK görseli	20
Şekil 2.4 : S. stricta BuOH ekstresi VLC 7. fraksiyon sefadeks kolon İTK görseli ..	20
Şekil 2.5 : S. stricta BuOH ekstresi VLC 8. fraksiyonu sefadeks kolon İTK görseli	21
Şekil 2.6 : Hücre canlılığında belirteç olarak kullanılan resazurinin resofurine indirgenmesi.....	23
Şekil 2.7 : WST-1'in canlı hücreler tarafından formazana indirgenmesi	24
Şekil 3.1 : 7-Epicandicandiol molekülünün kimyasal yapısı.....	26
Şekil 3.2 : Foliol molekülünün kimyasal yapısı	28
Şekil 3.3 : Linearol molekülünün kimyasal yapısı	29
Şekil 3.4 : 4'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)-6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside] molekül yapısı.....	31
Şekil 3.5 : Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)- 6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside] molekül yapısı.....	32
Şekil 3.6 : 4'-O-methylisoscuteallarein-7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)- 6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside molekül yapısı	33
Şekil 3.7 : 3'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)-6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside] molekül yapısı.....	34
Şekil 3.8 : Linearol maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi	39
Şekil 3.9 : 7-Epicandicandiol maddesinin CCRF ve CEM hücre hatları canlılığı üzerine etkisi	39
Şekil 3.10 : Foliol maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi	40
Şekil 3.11 : F2 maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi	40
Şekil 3.12 : F3 maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi	40
Şekil 3.13 : F4 maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi	41
Şekil 3.14 : Etiketli ve kutulu haliyle şurup formülasyonu	45

İKİ ENDEMİK SİDERİTİS TÜRÜ ÜZERİNDE FİTOKİMYASAL VE BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

ÖZET

Bu çalışmada ülkemiz için yüksek endemizm gösteren *Sideritis* cinsine ait iki tür olan *Sideritis congesta* P.H. Davis et Hub.-Mor. ve *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. apud Bentham için fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmaları yürütülmüştür.

İki bitkinin topraküstü kısımlarından maserasyon ile metanol (MeOH) ekstraktları ayrı ayrı hazırlanmış, ardından sıvı-sıvı geri-ekstraksiyon ile petrol eteri (PE), diklorometan (DCM), etilasetat (EtOAc) ve butanol (BuOH) ekstraktları elde edilmiştir.

Seçilen ekstraktlarda (MeOH, PE, DCM ve BuOH) sitotoksik aktivite WST-1 hücre proliferasyon testi ile MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A fibrokistik meme epitelyal hücre hattında test edilmiştir. Test edilen ekstraktlar içinde *S. congesta* için DCM ekstresi, *S. stricta* için DCM ve PE ekstraktları diğer ekstraktlardan daha aktif olarak gözlenmiştir.

S. stricta BuOH ekstresi, tüm ekstraktlar içinde en yüksek ekstraksiyon verimine sahip olduğu için ve *S. congesta* DCM ekstresi diğer ekstraktlardan daha aktif bulunduğu için çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. *S. congesta* DCM ekstresinden linearol, 7-epikandikandiol ve foliol; *S. stricta* BuOH ekstresinden ise 4'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil- β -D-allopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)-6''-O-asetil]- β -D-glikopiranozit (F1), izoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil- β -D-allopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)-6''-O-asetil- β -D-glikopiranozit] (F2), 4'-O-metilizoskutellerain-7-O-[6'''-O-asetil- β -D-allopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)-6''-O-asetil- β -D-glikopiranozit] (F3), 3'-O-metilhipolaetin-7-O-[6'''-O-asetil- β -D-allopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)-6''-O-asetil- β -D-glikopiranozit] (F4), saflaştırılmıştır. Saflaştırılan maddelerin yapı tayini 1D ve 2D-NMR ile MS spektroskopik yöntemleri kullanılarak yapılmıştır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonla elde edilmiş PE, DCM, EtOAc ve BuOH ekstraktlarında fenolik maddelerin tespiti ve miktar tayini LC-HRMS ile gerçekleştirilmiştir. Her iki bitkinin alt ekstraktlarının analizi en zengin fenolik madde içeriğinin EtOAc ve müteakiben BuOH ekstraktlarında olduğunu göstermiştir. *S. congesta* ekstraktlarında p-kumarik asit ve verbaskozit, *S. stricta* ekstraktlarında ise verbaskozit ve klorojenik asit yüksek miktarda saptanmıştır.

S. congesta DCM ekstresinden izole edilen linearol ve 7-epikandikandiol maddeleri için WST-1 testi gerçekleştirilmiş ve ekstrakte linearolün yüksek miktarda bulunmasına rağmen aktivite göstermediği, dolayısıyla ekstraktın aktivitesinden sorumlu olmadığı, buna karşın 7-epikandikandiol 72 saat inkübasyon ile MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücre hatlarında orta-iyi derecede aktivite gösterdiği bulunmuştur (IC₅₀ değerleri sırasıyla 12.39, 31.96 ve 11.90 μ M bulunmuştur).

Saflaştırılmış diterpenler (linearol, foliol ve 7-epikandikandiol) ile F2, F3 ve F4 flavonoid glikozitlerinde sitotoksik aktivite tayini resazurin testi ile CCRF-CEM ve çoklu ilaca dirençli CEM/ADR5000 lösemi hücre hatları kullanılarak da yapılmıştır.

Flavonoid glikozitleri seçilen hücre hatları üzerinde aktif bulunmazken test edilen diterpenlerden en aktifi 7-epikandikandiol olarak saptanmıştır (IC₅₀ değeri her iki hücre hattı için sırasıyla 16.83 ± 1.00 µM ve 31.52 ± 3.00 µM).

Tez kapsamında *Sideritis congesta*, *Zingiber officinale* (zencefil), *Tilia* sp. (ıhlamur) ve *Cinnamomum* sp. (tarçın) bitkilerinin ekstreleri kullanılarak şurup formülasyonu hazırlanmış ve formülasyona giren bitkilerin geleneksel kullanımları doğrultusunda üst solunum yolları enfeksiyonu ile ilişkili semptomların azaltılmasında kullanılabileceği belirtilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Sideritis congesta*, *Sideritis stricta*, ekstraksiyon, izolasyon, yapı tayini, LC-HRMS, sitotoksik aktivite, şurup formülasyonu



PHYTOCHEMICAL AND BIOACTIVITY STUDIES ON TWO ENDEMIC SIDERITIS SPECIES

SUMMARY

In this thesis study, phytochemical and bioactivity studies were carried out on *Sideritis congesta* P.H. Davis et Hub-Mor and *Sideritis stricta* Boiss. & Held. apud Benthams, two species belonging to *Sideritis* genus, which has a high endemism ratio for our country.

The aerial parts of the two species were first macerated with methanol (MeOH) separately to get the main extracts. Then the main extracts were subjected to liquid-liquid re-extraction to get the sub-extracts of petroleum ether (PE), dichloromethane (DCM), ethyl acetate (EtOAc) and butanol (BuOH).

Cytotoxic activity in selected extracts (MeOH, PE, DCM and BuOH) was tested using WST-1 cell proliferation assay on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines and MCF-10A fibrocystic breast epithelial cell line. Comparison of IC₅₀ values showed that DCM extract for *S. congesta*, DCM and PE extracts for *S. stricta* had more antiproliferative activity than the rest extracts.

Since *S. stricta* BuOH extract had the highest extraction yield among all extracts and *S. congesta* DCM extract was found to be more active than other extracts, they were subjected to isolation by column and thin layer chromatography techniques. Linearol, 7-epicandicandiol, and foliol were isolated from *S. congesta* dichloromethane extract while four flavonoid glycosides 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F1), isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F2), 4'-O-methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F3), 3'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F4) were isolated from *S. stricta* butanol extract. Structure elucidation of the isolated compounds was made with 1D- and 2D NMR and MS techniques.

By using LC-HRMS, identification and quantification of phenolic compounds was performed in the PE, DCM, EtOAc and BuOH extracts obtained by liquid-liquid extraction. EtOAc extracts followed by BuOH extracts were found to have high concentrations of phenolic content in both species. While *p*-coumaric acid and verbascoside were found to be in large quantities in *S. congesta* extracts, *S. stricta* extracts were rich in verbascoside and chlorogenic acid, in general.

WST-1 test is also performed for linearol and 7-epicandicandiol isolated from *S. congesta* DCM extract. Although linearol was present to be high quantities in *S. congesta* DCM extract, it was not found to be active on the tested cell lines, showing that the activity of DCM extract can not be attributed to linearol. In contrast 7-epicandicandiol showed moderate activity on MCF-7, MDA-MB-231 and MCF-10A

cell lines after 72 hours of incubation (IC_{50} values were found to be 12.39, 31.96 and 11.90 μM , respectively).

Cytotoxic activity assay in purified diterpenes (linearol, 7-epicandicandiol and foliol) and F2, F3 and F4 flavonoid glycosides was performed by means of resazurin assay on CCRF-CEM and multi-drug resistant CEM/ADR5000 leukemia cell lines. The flavonoid glycosides were not found to be active on the selected cell lines, however 7-epicandicandiol among the three kaurene diterpenes was found to be the most active diterpene (IC_{50} $16.83 \pm 1.00 \mu M$ and $31.52 \pm 3.00 \mu M$ for two cell lines, respectively).

Within the scope of the thesis by using the extracts of *Sideritis congesta*, *Zingiber officinale* (ginger), *Tilia* sp. (linden) and *Cinnamomum* sp. (cinnamon) a syrup formulation was prepared. In accordance with the traditional usage of the plants in the formulation the syrup can be used to reduce the symptoms of upper respiratory tract infections.

Key words : *Sideritis congesta*, *Sideritis stricta*, extraction, isolation, structure elucidation, LC-HRMS, cytotoxic activity, syrup formulation

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde geniş yayılış gösteren Labiatae (Lamiaceae) familyasının önemli bir cinsi olan *Sideritis* L., özellikle Akdeniz bölgesinde olmak üzere dünyada tek yıllık ve çok yıllık yaklaşık 150 tür ile, Türkiye’de 39’u endemik olmak üzere 46 tür ile temsil edilmektedir ve %78’lik endemizm oranı ile *Sideritis* cinsi Türkiye’de yetişen bitkiler arasında en yüksek endemizme sahip olan cinslerden birisidir [1, 2].

Sideritis türlerinin terapötik kullanımı ilk kez Dioscorides’in 1.yy’da yazılan kitabında; “De Materia Medica” da bahsedilmiştir. *Sideritis* L. cinsi, adını Yunanca bir kelime olan “sideros” (demir) dan alır ve antik zamanlardan beri kılıç gibi silahların açtığı yaraları iyileştirme amacıyla kullanıldığı ifade edilmiştir. Folklorik olarak *Sideritis* türlerinin toprak üstü kısımları ile hazırlanan dekoksiyon veya infüzyon oral ya da topikal olarak yüzyıllardır antienflamatuvar, antiülserojenik, sindirimi düzenleyen, antispazmodik, antikonvülsan, antimikrobiyal, analjezik ve yara iyi edici özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır [3, 4].

Anadolu’da *Sideritis* türleri daha çok “Dağ çayı, Yayla çayı, Adaçayı” olarak tanınmaktadır. Aromalarından dolayı Türkiye’de yaygın şekilde bitki çayı olarak kullanılmaktadır ve halk arasında özellikle kır kahvehanelerinde ‘Adaçayı’ diye *Sideritis* türleri tüketilmektedir [5].

Sideritis türlerinin özellikle herbası başlıca mide ve bağırsak rahatsızlıkları ve de öksürük ve soğuk algınlığı durumlarında tedavi edici amaçlı olarak kullanılmaktadır ve nitekim EMA (European Medicinal Agency), Avrupa’da “ironwort, mountain tea ve shepherd's tea” olarak bilinen *Sideritis* türlerinden üçünün (*Sideritis scardica* Griseb., *Sideritis clandestina* Bory & Chaub. Hayek ve *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr.) 15 yılı aşkın bir süredir kullanılmasına dayanarak bir monograf hazırlamıştır. Monograf, üç türün soğuk algınlığı ile ilişkili öksürük ile orta derece gastrointestinal hastalıklarının rahatlatılması endikasyonlarında geleneksel olarak kullanıldığını belirtmiştir [6].

1.1 Tezin Amacı

Bu çalışmada Türkiye için endemik iki tür olan *Sideritis congesta* P.H. Davis et Hub.-Mor. ve *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. apud Bentham bitkileri ile fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmaları yapılması planlanmıştır. Bu doğrultuda her iki bitkinin ekstraksiyonu, saf madde izolasyonu, yapı tayini, LC-HRMS ile ekstraktlerde madde tayini, ekstraktlerde ve saf maddelerde sitotoksik aktivitenin incelenmesi amaçlanmıştır. İlave olarak *Sideritis* türlerinin dahil olduğu bir şurup formülasyonu geliştirilmesi hedeflenmiştir.

1.2 Literatür Araştırması

1.2.1 Lamiaceae familyası

Lamiaceae familyası Angiospermae sınıfının 6. büyük ailesi olup, tanımlanmış 245 cins ve 7886 türe sahiptir. Türkiye'nin üçüncü büyük familyası olan Lamiaceae ülkemizde 48 cins, 782 takson (603 tür, 179 alttür ve varyete) ile temsil edilmekte olup familyanın 346 taksonu (yaklaşık % 44) endemiktir. (Celep ve Dirmenci, 2017). Takson sayısına göre familyanın ülkemizdeki en büyük beş cinsi *Stachys* (118 takson), *Salvia* (107 takson), *Sideritis* (54 takson), *Phlomis* (53 takson) ve *Teucrium* (49 takson) olarak sıralanır [7, 8].

Familya yaygın olarak Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi dağlık alanlarında yayılış göstermekte olup tek yıllık veya çok yıllık aromatik bitkilerden ibaret çoğunlukla ot ve çalı formundadırlar.

1.2.2 *Sideritis* cinsi

Sideritis cinsi, dünyada yaklaşık 150 tür ile, Türkiye'de 39'u endemik olmak üzere 46 tür ile temsil edilmektedir, %78'lik endemizm oranı ile *Sideritis* cinsi Türkiye'de yetişen bitkiler arasında en yüksek endemizme sahip olan cinslerden birisidir.

Sideritis türleri, ot ya da çalimsı formda, tek ya da çok yıllık türlerdir. Gövdeleri dik, yükselici yapıda, genellikle dallanmış ve tabanda odunsu haldedir.

Türe bağlı olarak gövdedeki tüyler; pilos (yumuşak, ince zayıf tüyler) veya tomentos (keçimsi, oldukça sağlam tüylü) şeklinde veya nadiren tüysüz de olabilir. Salgı bezine sahip olan ve olmayan türleri bulunmaktadır.

Basit veya parçalı olan yaprakları, genellikle karşılıklı olup yaprak kenarları krenat (oval tırtıklı) ya da dentat (iri ve keskin dişlerin eksenleri yaprağa dik) şeklindedir, yapraklar saplı ve sapsız olabilir.

Çiçek dizilimi, vertisillastrum (dairesel, halka dizilişe sahip) şeklinde ve vertisillatların arası mesafeli veya birbirine yakın ve spika seklinde kümelenmiştir. Vertisillatlar 4-20 adet, her vertisillat 5-6 çiçeklidir. Brakteoller (çiçek sapındaki küçük yaprakçıklar) yoktur.

Brakteler (çiçek sapı yaprakçığı) yaprağa benzer ve kaliks (çanak yaprak) tüpünü örter. Kaliks, tüp şeklinde ve çana benzemektedir bazen de bilabiat, 5-10 damarlı ve 5 dişlidir. Dişler birbirine eşit veya üst diş alt diştten daha geniştir.

Korolla genellikle sarı olmakla beraber beyaz ve kırmızı renklerde de olabilir. Korolla tübü kaliks içinde, bilabiat, üst dudak hemen hemen dik, tam ya da iki parçalı, ortadaki daha geniş ve daha derindir. Stamenler korolla tüpü içinde, 4 adet, didinam (iki uzun, iki kısa), birbirine paralel iki sıra olarak, alt stamenler üst stamenlerden daha uzundur.

Anterler 2 gözlü ve çoğunlukla bozuk şekillidir. Stilus korolla tüpü içinde, silindirik, ginobazik (yumurtalığın tabanından çıkan), bifid, üst lobu sarar. Ovaryum üst durumda, iki karpelli, 4 gözlü, her göz tek ovüllüdür [9, 10].

Doktora tezine konu olan iki *Sideritis* türü için;

Sideritis congesta P.H. Davis et Hub.-Mor. (Başakçayı)

- Yöresel Adları: Anamur adaçayı, Yayla çayı, Dağ çayı
- Türkiye’de Yayılışı: Antalya ve İçel

Sideritis stricta Boiss. & Heldr. apud Benth (Tilkikuyruğu çayı)

- Yöresel Adları: Tilki kuyruğu, Dokuz donlu, Dağ çayı
- Türkiye’de Yayılışı: Antalya ve Mersin

1.2.3 Fitokimyasal açıdan *Sideritis* türleri

Sideritis türlerinde şu ana kadar yapılmış fitokimyasal çalışmalar tarandığında türün diterpenlerce ve flavonoid türevlerince zengin olduğu gözlenmektedir.

Web of Science veri tabanında *Sideritis* türlerinde bu zamana kadar yapılmış fitokimyasal çalışmalar taranmıştır. Saflaştırılıp yapısı aydınlatılan, sıvı kromatografisi ile yapısı tayin edilen ve uçucu yağının gaz kromatografisi ile analiz edildiği çalışmalar incelenmiş ve tür içinde var olan bileşikler sıralanmış ve iskelet

yapılarına göre Şekil 1.1’de gösterilmiştir (Uçucu yağın bileşiminde % 1 den az olarak var bileşikler dahil edilmemiştir).

Bugüne değin tür için izole edilmiş veya tespit edilmiş 218 diterpen olup bunların 98’i kauren diterpen, 59’u labdan, 26’sı beyeran, 9’u abietan, 8’i atisan, 7’si pimarane, 7’si trakiloban ve 2’si rozan tip diterpendir.

Ülkemizdeki *Sideritis* türlerine ait fitokimyasal çalışmalar incelendiğinde özellikle polar olmayan ekstraktların izolasyon ve yapı tayini çalışmaları danışman hocam ve grubu tarafından yapılmış olduğu görülmektedir. Elde edilen bileşiklerden yola çıkarak Doğu ve Orta Akdeniz Bölgelerinde yetişen türlerde neredeyse sadece kauran tip diterpenlere rastlanırken, nadiren farklı iskelette diterpenler de bulunmuştur [11-15].

Batı Akdeniz bölgesinde ve Makaronezya bölgelerinde yetişen türler farklı tip iskelette (labdan, atisan, beyeran, pimarane, trakiloban ve rozan) diterpenleri de barındırmaktadır [16-18].

Kaurene diterpenlerinden lineanol, foliol, sidol, isolineanol, sideridiol, 7-epicandiciol en yaygın olarak bulunurken diğer iskeletlerde bulunan diterpenlerden bazıları labdan; ribenol ve andalusol, beyeran; tobarrol ve conchitriol, rozan; lagascol ve lagascatriol, atisan; serradiol ve sideritol, abietan; sideritins a ve b, trakiloban; trachinol ve trachinodiol, pimarane; 3 β -hydroxy-entpimara-8(14),15-diene olarak örnek verilebilir.

Fenolik maddelerden şu ana kadar izole edilmiş veya tespit edilmiş olanlar 211 adet olup bunlardan 131 tanesi flavonoid ve türevleri, 51’i basit fenolik, 15’i feniletanoit, 7’si kumarin ve 7’si lignandır.

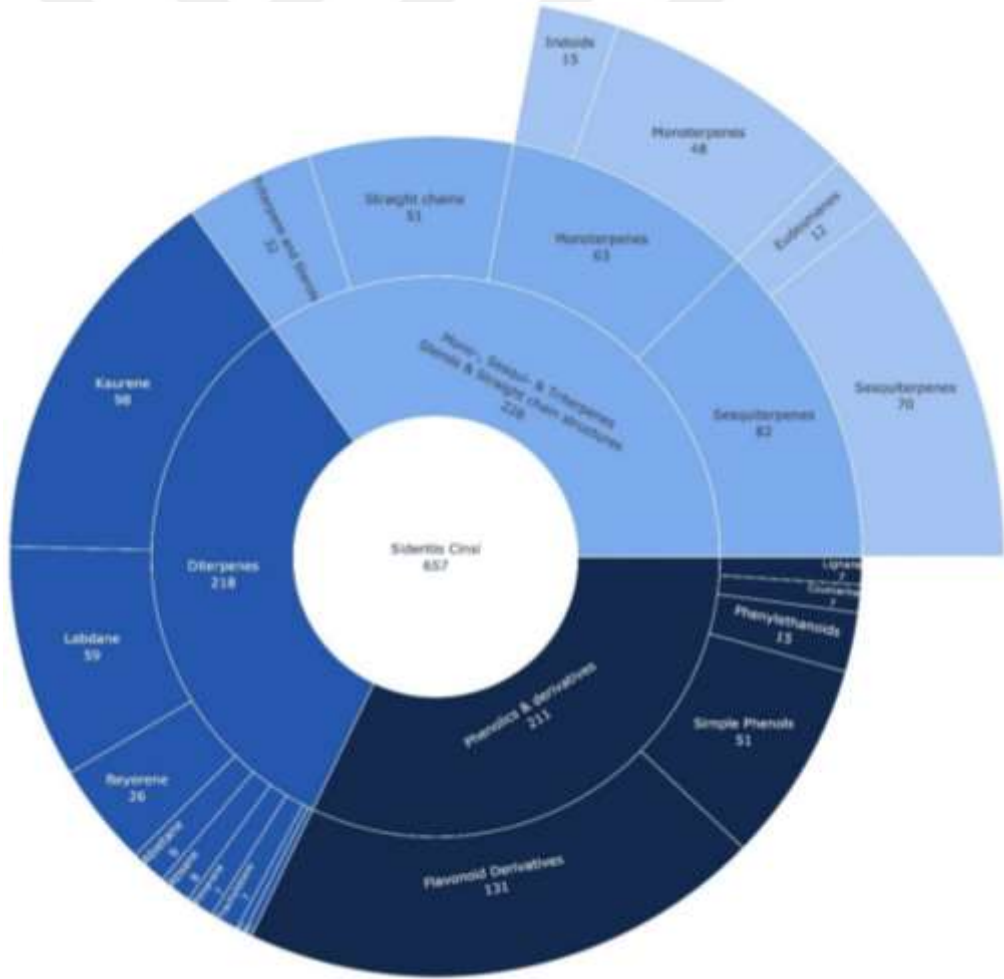
Sideritis türlerinden izole edilen flavonoit glikozitlerinin çoğu isoscutellarein veya hypolaetin flavonları olup bu flavonlar C-7’den O-allopiranoz ve bu allopiranozun 2. konumuna O-glikopiranozun bağlanması şeklinde görülmüştür. Bu altı üyeli şekerlerde, asetil grubu 6'' ve 6''' konumların biri ya da her ikisinde yerleşmiş olabileceği gibi asetil grubu hiç görülmeyebilir de. İki iskeletin B halkası bazen 4' konumda, hypolaetin iskeleti için hem 3' hem de 4' konumda metoksi grubu taşıyan flavonoid glikozitleri şeklinde izlenmiştir.

Verbascoside ve isoverbascoside *Sideritis* türlerinde en yaygın olarak bulunan feniletanoit yapısındaki maddelerdir. Bu yapıda izole edilen veya tespit edilen diğer maddelerden bazıları; lavandulifolioside, leonoside, samioside, trans lamalboside dir.

Kumarin türevi maddelerden siderin, *S. canariensis*'den izole edilmiştir [19] *S. pullans*'tan ise 8-methoxy-coumarsabin izole edilmiştir [20].

Lignanlardan örnek olarak *S. massoniana* var. *crassifolia* ve *S. canariensis*'den sesamin [19], *S. germanicopolitana*'dan dehydrodiconiferylalcohol 4-*O*- β -D-glucopyranose, pinoresinol 4'-*O*- β -glucopyranoside dir [21].

Diğer sayılan terpenik maddelerden 82 tanesi seskiterpen olup bunlardan 12 tanesi ödesman tipli seskiterpendir, 63 tanesi monoterpen yapıda olup bunların 15 tanesi iridoit ve iridoit glikozitleri, 32 tanesi triterpen ve sterol yapısındadır. Son olarak 53 düz zincirli yapı sayılmıştır.



Seskiterpen yapısındaki maddelerin çoğunluğu uçucu yağda gaz kromatografisi ile tespit edilmiş olup ödesman tip seskiterpenler *S. varoi*'nin farklı alt sınıflarından izole edilmiştir.

Lamiaceae familyası uçucu yağ zenginliği ile bilinirken *Sideritis* türleri yağ verimi bakımından fakir sayılabilir [22]. *Sideritis* türlerinin yarısından çoğu (% 57), uçucu yağında monoterpen hidrokarbonları zengin olarak barındırmakla birlikte oksijene monoterpenleri veya seskiterpen hidrokarbonları veya oksijene seskiterpenleri veya diterpenleri zengin olarak barındıranlar da mevcuttur [23]. Monoterpen hidrokarbonları zengin olarak barındıranlar için ana bileşenler α -pinen, β -pinen, β -phellandrene, sabinene and myrcene dir [24]. Uçucu yağında seskiterpenleri zengin bulunduran türler için tanımlanan ana bileşenler caryophyllene, germacrene D ve calamene [23] dir. Oksijene monoterpenleri yüksek oranda barındıranlar için thymol ana bileşen iken oksijene seskiterpenleri yüksek oranda barındıranlar için α -bisabolol [25], diterpenleri yüksek oranda barındıranlar için 8 α -13-hydroxy-14-en-epilabdane örnek verilebilir [23].

İridoit ve iridoit glikozitlerinde *Sideritis montana*'dan ajugol, ajugoside, *S. trojana*'dan melittoside, stachyoside-E ve A [26], *S. montana* L. subsp. *montana*'dan harpagide izole edilen maddeler arasındadır [27].

Toplamda *Sideritis* cinsinin tüm türleri için 657 madde sayılmış ve totalde bu rakamın yaklaşık üçte birinin diterpenlere ait olduğu, diğer üçte birinin ise fenolik türevlerine ait olduğu belirlenmiştir. Sayılan diterpenlerin yaklaşık yarısının kauren iskeletine sahip diterpen olduğu, fenolik türevi maddelerin ise yarısından fazlasının flavon türevlerine ait olduğu görülmektedir.

Doktora tezine konu olan iki *Sideritis* türünden şu ana kadar literatüde var olan izole edilmiş maddeler aşağıdaki iki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 1.1 : *S. congesta*'dan izole edilmiş maddeler

Madde türü	İzole edilen madde	Ref.
Diterpenler	linearol	[28, 29]
	7-epicandicandiol	[28, 29]
	7-acetyldistanol	[28]
	epoxyisolinearol	[28]
	sideroxol	[28]
	sideridiol	[28]
	siderol	[28]

	foliol	[28]
	sidol	[28]
Monoterpenoitler	betulalbuside A	[30]
	1-hydroxylinaloyl 6-O- β -D-glucopyranoside	[30]
İridoitler	ajugoside	[30]
Flavonoitler	stachyspinoside	[29, 30]
	isoscuteallarein [7-O-6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl -(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside]	[30]
Fenolikler	chlorogenic acid	[30]

Tablo 1.2 : *S. stricta*'dan izole edilmiş maddeler.

Madde türü	İzole edilen madde	Ref.
Diterpenler	sideridiol	[31]
	isosidol	[31]
	sideridiol	[31, 32]
	linearol	[31, 32]
	ent-1 β -hydroxy-7 α -acetyl-15 β ,16 β -epoxykaurane	[32]
	foliol	[32]
	sideroxol	[32]
	siderol	[32]
	7-acetyl sideroxol	[32]
	7-epicandicandiol	[32]
	ent-7 α -acetyl,15,18- dihydroxy-kaur-16-ene	[32]
	ent-7 α ,15 β ,18-trihydroxy-kaur-16-ene	[32]
Flavonoitler	isoscuteallarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside	[31, 33]
	isoscuteallarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside]	[31, 33]
	xanthomicrol (methoxyflavone)	[31, 33]
Feniletanoitler	verbascoside	[31, 33]

1.2.4 Geleneksel kullanım

Font Quer'e göre *Sideritis* türlerinin tıbbi bitki olarak kullanımı ile ilgili ilk bilgiler 1. yy'a Dioscorides'in "De Materia Medica" kitabına dayanmaktadır. *Sideritis* L. cinsi, adını Yunanca bir kelime olan "sideros" (demir) dan alır ve antik zamanlardan beri bu metalle yapılan silah (kılıç) kaynaklı yaraları iyileştirmek için kullanımına atıf yapılır. Etnobotanik çalışmalarda bir çok yazar *Sideritis* türlerinin bitkisel çay olarak kullanımına işaret etmiştir. Topraküstü kısımlardan hazırlanan çaylar, bazı türlerin yüksek dağlık alanlarda yetişmesinden dolayı türün "mountain tea (dağ çayı)" diye adlandırılmasına sebep olmuştur. Türkiye'de *Sideritis* türleri "dağ çayı, yayla çayı, adaçayı" olarak bilinir, bitkiden hazırlanan çayların kendine özgü tadı, sarımsı rengi

vardır. *Sideritis* çaylarının karın ağrısı, hazımsızlık, gaz gibi gastrointestinal sistem hastalıklara ve ateş, burun akıntısı, boğaz ağrısı, bronşit gibi soğuk algınlığı semptomlarına karşı, ürogenital hastalıklarda ve yara iyilişmesinde kullanımı yaygındır [3, 34].

Doktora tezine konu olan iki *Sideritis* türü için geleneksel kullanım şu şekildedir:

Almanya, Köln'deki Türk göçmenler arasında yapılan bir etnofarmakolojik bir çalışmada *S. congesta*, *S. libanotica* and *S. pisidica*'nın çiçek, yaprak dekoksion ve infüzyonlarının öksürüğü, bağırsak sorunlarını, hipertansiyonu ve halk ağzında 'gözde kurtçuk' olarak adlandırılan sendromu tedavi etmede yaygın olarak kullanıldığını göstermiştir [35].

Adana ve Mersin bölgelerinde *S. congesta*'nın obeziteye karşı kullanıldığı bildirilmiştir [36]. Yine Mersin bölgesinde *S. congesta*'nın soğuk algınlığı ve karın ağrısı için yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir [37].

S. stricta'nın geleneksel olarak iştah açıcı, gaz söktürücü olarak [38] kullanıldığı bilinmekle birlikte Aladağlar bölgesinde yapılan etnobotanik çalışmalar soğuk algınlığı ve grip tedavisinde kullanıldığını göstermiştir [39].

1.2.5 *Sideritis* cinsine ait moleküllerde farmakolojik aktivite

1.2.5.1 Antienflamatuvar aktivite

Sideritis türlerinde bulunan bileşiklerin büyük bir çoğunluğu belirgin antienflamatuvar aktiviteye sahiptir, aktivite türe ait ekstrelerde çeşitli teknikler kullanılarak gösterilmiştir. [34].

Sideritis türlerinden izole edilmiş bileşenleri üzerinde yapılan biyoaktivite çalışmalarına bakıldığında şu ana kadar aktif bileşenlerinden;

S. javalambrensis den izole edilen labdan diterpenlerinden ent-16-hydroxy-13-epi-manoyl-oxide; ent-13-epi-16-manoyl-oxide; karragen ile indüklenmiş pençe ödemi modelinde enflamasyonun ikinci fazında anti-enflamatuvar aktivite göstermiştir [40].

Ent-8 α -hydroxy-labda 13(16), 14-diene; ent-13-epi-12 α -acetoxymannoyl-oxide çeşitli ajanlarla stimule edilmiş fare peritoneal makrofajında prostaglandin E2 üretimini inhibe etmiştir [41].

S. foetens'den izole edilen andolusol'un oral 60 mg/kg alımı ile karragen indüklü fare ödemi modelinde en yüksek inhibisyon görülmüştür. 0.5 - 1 mg/kulaktan topikal

uygulaması ile de TPA indüklü ödemi önemli ölçüde azalttığı bunun da nötrofil infiltrasyonundaki azalma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Yine andalusol, stimule edilmiş fare peritoneal mast hücrelerinden histamin salınımını doza bağımlı olarak inhibe etmiştir [42]. Ayrıca andalusolun makrofajlardaki NOS-2 ekspresyonunu Nf- κ B inaktivasyonu ile inhibe ettiği gösterilmiştir [43].

S. mugronensis'den izole edilen borjatriol'ün farklı modellerde antienflamatuvar aktivitesi gösterilmiştir, farelerde pamuk pellet indüklü granulomayı inhibe ettiği, nystatin indüklü ödemin gelişimini önlediği ve adjuvant artritle hastalarda belirteç olan yüksek serum lizozim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir [44-46].

S. angustifolia'dan izole edilen lagascatriol'ün de 25 μ M konsantrasyonunda makrofajlarda stimule edilmiş COX-1 izoenzimi inhibe ederek PGE2 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir [47].

Flavonoid glikozitlerinden *S. öztürkii*'den izole edilen öztürkozit A, B ve C'den özellikle öztürkozit C'nin karragen indüklü pençe ödemi modelinde antienflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [48].

Bir seri aglikon ve glikozit türevlerinin antienflamatuvar aktivitesi, 5-lipoksijenaz ve siklo-oksijenaz yolları üzerinden eikonozoit üretimini inhibisyonu, stimule edilmiş edilmiş fare peritoneal lökositlerinde incelenmiştir. Bunlar arasında *S. mugronensis*'den izole edilen hyolaetin 8-glucoside ve aglikonu hypolaetin üzerinde yapılan çalışmalarda aglikonun 5-lipoksijenaz enzim aktivitesi inhibisyonunda daha güçlü olduğu görülmüştür. Buradan da şeker yoğunluğu inhibitor potansi azaltmakta olduğu sonucu çıkarılmıştır. Flavonoidlerin yapı aktivite ilişkisi incelendiğinde B halkasında kateşol grubu barındıran flavonoidlerin potent ve seçici 5-lipoksijenaz inhibitörü olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte B halkası dışında yapısında hidroksil grubu taşıyanların siklookjenez enzimine karşı seçici olduğu gözlenmiştir [49].

Kateşol grubunun önemi *S. leucantha* ve *S. mugronensis*'den izole edilen sideritoflavone, cirsiliol, hypolaetin-8-glucoside'ün koyun plateletlerinin seçici 12-lipoksijenaz inhibitörü olduğu gösterilirken xanthomicrol'ün de test edilen yüksek konsantrasyonda siklooksijenazı inhibe ettiği gösterilmiştir [50].

Kateşol grubun lipoksijenaz inhibisyonunda zaruri olmadığı *S. tragoriganum*'dan izole edilen 5-O-demetilnobiletin ile gösterilmiştir. Antienflamatuvar aktiviteye hem

karragen ve PLA₂ indüklü pençe ödeminde hem de TPA ile oluşturulan fare kulak ödeminde bakılmış olup 5-lipoksijenaz ve elastaz üzerindeki aktiviteler değerlendirilmiştir. 5-O-demetilnobiletin'in fare kulak enflamasyonunda ödem oluşumu, hücre infiltrasyonu ve doku hasarını azalttığı; fare pençesinde ise akut ödemi ve PLA₂ indüklü ödemi azalttığı gösterilmiştir. Flavon fare nötronlarında lökotrien B4 ve insan nötrofillerinde elastaz salınımını inhibe ederken murin makrofajında siklojenaz-2 ekspresyonunu azaltmamıştır. Sonuç olarak bileşiğin 5-lipoksijenazı, siklooksijenaz ekspresyonunu etkilemeden direk inhibe ettiği gösterilmiştir [51].

S. perfoliata ekstreleri ve izole edilen maddelerin DPPH spektrofotometrik ve TBA lipit peroksidasyonu kullanılarak antioksidan ve soya lipoksijenaz ile de antienflamatuvar aktivitelerine bakılmıştır. İzole edilen verbascoside, lavandulifolioside, 4'-O-methylisoscuteallarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside, isoscuteallarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside, isoscuteallarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside, 4'-O-methyl-hypolaetin-7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside, martynoside, leucosceptoside A, caffeic acid ve ajugoside maddelerinden soya lipoksijenaz inhibisyonu için en aktif olanı martynoside olarak bulunmuştur. Son 5 madde dahil edilmeyerek yapılan lipit peroksidasyon inhibisyonu için ise en aktif verbascoside (% 77.4) maddesi bulunmuştur [52].

Fenilpropanoid glikozitlerinden lavandulifolioside, martysonide, verbascoside, ve leucosceptoside'in karragen-indüklü fare pence ödemi tekniği ile antienflamatuvar aktivitesi gösterilmiştir. Referans molekül indometazinden %50 daha az gastrik ülserasyana sebep olmuşlardır. Aynı çalışmada *Sideritis* flavonoid glikozitlerinden 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl-D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-D-glucopyranoside], 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl-D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-6''-O-acetyl-D-glucopyranoside de değerlendirilmiştir, flavonoid glikozitleri daha yüksek aktivite gösterse de fenilpropanoid glikozitlerinin gastrik ülserasyon etkisi daha düşük olduğu gösterilmiştir [53].

S. hyssopifolia'dan izole edilen 11,12-didehydrosiderol ve hyssopifoliol A'nın stimule edilmiş deri epitel hücrelerinde anti-IL-1 α etkisi olduğu gösterilmiştir [54].

S. euboea etil asetat ekstresi ve izole edilen maddelerden apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, apigenin 7-*O*-*p*-coumaroyl-glucoside, 4'-*O*-methyl-hypolaetin 7-*O*-[6'''-*O*-acetyl- β -D-allopyranosyl]-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside'in anti-hyaluronidaz aktivitelerine bakılmış ve 500 μ g/mL'de apigenin 7-*O*- β -D-glucopyranoside'in potent olabileceği gösterilmiştir [55].

1.2.5.2 Antioksidan Aktivite

Sideritis türlerinden çokça izole edilen linearol, sidol ve foliol'un mitokondrial oksidatif stres üzerinde etkileri değerlendirilmiştir. Linearol ile sidolün membran potansiyeli artırıp, hem sitozolik hem de mitokondrial kalsiyum hemostazı kurduğu ve ATP yoksunluğunu önlediği, kaspaz-3 aktivitesini azaltarak mitokondri üzerinde koruyucu etki sağladığı bildirilmiştir [56].

Sideritis türlerinden izole edilmiş andalusol, conchitriol ve lagascatriol'un antioksidan etkilerinin incelendiği bir çalışmada izole bileşiklerle ön-müdahale sonrası hücreler H₂O₂ ile uyarılmıştır. İncelenen diterpenoidlerin uyarılmış hücrelerdeki membran bütünlüğünde, mitokondrial bütünlük ve aktiviteyi iyileştirdiği hücre içi ROS üretimi inhibe edip, lipid peroksidasyonu azalttığı, GSH/GSSG (indirgenmiş glutatyon/oksidlenmiş glutatyon) değişikliklerini önlediği gözlenmiştir. Ayrıca endojen antioksidan enzimlerin protein ekspresyonu ve aktiviteleri de artmıştır. Denenen diterpenlerin koruyucu etkiliğinde Nrf-2 yolağın rol oynadığı sonucuna varılmıştır [57].

Flavon glikozitleri arasında hypolaetin türevleri isoscutellarein türevlerinden daha aktif bulunmuştur. B halkası C-3' pozisyonunda hidroksil ve C-4' pozisyonunda metoksil grubu taşıyan moleküllerin sadece C-4' pozisyonunda hidroksil grubu taşıyanlardan daha aktif olduğu gösterilmiştir. C-7 deki *O*-glikozilasyonun aktivite üzerinde zayıf bir negatif etkiye sebep olduğu bildirilmiştir. İlginç olarak 6''' pozisyonundaki asetil grubun antiperoksidatif aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir [58].

1.2.5.3 Antiülserojenik aktivite

S. leucantha'dan izole edilen hypolaetin-8-*O*- β -D-glucoside'in farelerde mukus üretimini artırıp, asitliği ve peptik gastriti azaltarak gastrik lezyonu ve ilaç indüklü ülseri azaltmıştır. Yine flavonoid iskeletinde 3'-4'- pozisyonunda kateşol grubu varlığı antiülseratif aktivite ile ilişkilendirilmiştir [59].

1.2.5.4 Sitotoksik Aktivite

S. cypria'dan izole edilen apigenin, apigenin-7-O- β -D-glucopyranoside, apigenin-7-O-[4"-O-trans-p-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside MDA-MB231 göğüs kanseri hücre hattında test edilmiş ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 28.00, 30.54 ve 44.20 μ g/mL olarak bulunmuştur [60].

S. lycia'dan izole edilen linearol, sidol, siderol, 7-epicandicandiol, sideridiol aktivitesi KB, P-388, COL-2, hTERT RPE, LU1, LNCaP ve A2780 kanser hücre hatlarına karşı değerlendirilmiştir. 7-epicandicandiol en aktif bileşik olarak bulunmuş olup ED₅₀ değerleri; KB (13.3 μ g/mL), COL-2 (11.8 μ g/mL), LU1 (17.9 μ g/mL), LNCaP (14.9 μ g/mL) ve A2780 (9.0 μ g/mL). Linearol, sidol, isosidol ve aseton ekstresi için antiviral aktivite Vero hücreleri viyabilitesi üzerinde test edilmiştir ve antiviral indeks linearol (2.31), sidol (aktif değil), isosidol (2.01) ve *S. lycia* aseton ekstresi (2.58) olarak bulunmuştur [61].

S. euboea'dan izole edilmiş siderolün antiproliferatif aktivitesi MTT testi ile DLD1, HeLa, and A549 hücre hatlarında değerlendirilmiştir ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 26.4 μ M, 44.7 μ M, ve 46.0 μ M olarak bulunmuştur [62].

S. hyssopifolia'dan izole edilen hyssopifoliol A, 3-acetoxy-ent-3 β -7 α -dihydroxykaur-16-ene ve 11,12-didehydrosiderol'ün sitotoksik aktivitesi HaCaT hücre hattında denenmiş ve 10 μ g/mL'de hücre viyabilitesini %60'a düşüren 3-acetoxy-ent-3 β -7 α -dihydroxykaur-16-ene en aktif bileşik olarak gösterilmiştir [54].

Tablo 1.3 : *S. congesta* bitkisi üzerinde yapılmış aktivite çalışmaları.

Aktivite	Sonuç
Anti-enflamatuvar	3 farklı sulu fraksiyonun COX-2 ve NF-kB aktivitesi [29] üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Fraksiyon I en yüksek COX-2 inhibisyonu, fraksiyon III ise en yüksek NF-kB inhibisyon aktivitesini göstermiştir. Aktif bulunan fraksiyonlarda total fenolik, saponin ve flavonoid içeriğin en potent içerik olduğu saptanmıştır.
Antioksidan	<i>S. congesta</i> 'nın farklı ekstreleri (metanol, infüzyon) ve [30] fraksiyonlarının (kloroform, etilasetat, sulu kalan kısım) antioksidan aktivitesi DPPH, FRAP, CUPRAC ve total antioksidan kapasite testleri ile değerlendirilmiş EtOAc fraksiyonun en yüksek antioksidan aktiviteye ve aynı

zamanda en yüksek verbascoside ve martynoside içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir.

Antioksidan ve Antikolinesteraz	<i>S. congesta</i> aseton ve petrol eteri ekstraktları ile izole edilen acetyldistanol, epoxyisolinearol, sideroxol, sideridiol, siderol, 7-epicandicandiol, linearol ve sidol bileşiklerinin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Aseton ekstresi antioksidan aktivite olarak potansiyele sahip sonuçlar verse de izole bileşikler aktif bulunmamış veya düşük antioksidan aktivite göstermiştir. İzole bileşikler AChE enzimine karşı düşük aktivite gösterirken sideroxol ve 7-epicandicandiol BChE enzimine karşı standart bileşik galantaminden daha yüksek aktivite göstermiştir. [28]
Antioksidan	<i>S. congesta</i> ve <i>S. arguta</i> 'nın aseton, metanol ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS deneyleri ile test edilmiştir. DPPH radikal giderici deneyi baz alındığında <i>S. arguta</i> aseton ekstresi referans maddeye yakın olarak en yüksek aktiviteyi (38,3 µg/mL) göstermiştir ve sıralama ; <i>S. arguta</i> aseton > <i>S. arguta</i> metanol > <i>S. congesta</i> metanol ≥ <i>S. arguta</i> etil asetat > <i>S. congesta</i> etil asetat > <i>S. congesta</i> aseton ekstresi bulunmuştur. ABTS ile ise <i>S. arguta</i> aseton (3.2 mM) ekstresi en aktif ekstre olarak gösterilmiştir. [63]
Analjezik	<i>S. congesta</i> , <i>Origanum onites</i> ve <i>Satureja cuneifolia</i> uçucu yağlarının kuyruk daldırma testi ile analjezik aktiviteleri test edilmiş ve belirgin analjezik aktivite sadece <i>O. onites</i> uçucu yağında bulunmuştur. [64]
Antioksidan ve Antikolinesteraz	Aktarlardan temin edilen örneklerden hazırlanan infüzyonun, 1,00 mg/mL konsantrasyonunda DPPH testinde %59,9 ; ferröz iyon şelat yapıcı etki testinde %5,6 oranında; FRAP testinde 1,0'lık absorbansa, biyotografik DPPH testinde ise flavonoid türevi iki aktif bileşene sahip olduğu belirlenmiştir. İnfüzyon asetilkolinesteraz enzimine karşı aktivite göstermemiştir. [65]

Tablo 1.4 : *S. stricta* bitkisi üzerinde yapılmış aktivite çalışmaları.

Aktivite	Sonuç
Antibakteriyel ve Antifungal	<i>S. stricta</i> aseton ekstresi ve ekstreten izole edilen ent-1 β -hydroxy-7 α -acetyl-15 β ,16 β -epoxykaurane, sideroxol, 7-acetyl sideroxol, 7-epicandicandiol, linearol, ent-7 α ,15 β ,18-trihydroxy-kaur-16-ene, foliol, sideridiol ve siderol bileşikleri bakteri ve mantar suşlarına karşı denenmiş ve gentamisin ile [32]

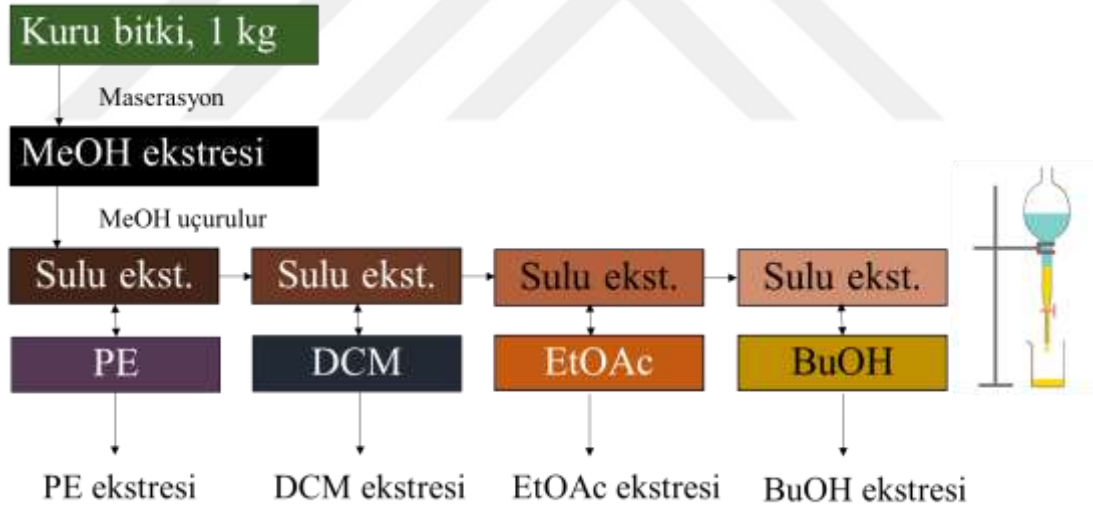
	flukanozola kıyasla düşük antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir.	
Antienflamatuvar ve Antinosiseptif	<i>S. stricta</i> aseton ekstresi ve izole edilen verbascoside, xanthomicrol ile iki flavonoid glikoziti; isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-glucopyranoside, isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]-6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside aktiviteleri <i>p</i> -benzokinonla indüklü abdominal kıvrınma testi ve karragenle indüklenen pençe ödemi modeli ile değerlendirilmiştir. Yüksek dozda (100 mg/kg) iki flavonoid glikoziti karışımının antienflamatuvar ve antinosiseptif aktivite gösterdiği bulunmuştur.	[33]
Antioksidan, Antikolinesteraz, Antitrozinaz	<i>S. stricta</i> hegzan, metanol, aseton ve su ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH, ABTS, CUPRAC ve metal şelatlama deneyleri ile değerlendirilmiştir. Aseton ve metanol ekstraktlarının radikal giderici etkileri standart maddelere göre daha yüksek bulunmuştur. Su ekstresinin metal şelatlama aktivitesi ise referans madde ile benzer bulunmuştur. Asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu aktivitesi için hegzan ekstresi orta derecede aktifken, bütirikolinesteraz enzimi için hegzan ve aseton ekstraktlarının aktivitesi potent gösterilmiştir. Trozinaz enzim inhibisyon aktivitesi için metanol ve aseton ekstresi düşük derecede aktif gösterilmiştir.	[66]

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Bitki Temini

Sideritis stricta, 2017 yılında kültür bitkisi olarak Konya'dan temin edilmiştir. Herbarium örnekleri Selçuk Üniversitesi, Tıbbi ve Endemik Bitkiler Eğitim ve Araştırma Çiftliği'nden temin edilmiştir ve Selçuk Üniversitesi Tıbbi ve Endemik Bitkiler Herbariumu'nda saklanmaktadır. Lokalite Bilgileri: Tıbbi ve Endemik Bitkiler Eğitim ve Araştırma Çiftliği, Selçuk Üniversitesi, 2019, 1020m, YK 1043 (SÜTEB 61). *Sideritis congesta*, 2016 yılında Antalya, Maha yaylasından toplanmıştır.

2.2 Ekstrelerin Hazırlanması



Şekil 2.1 : Ekstraksiyon şeması

2.2.1 Maserasyon

İki bitki türünden 1'er kg alınarak bitki değirmeninde öğütüldü. Metanol (MeOH) ile her seferinde 10 litre olmak üzere 3 kez masere edildi. Sıvı ekstreler evaporatörde (Heidolph) uçurulup vizkoz, balçık kıvamındaki MeOH ekstreleri elde edildi.

2.2.2 Sıvı-sıvı ekstraksiyon

S. congesta (SC) kuru MeOH ekstresi iki kısma ayrılarak her iki kısım için; 10:1 kısım su : metanol ile çözüldü. Ayırma hunisinde her birinde 275 mL olmak üzere petrol eteri (PE) ile 5 kez sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. PE evaporatörde uçurulup ekstre tartıldı.

Sulu kısım, her birinde 300 mL olmak üzere diklorometan (DCM) ile 4 kez ayırma hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. DCM evaporatörde uçurulup ekstre tartıldı.

Yine sulu kısım ayırma hunisinde her birinde 250 mL etil asetat (EtOAc) ile 3 kez sıvı-sıvı ekstraksiyon yapıldı. En son sulu kısım her birinde 250 mL butanol (BuOH) ile 3 kez ayırma hunisinden geçirildi. BuOH uçurulup ekstre tartıldı.

S. stricta (SS) MeOH ekstresi de iki kısma ayrılıp her bir kısım; 10:1 kısım su : metanol ile çözüldü. Ayırma hunisinde, her birinde 400 mL olmak üzere 4 defa PE ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. PE evaporatörde uçurulup kuru ekstre tartıldı.

Sulu kısım, her birinde 250 mL olmak üzere 4 defa DCM ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu, DCM uçurulup kuru ekstre tartıldı.

Sulu kısım, her birinde 250 mL olmak üzere EtOAc ile 3 defa ekstrakte edildi. EtOAc uçurulup kuru ekstre tartıldı.

Yine sulu kısım ayırma hunisinde her birinde 250 mL BuOH olmak üzere 3 defa ekstrakte edildi. BuOH uçurulup kuru ekstre tartıldı.

Bitkilere ait ekstraksiyon şeması Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

2.3 Saflaştırma

2.3.1 Kolon kromatografisi teknikleri

2.3.1.1 Silikajel kolon kromatografisi ile saflaştırma

Silika jel, polar özellikte olup polar maddeleri kolonda tutmasından dolayı apolar veya orta polar maddelerin saflaştırılması için idealdir. Apolar ekstraktlerin saflaştırılmasında farklı uzunlukta ve kalınlıktaki cam kolonlarda adsorban ve sabit faz olarak silika (Merck 107734, Kiesegel 60, 70-230 Mesh) kullanıldı.

2.3.1.2 Sefadeks kolon kromatografisi ile saflaştırma

Moleküler elek tekniğe dayalı sefadeks LH20, polar ekstrelerdeki flavon türevlerinin fraksiyonlandırılması için kullanıldı. Dolgu maddesi %50 metanol/su'da şişirildi, aynı çözücü sisteminde çözündürülen ekstre kolona tatbik edildi ve gradient akışta %100 metanol oluncaya kadar ekstre fraksiyonlandırıldı.

2.3.1.3 Ters Faz (C₁₈) kolon kromatografisi ile saflaştırma

Silika yüzeyine kovalent bağla alkil gruplarının bağlanması ile oluşturulmuş hidrofobik özellikteki ters faz kolon kromatografisi kullanılarak polar maddelerin ayrımı yapıldı

2.3.2 İnce tabaka ve preparatif ince tabaka kromatografisi (İTK ve p-İTK)

Kolondan alınan fraksiyonların değerlendirilmesi ve içeriklerine göre birleştirilmesi için İTK plakaları (Merck, Kieselgel 60 F254, 1.0554.001) kullanıldı. Hareketli faz olarak; polar içerik için 8:2 (kloroform : metanol) sistemi, apolar içerik içinse 9:1 (kloroform : aseton) sistemleri kullanıldı. Görüntüleme işlemi UV lambası (254 ve 360 nm, Camag) altında gerçekleştirilip ardından çeker ocak (Asistlab) altında seryum sülfat püskürtülerek etüvde (Nüve) yakıldı.

Preparatif ince tabaka kromatografisi (p-İTK) için fraksiyonlar cam plaklara (Merck, 105721.0001) , aşağıdan 1.5 cm yukarıda, düz çizgi halinde tatbik edildi ve mobil faz olarak 8:2 (kloroform : metanol) kullanıldı.

Cam tanklarda sürükleme işlemi bittikten sonra plaklar çeker ocakta kurutuldu, oluşan bantlar UV Kabin altında UV ışık yardımıyla işaretlendi. İşaretlenerek belirlenen alanlardaki silika kazınarak cam erlenlere alındı, üzerine mobil faz eklendi, ultrasonik banyoda (Bandelin Sonarex) 3 dk tutuldu, çıkarılıp 15 dk beklendi ardından süzülerek başka bir erlene alındı. Silikaya tekrar mobil faz eklenerek bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Toplanan kısımlar evaporatörde uçuruldu ve maddenin saflaşp saflaşmadığı önce İTK ile kontrol edildi ardından tek leke ise NMR'a gönderildi.

Diterpenler için p-İTK yapılırken mobil faz olarak 9:1 (kloroform : aseton) kullanıldı. Fraksiyonlar cam plaklara, aşağıdan 1.5 cm yukarıda, düz çizgi halinde tatbik edildi ve cam tanklarda (Camag) yürütüldü.

Diterpenler plaklarda gözle veya UV ışıktaki görülmediği ve sadece yakıldığına ortaya çıktığı için cam plaklar sürüklenme sonrasında sağ ve sol kenarlarından 1 cm açıkta kalacak şekilde alüminyum folyo ile kapatıldı. Açıkta kalan alanlar üzerine seryum sülfat (2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidratın 100 mL % 10'luk H₂SO₄'de çözülmesiyle

hazırlanan çözelti) püskürtüldü ve o kenarlar yakıldı. Yakılan kenarlardaki lekeler rehber alınarak püskürtme yapılmamış alanlar kazınarak cam erlenlere alındı, üzerine mobil faz eklendi, ultrasonik banyoda (Bandelin Sonarex) 3 dk tutulurak maddelerin silikadan çözeltiye geçisi sağlandı, çıkarılıp 15 dk beklendi ardından süzülerek başka bir erlene alındı. Tekrar mobil faz eklenerek bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Toplanan kısımlar evaporatörde uçuruldu ve maddenin saflaşıp saflaşmadığı önce İTK ile kontrol edildi ardından tek leke ise NMR'a gönderildi.

2.3.3 Nükleer manyetik rezonans (NMR)

Saflaştırılan bileşiklerin ¹H-NMR ve ¹³C-APT NMR spektrumları Bruker Avance NEO NMR Spektrometresi ile sırasıyla 500 ve 125 MHz'de alındı. Eşleşme sabitleri Hertz (Hz) olarak, kimyasal kaymalar δ (parts per million) unitleri olarak gözlendi. İç standart olarak tetrametilsilan ($\delta = 0.00$ ppm) kullanıldı.

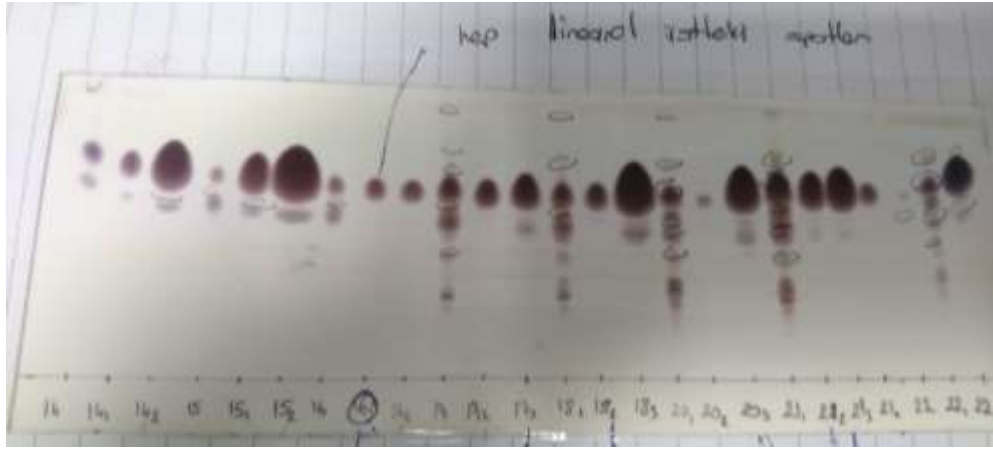
Yarılmalar s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), bs (broad singlet), dd (dubletin dubleti) ve dt (tripletin dubleti) şeklinde gösterildi.

2.3.4 *Sideritis congesta* diklorometan ekstresinin saflaştırılması

Kuru ekstre (25,5 g) az miktarda diklorometan ile çözündürülerek silikajel ile karıştırılması sağlandı ve oda sıcaklığında çözücü uçuruldu, ardından porselen havanda homojenize edildi. Dibine pamuk yerleştirilmiş ve ardından aynı tip silika ile doldurulmuş cam kolonun üzerine silikaya absorbe edilmiş ekstre tatbik edildi.

Kolondan her seferinde % 10 değişen konsantrasyonlarda gradient akışta sırasıyla hegzan, diklorometan, aseton ve metanol geçirildi. (Örn; % 90 hegzan % 10 DCM, % 80 hegzan % 20 DCM..... %100 DCM, %90 DCM % 10 Aseton...) Her bir solvan sisteminden yaklaşık 1000-2000 mL geçirilirken sadece % 40 aseton/diklorometan sisteminden 4000 mL geçirildi. Her bir fraksiyon 500 mL olarak toplandı ve uçuruldu. İlk kolondan toplamda 89 fraksiyon elde edildi. Fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi (ITK) için silika plaklara tatbik edilip incelendi, benzer fraksiyonlar birleştirildi.

S. congesta diklorometan (SCD) ekstresinin % 30 aseton/diklorometan ile gelen [27-28] fraksiyonu yaklaşık 6,1 g olup silika kolona tatbik edildi. Sırasıyla gradient akışta hekzan, diklorometan, aseton ve metanol geçirildi. Her bir fraksiyon 500 mL olarak toplandı. Toplamda 73 fraksiyon elde edildi. Bu kolonun 14-22. fraksiyonlarından linearol maddesi elde edildi (Şekil 2.2).



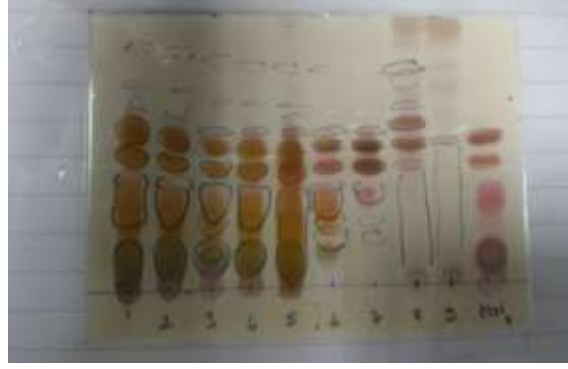
Şekil 2.2 : *S. congesta* DCM ekstresi [27-28] fraksiyonun silika kolona uygulanması ile alınan İTK görseli ve linearol spotları

SCD ekstresinin [29-33] fraksiyonu (1.3 g), 2.9 g silikaya absorbe edilip silikajel kolon kromatografisi yapıldı. Kolondan izokratik akışta kloroform: metanol (50:1) geçirildi, ve bu kolonun 20. Fraksiyonundan preparatif İTK ile 7-epicandicandiol maddesi izole edildi.

İlk kolondan gelen SCD [43-67] fraksiyonu 2,9 g olup silika jel kolona uygulandı. Sırasıyla gradient akışta hekzan, diklorometan, aseton ve metanol geçirildi. Bu kolondan elde edilen fraksiyonlardan yıkanması ile elde edilen maddeler NMR'a gönderildi. Bu kolondan da foliol maddesi elde edildi.

3.2.2 *Sideritis stricta* butanol ekstresinin saflaştırılması

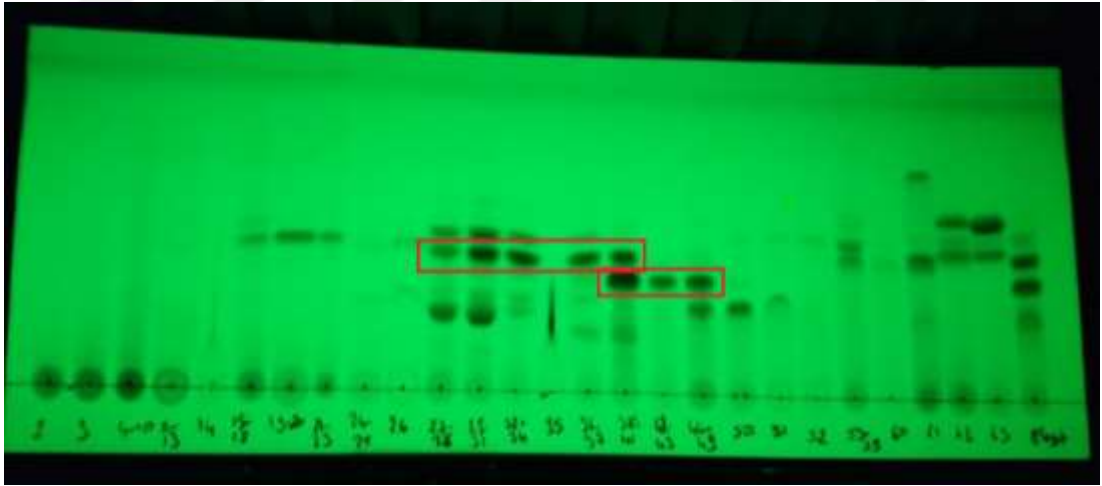
Sideritis stricta butanol ekstresi diğer ekstreler içinde en yüksek verimle elde edilen ekstreydi (136,5 g). Polar bileşikler elde etmek amacıyla bu ekstreden 50 g alınarak 425 mL metanolde çözündürmek için 1 saat 40°C'deki su banyosunda bekletildi. Oluşan süspansiyonda katı kısmı tam olarak çöktürüp ayırmak için buzdolabında 1 gece bekletildi. Ertesi gün buzdolabından alınıp santrifüjlendi, çöken kısım ayrıldı. Kalan metanol ekstresi uçuruldu, kuru ekstre 40,1 g olarak tartıldı. Toplamda 30 g *S. stricta* butanol - metanol ekstresi, 50 mL metanolde çözündürüldükten sonra, 20 g C₁₈ silikaya absorbe edildi. Cam kolona uygulandı, vakum likit kromatografisi (VLC) ile fraksiyonlandırıldı. Kolondan önce %100 su geçirildi sonra sırasıyla su:metanol (90:10), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (40:60) (30:70), (20:80), (10: 90) ve %100 metanol geçirildi. Kabaca 13 fraksiyona ayrıldı (Şekil 2.3). Toplanan fraksiyonlar İTK ile incelendi. Mobil faz: 8:2 kloroform : metanol.



Şekil 2.3 : *S. stricta* BuOH ekstresi C18 kolondan alınan İTK görseli

Vakum likit kromatografisinden alınan 7. fraksiyonun (2,58 g) 1,0 gramı alındı, 12 mL çözücü (1:1, su:metanol) ilave edildi. Çöken kısım santrifüjle ayrıldı.

Sulu metanolde çözünen kısım alındı, çözücüsü uçuruldu ve kuru ekstre 0,367 g olarak tartıldı. Ardından 0,367 g ekstre, sefadeks kolonda moleküler elek sistemine göre ayrıldı. Önce kolondan %50 metanol geçirildi, sonra sırasıyla metanol:su (60:40), (70:30), (80:20), (90:10) ve %100 metanol geçirildi. Toplamda 63 fraksiyon toplandı (Şekil 2.4). Toplanan fraksiyonlar İTK ile incelendi (mobil faz: 8:2 kloroform : metanol) ve benzer fraksiyonlar birleştirildi.

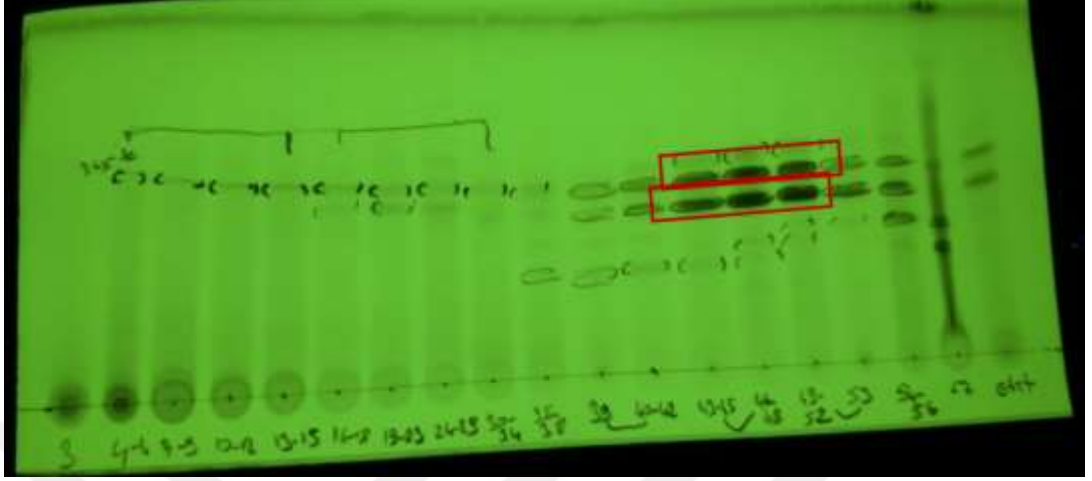


Şekil 2.4 : *S. stricta* BuOH ekstresi VLC 7. fraksiyon sefadeks kolon İTK görseli

Burdan alınan fraksiyonlardan 2 adet flavonoit glikoziti elde edildi. Şekil 2.4'te kırmızı kareler içinde gösterilen spotlardan üsttekinine F1 alttakine ise F2 kodu verildi ve bu maddeler preparatif İTK ile elde edilip NMR'a gönderildi.

Vakum likit kromatografisinden (VLC) alınan 8. Fraksiyon 142,4 mg sefadeks kolona tatbik edildi. Önce kolondan 300 mL %50 metanol geçirildi, sonra sırasıyla 100'er mL metanol:su (60:40), (70:30), (85:15), (95:10) ve %100 metanol geçirildi. Toplamda

63 fraksiyon toplandı. Toplanan fraksiyonlar İTK ile incelendi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi ve buradan da F3 ve F4 maddeleri yine preparatif İTK ile elde edildi (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 : *S. stricta* BuOH ekstresi VLC 8. fraksiyonu sefadeks kolon İTK görseli

2.4 LC-HRMS Tayini

S. congesta ve *S. stricta* bitkilerine ait PE, DCM, EtOAc ve BuOH ekstralarında fenolik maddelerin tespiti ve miktar tayini için LC-HRMS (liquid chromatography-high resolution mass spectrometry) tekniği kullanılmıştır. Metoda ait HPLC ve MS şartları aşağıda verilmiştir.

2.4.1 HPLC şartları

Mobil Faz A: %1 Formik Asit - H₂O

Mobil Faz B: %1 Formik Asit - MeOH

Kolon: Troyasil C18 HS – 150 x 3 mm 5 µ

Tablo 2.1 : Kolon gradient akış tablosu.

Zaman	Akış (mL/min)	% B
0.00	0.35	50
1.00	0.35	50
3.00	0.35	100
6.00	0.35	100
7.00	0.35	50
15.00	0.35	50

2.4.2 MS şartları (Kütle Spektrometresi)

Sistem: Thermo Orbitrap Q-Exactive

İyon kaynağı: ESI

Kütle tarama aralığı: 100-900 m/z

Sheath gaz akış hızı : 45

Aux gas akış hızı: 10

Sprey voltaj (kV) : 3.80

Kapiler sıcaklık (°C) : 320

Aux gas heater sıcaklığı (°C) : 320

S-lens RF düzeyi : 50.0

Tanımlamalar: İlmer Kütüphanesi

Çevre Şartları

Sıcaklık : (22,0 ± 5,0) °C

Bağıl Nem : (50 ± 15) % rh

Sisteme tanımlanan maddeler: Ascorbic acid (≥ 99 , Sigma-Aldrich), chlorogenic acid (≥ 95 % Sigma-Aldrich), p-coumaric acid (≥ 98 , Sigma-Aldrich), kaempferol (> 90 , Sigma-Aldrich), homogenistic acid (> 90 , Sigma-Aldrich), verbascoside (86.31 , Hwi analytik GMBH), vanillic acid (> 97 , Sigma-Aldrich), nepetin (> 98 , supelco), orientin (> 97 , TRC Canada), caffeic acid (≥ 98 , Sigma-Aldrich), luteolin 7-glucoside (> 97 , TRC Canada), rutin (≥ 94 , Sigma-Aldrich), hyperoside (> 97 TRC Canada), apigenin 7-glucoside (> 97 , EDQM CS), quercetin (≥ 95 Sigma-Aldrich), salicylic acid (≥ 98 , SigmaAldrich), apigenin (> 97 , TRC Canada), chrysin (≥ 96 , SigmaAldrich), acacetin (> 97 , TRC Canada), 3,4-dihydroxy benzaldehyde, hispidulin 7-glucoside, apigenin 7-metillat ve apigenin 7-acylglucoside (bu maddeler çeşitli projeler kapsamında izole edilmiş ve yapıları NMR ile tayin edilmiştir).

2.5 Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

2.5.1 Resazurin testi

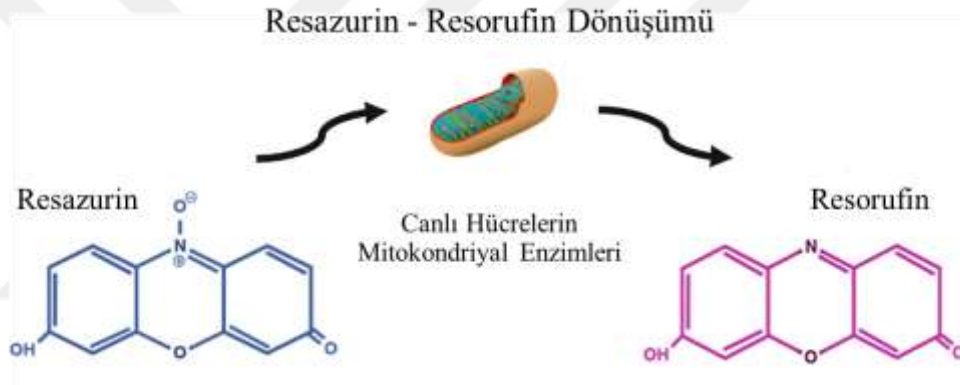
Resazurin (Promega, Mannheim, Germany) indirgeme deneyi örneklerin sitotoksitesini test etmek için kullanıldı.

Resazurin canlı hücre metabolizmasıyla resorufin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Resazurin, oksidatif formda bulunan koyu mavi renkte bir redoks

boyasıdır, hücre zarından serbestçe geçerek hücrelere girer ve burada indirgenerek floresans özellikteki pembe renkli resorufin bileşiğine dönüşür (Şekil 2.6). Ölü hücreler, metabolik aktivitelerini kaybettikleri için resazurini indirgeyemez ve floresans sinyali oluşturamazlar. Oluşan sinyal, florometre kullanılarak tespit edilir ve canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir [67].

İlaç duyarlı CCRF-CEM ve çoklu ilaca dirençli CEM/ADR5000 lösemi hücre hatları, %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin (Invitrogen, Darmstadt, Germany) içeren RPMI 1640 medyumunda haftada iki defa pasajlanarak 37 °C, %5 CO₂ şartlarında inkübe edilerek deneye hazır hale getirildi.

İzole bileşikler (linearol, foliol, 7-epicandicandiol, F2, F3 ve F4) dimetil sülfoksitte çözündürülerek 20 mM konsantrasyonunda hazırlandı ve ardından seri dilüsyonla 10 farklı konsantrasyona seyreltilti.



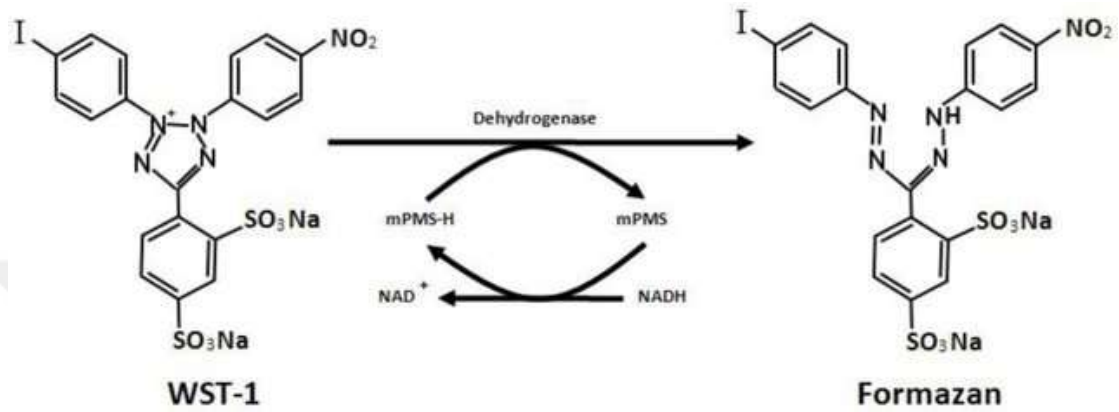
Şekil 2.6 : Hücre canlılığında belirteç olarak kullanılan resazurinin resofurine indirgenmesi

CCRF-CEM ve CEM/ADR5000 süspansiyon hücreleri (1×10^6 hücre/mL) 96 kuyucuklu plaklara kuyu başı 10.000 hücre olacak şekilde ekildi. Ardından bileşiklerin 10 farklı konsantrasyonu; 0.00003, 0.0001, 0.003, 0.01, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M hücrelere muamele edildi, kuyu başı 200 μ L hacme varıldı. 72 saat sonunda her kuyucuğa 20 μ L, %0.01 w/v resazurin solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Floresans, Infinite M200 Pro-plate okuyucu (Tecan, Crailshwim, Germany) ile Ex/Em=550 nm/590 nm dalga boyunda ölçüldü.

Her bir deney birbirinden bağımsız olarak 3 kez, her bir konsantrasyonda da 6 kez tekrarlandı. Hücre proliferasyonunu %50 inhibe etmek için gerekli olan konsantrasyon IC₅₀ değeri, logaritmik fonksiyon kullanılarak doz-cevap eğrisinden elde edildi.

2.5.2 WST-1 testi

WST-1 [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] bir tetrazolyum tuzu olup canlı hücrelerde mitokondrial dehidrogenazlarla formazana indirgenirler. Canlı hücre sayısı ne kadar fazlaysa, mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi o kadar yüksek olur ve buna karşılık oluşan formazan boyası miktarı da o kadar fazla olur (Şekil 2.7) [68].



Şekil 2.7 : WST-1'in canlı hücreler tarafından formazana indirgenmesi

Çalışmada meme kanseri hücre hatları olan the MCF-7 ile MDA-MB-231 ve fibrokistik meme epitelyal hücre hattı, MCF-10A kullanıldı.

İki bitkiye ait hazırlanan ekstrelerden maserasyonla elde edilen ana metanol ekstresi ile sıvı-sıvı ekstraksiyonla elde edilen PE, DCM ve BuOH ekstreleri aynı zamanda linearol ve 7-epicandicandiol saf maddeleri teste tabi tutuldu.

Üç hücre hattı da Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Rockville, MD), diğer hücre kültürü metaryalleri Biochrome (Berlin, Germany)'dan satın alındı. Hücreler %10 FBS, %1 glutamin, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich) medyumunda pasajlanarak ve 37°C, %5 CO₂ koşullarında inkübatörde (Thermo electro corporation) inkübe edilerek deneye hazır hale getirildi. MCF-10 hücre hattı %10 FBS, %1 glutamin, % 1 penisilin içeren MEGM (Mammary epithelial cellgrowth medium; Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) medyumunu ve Bullet kitinde (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) pasajlandı.

Hücreler deneye hazır hale gelince tripsinle flaska tutunan hücreler kaldırıldı, tripsin uzaklaştırılıp Vi-Cell cihazı (Beckman Coulter Vi Cell XR) ile sayıldı. 96 kuyucuklu plaklara kuyu başı 100 µL'de 10.000 hücre olacak şekilde ekildi ve tutunma için

plaklar inkübatörde 1 gün inkübe edildi. Ertesi gün ekstreler 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL; saf maddeler ise 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µM son konsantrasyonda ve her bir konsantrasyon için 4 tekrar olacak şekilde plaklardaki hücrelere muamele edildi. 24, 48 ve 72 saat plakları inkübatörde inkübe edildi ve ölçüm günü karanlıkta her bir kuyuya 10 µl WST-1 (Roche) eklenip 1.5 saat beklendi. Ardından mikropate okuyucu ile 450 nm dalga boyunda plaklar okunarak absorbanlar ölçüldü. Hücre proliferasyonunu %50 inhibe etmek için gerekli olan konsantrasyon IC₅₀ değeri, logaritmik fonksiyon kullanılarak doz-cevap eğrisinden elde edildi.

2.6 Şurup Formülasyonu

Sideritis türleri, geleneksel olarak soğuk algınlığı ve üst solunum sistemi enfeksiyonlarına ilişkin semptomlarda hafifletilmesinde kullanıldığı için bu endikasyon hedeflenerek bir şurup formülasyonu hazırlanması amaçlanmıştır.

Tagem -15/Ar-Ge-54 projesi kapsamında Bezmialem Fitoterapi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezinde (BİTEM) hazırlanan formülasyonda;

- *Sideritis congesta* ekstresi, 1 kısım
- *Tilia* sp. (İhlamur) ekstresi, 1 kısım
- *Zingiber officinale* (Zencefil) ekstresi, 1 kısım
- *Cinnamomum* sp. (Tarçın) ekstresi, 1/8 kısım
- Greyfurt + limon ekstresi 1/60 kısım

Ekstreler hazırlanırken öğütülmüş bitkiler çözücü ile bir gün 30-40°C’de maserasyona tabi tutuldu ertesi gün ekstraktöre bağlı cihazda süzüldü. Hazırlanan her bir ekstre koruyucu ilave edilinceye kadar buzdolabında bekletildi. Süzölmüş ekstreler yukarıda belirtilen oranlarda birleştirilerek 1 saat karıştırıldı, elde edilen karışımda pastörizasyon yapıldı, pH: 4.3’e (sitrik asitle) ayarlandı, koruyucu ilavesi % 0.1 potasyum sorbat ve % 0.1 sodyum benzoat olacak şekilde yapıldı.

Tagem projesi kapsamında alınan şurup dolum hattı (Frumak) ile total ekstre sıvısının şurup şişelerine dolumu yapıldı.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 Ekstraksiyon

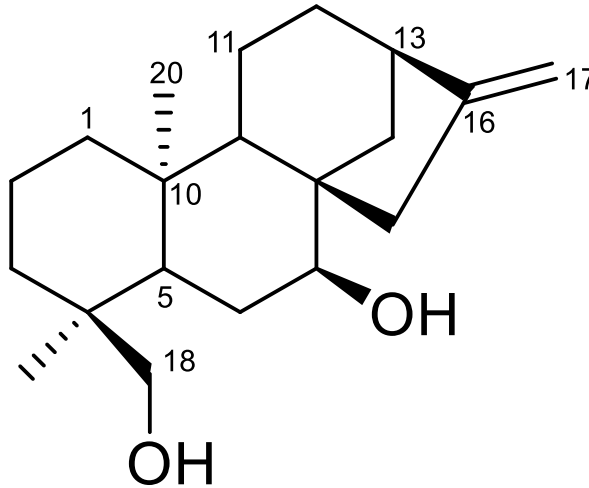
İki bitkiye ait ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstratlar, miktarları ile birlikte Tablo 3.1’de gösterilmiştir. EtOAc ekstratları genel olarak düşük verimle elde edilirken, *S. stricta* BuOH ekstratı en yüksek verimle elde edilen ekstrat olmuştur.

Tablo 3.1 : Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrat miktarları.

Bitki	Kuru Bitki	Maserasyon Metanol ekstratı	Sıvı-sıvı ekstraksiyon			
			PE ekstratı	DCM ekstratı	EtOAc ekstratı	BuOH ekstratı
<i>S. congesta</i>	1 kg	230.2 g	30.5 g	25.5 g	6.6 g	25.5 g
<i>S. stricta</i>	1 kg	346.2 g	24.8 g	5.5 g	9.8 g	135.3 g

3.2 *Sideritis congesta* Bitkisinden Saflaştırılan Maddeler

3.2.1 7-Epicandicandiol



Şekil 3.1 : 7-Epicandicandiol molekülünün kimyasal yapısı

S. congesta DCM ekstratının silika kolona uygulanması ve % 40 aseton / diklorometan çözücü sisteminden gelen fraksiyonun ikinci kolona uygulanması ile 197.6 mg olarak izole edildi.

Kütle spektrometresi analiziyle yapının moleküler $[M-H]^+$ piki m/z 303.23'de görülmüştür. $C_{20}H_{32}O_2$: 304.47 g/mol.

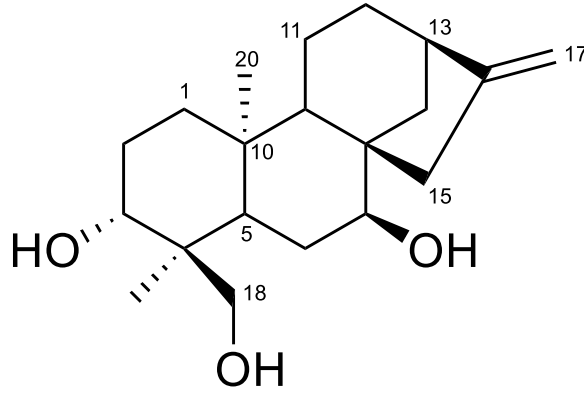
1H -NMR spektrumunda 4.80 ve 4.83'deki iki adet singletin C-17'deki iki adet protona olduğu görüldü. 3.60'taki triplet sinyal C-7'deki protona aitken 3.48 ve 2.98 de gözlenen iki adet duplet ($J = 11.3$) 18. konumdaki oksijene komşu $-CH_2$ grubuna ait sinyalleri göstermektedir. 2.68'deki yayvan singlet sinyali ise H-13 protonuna işaret etmiştir. 0.72 ve 1.06'da görülen her biri 3 protonluk iki adet singlet, moleküldeki iki metil sinyalinin varlığını göstermiştir.

Bileşiğin APT tekniği ile alınan ^{13}C -NMR spektrumunda 4 adet CH, 10 adet CH_2 , 2 adet CH_3 ve 4 C (katerner) atomu gözlemlendi. 17.65 ve 17.68'teki sinyallerin CH_3 karbonlarına ait olduğu görüldü. 103.66'da ekzosiklik karbon atomu (C-17), 155.00'da ise kuaterner karbon atomu (C-16) gözlemlendi. 77.34'de C-7 karbonu, 71.18'de ise C-18 hikroksimetilen grubunun karbonuna ait olduğu gözlemlendi.

HMBC NMR spektrumunda δ_H 0.84 ppm'deki (td, $J = 13.0, 3.8$ Hz, 1H) proton pikinin δ_C 17.65 ppm'de izlenen C-20 ile 3 bağ korelasyonu vermesi, 1.81 ppm'de izlenen multiplet pikinin 18.00 ppm'de gözlenen C-2 sinyali ile 2 bağ uzaklığı korelasyonu vermesi C-1, C-2 ve C-20 teşhisini doğrulamıştır. 3.60 ppm'deki (t, $J = 0.3$ Hz, 1H) protonun C-9 (50.80) ve C-5 (38.60) karbon pikleri ile 3 bağ korelasyon göstermiş olması C-7, C-9 ve C-5 teşhisini doğrulamıştır. δ_H 1.84-1.86 ppm'deki multiplet proton, C-7 (77.34), C-15 (45.15) ve C-9 (50.80) pikleri ile gösterdiği korelasyon H-14 protonlarından birine işaret etmiş diğer 1.15-1.18 ppm'deki multiplet H-14 protonu ise C-12 (33.62), C-13 (43.74) ve C-8 (48.39) karbon sinyalleri ile korelasyon göstermiştir.

Elde edilen verilerden molekülün 7-epicandicandiol olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1). Moleküle ait detaylı spektrum verileri Tablo 3.2'de verilmiştir.

3.2.2 Foliol



Şekil 3.2 : Foliol molekülünün kimyasal yapısı

S. congesta DCM ekstresinin silika kolona uygulanması ile gelen [43-67] fraksiyonun ikinci kolona uygulanması ile 102.5 mg olarak izole edildi.

Kütle spektrometresi (ESI-MS) analiziyle yapının moleküler $[M-H]^+$ piki m/z 319.23'de görülmüştür. $C_{20}H_{32}O_3$: 320.47 g/mol.

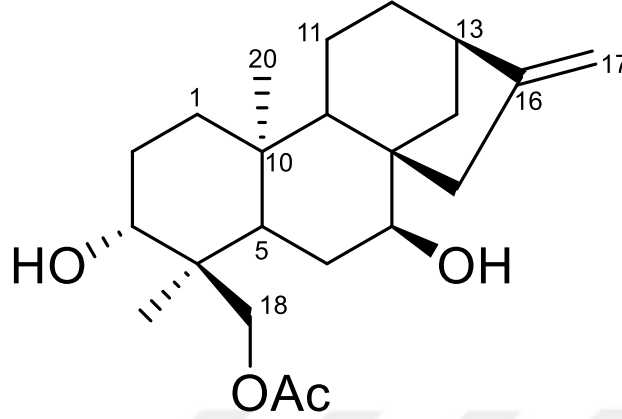
1H -NMR spektrumunda 1.08 ve 0.73 ppm'de singlet olarak 3 birim integrasyon değerindeki metil protonları ve 2.63 ppm'de karakteristik multipliyle H-13 protonu izlendi. Ekzosiklik metilen protonları ise 4.79 ve 4.75 ppm'de yayvan (br) singletler olarak görüldü.

APT tekniği ile alınan ^{13}C -NMR spektrumunda ekzosiklik metilen grubu sinyallerine ait pikler 155.23 ve 102.40 ppm'de görülmüştür. 73.39 ve 76.70 ppm'deki sinyaller ise sırasıyla 3. ve 7. pozisyonda sekonder hidroksil grupları taşıyan CH gruplarına, 67.12 ppm'deki sinyalin ise C-18'deki hidroksimetilen grubunun karbonuna ait olduğu gösterildi.

HMBC NMR spektrumunda δ_H 0.96 ppm'deki (td, $J = 13.3, 4.0$ Hz, 1H) proton pikin δ_C 17.03 ppm'de izlenen C-20 ile 3 bağ ve 26.16 ppm'de izlenen C-2 sinyali ile 2 bağ uzaklığı korelasyonu vermesi ve yine δ_H 1.84 ppm'deki (dt, $J = 13.1, 3.6$ Hz, 1H) protonun C-20 ve C-2 karbonlarıyla sırasıyla 2 bağ ve 3 bağ korelasyonu vermesi C-1 protonlarını ve C-1 de C-2 ve C-20 teşhisini doğrulamıştır. δ_H 1.14 ppm'de (ddt, $J = 11.3, 5.3, 1.7$ Hz, 1H) izlenen proton sinyalinin, C-12 (33.27), C-13 (43.76), C-8 (47.80) ve C-7 (76.70) karbon pikleri ile gösterdiği HMBC korelasyonu H-14 protonlarından birine işaret etmiş ve δ_H 1.89 ppm'de (dd, $J = 11.2, 2.3$ Hz, 1H) izlenen diğer H-14 protonu ise, C-15 (44.96), C-12 (33.27), C-9 (50.13) karbon sinyalleri ile korelasyon göstermiştir. Elde edilen

verilerden molekülün foliol olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Moleküle ait detaylı spektrum verileri Tablo 3.2’de verilmiştir.

3.2.3 Linearol



Şekil 3.3 : Linearol molekülünün kimyasal yapısı

%30 Aseton/diklorometan sisteminden 3.2 gram olarak beyaz kristaller halinde geldi, erime noktası 201-205 °C dir. $C_{22}H_{34}O_4$: 362.5 g/mol.

Kütle spektrometresi analizi ile yapının moleküler $[M+Na]^+$ piki m/z 385’de görülmüştür.

1H -NMR spektrumunda iki metil grubu 0.78 ve 1.08’da, 2.10’da ise asetil grubunun metil sinyali singlet olarak gözlemlendi. 4.84 ve 4.81’te genişlemiş singletler halinde gözlenen olefinik iki proton sinyali, moleküldeki ekzosiklik metilen grubunu göstermektedir. CH_2OH grubunun varlığı 4.06 ve 4.01 ppm’deki 11.6 Hz lik AB proton sinyalleri ile izlenmiştir. Oksijene komşu 7. ve 3. konumdaki sekonder alkol gruplarının varlığına işaret eden CH protonları 3.62’de genişlemiş singlet ve 3.55 dd olarak görülmüştür. C-13 protonu ise 2.70’de multiplet olarak görüldü. Elde edilen verilerden molekülün Linearol olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): 4.84 (1H, brs, H-17a), 4.81 (1H, br s, H-17b), 4.06 (d, $J = 11.6$ Hz, H-18a), 4.01 (1H, d, $J = 11.6$, H-18b), 3.62 (1H, brs, H-7 α), 3.55 (1H, dd, $J = 9.8, 6.8$ Hz, H-3 β), 2.70 (1H, m, H-13), 2.10 (3H, s, O-COCH₃), 1.08 (3H, s, Me-20), 0.78 (3H, s, Me-19).

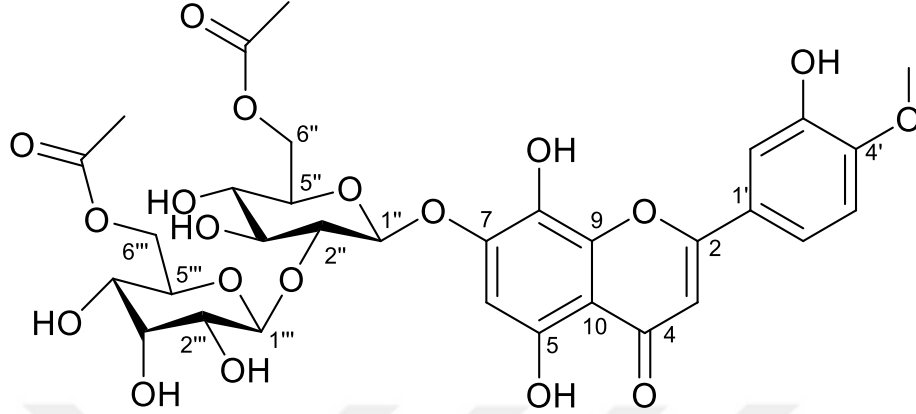
^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 38.28 (C-1), 27.33 (C-2), 72.22 (C-3), 41.83 (C-4), 38.17 (C-5), 26.48 (C-6), 76.86 (C-7), 47.96 (C-8), 50.24 (C-9), 38.79 (C-10), 17.84 (C-11), 33.53 (C-12), 43.65 (C-13), 38.41 (C-14), 45.05 (C-15), 155.00 (C-16), 103.60 (C-17), 66.05 (C-18), 11.95 (C-19), 17.97 (C-20), 21.20- COCH₃, 171.89-COCH₃

Tablo 3.2 : Foliol ve 7- Epicandicandiol moleküllerinin spektral verileri.

C	Foliol		7-Epicandicandiol	
	¹³ C	¹ H-NMR (CD ₃ OD)	¹³ C	¹ H-NMR (CDCl ₃)
1	38.28	0.96 (td, <i>J</i> = 13.3, 4.0 Hz, 1H), 1.84 (dt, <i>J</i> = 13.1, 3.6 Hz, 1H)	39.94	0.84 (dd, <i>J</i> = 13.0, 3.8 Hz, 1H), 1.81 (m, 1H)
2	26.16	1.68-1.70 (m, 1H), 1.62-1.66 (m, 1H)	18.00	1.69-1.65 (m, 1H), 1.49-1.51 (m-1H)
3	73.39	3.63 (dd, <i>J</i> = 11.6, 5.0 Hz, 1H)	35.18	1.19-1.21 (m, 1H), 1.56-1.58 (m, 1H)
4	41.40	-	36.99	-
5	38.62	1.72-1.77 (m, 1H)	38.60	1.63-1.65 (m, 1H)
6	26.81	1.60-1.53 (m, 2H)	26.96	1.57-1.59 (m, 1H), 1.66-1.68 (m, 1H)
7	76.70	3.52-3.54 (m, 1H)	77.34	3.60 (t, <i>J</i> = 0.3 Hz, 1H)
8	47.83	-	48.39	-
9	50.13	1.46-1.43 (m, 1H)	50.80	1.51-1.54 (m, 1H)
10	38.44	-	38.87	-
11	17.52	1.58-1.65 (m, 1H)	17.75	1.58-1.60 (m, 2H)
12	33.27	1.50-1.46 (m, 1H), 1.59-1.57 m, 1H)	33.62	1.69-1.71 (m, 1H) 1.58-1.60 (m, 1H)
13	43.76	2.61-2.65 (m, 1H)	43.74	2.66-2.70 (m, 1H)
14	38.16	1.14 (ddt, <i>J</i> = 11.3, 5.3, 1.7 Hz, 1H), 1.89 (dd, <i>J</i> = 11.2, 2.3 Hz, 1H)	38.64	1.84-1.86 (m, 1H) 1.15-1.18 (m, 1H)
15	44.96	2.25 (dt, <i>J</i> = 17.3, 2.6 Hz, 1H), 2.20 (dd, <i>J</i> = 17.3, 2.0 Hz, 1H).	45.15	2.23-2.26 (m, 2H)
16	155.23	-	155.00	-
17	102.4	4.75 (brs, 1H), 4.79 (brs, 1H)	103.66	4.83 (brs, 1H), 4.80 (brs, 1H)
18	67.12	3.51 (d, <i>J</i> = 11.1 Hz, 1H) 3.29 d (d, <i>J</i> = 11.1 Hz, 1H)	71.18	3.48 (d, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H), 2.98 (d, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H)
19	11.13	0.73 (s, 3H)	17.68	0.72 (s, 3H)
20	17.03	1.08 (s, 3H)	17.65	1.06 (s, 3H)

3.3 *Sideritis stricta* Bitkisinden Saflaştırılan Maddeler

3.3.1 4'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)- 6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside] (F1)



Şekil 3.4 : 4'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)- 6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside] molekül yapısı

Butanol ekstresinin vakum likit kromatografisi kolona uygulanması ile gelen 7. fraksiyonun sefadeks kolana uygulanması ile 72 mg olarak parlak sarı renginde katı olarak elde edildi.

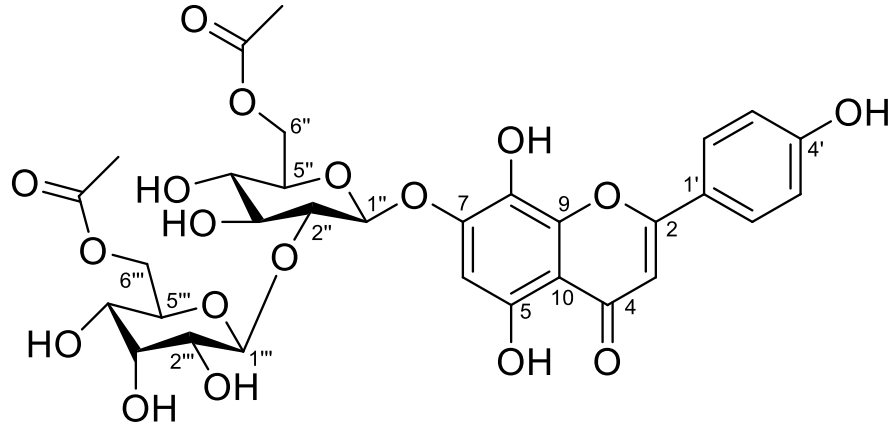
Kütle spektrumunda $[M+1]^+$ piki m/z 725.19'de ve $[M+Na]^+$ piki 747.17'de gözlemlendi. $C_{32}H_{36}O_{19}$: 724.62 g/mol.

1H -NMR 7.58 (1H, dd, 2.31 Hz, 8.53 Hz), 7.47 (1H, d, 2.27 Hz) ve 7.09 (1H, d, 8.62 Hz) ppm'deki sinyaller B halkasının ABX şeklinde 3,4-disüstitüe olduğunu gösterdi. Flavonlara bağlı şekerlerin asetil gruplarına ait metiller 2.00 ve 2.14'te 3 birimlik integrasyonla gözlemlendi. HMBC spektrumu yardımıyla 6.71 ppm'deki singlet sinyalin H-6'ya, 6.63 ppm'deki singletin ise H-3'e ait olduğu gösterildi.

APT tekniği ile alınan ^{13}C -NMR spektrumunda on beş CH, iki CH_2 , üç CH_3 ve oniki adet C olmak üzere 32 karbon sinyali mevcuttur. İki şekerle ait asetil gruplarındaki metil gruplarına ait sinyaller 19.48 ve 19.40 ppm'de, karboksil sinyalleri ise 171.39 ve 171.92 ppm'de görülmüştür.

Maddeye ait moleküler yapı Şekil 3.4'te ve detaylı spektrum verileri Tablo 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

3.3.2 Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F2)



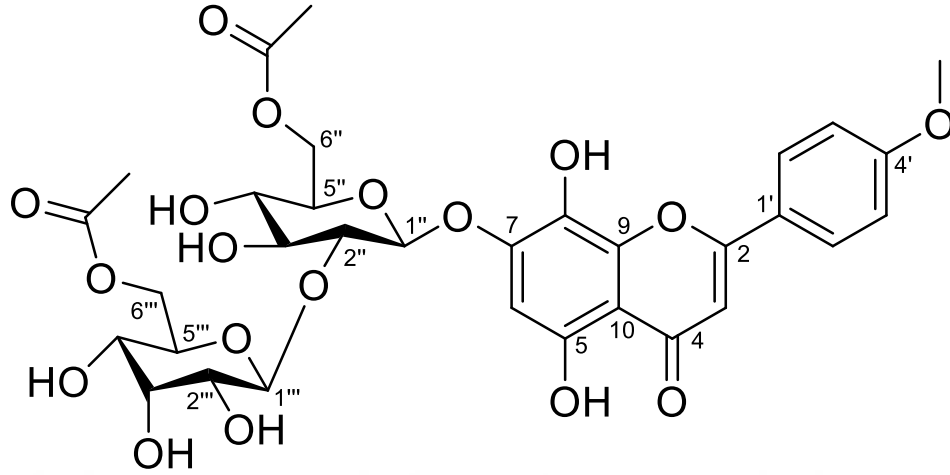
Şekil 3.5 : Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] molekül yapısı

F1 maddesinin elde edildiği kolondan 14.3 mg olarak katı ve sarı renğinde elde edildi. Kütle spektrumunda m/z $[M+1]^+$ 695.2 ve $[M+Na]^+$ 717.2 moleküler iyon piki gözlemlendi. $C_{31}H_{34}O_{18}$: 694.6 g/mol.

1H -NMR spektrumunda her biri iki birimlik integrasyon değerindeki δ_H 7.92 ve 6.93 ppm'de 8.8 Hz'lik iki orto etkileşime sahip dubletin bulunması flavon iskeletinin B halkasının AA' BB' şeklinde 4' konumundan mono süstitüe olduğunu gösterdi. δ_H 6.63 ve 6.71 ppm'de bulunan singletlerden HMBC spektrumu incelenerek 6.60'taki sinyalin H-3'e, 6.71'daki sinyalin ise H-6'ya ait olduğu gösterildi. δ_H 2.14 ve 1.98 ppm'de görülen her biri 3 birim integrasyon değerindeki singletler moleküldeki iki asetil grubuna ait CH_3 gruplarının varlığını gösterdi. Anomerik karbonlar 5.05 ve 4.92 ppm'de dublet olarak görüldü, HSQC spektrumu yardımıyla bu anomerik protonların sırasıyla 102.89 ve 101.19 anomerik karbonları ile örtüştüğü görülmüştür.

^{13}C -NMR spektrumunda on beş CH, iki CH_2 , iki CH_3 ve onbir adet C olmak üzere molekülün kapalı formülüne uygun olarak 31 karbon sinyali mevcuttur. İki şekere ait asetil gruplarındaki metil gruplarına ait sinyaller 19.44 ve 19.39 da, karboksil sinyalleri ise 171.60 ve 171.35'de görülmüştür. Flavonoid'in B halkasındaki 2' ve 4' karbonlar 128.45; 3' ve 5' karbonlar ise 115.71'de görülmüştür. Moleküle ait detaylı spektrum verileri Tablo 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. Tüm veriler incelendiğinde yapının isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] olduğu ortaya çıktı (Şekil 3.5).

3.3.3 4'-O-methylisoscutellarein-7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)-6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside] (F3)



Şekil 3.6 : 4'-O-methylisoscutellarein-7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)- 6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside molekül yapısı

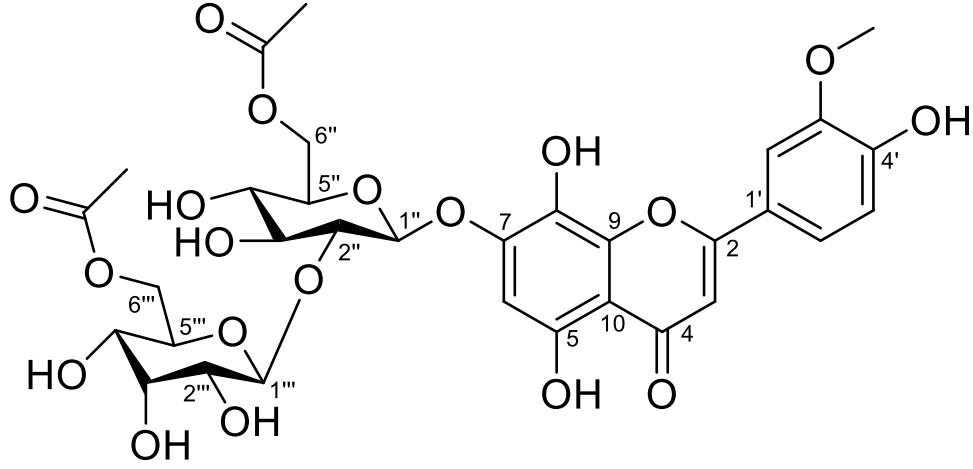
Molekül *S. stricta* butanol ekstresinin ters faz kromatografi ile gelen 8. fraksiyonun sefadeks kolona uygulanması ve preparatif İTK ile 10 mg olarak parlak sarı renğinde katı olarak elde edildi.

Kütle spektrumunda m/z $[M+1]^+$ 709.2 moleküler iyon piki gözlemlendi. $C_{32}H_{36}O_{18}$ için hesaplanan: 708.6 g/mol.

1H -NMR spektrumunda δ_H 8.02 (2H, d, 9.0 Hz, H-2'/ H-6') ve 7.10 (2H, d, 9.0 Hz, H-3'/ H-6') pikleri flavonun AA' BB' şeklinde iskelete sahip olduğunu göstermiştir. δ_H 6.69 ve 6.72'de bulunan singlet sinyallerin sırasıyla C-3 ve C-6'daki protonlara ait olduğu gösterildi.

APT tekniği ile alınan ^{13}C -NMR spektrumunda moleküle ait on altı CH, iki CH_2 , üç CH_3 ve onbir adet C olmak üzere 32 karbon sinyali molekülün kapalı formülüne uygun şekilde mevcuttur. Flavonoid'in B halkasındaki 2' ve 4' karbonlar 128.28; 3' ve 5' karbonlar ise 114.24'de görülmüştür. δ_C 19.38 ve 19.44 ppm'deki metil sinyalleri; 171.63 ve 171.36'de karbonil sinyalleri molekülde iki adet asetil grubunun varlığını göstermektedir. Moleküle ait detaylı spektrum verileri Tablo 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. Moleküle ait spektrum verileri incelendiğinde yapının 4'-O-methylisoscutellarein-7-O-[6'''-O-acetyl-β-D-allopyranosyl-(1 → 2)- 6''-O-acetyl-β-D-glucopyranoside olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 3.6).

3.3.4 3'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] (F4)



Şekil 3.7 : 3'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] molekül yapısı

F3 ile aynı kolondan 9.3 mg, sarı ve katı olarak elde edildi. Kütle spektrumunda $[M+1]^+$ m/z piki 725.19'de ve $[M+Na]^+$ piki 747.17 gözlemlendi $C_{32}H_{36}O_{19}$: 724.62 g/mol.

1H -NMR spektrumunda 7.58 (dd, 8.54 Hz, 2.28 Hz), 7.48 (d, 2.27 Hz) ve 7.08 (d, 8.64 Hz) sinyalleri B halkasının ABX sistemi şeklinde 3,4-disüstitüe olduğunu gösterdi. İki karakteristik anomerik protonun δ_H 5.05 (1H, d, 8.12 Hz) ve 4.91 (1H, d, 7.53 Hz)'de ve 3.43-4.48 birimleri aralığında izlenen hidroksillenmiş proton sinyalleri molekülde β -konfigürasyonunda iki adet şekerin varlığına işaret etti. H-1''' (5.05) /C-2 (82.39) HMBC etkileşimi allozun glukozu C-2 konumundan bağlı olduğunu gösterdi. δ_H 2.14 ve 2.00 ppm'de iki metil sinyali, HSQC spektrumunda görülen bu iki sinyale denk düşen 19.47 ve 19.40 ppm karbonları ve δ_C 171.37 ve 171.90 ppm'deki iki karbonil sinyali, molekülde iki asetil grubunun varlığını doğruladı. δ_H 6.71 ve 6.63 ppm'de bulunan singlet sinyaller C-3 ve C-6'daki protonlar için uygun olup, HMBC spektrumuna bakıldığında 6.63 (H3)/164.98 (C-2), 6.63 (H3)/ 183.08 (C-4), 6.63 (H3)/123.52 (C-1'), 6.63 (H3)/106.42 (C-10) etkileşimleri görüldü, bu veriler de δ_H 6.63 pikinin H-3 protonuna ait olduğunu doğruladı. HMBC spektrumunda görülen H-1'' (4.91) /C-7 (150.39) etkileşimi glukozun flavon iskeletine C-7'den bağlandığını, C-2'' (82.39) /H-1''' (5.05) etkileşimi allozun glukoz grubuna C-2'' konumundan bağlandığını ifade etti (Şekil 3.7). APT tekniği ile alınan ^{13}C -NMR spektrumunda on beş CH, iki CH₂, üç CH₃ ve oniki adet C (katerner) olmak üzere 32 karbon sinyali mevcuttur. Moleküle ait spektrum verileri Tablo 3.3 ve 3.4'de verilmiş olup molekül yapısı Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3 : Saflaştırılan flavonoid glikozitlerinin ¹³C-NMR spektrum verileri.

C	F1	F2	F3	F4
Aglikon				
2	165.00	165.35	164.91	164.98
3	103.02	102.28	102.90	103.00
4	183.08	183.09	183.11	183.08
5	152.63	152.60	152.68	152.64
6	100.35	100.28	100.33	100.31
7	150.40	150.32	150.40	150.39
8	128.36	*	128.33	*
9	143.97	143.93	143.96	143.96
10	106.44	106.38	106.42	106.42
1'	123.52	121.60	123.09	123.52
2'	111.29	128.45	128.28	111.26
3'	146.79	115.71	114.24	151.45
4'	151.46	161.88	163.21	146.79
5'	112.76	115.71	114.24	112.75
6'	119.11	128.45	128.28	119.09
4'-OMe	55.1	-	54.71	55.10
Glukopiranoz				
1''	101.23	101.19	101.18	101.21
2''	82.37	82.59	82.63	82.39
3''	76.03	76.03	76.03	76.02
4''	69.97	69.97	69.96	69.96
5''	74.31	74.31	74.32	74.30
6''	63.28	63.27	63.27	63.27
CO CH3	19.48	19.44	19.44	19.47
CO CH3	171.39	171.60	171.36	171.37
Allopiranoz				
1'''	102.77	102.89	102.92	102.78
2'''	71.62	71.64	71.66	71.63
3'''	71.17	71.17	71.16	71.17
4'''	67.04	67.03	67.06	67.03
5'''	71.97	71.98	71.99	71.96
6'''	63.61	63.60	63.64	63.61
CO CH3	19.40	19.39	19.38	19.40
CO CH3	171.92	171.35	171.63	171.90

* sinyal tespit edilmedi.

Tablo 3.4 : Saflaştırılan flavonoid glikozitlerinin ¹H-NMR spektrum verileri.

H	F1	F2	F3	F4
Aglikon				
H-3	6.63 s	6.63 s	6.69 s	6.63 s
H-6	6.71 s	6.71 s	6.72 s	6.70 s
H-2'	7.47 d (2.27)	7.92 d (8.83)	8.02 d (8.93)	7.46 d (2.28)
H-3'	-	6.93 d (8.83)	7.10 d (8.98)	-
H-5'	7.09 d (8.62)	6.93 d (8.83)	7.10 d (8.98)	7.08 d (8.57)
H-6'	7.58 dd (2.31, 8.53)	7.92 d (8.83)	8.02 d (8.93)	7.58 dd (8.56, 2.29)
4'-OCH ₃	3.94 s	-	3.89 s	3.94 s
Glukopiranoz				
H-1''	4.94 d*	4.92 d (7.57)	4.91 d (6.80)	4.91 d (7.53)
H-2''	3.71-3.74	3.71-3.74 m	3.71-3.75 m	3.71-3.74 m
H-3''	3.65-3.69 m	3.69-3.65 m	3.69-3.65 m	3.66-3.69 m
H-4''	3.43-3.45 m	3.43-3.45 m	3.44-3.42 m	3.43-3.45 m
H-5''	3.67-3.68 m	3.72-3.70 m	3.72-3.70 m	3.70-3.72
H-6''	4.47 dd (2.24, 11.88)	4.47 dd (2.17, 11.89)	4.47 dd (2.23, 11.86)	4.48 dd (11.82, 2.12)
	4.30 dd (5.80, 13.22)	4.30 dd (12.49, 5.01)	4.30 dd (11.95, 4.5)	4.30 (13.40, 5.95)
COCH ₃	2.14 s	2.14	2.14 s	2.14 s
Allopiranoz				
H-1'''	5.07 d*	5.05 d (8.05)	5.06 d	5.05 d (8.12)
H-2'''	3.45-3.47 m	3.45-3.47 m	3.45-3.47 m	3.46 dd (8.09, 2.84)
H-3'''	4.12 t (2.90)	4.12 t	4.12 t (2.89)	4.12 t (2.89)
H-4'''	3.65-3.62 m	3.65-3.62 m	3.65-3.62 m	3.64 dd (10.02, 2.77)
H-5'''	4.04 dd (2.24, 5.13, 10.01)	4.05 ddd	4.05 ddd (2.16, 5.22; 10.00)	4.04 ddd (2.12, 5.02, 10.03)
H-6'''	4.33 dd (2.20, 12.12)	4.33 dd (12.11, 2.10)	4.33 dd (2.17, 12.13)	4.34 dd (2.20, 12.15)
	4.25 dd (5.11, 12.18)	4.28-4.23 m	4.28-4.23 m	4.25 (12.21, 5.12)
COCH ₃	2.00 s	1.98 s	1.97 s	2.00 s

* : sinyal J değeri hesaplanamadı

3.4 LC-HRMS Sonuçları

S. congesta ve *S. stricta* bitkilerinin sıvı-sıvı ekstraksiyonla elde edilen PE, DCM, EtOAc ve BuOH ekstralarında LC-HRMS tayini yapılmış ve 22 madde tanımlanmıştır. Karşılaştırılan 4 ekstre içinde, kütüphanede bulunup taranan maddelerce en zengin EtOAc ekstresi ve bunu takiben BuOH ekstresi bulunmuştur. PE ekstresi beklenildiği üzere fenolik maddelerce diğer ekstrele göre daha fakir gözlemlenmiştir.

S. congesta bitkisi için EtOAc ekstresi p-coumaric acid (134555.54 mg/kg), verbascoside (64483.85 mg/kg), vanillic acid (22607.11 mg/kg), hispidulin 7-glucoside (13846.21 mg/kg) maddelerince zengin bulunmuştur. BuOH ekstresi verbascoside (39663.64 mg/kg), chlorogenic acid (12035.84 mg/kg) maddelerini, DCM ekstresi ise acacetin (24047.93 mg/kg) vanillic acid (20162.41 mg/kg) ve p-coumaric acid (16275.00 mg/kg) maddelerini zengin olarak içermektedir (Tablo 3.5)

Tablo 3.5 : *S. congesta* ekstralarında tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg ekstre).

Madde Adı	SC-PE	SC-DCM	SC-EtOAc	SC-BuOH	U %
Ascorbic acid	272.78	98.83	120.90	77.96	3.94
Chlorogenic acid	2295.55	2150.00	7638.78	12035.84	3.58
Verbascoside	3197.05	6869.43	64483.85	39663.64	2.93
Caffeic acid	62.38	146.30	4730.79	162.94	3.74
Vanillic acid	1053.73	20162.41	22607.11	368.79	3.49
Luteolin 7-glucoside	7.61	19.04	113.75	55.48	4.14
p-Coumaric acid	1825.72	16275.00	134555.54	2659.28	3.31
Rutin	189.38	179.07	536.44	1429.28	3.07
Hyperoside	2.47	7.67	152.74	40.51	3.46
Apigenin 7-glucoside	35.56	105.73	865.86	131.07	3.59
Quercetin	0.95	5.75	27.01	5.97	2.95
Salicylic acid	215.35	1448.76	6448.41	550.04	1.89
Nepetin	7.94	98.81	414.13	7.21	2.19
Kaempferol	13.47	92.15	699.32	11.73	3.56
Apigenin	33.27	388.60	1125.96	16.64	2.87
Chrysin	3.85	45.28	6.61	0.29	3.24
Acacetin	1481.46	24047.93	3064.52	48.64	3.98
Homogentisic acid	<LOD	<LOD	1375.69	<LOD	4.35
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	4.46	42.33	155.81	2.88	3.79
Hispidulin 7-glucoside	1139.18	3420.36	13846.21	3650.23	4.57
Apigenin 7-O-acetylglucoside	2.99	11.97	54.38	3.83	2.70
Apigenin 7-metilal	192.22	3089.17	398.86	6.36	2.94

Tablo 3.6 : *S. stricta* ekstrelerinde tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg ekstre).

Madde Adı	SS-PE	SS-DCM	SS-EtOAc	SS-BuOH	U %
Ascorbic acid	129.30	125.04	40.67	32.69	3.94
Chlorogenic acid	7222.01	3451.93	18795.35	19263.92	3.58
Verbascoside	11671.16	3946.26	62273.74	31015.36	2.93
Caffeic acid	123.55	185.10	816.61	65.81	3.74
Vanillic acid	524.07	19617.69	1042.16	<LOD	3.49
Luteolin 7-glucoside	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.14
p-Coumaric acid	2276.63	18164.59	7678.22	935.84	3.31
Rutin	990.64	248.09	642.78	1689.96	3.07
Hyperoside	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3.46
Apigenin 7-glucoside	3.78	1.49	22.95	8.87	3.59
Quercetin	5.38	8.06	90.70	12.60	2.95
Salicylic acid	515.17	14393.50	534.56	261.76	1.89
Nepetin	16.02	93.49	194.06	21.07	2.19
Kaempferol	8.49	12.04	55.96	<LOD	3.56
Apigenin	3.17	7.29	19.74	0.66	2.87
Chrysin	1.34	27.42	1.73	0.26	3.24
Acacetin	61.10	3046.55	185.76	4.21	3.98
Homogentisic acid	<LOD	152.78	212.43	39.93	4.35
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	7.33	76.11	23.30	1.75	3.79
Hispidulin 7-glucoside	295.52	104.53	2794.68	1609.64	4.57
Apigenin 7-O-acylglucoside	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.70
Apigenin 7-metilat	8.05	395.16	24.33	0.57	2.94

LOD: Tayin limiti

S. stricta ekstrelerinden EtOAc ekstresi verbascoside (62273.74 mg/kg), chlorogenic acid (18795.35 mg/kg); BuOH ekstresi verbascoside (31015.36 mg/kg), chlorogenic acid (19263.92 mg/kg); DCM ekstresi vanillic acid (19617.69 mg/kg), p-coumaric acid (18164.59 mg/kg), salicylic acid (14393.50 mg/kg), PE ekstresi ise verbascoside (11671.16 mg/kg) maddelerince zengin bulunmuştur (Tablo 3.6).

Ölçüm Belirsizliği; Belirsizlik değerleri sonuçlarla birlikte Tablo 3.6’da U (k=2, % 95 güvenirlilik aralığında) verilmiştir. Ölçüm belirsizliği GUM ve EA-4/02 dokümanlarına uygun olarak belirlenmiştir.

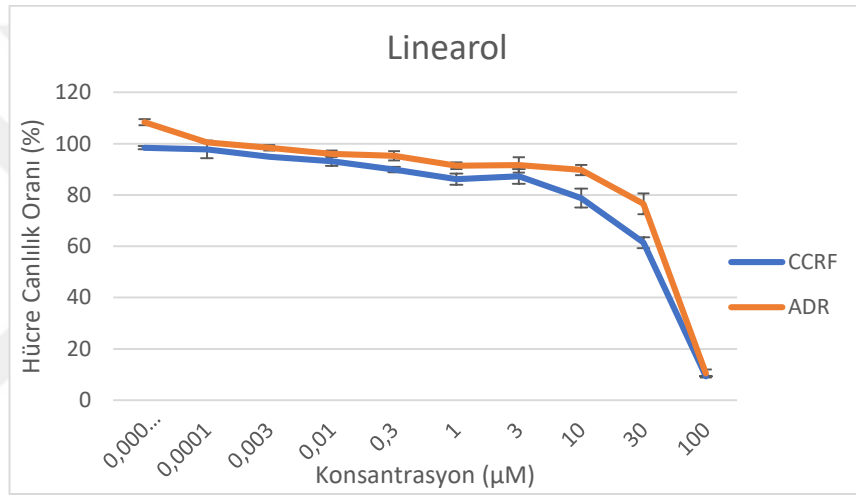
LC-HRMS analizi ile ilgili 8 farklı ekstrenin kromatogramları Ek I’da verilmiştir.

3.5 Sitotoksik Aktivite Sonuçları

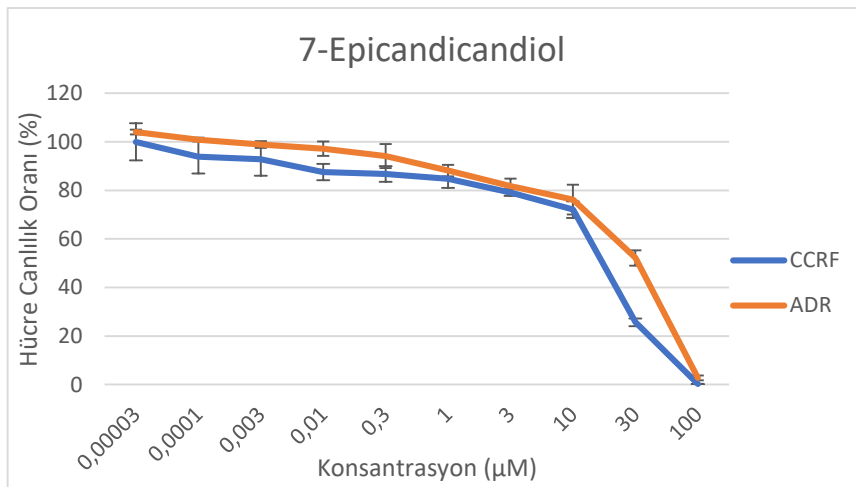
3.5.1 Resazurin testi sonuçları

İzole edilen diterpenler (linearol, 7-epicandicandiol ve foliol) ve flavonid glikozitleri (F2, F3 ve F4) lösemi hücre hatları olan CCRF-CEM ve çoklu ilaca dirençli CEM/ADR5000 üzerinde test edilmiştir.

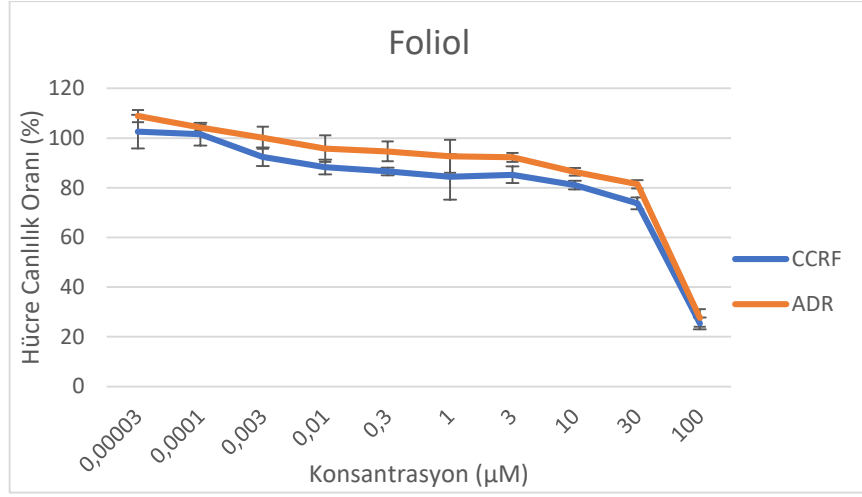
Flavonoid glikozitleri CCRF-CEM hücre hatları üzerinde düşük sitotoksik aktiviteye sahipken CEM/ADR5000 hücre hatlarında aktif bulunmamıştır. Test edilen 3 diterpen içinde en aktif olarak 7-epicandicandiol gösterilmiş olup CCRF ve ADR hattı için IC₅₀ değerleri sırasıyla 16.83 ± 1.00 µM ve 31.52 ± 3.00 µM olarak hesaplanmıştır.



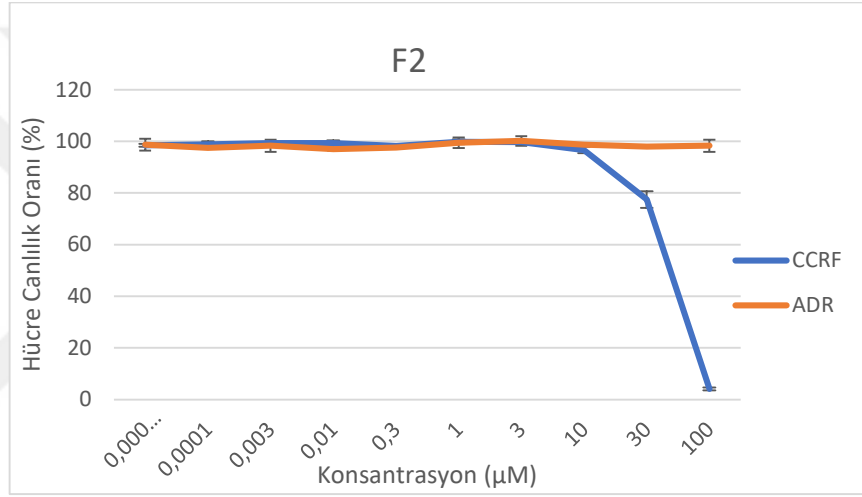
Şekil 3.8 : Linearol maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi



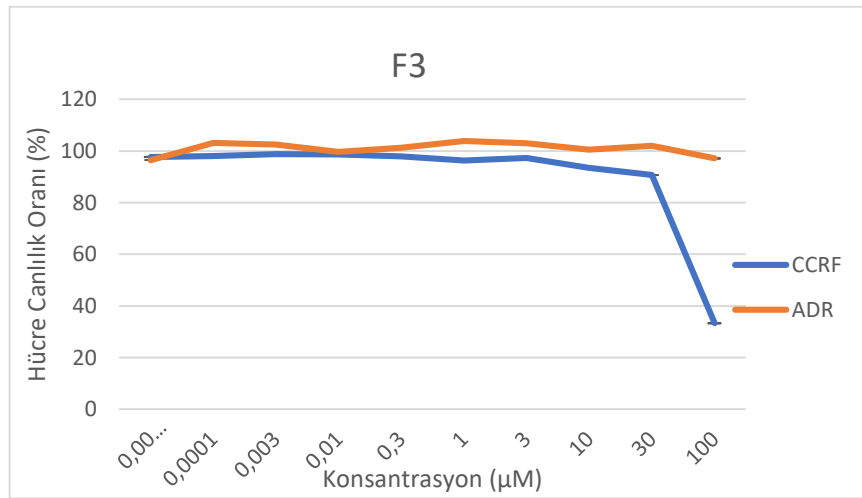
Şekil 3.9 : 7-Epicandicandiol maddesinin CCRF ve CEM hücre hatları canlılığı üzerine etkisi



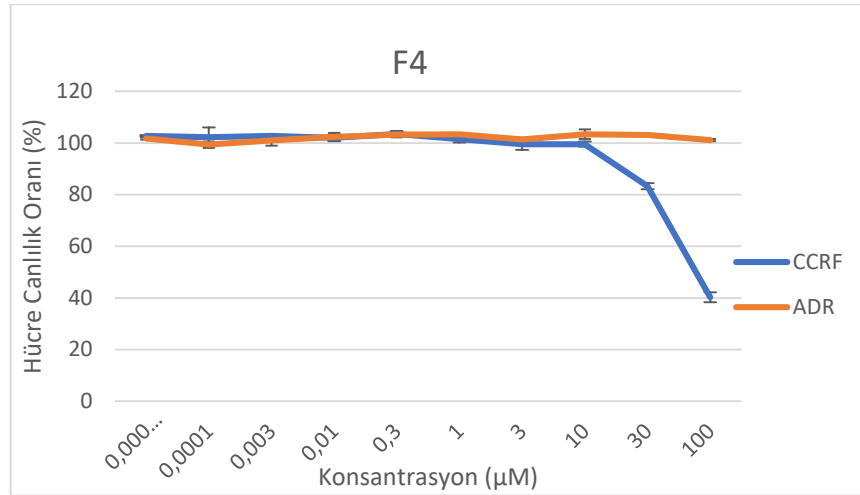
Şekil 3.10 : Foliol maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.11 : F2 maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.12 : F3 maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi



Şekil 3.13 : F4 maddesinin CCRF ve ADR hücre hatları canlılığı üzerine etkisi

Maddelerin hücre hatları canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 ve 3.13'te ve hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7 : Maddelerin Resazurin testi ile belirlenen IC₅₀ değerleri.

Madde	IC ₅₀ (μM)	
	CCRF-CEM	CEM/ADR5000
7-Epicandicandiol	16.83 ± 1.00	31.52 ± 3.00
Linearol	39.00 ± 2.03	48.51 ± 2.30
Folliol	54.16 ± 0.19	60.70 ± 1.80
F2	47.04 ± 2.48	> 100
F3	70.04 ± 4.78	> 100
F4	76.35 ± 3.58	> 100

3.5.2 WST-1 testi sonuçları

S. congesta ve *S. stricta* bitkilerinin ana ekstresi olan MeOH ekstraktlarının yanısıra ana ekstraktların geri ekstraksiyonu ile elde edilen üç alt ekstre (PE, DCM ve BuOH) ve *S. congesta*'dan izole edilmiş linearol ve 7-epicandicandiol diterpenlerinin antiproliferatif etkileri MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları ile MCF-10A fibrokistik meme epitelyal hücre hattında test edildi.

Sonuçlar, test edilen örnekler için en dirençli hücre hattının MDA-MB-231, en duyarlı hattın ise MCF-7 olduğunu göstermiştir. *S. stricta* ekstraktları için MDA MB 231 ve MCF-10A benzer duyarlılıkta bulunurken *S. congesta* ekstraktları için MCF-7 ve MCF-10A hattı benzer duyarlılıkta bulunmuştur.

Ektreler içinde *S. congesta* DCM ekstresi genel olarak en düşük IC₅₀ değerlerini vermiştir, özellikle ana ekstre olan MeOH ekstresinden daha aktif görülmesi, sıvı sıvı ekstraksiyonla aktif olmayan madde grupların diğer alt ekstrelelere geçmesine bağlanmıştır. MCF-7 hücre hattı için test edilen üç zaman diliminde (24, 48 ve 72 sa) de IC₅₀ değerleri 6.5 µg/mL'den düşük bulunmuştur. MDA MB 231 hücre hattı için 20.65, 21.23 ve 27.97 µg/mL, MCF-10A hücre hattı içinse 30.66, 16.38 ve 25.52 µg/mL olarak bulunmuştur. İnkübasyon zamanındaki artış ile aktivitede bir korelasyon görülmemiştir.

S. congesta DCM ekstresinin potent görülmesine karşılık bu ekstreden elde edilen ve ekstre içinde yüksek miktarda bulunan linearol maddesinin aktivite göstermediği dolayısıyla DCM ekstresinin aktivitesinden sorumlu olmadığı gösterilmiştir. Yine bu ekstreden izole edilen 7-epicandiciandiol'ün 72 saat inkübasyonla MCF-7, MDA MB 231 ve MCF-10A hücre hatları için IC₅₀ değerleri sırasıyla 12.39, 31.96 ve 11.90 µM olarak bulunmuştur. MCF-7 ve MDA MB 231 için inkübasyon zamanındaki artış ile aktivite artarken MCF-10A için değişiklik göstermemiştir.

S. stricta ekstrelerinin tamamı 3 inkübasyon zamanı için de MCF-7 hücre hattı üzerinde antiproliferatif aktivite göstermiş ve IC₅₀ değerleri 10 µg/mL'dan düşük bulunmuştur. Diğer iki hücre hattı için ana ekstre MeOH ekstresi aktif bulunmazken alt ekstrelerden DCM ve PE ekstreleri benzer IC₅₀ değerlerini vermiştir. Ekstreler ve saf maddeler için hesaplanan IC₅₀ değerleri Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8 : Ekstrelerin ve maddelerin WST-1 testi ile belirlenen IC₅₀ değerleri

	MCF-7			MDA MB 231			MCF 10A		
	24 sa	48sa	72 sa	24 sa	48 sa	72 sa	24 sa	48 sa	72 sa
Ekstreler (µg/mL)									
<i>S. congesta</i> MeOH	< 6.25	24.00	17.86	> 100	82.40	75.61	17.86	65.56	20.30
<i>S. congesta</i> PE	30.55	30.79	14.40	80.37	67.31	65.21	60.61	41.87	11.96
<i>S. congesta</i> DCM	< 6.25	< 6.25	< 6.25	20.65	21.23	27.97	30.66	16.38	25.52
<i>S. congesta</i> BuOH	10.48	83.48	12.19	> 100	> 100	93.16	> 100	> 100	9.40
<i>S. stricta</i> MeOH	< 6.25	< 6.25	< 6.25	> 100	> 100	> 100	> 100	64.70	> 100
<i>S. stricta</i> PE	< 6.25	< 6.25	9.83	58.71	42.59	34.45	41.37	43.35	32.48
<i>S. stricta</i> DCM	< 6.25	< 6.25	< 6.25	71.60	28.44	38.34	31.76	34.98	42.58
<i>S. stricta</i> BuOH	< 6.25	< 6.25	< 6.25	> 100	51.87	> 100	> 100	25.32	63.46
Saf Maddeler (µM)									
Linearol	> 100	> 100	52.77	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
7-Epicandicandiol	37.84	39.31	12.39	42.89	37.67	31.96	11.90	12.26	11.90

3.6 Şurup Formülasyonu

Hazırlanan koyu kahve rengindeki, homojen, hafif vizkoz formülasyonun, şurup dolum hattı ile şişelere dolumu ile toplamda 1600 şişe şurup elde edildi, etiket ve kutulama yapıldı.

Hazırlanan şurup formülasyonunda (Şekil 3.14) diğer iki ana bitki olarak *Zingiber officinale* ve *Tilia* sp. seçilmesinin sebebi bu iki bitkinin geleneksel olarak kullanım amaçları ve literatürde gösterilmiş olan biyoaktiviteleridir.

Tilia sp. (ıhlamur) soğuk algınlığı semptomlarını azaltmak için geleneksel olarak kullanılmaktadır. Komisyon E monografi ıhlamur yapraklarının soğuk algınlığı ve soğuk algınlığı ile ilişkili öksürüğün tedavisinde kullanımını onaylamıştır [69].

Zingiber officinale (zencefil) geleneksel olarak soğuk algınlığı, öksürük ve üst solunum yolları enflamasyonu ile ilişkili diğer semptomların azaltılmasında kullanılmaktadır [70, 71]. Zencefil bileşiklerinin fosfodiesterazın baskılanması yoluyla insan hava yolu düz kasında β -agonist indüklü gevşemeyi desteklediği [72], polisakkaritlerinin rodentlerde sitrik asitle stimule edilmiş öksürük sayısını azalttığı gösterilmiştir [73]. Biyoaktivite testlerinde taze zencefil, kuru zencefilden daha aktif olarak gösterildiği için formülasyonda taze zencefil kullanılmıştır [74].

Formülasyona giren bitkilerin ekstraksiyonu için çözücü sistemi olarak %50 gliserin/su seçilmiştir. Gliserinin etanol gibi uçucu ve yanıcı olmaması, aynı zamanda etanol gibi suyla kolaylıkla karışıyor olması özellikleri ekstraksiyon için kullanımını uygun yapmaktadır. Tatlı tadı, düşük glisemik indeksi ile gliserin çocuklarda, alkol-bağımlılarında, dikkat gerektiren (cihaz operatörleri, sürücüler gibi) işlerde çalışanlarda ve diyabetlilerde kullanımı etanole göre daha güvenlidir [75].

Gliserin viskoz özelliğiyle farenksi kaplayarak bir kayganlaştırıcı görevi görmekte, farenks ile dilin hareketli yüzeyleri arasındaki sürtünmeyi azaltmakta ve dolayısıyla öksürüğün yatışmasına yardımcı olmaktadır [76]. Aynı zamanda gliserin-su sisteminin polifenolik bileşikleri ve flavonoidleri ekstre etmede diğer çözücü sistemlerine kıyasla daha etkin olduğu belirtilmiştir [77].



Şekil 3.14 : Etiketli ve kutulu haliyle şurup formülasyonu

4. SONUÇ

Bu çalışmada ülkemiz için iki endemik bitki olan *Sideritis congesta* ve *S. stricta* bitkisinin maserasyon ve sıvı-sıvı ekstraksiyonla ekstreleri hazırlanmış, ekstrelerin antiproliferatif aktivitelerine, MCF-7 ve MDA MB 231 meme kanseri hücre hatları ile sağlıklı meme epitel hücreleri olan MCF 10A hattında WST-1 testi ile bakılmıştır. *S. congesta* DCM ekstresi tüm ekstreler içinde hem MCF-7 hem de MDA MB 231 hücre hattında en düşük IC₅₀ değerini verdiği için, *S. stricta* BuOH ekstresi ise tüm ekstreler içinde en yüksek ekstraksiyon verimine sahip olduğu için izolasyona tabi tutulmuştur. *S. congesta* DCM ekstresinden linearol, 7-epicandicandiol ve foliol maddeleri, *S. stricta* BuOH ekstresinden ise isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 4'-O-methylisoscuteallarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 3'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] maddeleri izole edilmiştir.

Saflaştırılan maddelerden linearol ve 7-epicandicandiol WST-1 ile test edildiğinde diklorometan ekstresinde yüksek miktarda bulunan Linearol'un IC₅₀ değeri MCF-7 hücre hattında 72 saat inkübasyonla 52.77 μ M, diğer hücre hatlarında >100 μ M olarak hesaplandığı için antiproliferatif aktiviteye sahip olmadığı dolayısıyla DCM ekstresinin aktivitesinden sorumlu olmadığı anlaşılmıştır. Buna karşılık 7-epicandicandiol maddesinin IC₅₀ değeri MCF-7, MDA MB 231 ve MCF-10A hatları için 72 saat inkübasyonla IC₅₀ değerleri sırasıyla 12.39, 31.96 ve 11.90 μ M olarak bulunmuştur.

Bu çalışma ile ilk defa linearol ve 7-epicandicandiol maddelerinin antiproliferatif aktivitelerine MCF-7 ve MDA MB 231 meme kanseri hücre hatları MCF-10A fibrokistik meme epitelyal hücre hatlarında bakılmıştır. Daha önce danışman hocamın grubu tarafından *S. lycia*'dan izole edilen linearol, 7-epicandicandiol, sidol, siderol, sideridiol sitotoksik aktivitelerine KB, P-388, COL-2, hTERT RPE, LU1, LNCaP ve A2780 kanser hücre hatlarında bakılmış ve 7-epicandicandiol test edilen maddeler içinde en aktif bileşik olarak gösterilmiştir (ED₅₀ değerleri sırasıyla 13.3 μ g/mL, 11.8 μ g/mL, 17.9 μ g/mL, 14.9 μ g/mL ve 9.0 μ g/mL) [61].

Yine bu çalışma ile ilk defa linearol, foliol ve 7-epicandicandiol diterpenleri ile isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 4'-O-methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 3'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] maddelerinin sitotoksik aktivitelerine CCRF-CEM ve CEM/ADR5000 lösemi hücre hatlarında bakılmıştır. Flavonoid diglikozitleri yüksek IC₅₀ değerleri ile aktif olarak bulunmazken diterpenlerden linearol ve foliol düşük aktivite göstermiştir. 7-epicandicandiol maddesi test edilen diğer maddelere kıyasla daha iyi sitotoksik aktivite göstermiş olup IC₅₀ değerleri sırasıyla 16.83 $\pm$ 1.00 μ M ve 31.52 $\pm$ 3.00 μ M olarak saptanmıştır.

Bu çalışma ile ilk defa 4'-O-methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside], 3'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] flavonoid glikozitleri *Sideritis stricta* bitkisinden izole edilmiştir. Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] ise daha önceden *S. stricta*'dan izole edilmiştir [31]. 4'-O-methylisoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] ve 4'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] daha önce *S. caesarea*'dan [78], 3'-O-methylhypolaetin 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] ise daha önceden *S. libanotica*'dan izole edilmiştir [79].

Bu tez kapsamında aynı zamanda sıvı-sıvı ekstraksiyonla elde edilmiş PE, DCM, EtOAc ve BuOH alt ekstrelerinde fenolik maddelerin tespiti ve miktar tayini LC-HRMS ile yapılmıştır. İki bitki için de EtOAc ekstrelerinin taranan maddelerce en zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiş bunları da BuOH ekstreleri takip etmiştir. Taranan maddelerden verbascoside iki bitkinin çeşitli ekstrelerinde yüksek konsantrasyonda saptanmıştır. Literatüre bakıldığında bu maddenin *Sideritis* cinsinde ilk defa *S. perfoliata*'dan izole edildiği [80] devamında gelen çalışmalardaü, doktora tezine konu olan *S. stricta* dahil diğer *Sideritis* türlerinden de çokça saflaştırıldığı ve tespit edildiği gösterilmiştir [31, 81, 82]. Yapılan analizde *S. stricta* ekstrelerinde

chlorogenic acid, *S. congesta* ekstrelerinde ise *p*-coumaric acid yüksek konsantrasyonda rastlanmıştır. Bu maddelerin farklı *Sideritis* türlerinde de zengin miktarda yer aldığı bilinmektedir [83].

Ülkemizde ilk defa bir *Sideritis* türü formülasyonun içeriğine girmiş ve türün geleneksel kullanım amacı ile aynı doğrultuda olacak şekilde formülasyon, zencefil ve ıhlamur ekstreleri ile zenginleştirilmiştir. Böylelikle ülkemiz için yüksek endemizme sahip olan *Sideritis* türlerinden katma değeri yüksek bir son ürün elde edilmiştir.

Sonuç olarak *Sideritis* türlerinden elde edilen ekstre ve saf maddelerin sitotoksik aktivitesinin yüksek bulunmaması bu bitkiye ait bileşiklerde diğer aktivitelerin araştırılması gerektiğini düşündürmüştür. Bitkide bulunan zengin fenolik içerikten dolayı ve geleneksel kullanımdan da yola çıkarak anti-enflamatuvar aktivite ve bu aktiviteye ait moleküler yollar üzerine odaklanılabilir.

KAYNAKÇA

- [1] **Aytaç, Z. & Aksoy, A.** (2000). A new *Sideritis* species (Labiatae) from Turkey. *Flora Mediterranea*. 10, 181-184.
- [2] **Duman, H.** (2000). *Sideritis* L. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2), ed. A. Güner, N. Özhatay, T. Ekim, & K. Başer. Vol. 11. Edinburgh Üniv. Pres. 5-201.
- [3] **González-Burgos, E., Carretero, M. & Gómez-Serranillos, M.** (2011). *Sideritis* spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities—a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 135(2), 209-225.
- [4] **Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. & Takaishi, Y.** (1995). Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology*. 46(3), 133-152.
- [5] **Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K. & Ikeshiro, Y.** (1993). Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *Journal of Ethnopharmacology*. 39(1), 31-38.
- [6] **HMPC,** (2016). Assessment report on *Sideritis scardica* Griseb.; *Sideritis clandestina* (Bory & Chaub.) Hayek; *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr.; *Sideritis syriaca* L., herba.
- [7] **Celep, F. & Dirmenci, T.** (2017). Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey. *Natural Volatiles and Essential Oils*. 4(4), 14-27.
- [8] **Merttürk, N.** (2021). *Bazı Lamiaceae Türlerinin Odun Anatomisi Özellikleri*. (Yüksek Lisans Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi)
- [9] **Huber-Morath, A. & Phlomis, L.** (1982). *Sideritis* L. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. *PH Davis, Edinburgh University Press, Edinburgh*. 7(193).
- [10] **Davis, P.,** Flora of Turkey and The East Aegean Islands, 1988. Edinburgh University Press, Edinburgh. p. 178-179.
- [11] **Topcu, G., Gören, A.C., Kilic, T., Yildiz, Y.K. & Tümen, G.** (2002). Diterpenes from *Sideritis sipylea* and *S. dichotoma*. *Turkish Journal of Chemistry*. 26(2), 189-194.
- [12] **Kılıç, T., Yıldız, Y., Gören, A.C., Tümen, G. & Topçu, G.** (2003). Phytochemical analysis of some *Sideritis* species of Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*. 39(5), 453-456.
- [13] **Fraga, B.M., Hernández, M.G. & Diaz, C.E.** (2003). On the ent-kaurene diterpenes from *Sideritis athoa*. *Natural Product Research*. 17(2), 141-144.
- [14] **Ertaş, A.I., Öztürk, M., Boga, M. & Topçu, G.** (2009). Antioxidant and Anticholinesterase Activity Evaluation of ent-Kaurane Diterpenoids from *Sideritis arguta*. *Journal of Natural Products*. 72(3), 500-502.
- [15] **Topcu, G., Goren, A.C., Kilic, T., Yildiz, Y.K. & Tumen, G.** (2002). Diterpenes from *Sideritis trojana*. *Natural Product Letters*. 16(1), 33-37.
- [16] **De Quesada, T.G., Rodríguez, B. & Valverde, S.** (1974). Diterpenes from *Sideritis lagascana* and *Sideritis valverdei*. *Phytochemistry*.

- [17] **Garcia-Granados, A., Martinez, P. & Parra, A.** (1982). Terpenic components of Spanish Labiatae, 8: Diterpenes of *Sideritis leucantha* var *meridionalis* Font Quer [mint]. *Serie C: Quimica Organica y Bioquimica*.
- [18] **Cabrera, E., García-Granados, A., de Buruaga, A.S. & de Buruaga, J.M.S.** (1983). Diterpenoids from *Sideritis hirsuta* subsp. *nivalis*. *Phytochemistry*. 22(12), 2779-2781.
- [19] **González, A.G., Fraga, B.M., Hernández, M.G. & Gutiérrez Luis, J.** (1972). Siderin, a new coumarin from *Sideritis canariensis*. *Phytochemistry*.
- [20] **Faiella, L., Dal Piaz, F., Bader, A. & Braca, A.** (2014). Diterpenes and phenolic compounds from *Sideritis pullulans*. *Phytochemistry*. 106, 164-170.
- [21] **Kirmizibekmez, H., Erdoğan, M., Kúsz, N., Karaca, N., Erdem, U., Demirci, F. & Hohmann, J.** (2021). Secondary metabolites from the aerial parts of *Sideritis germanicopolitana* and their in vitro enzyme inhibitory activities. *Natural Product Research*. 35(4), 655-658.
- [22] **Kirimer, N., Baser, K., Demirci, B. & Duman, H.** (2004). Essential oils of *Sideritis* species of Turkey belonging to the section *Empedoclia*. *Chemistry of Natural Compounds*. 40(1), 19-23.
- [23] **Baser, K.H.C.** (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry*. 74(4), 527-545.
- [24] **Kirimer, N., Tabanca, N., Baser, K.H.C. & Tumen, G.** (2001). Composition of the essential oil of *Sideritis congesta* PH Davis et Hub.-Mor. *Journal of Essential Oil Research*. 13(2), 132-133.
- [25] **Kirimer, N., Tabanca, N., Ozek, T., Baser, K.H.C., Tümen, G. & Duman, H.** (2003). Composition of Essential Oils from Five Endemic *Sideritis* Species. *Journal of Essential Oil Research*. 15, 221-225.
- [26] **Kirmizibekmez, H., Ariburnu, E., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Yesilada, E. & Piacente, S.** (2012). Iridoid, phenylethanoid and flavonoid glycosides from *Sideritis trojana*. *Fitoterapia*. 83(1), 130-136.
- [27] **Venditti, A., Bianco, A., Frezza, C., Serafini, M., Giacomello, G., Giuliani, C., Bramucci, M., Quassinti, L., Lupidi, G. & Lucarini, D.** (2016). Secondary metabolites, glandular trichomes and biological activity of *Sideritis montana* L. subsp. *montana* from Central Italy. *Chemistry & Biodiversity*. 13(10), 1380-1390.
- [28] **Topcu, G., Ertas, A., Ozturk, M., Dincel, D., Kilic, T. & Halfon, B.** (2011). Ent-kaurane diterpenoids isolated from *Sideritis congesta*. *Phytochemistry Letters*. 4(4), 436-439.
- [29] **Osthoff, J., Carola, C., Salazar, A. & von Hagen, J.** (2021). Bioactivity-Guided Single-Step Isolation of Stachyspinoside from *Sideritis congesta* by Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Chemistry*. 2021.
- [30] **Bardakci, H., Cevik, D., Barak, T.H., Gozet, T., Kan, Y. & Kirmizibekmez, H.** (2020). Secondary metabolites, phytochemical characterization and antioxidant activities of different extracts of *Sideritis congesta* PH Davis et Hub.-Mor. *Biochemical Systematics and Ecology*. 92(104120).
- [31] **Şahin, F.P., Ezer, N. & Çaliş, İ.** (2006). Terpenic and phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Turkish Journal of Chemistry*. 30(4), 495-504.
- [32] **Kilic, T.** (2006). Isolation and Biological Activity of New and Known Diterpenoids From *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. *Molecules*. 11(4), 257-262.

- [33] **Küpelı, E., Yeşılada, E., Calış, İ. & Ezer, N.** (2007). In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 62(7-8), 519-525.
- [34] **Aneva, I., Zhelev, P., Kozuharova, E., Danova, K., Nabavi, S.F. & Behzad, S.** (2019). Genus *Sideritis*, section *Empedoclia* in southeastern Europe and Turkey—studies in ethnopharmacology and recent progress of biological activities. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27(1), 407-421.
- [35] **Pieroni, A., Muenz, H., Akbulut, M., Başer, K.H.C. & Durmuşkahya, C.** (2005). Traditional phytotherapy and trans-cultural pharmacy among Turkish migrants living in Cologne, Germany. *Journal of Ethnopharmacology*. 102(1), 69-88.
- [36] **Everest, A. & Ozturk, E.** (2005). Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 1, 6.
- [37] **Emre, G., Dogan, A., Haznedaroglu, M.Z., Senkardes, I., Ulger, M., Satiroglu, A., Can Emmez, B. & Tugay, O.** (2021). An Ethnobotanical Study of Medicinal Plants in Mersin (Turkey). *Frontiers in Pharmacology*. 12, 664500-664500.
- [38] **Baytop, T.** (1999). Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün. Nobel Tıp Kitabevleri. 422.
- [39] **Özdemir, E. & Alpınar, K.** (2015). An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde – Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. 166, 53-65.
- [40] **Alcaraz, M., Jimenez, M., Valverde, S., Sanz, J., Rabanal, R. & Villar, A.** (1989). Anti-inflammatory compounds from *Sideritis javalambrensis* n-hexane extract. *Journal of Natural Products*. 52(5), 1088-1091.
- [41] **De Las Heras, B. & Hoult, J.** (1994). Non-cytotoxic inhibition of macrophage eicosanoid biosynthesis and effects on leukocyte functions and reactive oxygen species of two novel anti-inflammatory plant diterpenoids. *Planta Medica*. 60(06), 501-506.
- [42] **Navarro, A. & De las Heras, B.** (1997). Andalusol, a diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Sideritis foetens* Clemen. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 52(11-12), 844-849.
- [43] **De Las Heras, B., Navarro, A., Díaz-Guerra, M.J., Bermejo, P., Castrillo, A., Boscá, L. & Villar, A.** (1999). Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF-κB by andalusol. *British Journal of Pharmacology*. 128(3), 605-612.
- [44] **Villar, A., Salom, R. & Alcaraz, M.** (1984). An approach to the antiinflammatory activity of borjatriol. *Planta Medica*. 50(01), 90-92.
- [45] **Villar, A. & Alcaraz, M.** (1984). Effect of borjatriol on nystatin oedema. *Die Pharmazie*. 39(4), 278-279.
- [46] **Villar, A., Salom, R. & Alcaraz, M.** (1983). Effect of borjatriol on established adjuvant arthritis. *Die Pharmazie*. 38(8), 566-566.
- [47] **De las Heras, B., Abad, M., Silvan, A., Pascual, R., Bermejo, P., Rodríguez, B. & Villar, A.** (2001). Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sciences*. 70(3), 269-278.
- [48] **Küpelı, E., Şahin, F.P., Çalış, İ., Yeşılada, E. & Ezer, N.** (2007). Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 112(2), 356-360.

- [49] **Moroney, M.-A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F. & Houlst, J.R.S.** (2011). Selectivity of Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase Inhibition by an Anti-inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 40(11), 787-792.
- [50] **Ferrándiz, M.L., Nair, A. & Alcaraz, M.J.** (1990). Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Die Pharmazie*. 45 3, 206-208.
- [51] **Bas, E., Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Cerdá-Nicolás, M. & Ríos, J.-L.** (2006). Anti-inflammatory activity of 5-O-demethylnobiletin, a polymethoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*. *Planta Medica*. 72(02), 136-142.
- [52] **Charami, M.T., Lazari, D., Karioti, A., Skaltsa, H., Hadjipavlou-Litina, D. & Souleles, C.** (2008). Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*. 22(4), 450-454.
- [53] **Akcos, Y., Ezer, N., Calis, I., Demirdamar, R. & Tel, B.** (1999). Polyphenolic compounds of *Sideritis lycia* and their anti-inflammatory activity. *Pharmaceutical Biology*. 37(2), 118-122.
- [54] **Aimond, A., Calabro, K., Audoin, C., Olivier, E., Dutot, M., Buron, P., Rat, P., Laprèvote, O., Prado, S. & Roulland, E.** (2020). Cytotoxic and anti-inflammatory effects of ent-kaurane derivatives isolated from the Alpine plant *Sideritis hyssopifolia*. *Molecules*. 25(3), 589.
- [55] **Tomou, E.M., Papaemmanouil, C.D., Diamantis, D.A., Kostagianni, A.D., Chatzopoulou, P., Mavromoustakos, T., Tzakos, A.G. & Skaltsa, H.** (2021). Anti-Ageing Potential of *S. euboea* Heldr. Phenolics. *Molecules*. 26(11).
- [56] **Gonzalez-Burgos, E., Duarte, A.I., Carretero, M.E., Moreira, P.I. & Gomez-Serranillos, M.P.** (2016). Kaurane diterpenes as mitochondrial alterations preventive agents under experimental oxidative stress conditions. *Pharmaceutical Biology*. 54(4), 705-711.
- [57] **González-Burgos, E., Carretero, M.E. & Gómez-Serranillos, M.P.** (2013). Involvement of Nrf2 signaling pathway in the neuroprotective activity of natural kaurane diterpenes. *Neuroscience*. 231, 400-412.
- [58] **Rios, J.L., Mañez, S., Paya, M. & Alcaraz, M.J.** (1992). Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*. 31(6), 1947-1950.
- [59] **Alcaraz, M.J. & Tordera, M.** (1988). Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypolaetin-8-glucoside. *Phytotherapy Research*. 2(2), 85-88.
- [60] **Lytra, K., Tomou, E.M., Chrysargyris, A., Christofi, M.D., Miltiadous, P., Tzortzakakis, N. & Skaltsa, H.** (2021). Bio-Guided Investigation of *Sideritis cypria* Methanol Extract Driven by in Vitro Antioxidant and Cytotoxic Assays. *Chemistry & Biodiversity*. 18(3), e2000966.
- [61] **Kilic, T., Topcu, G., Goren, A.C., Aydogmus, Z., Karagoz, A., Yildiz, Y.K. & Aslan, I.** (2020). Ent-kaurene Diterpenoids from *Sideritis lycia* with Antiviral and Cytotoxic Activities. *Records of Natural Products*. 14(4), 256-268.
- [62] **Tomou, E.-M., Chatziathanasiadou, M.V., Chatzopoulou, P., Tzakos, A.G. & Skaltsa, H.** (2020). NMR-Based Chemical Profiling, Isolation and

- Evaluation of the Cytotoxic Potential of the Diterpenoid Siderol from Cultivated *Sideritis euboea* Heldr. *Molecules*. 25(10), 2382.
- [63] **Erkan, N., Cetin, H. & Ayranci, E.** (2011). Antioxidant activities of *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath and *Sideritis arguta* Boiss et Heldr: Identification of free flavonoids and cinnamic acid derivatives. *Food Research International*. 44(1), 297-303.
- [64] **Aydin, S., Ozturk, Y., Beis, R. & Baser, K.H.C.** (1996). Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy Research*. 10(4), 342-344.
- [65] **Erdogan-Orhan, I., Baki, E., Senol, S. & Yilmaz, G.** (2010). Sage-called plant species sold in Turkey and their antioxidant activities. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 75(11), 1491-1501.
- [66] **Deveci, E., Tel-Çayan, G. & Duru, M.E.** (2018). Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta*. *International Journal of Food Properties*. 21(1), 771-783.
- [67] **Tokur, O. & Aksoy, A.** (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 6(1), 112-118.
- [68] **Yin, I.-m., Wei, Y., Wang, Y. & Xu, Y.-D.** (2013). Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *International Journal of Medical Sciences*. 10, 68-72.
- [69] **HMPC**, (2012). Assessment report on *Tilia cordata* Miller, *Tilia platyphyllos* Scop., *Tilia x vulgaris* Heyne or their mixtures, flos.
- [70] **Baliga, M.S., Haniadka, R., Pereira, M.M., D'Souza, J.J., Pallaty, P.L., Bhat, H.P. & Popuri, S.** (2011). Update on the Chemopreventive Effects of Ginger and its Phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(6), 499-523.
- [71] **Shahrajabian, M.H., Sun, W. & Cheng, Q.** (2019). Clinical aspects and health benefits of ginger (*Zingiber officinale*) in both traditional Chinese medicine and modern industry. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*. 69(6), 546-556.
- [72] **Townsend, E.A., Zhang, Y., Xu, C., Wakita, R. & Emala, C.W.** (2014). Active components of ginger potentiate β -agonist-induced relaxation of airway smooth muscle by modulating cytoskeletal regulatory proteins. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 50(1), 115-124.
- [73] **Bera, K., Nosalova, G., Sivova, V. & Ray, B.** (2016). Structural Elements and Cough Suppressing Activity of Polysaccharides from *Zingiber officinale* Rhizome. *Phytotherapy Research : PTR*. 30(1), 105-111.
- [74] **Chang, J.S., Wang, K.C., Yeh, C.F., Shieh, D.E. & Chiang, L.C.** (2013). Fresh ginger (*Zingiber officinale*) has anti-viral activity against human respiratory syncytial virus in human respiratory tract cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 145(1), 146-151.
- [75] **Kowalska, G., Baj, T., Kowalski, R. & Szymańska, J.** (2021). Optimization of glycerol–water extraction of selected bioactive compounds from peppermint and common nettle. *Antioxidants*. 10(5), 817.
- [76] **Eccles, R. & Mallefet, P.** (2017). Soothing Properties of Glycerol in Cough Syrups for Acute Cough Due to Common Cold. *Pharmacy (Basel)*. 5(1).
- [77] **Huamán-Castilla, N.L., Mariotti-Celis, M.S., Martínez-Cifuentes, M. & Pérez-Correa, J.R.** (2020). Glycerol as Alternative Co-Solvent for Water

- Extraction of Polyphenols from Carménère Pomace: Hot Pressurized Liquid Extraction and Computational Chemistry Calculations. *Biomolecules*. 10(3).
- [78] **Halfon, B., Ciftci, E. & Topcu, G.** (2013). Flavonoid constituents of *Sideritis caesarea*. *Turkish Journal of Chemistry*. 37(3), 464-472.
- [79] **Demirtas, I., Ayhan, B., Sahin, A., Aksit, H., Elmastas, M. & Telci, I.** (2011). Antioxidant activity and chemical composition of *Sideritis libanotica* Labill. ssp. *linearis* (Benth) Borm. (Lamiaceae). *Natural Product Research*. 25(16), 1512-1523.
- [80] **Ezer, N., Sakar, M.K., Rodríguez, B. & Torre, M.C.d.** (1992). Flavonoid Glycosides and a Phenylpropanoid Glycoside from *Sideritis perfoliata*. *International Journal of Pharmacognosy*. 30(1), 61-65.
- [81] **Sahin, F.P., Ezer, N. & Calis, I.** (2004). Three acylated flavone glycosides from *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy. *Phytochemistry*. 65(14), 2095-2099.
- [82] **Petreska, J., Stefkov, G., Kulevanova, S., Alipieva, K., Bankova, V. & Stefova, M.** (2011). Phenolic Compounds of Mountain Tea from the Balkans: LC/DAD/ESI/MSn Profile and Content. *Natural Product Communications*. 6(1), 21-30.
- [83] **Dincer, C., Torun, M., Tontul, I., Topuz, A., Sahin-Nadeem, H., Gokturk, R.S., Tugrul-Ay, S. & Ozdemir, F.** (2017). Phenolic composition and antioxidant activity of *Sideritis lycia* and *Sideritis libanotica* subsp. *linearis*: Effects of cultivation, year and storage. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 5, 26-32.

EKLER

EK A: 7-Epicandicandiol Maddesinin Spektral Verileri

EK B: Foliol Maddesinin Spektral Verileri

EK C: Linearol Maddesinin Spektral Veriler

EK D: 4'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] Maddesinin Spektral Verileri (F1)

EK F: Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] Maddesinin Spektral Verileri (F2)

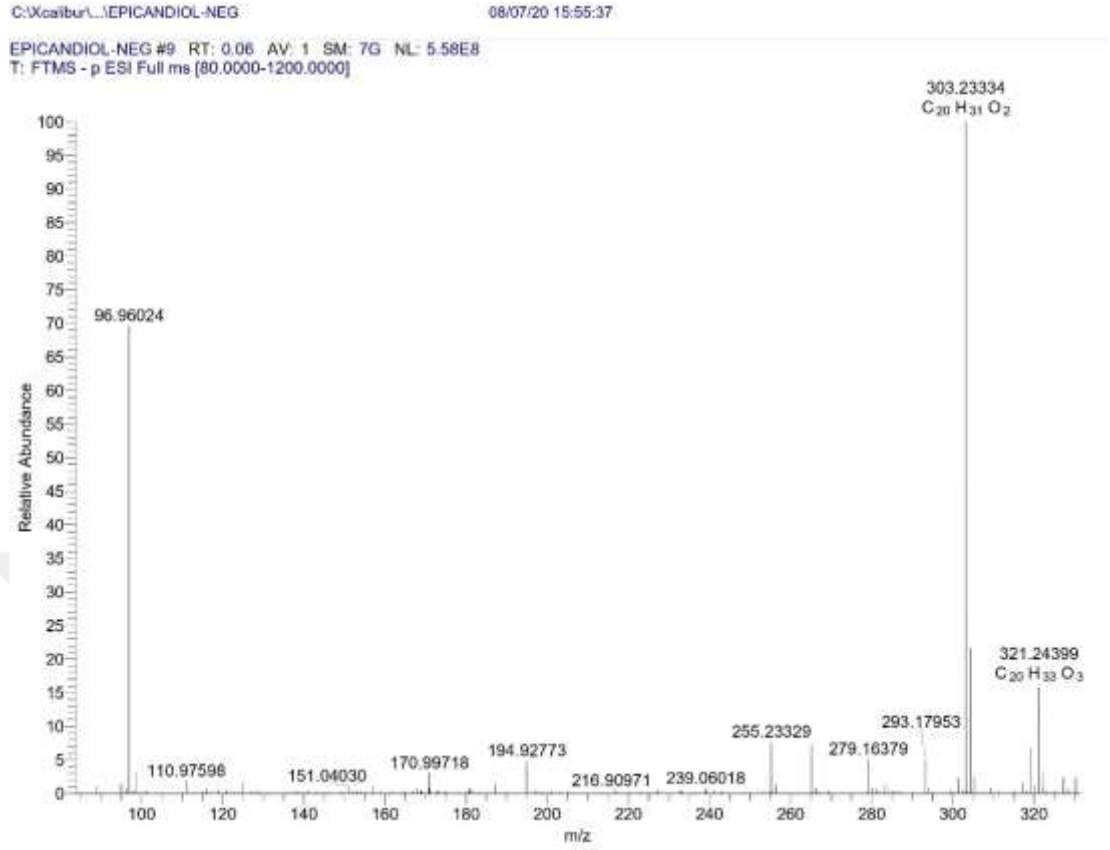
EK G: 4'-O-methylisoscuteallarein-7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside Maddesinin Spektral Verileri (F3)

EK H: 3'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] Maddesinin Spektral Verileri (F4)

EK I: LC-HRMS kromatogramları

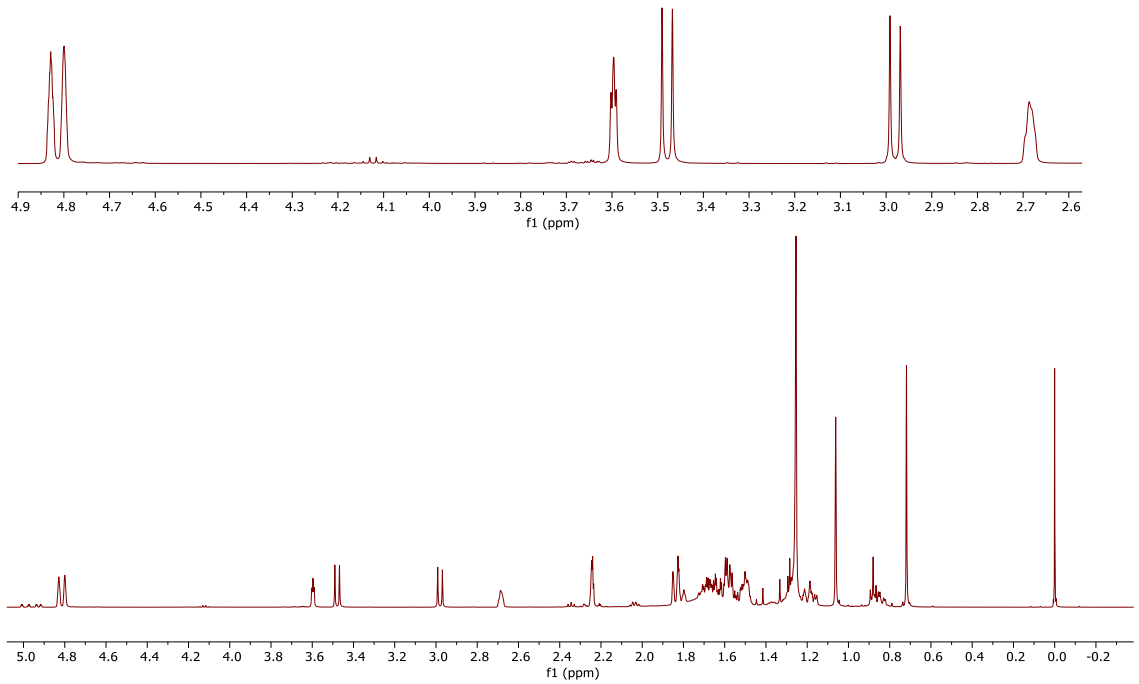
EK İ: WST-1 testi sonuçları

EK A: 7-Epicandicandiol Maddesinin Spektral Verileri

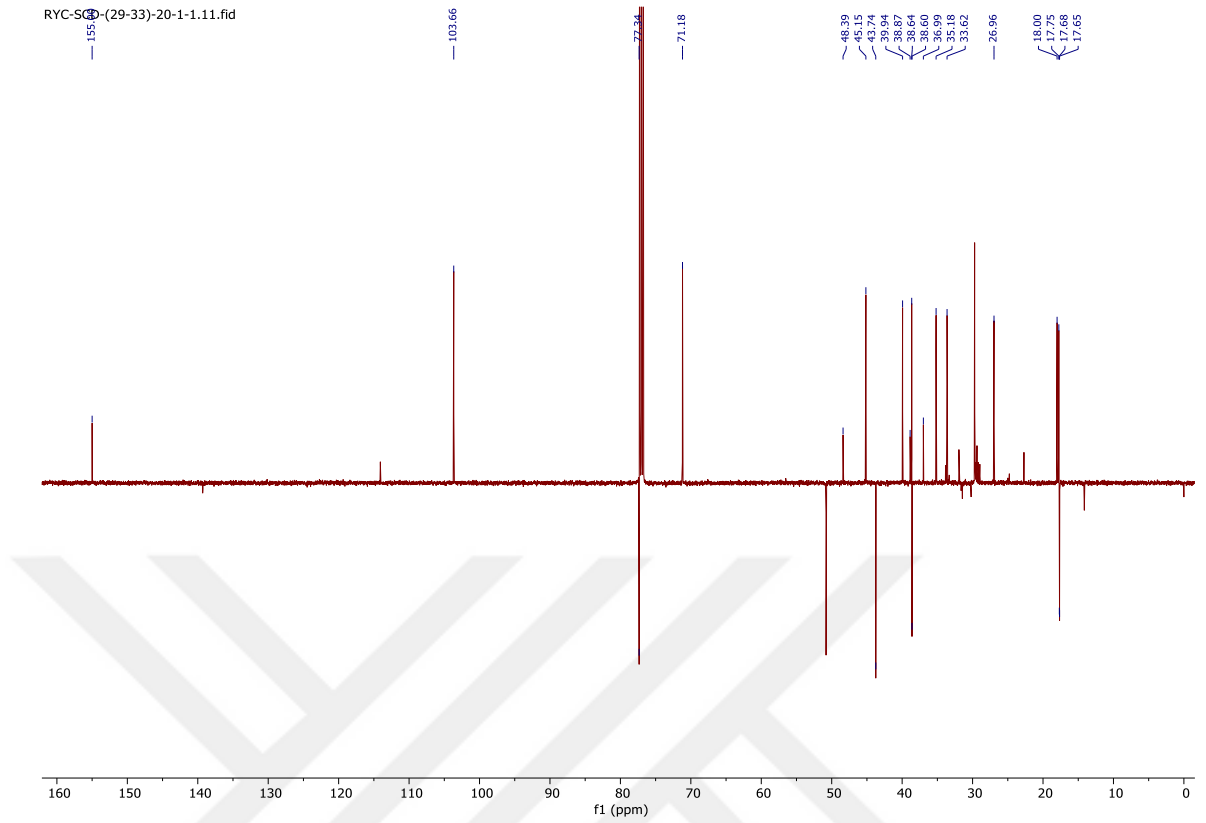


Şekil A.1 : 7-Epicandicandiol molekölü kütle spektrumu

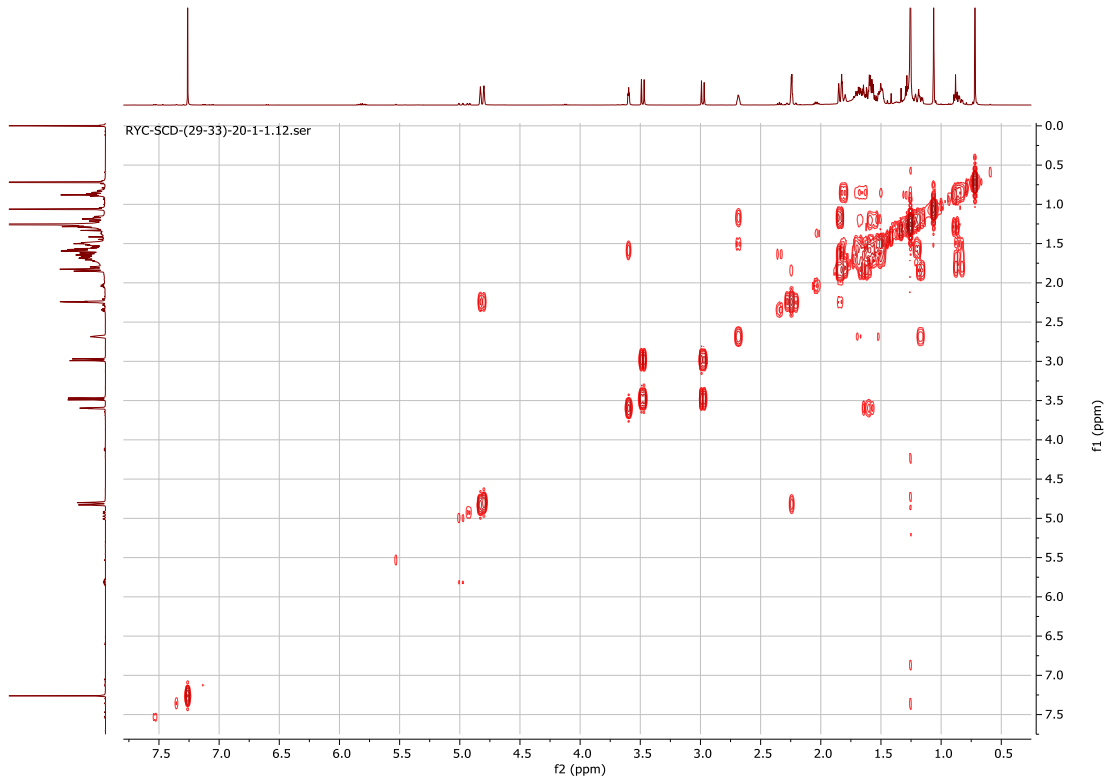
RYC-SCD-(29-33)-20-1-1.10.fid



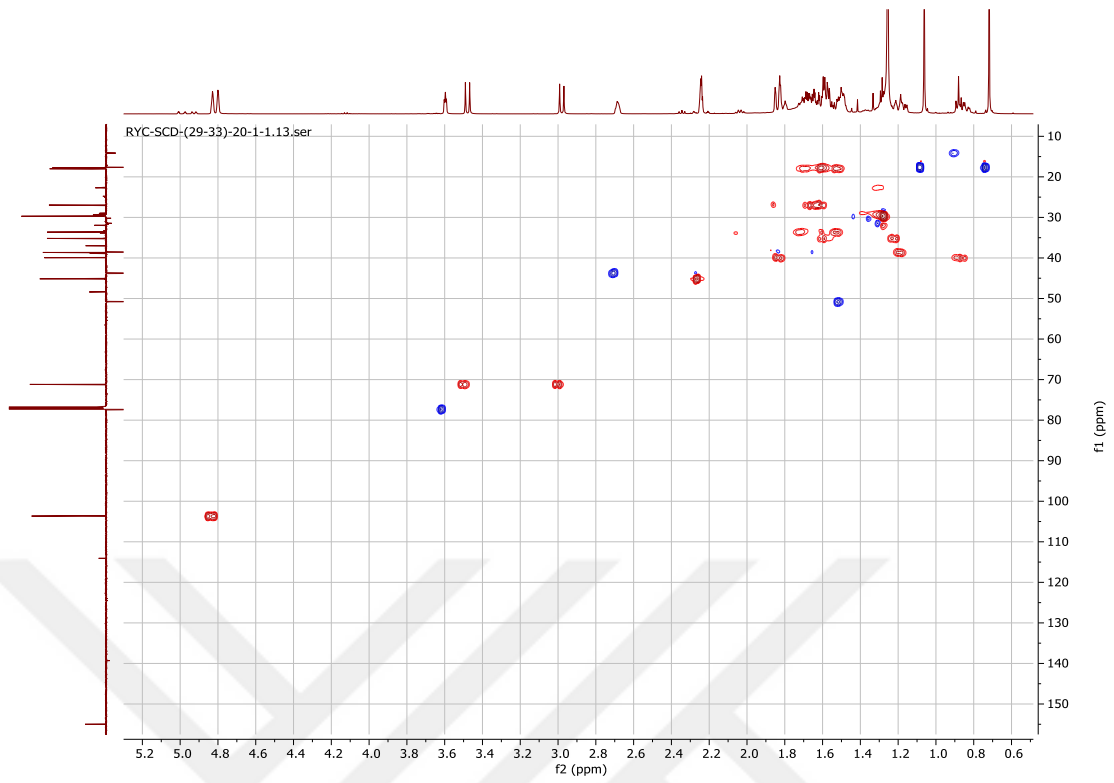
Şekil A.2 : 7-Epicandicandiol molekölü ¹H-NMR spektrumu



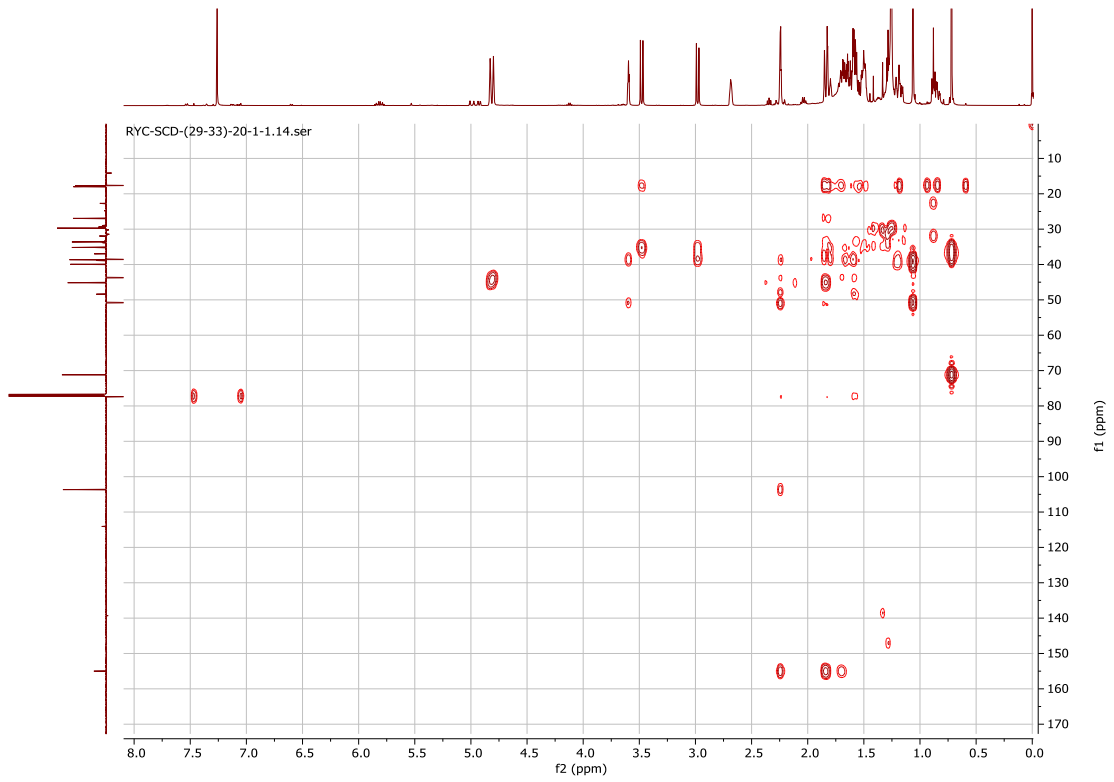
Şekil A.3 : 7-Epicandiciol molekülü ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil A.4 : 7-Epicandiciol molekülü COSY spektrumu

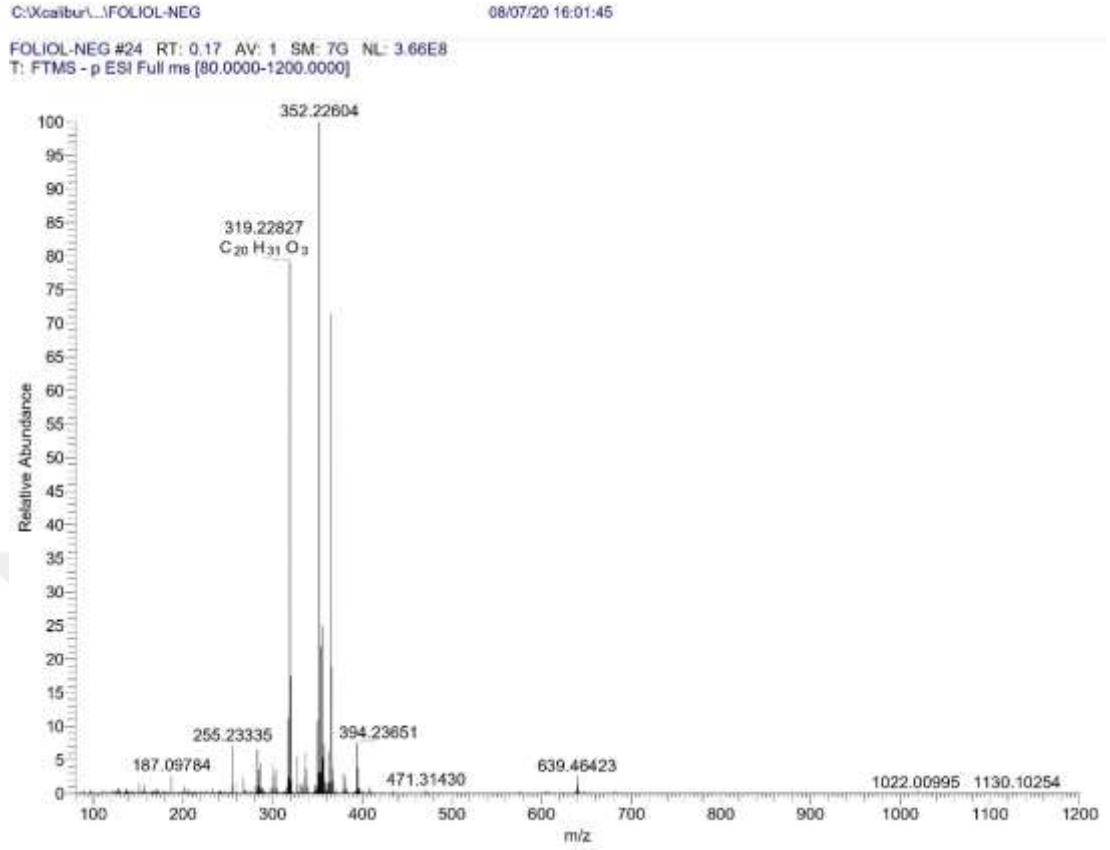


Şekil A.5 : 7-Epicandicandiol molekülü HSQC spektrumu

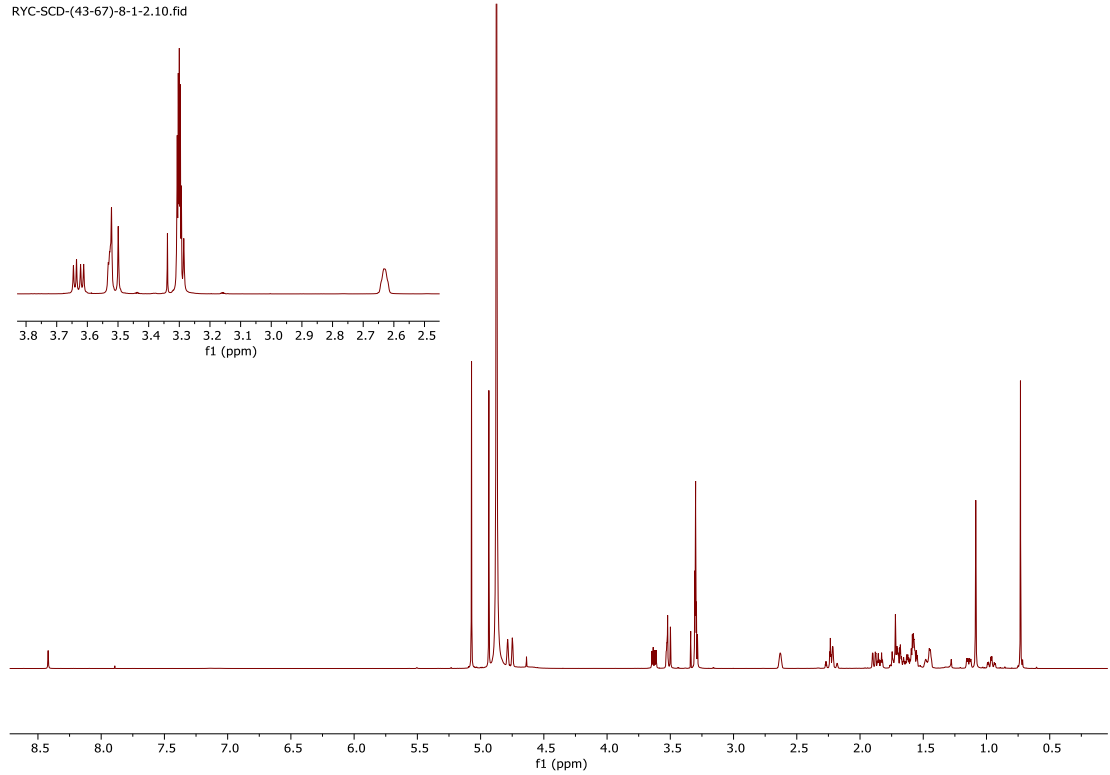


Şekil A.6 : 7-Epicandicandiol molekülü HMBC spektrumu

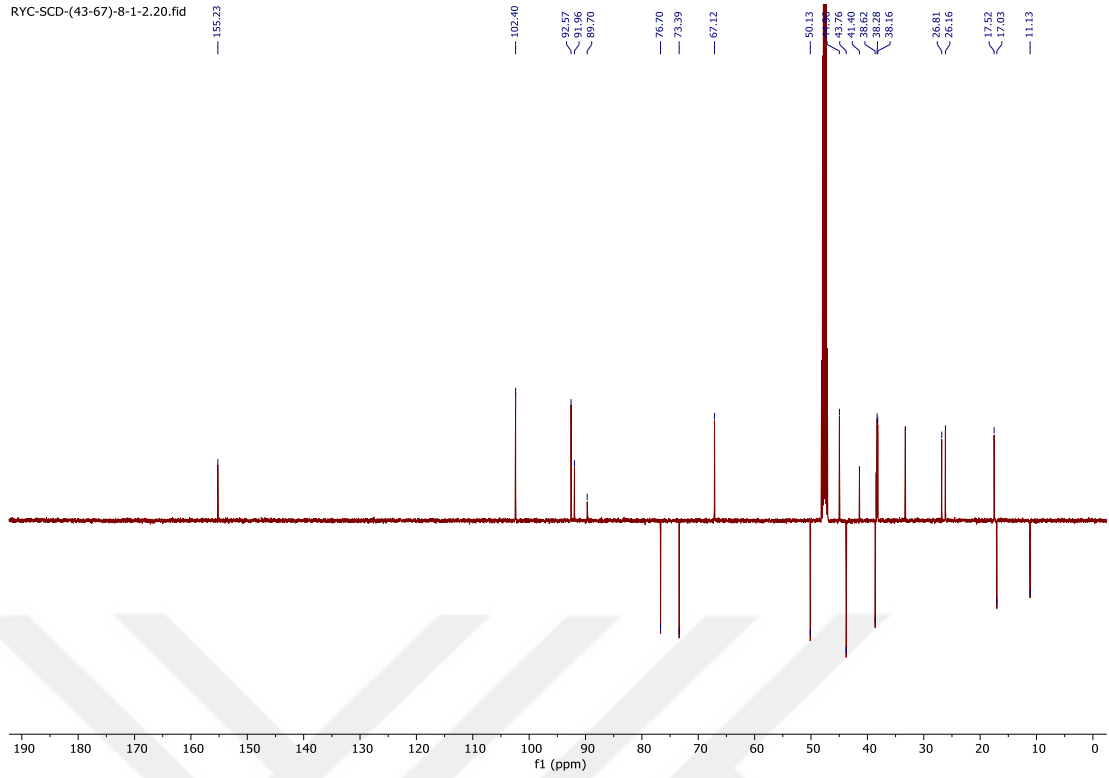
EK C: Foliol Maddesine Ait Spektral Veriler



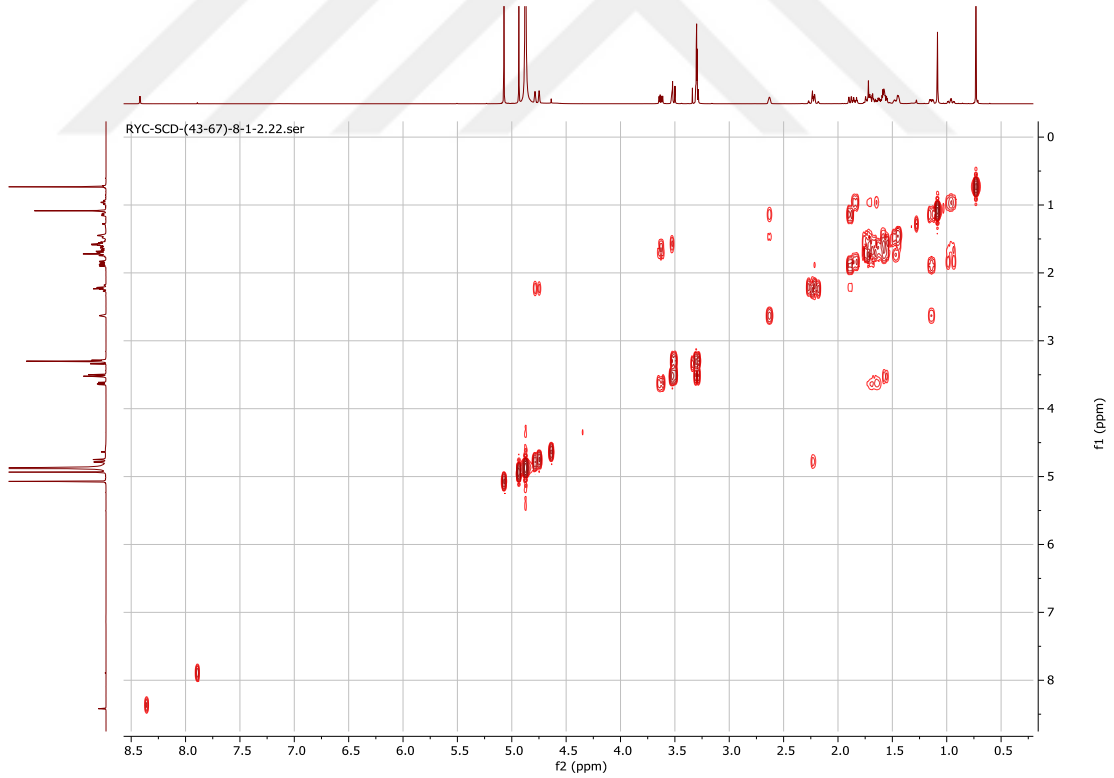
Şekil B.1 : Foliol molekölü kütle spektrumu



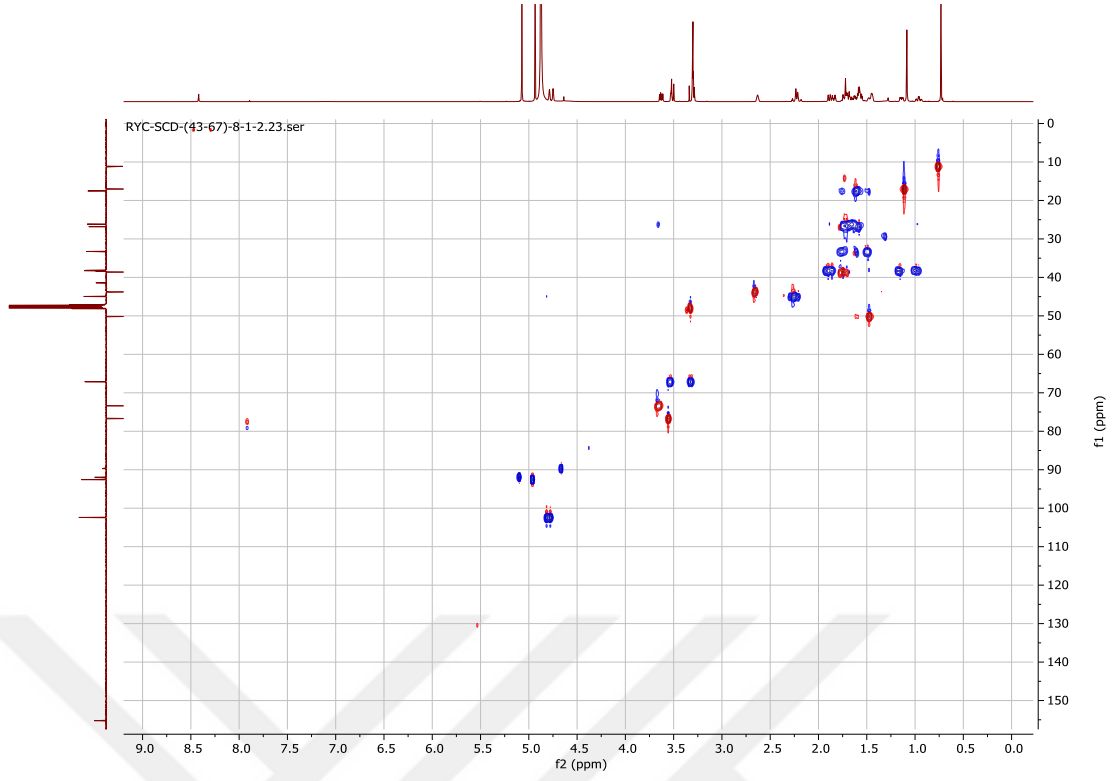
Şekil B.2 : Foliol molekölü 1H -NMR spektrumu



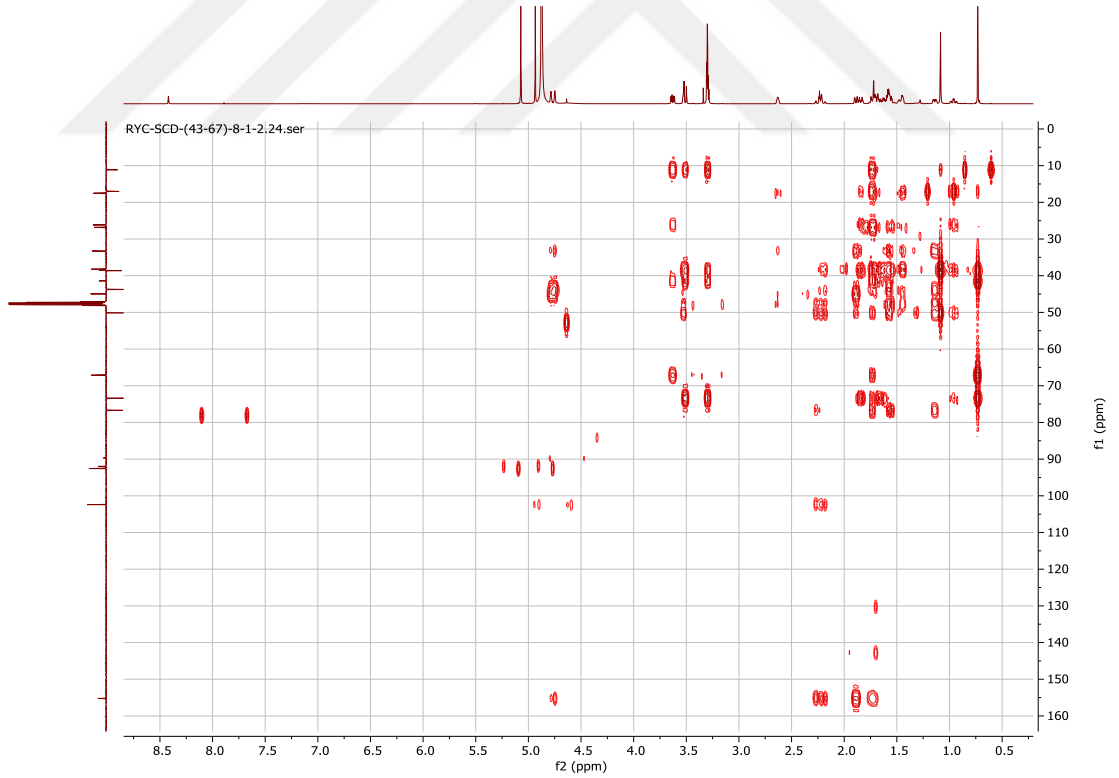
Şekil B.3 : Foliol molekülü ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil B.4 : Foliol molekülü COSY spektrumu

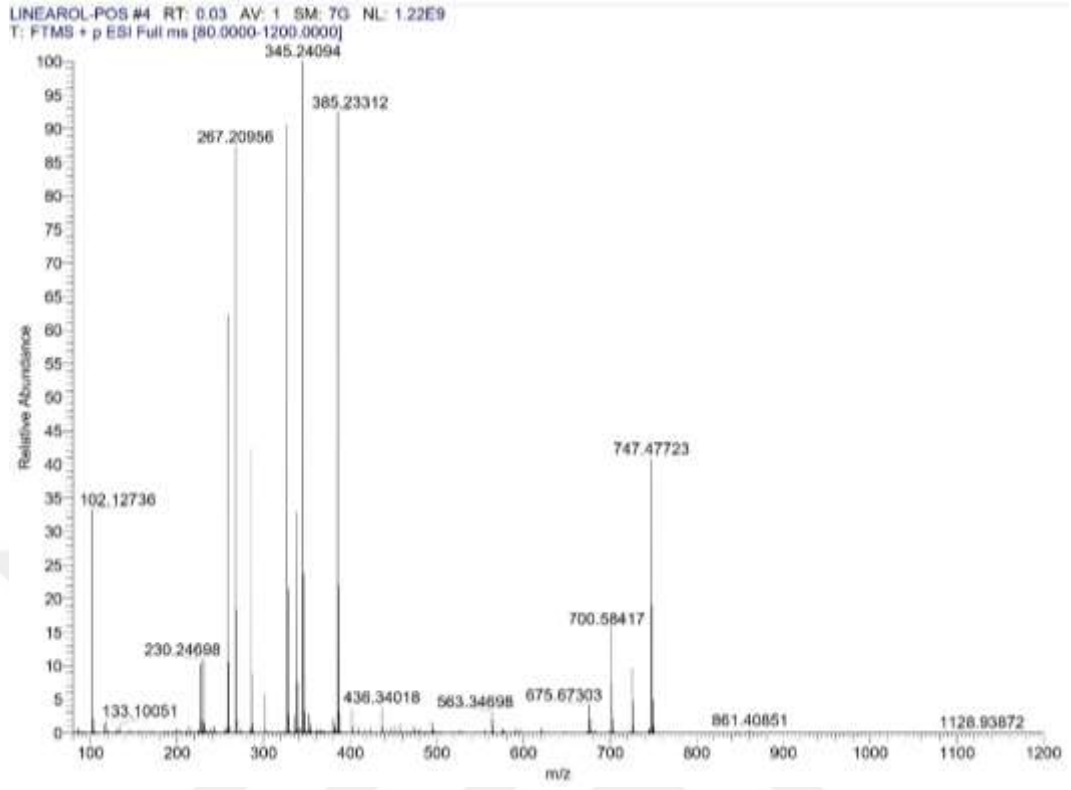


Şekil B.5 : Foliol molekülü HSQC spektrumu



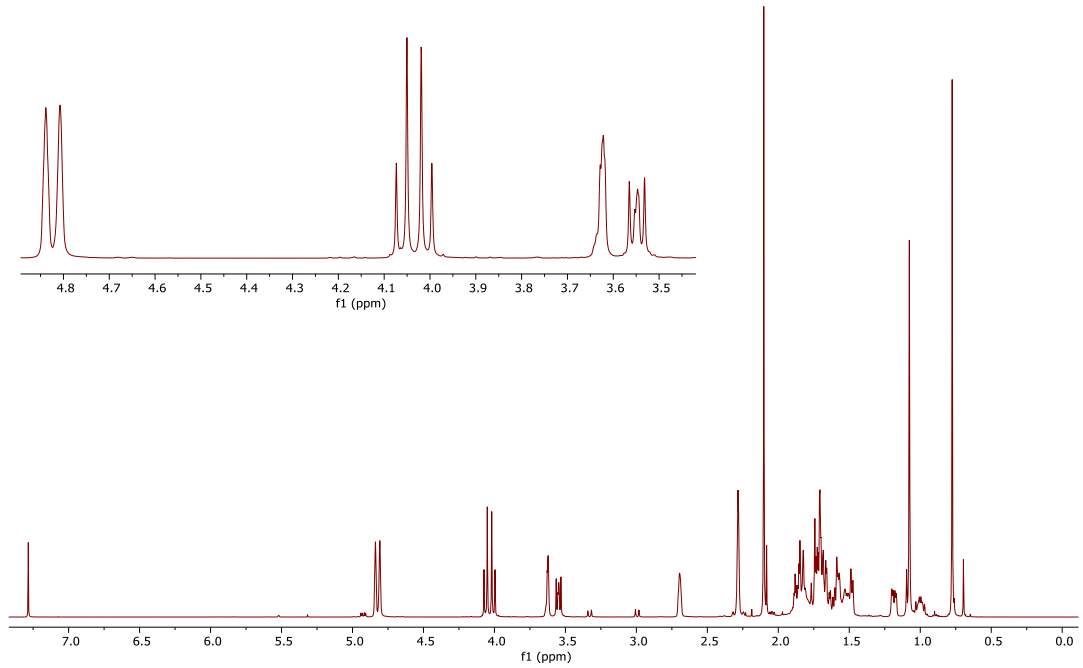
Şekil B.6 : Foliol molekülü HMBC spektrumu

EK C: Linearol Maddesinin Spektral Verileri

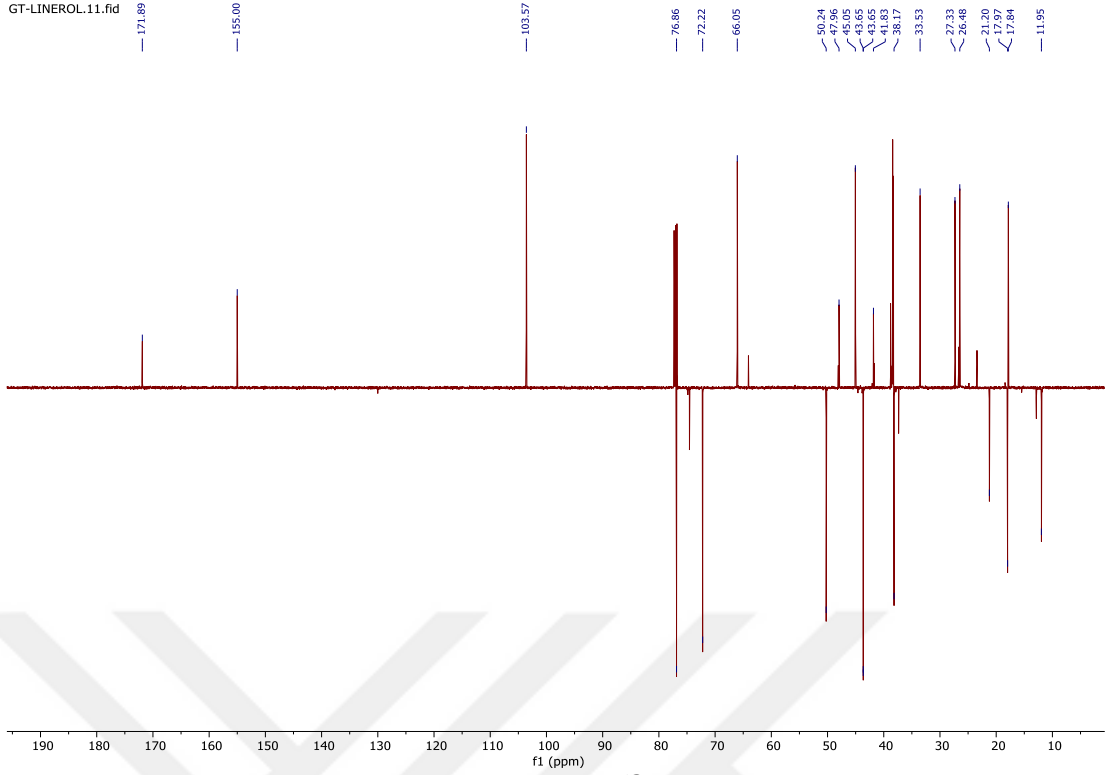


Şekil C.1 : Linearol molekölü kütle spektrumu

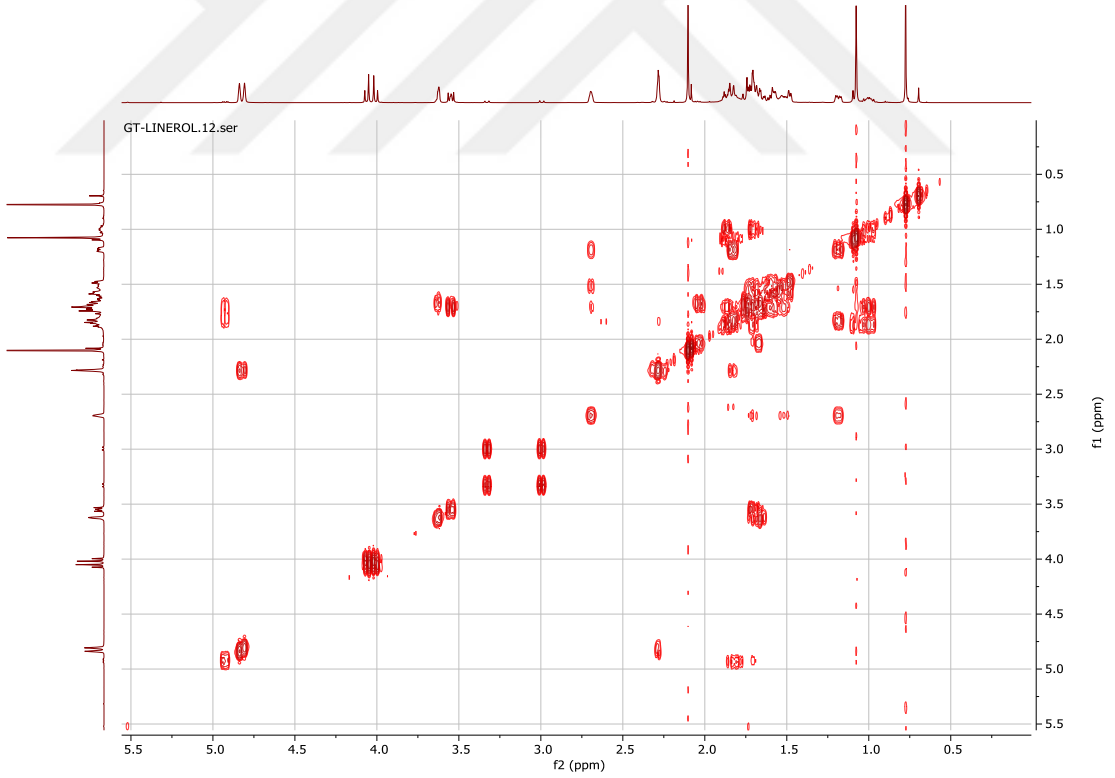
GT-LINEROL.10.fid



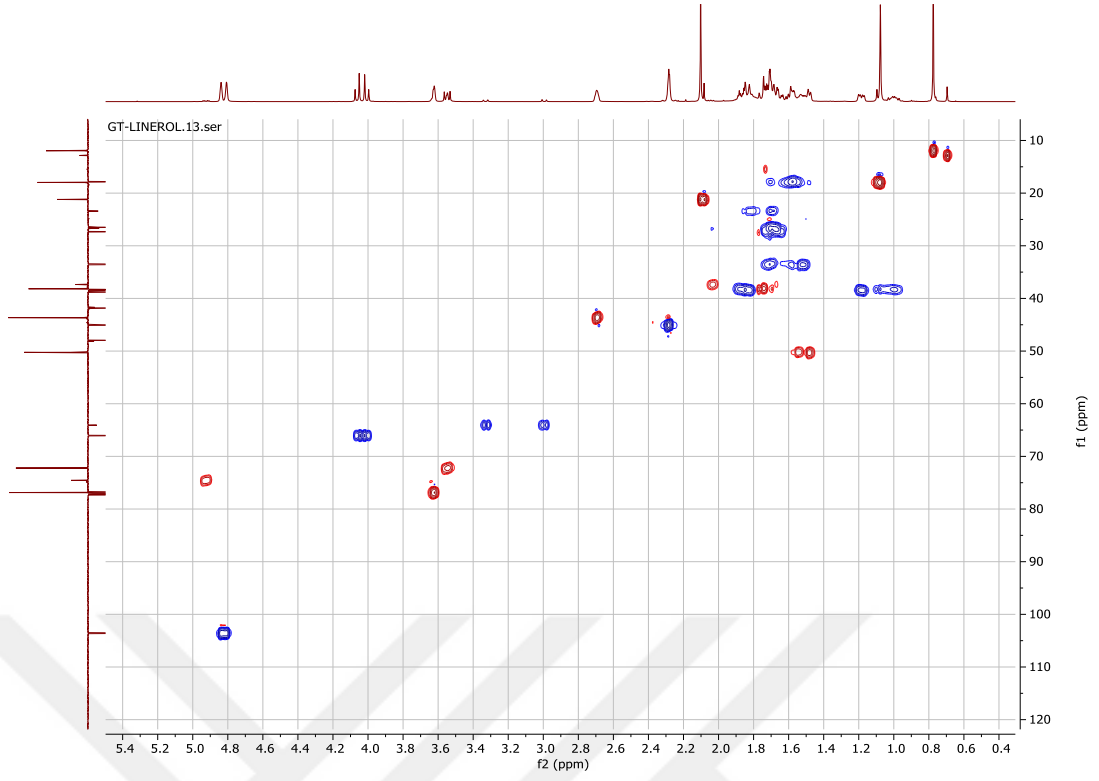
Şekil C.2 : Linearol molekölü ^1H -NMR spektrumu



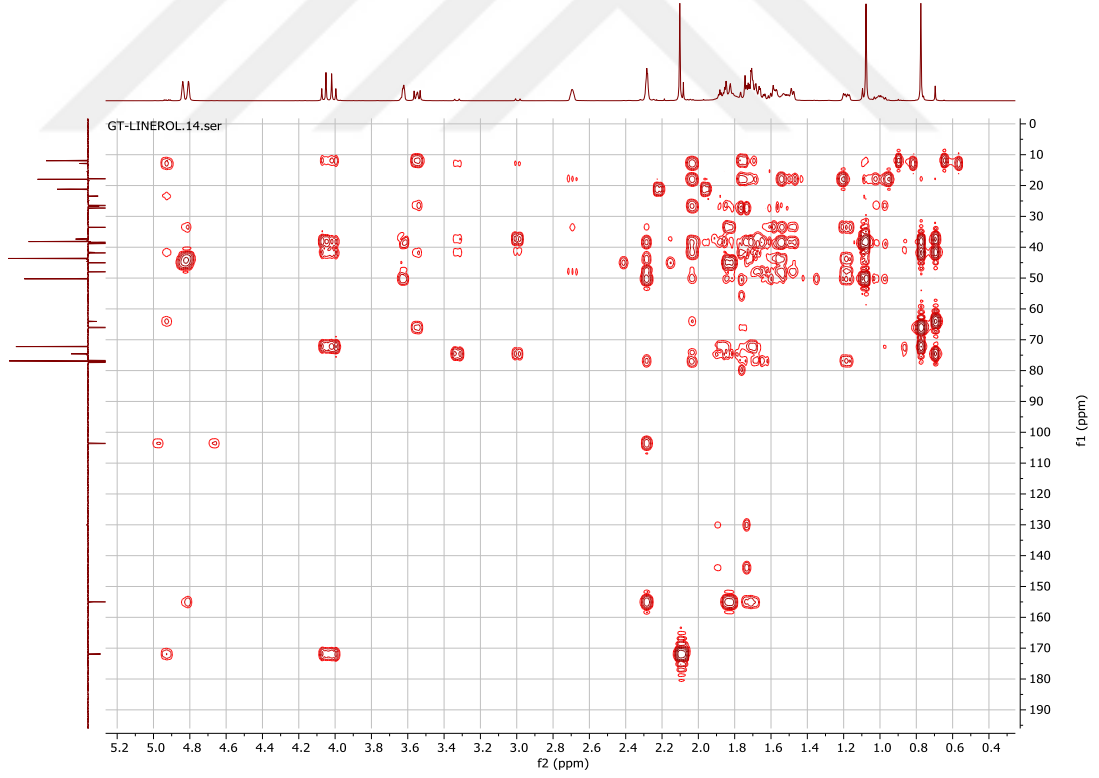
Şekil C.3 : Linearol molekülü ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil C.3 : Linearol molekülü COSY spektrumu

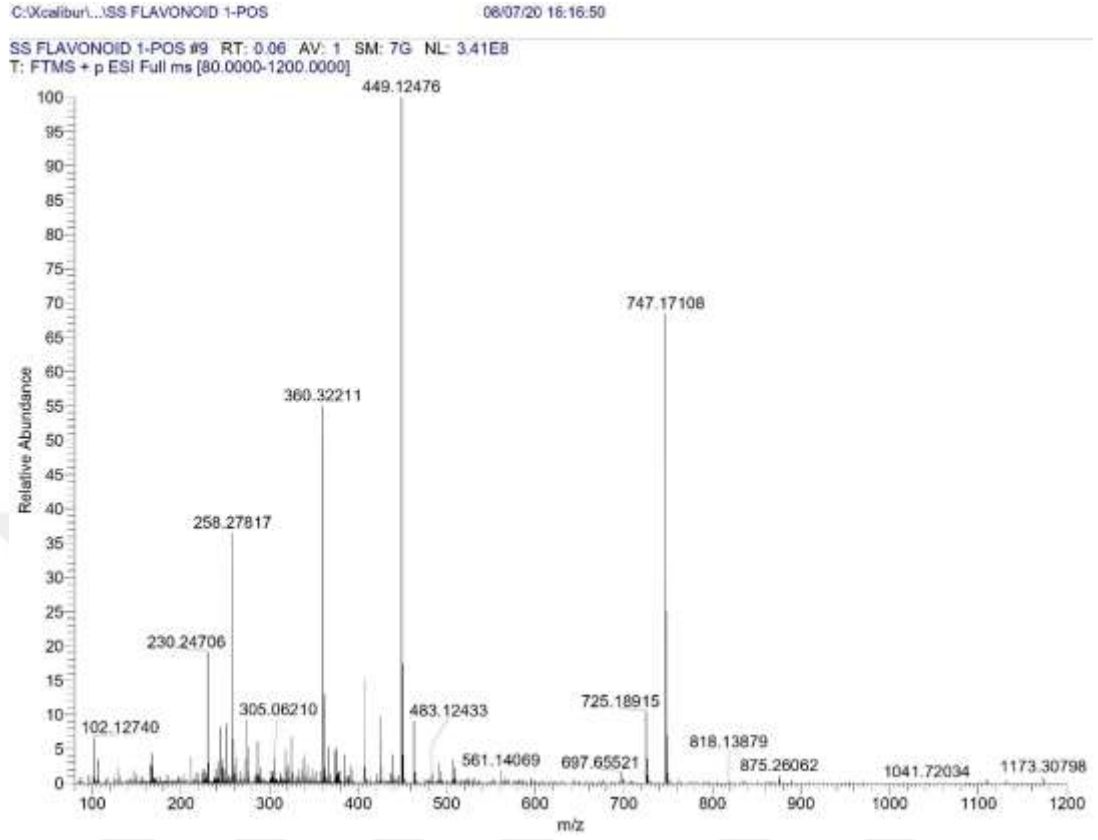


Şekil C.4 : Linearol molekülü HSQC spektrumu

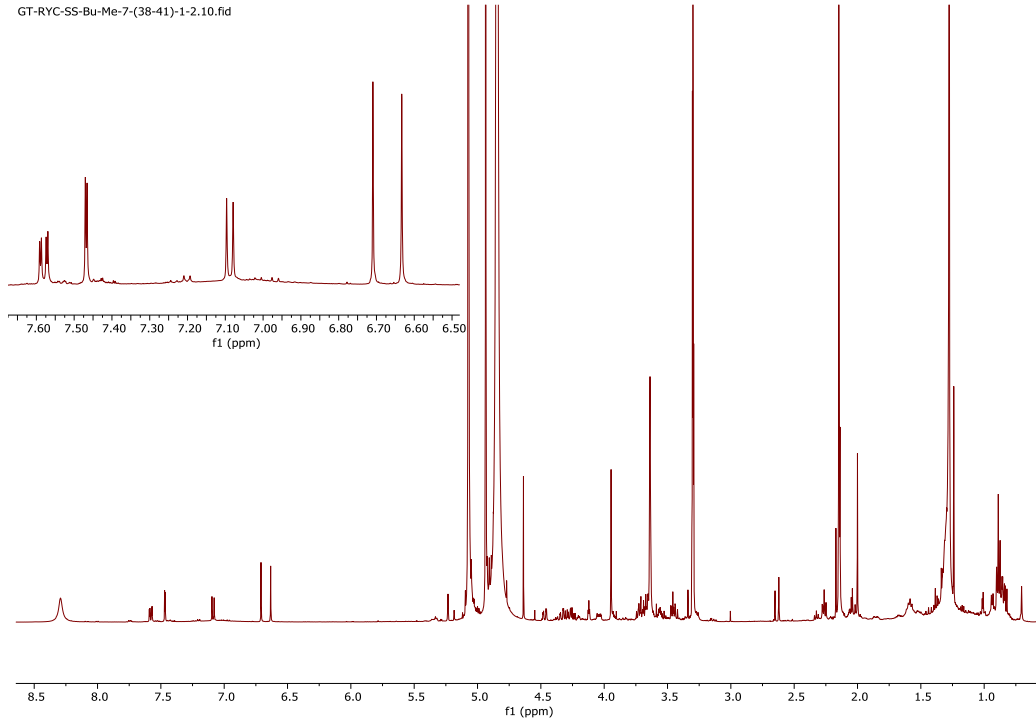


Şekil C.5 : Linearol molekülü HMBC spektrumu

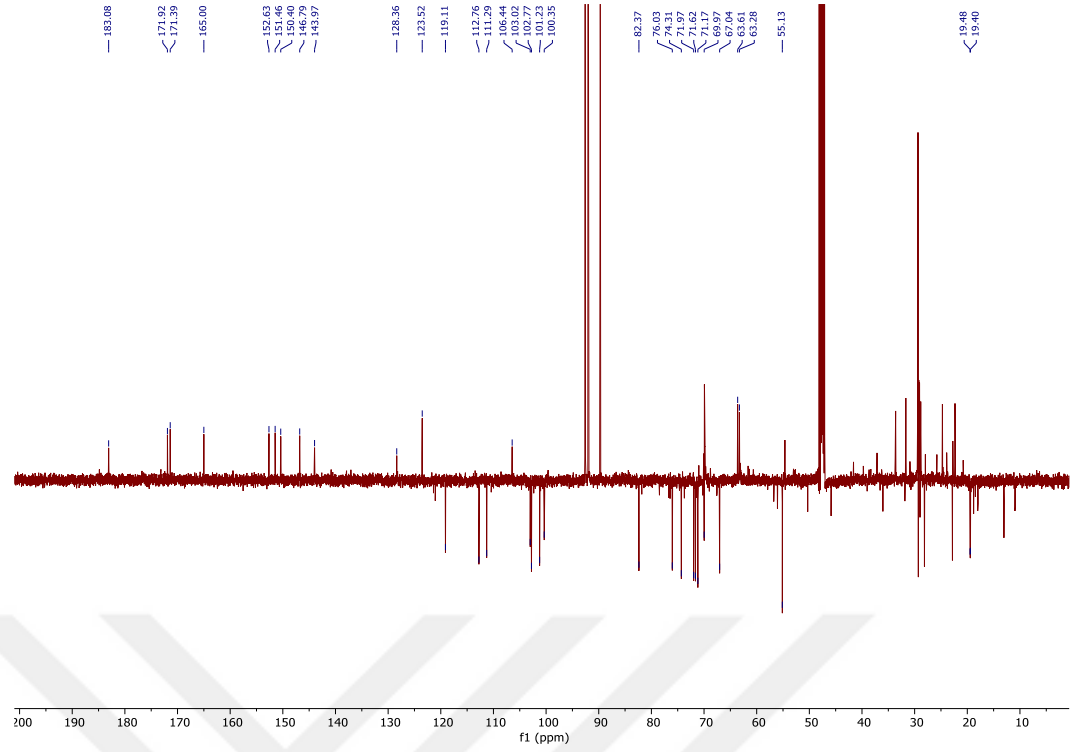
EK D: 4'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] Maddesinin Spektral Verileri (F1)



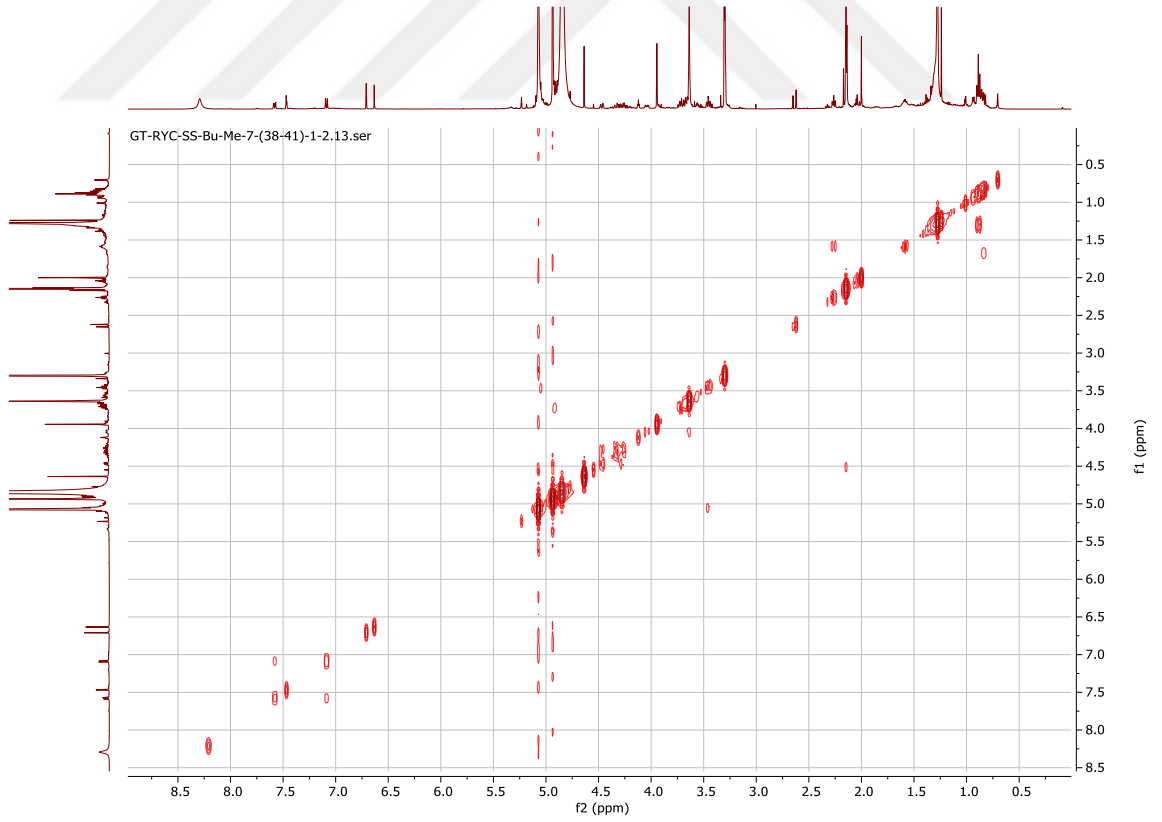
Şekil D.1 : F1 molekülü kütle spektrumu



Şekil D.2 : F1 molekülü ^1H -NMR spektrumu

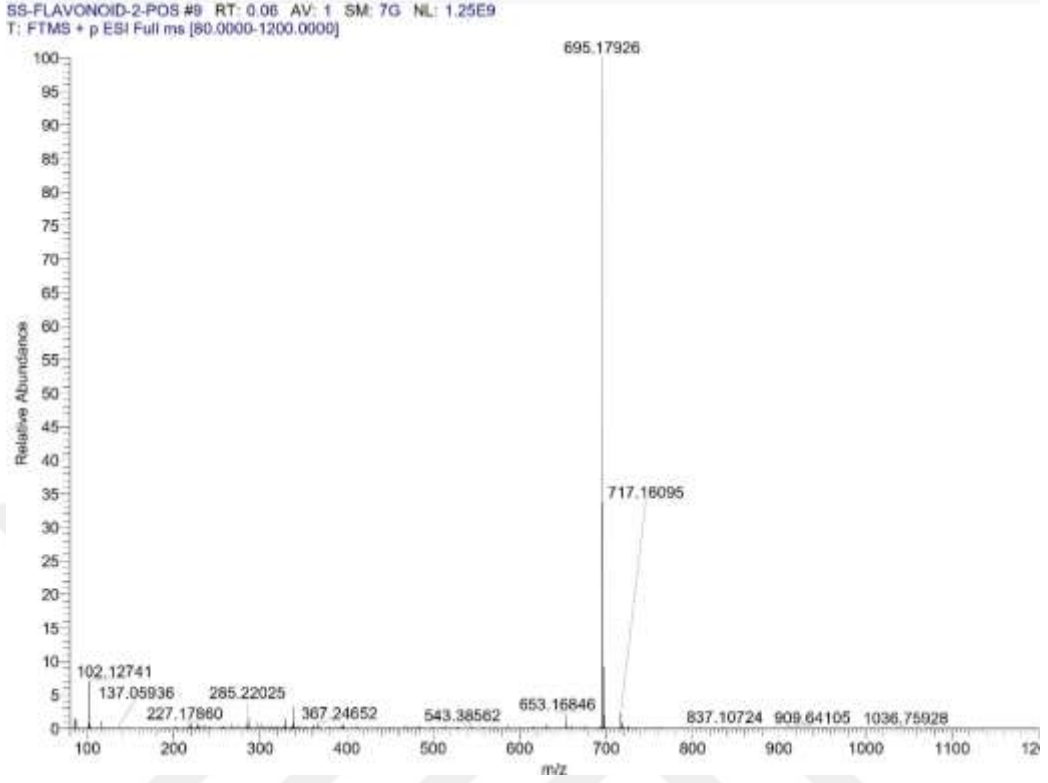


Şekil D.3 : F1 molekülü ¹³C-NMR spektrumu

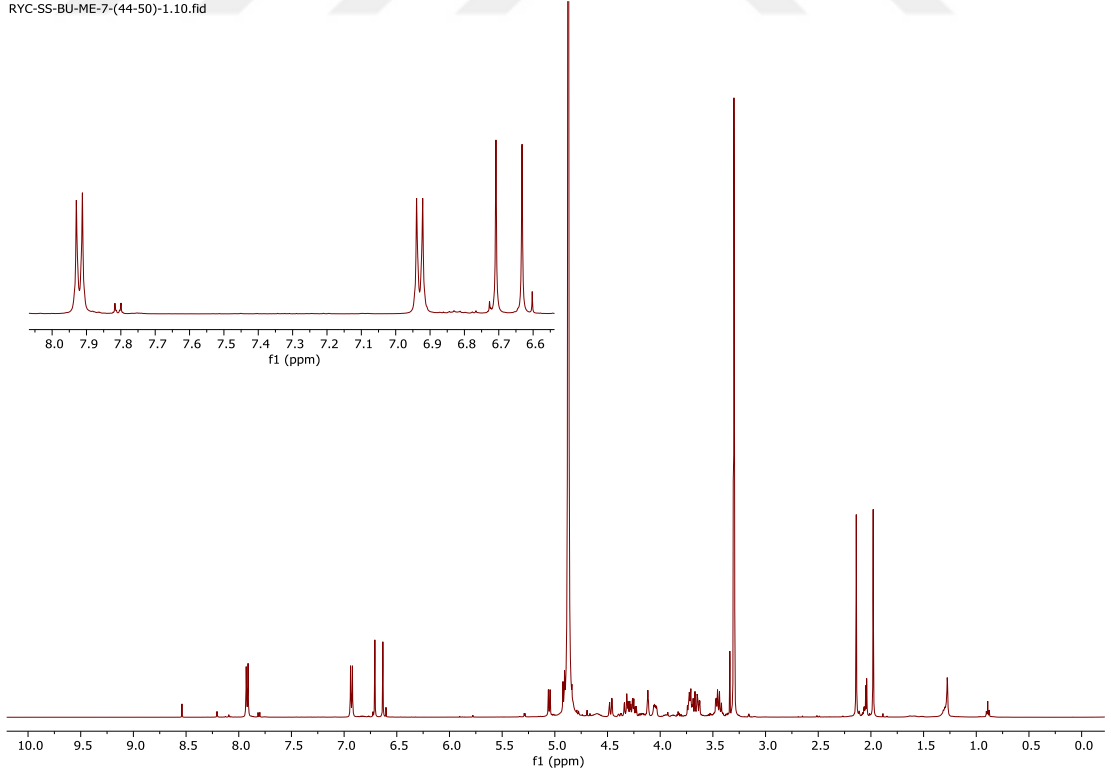


Şekil D.4 : F1 molekülü COSY spektrumu

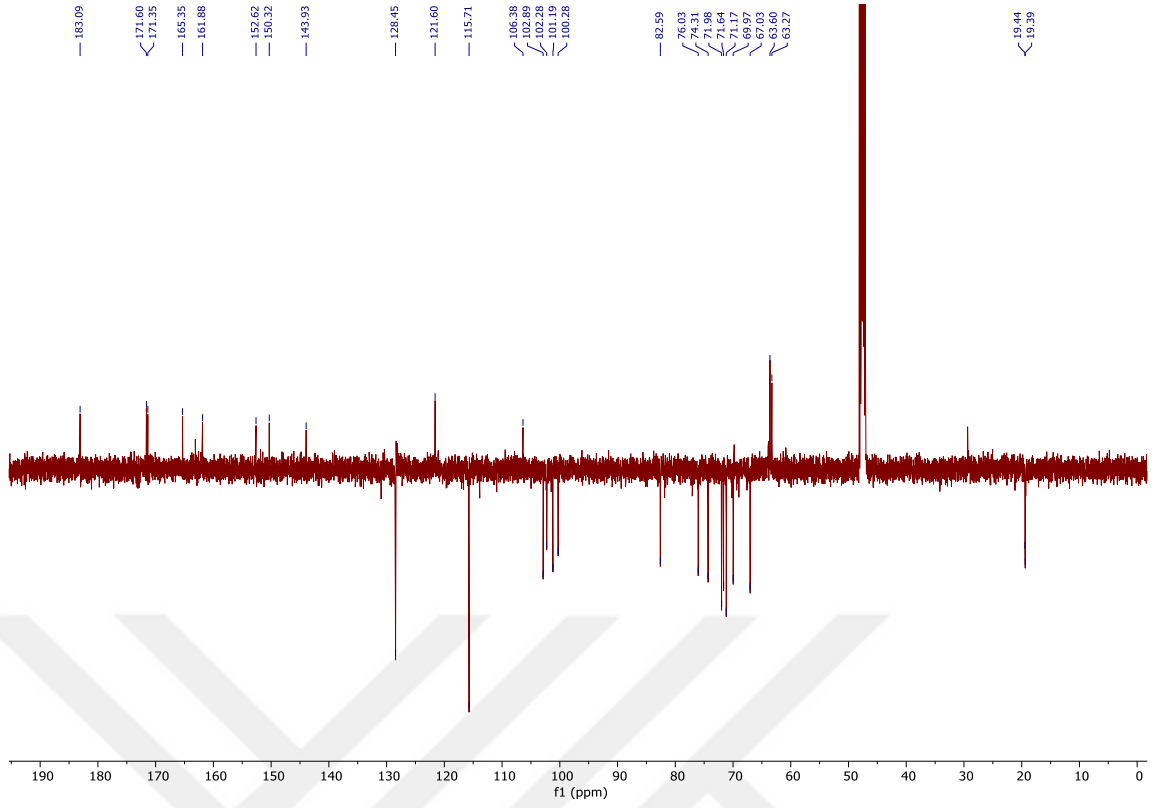
EK F: Isoscutellarein 7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] Maddesinin Spektral Verileri (F2)



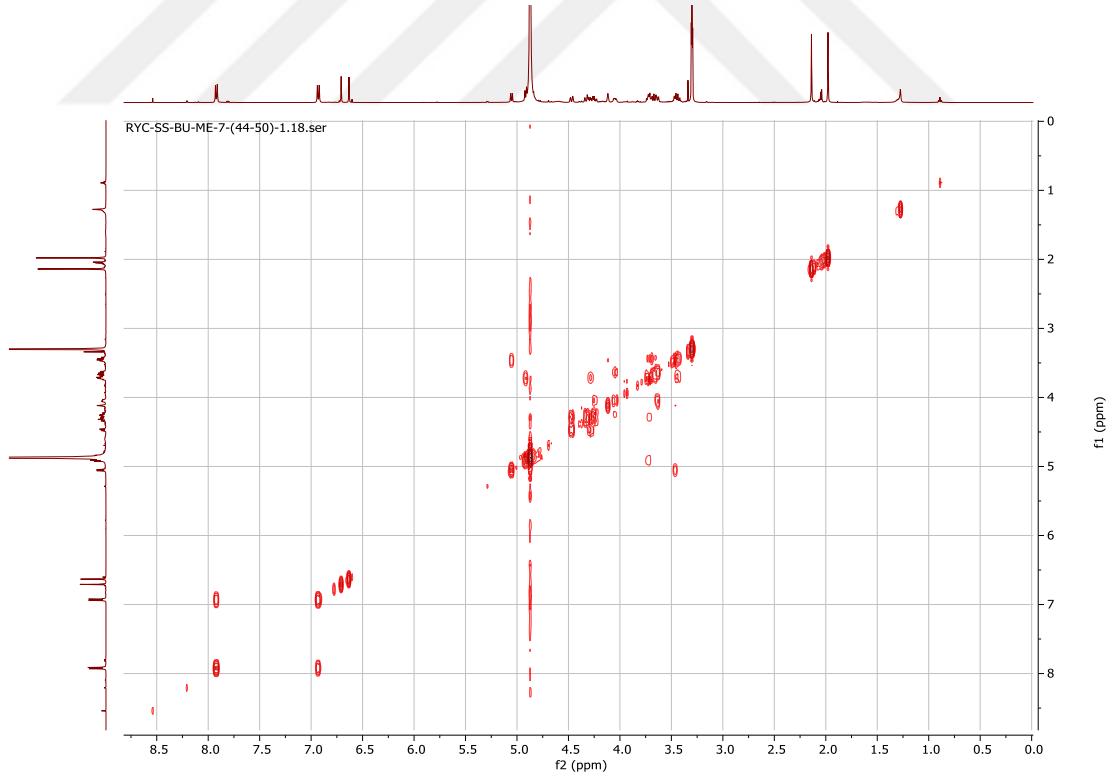
Şekil F.1 : F2 molekölü kütle spektrumu



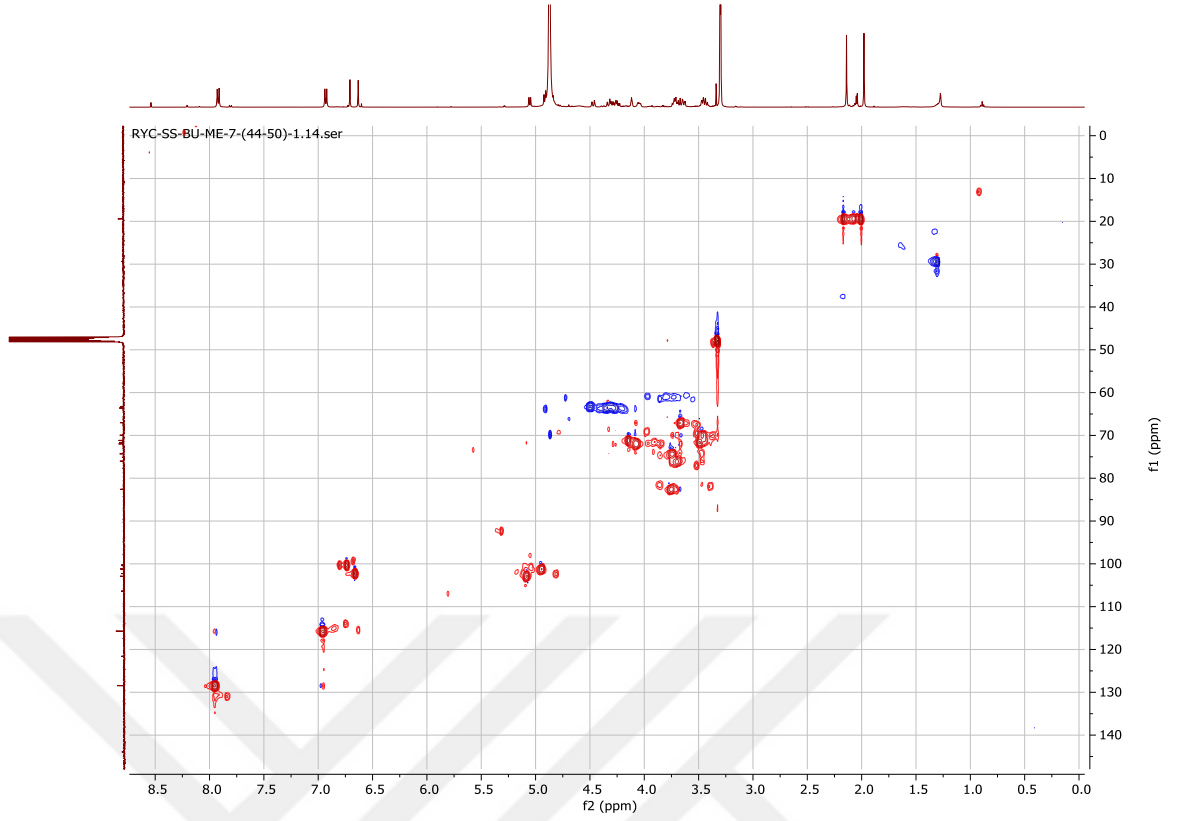
Şekil F.2 : F2 molekölü ^1H -NMR spektrumu



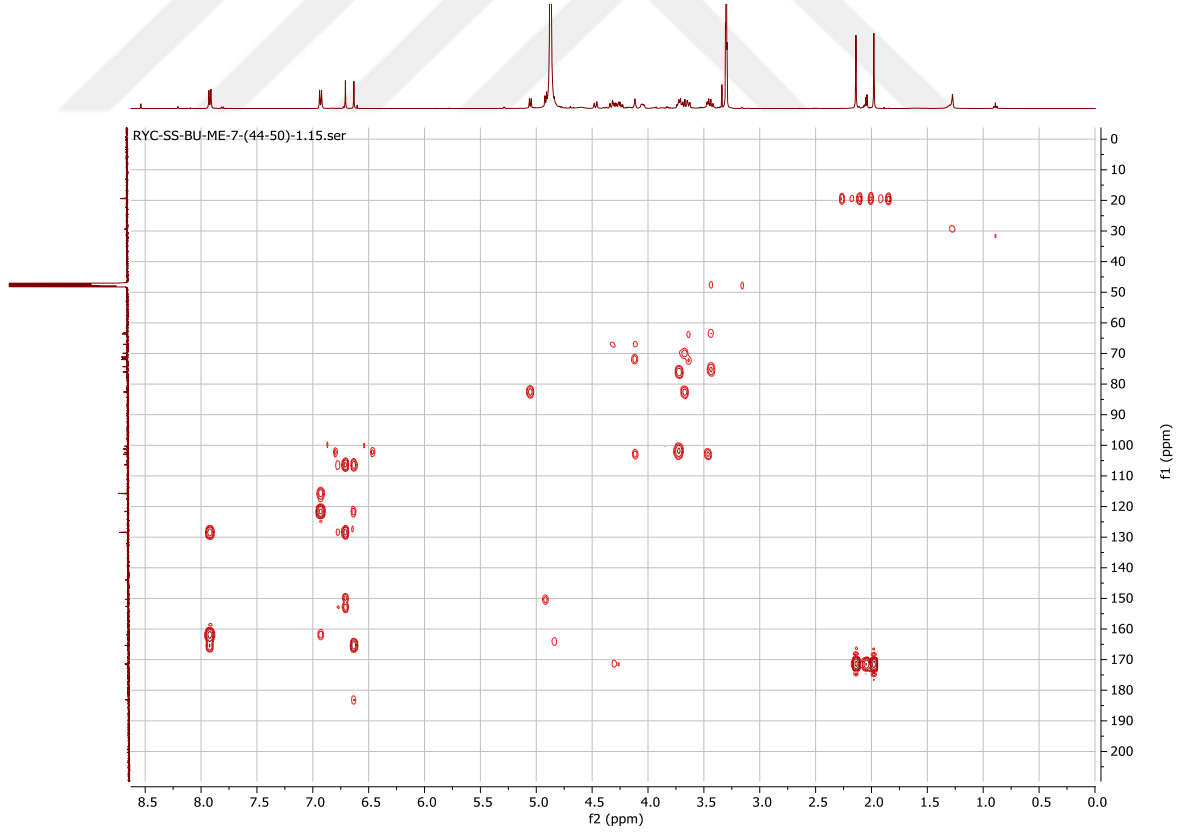
Şekil F.3 : F2 molekülü ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil F.4 : F2 molekülü COSY spektru

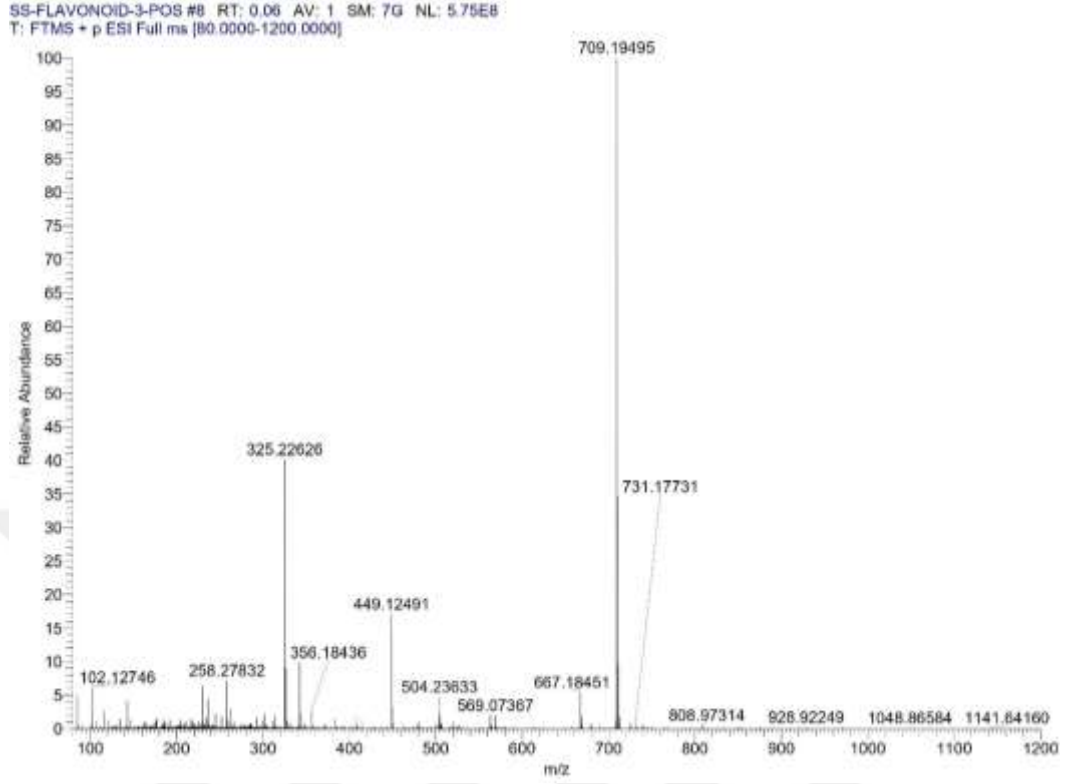


Şekil F.5 : F2 molekülü HSQC spektrumu

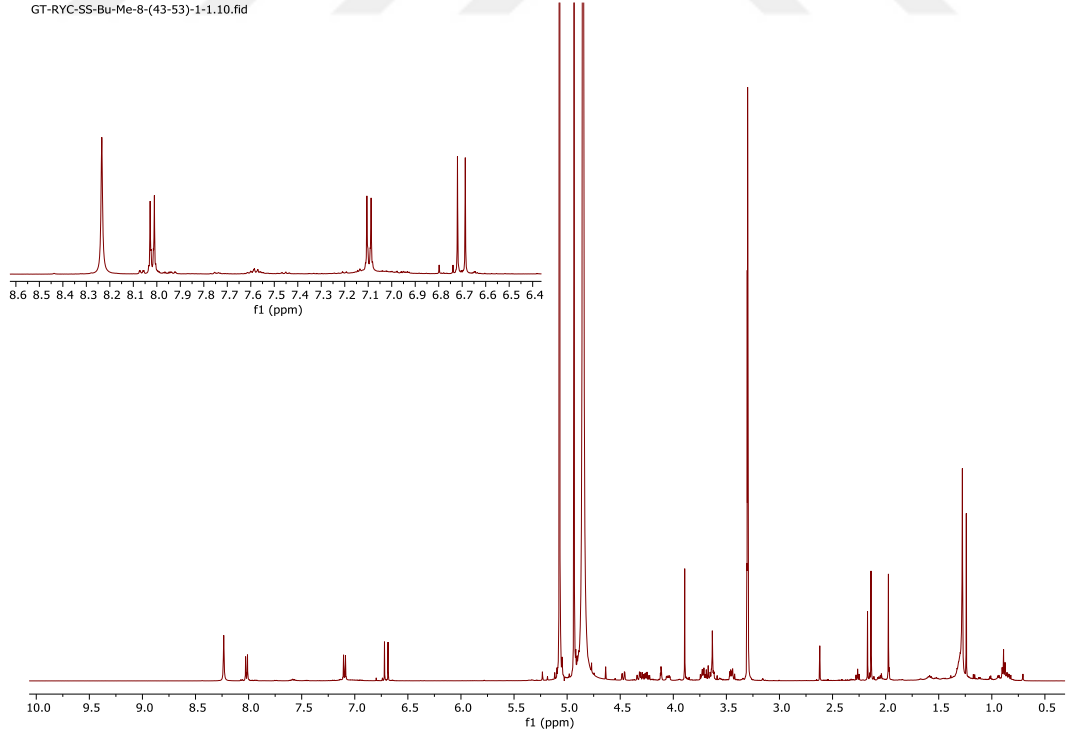


Şekil F.6 : F2 molekülü HMBC spektrumu

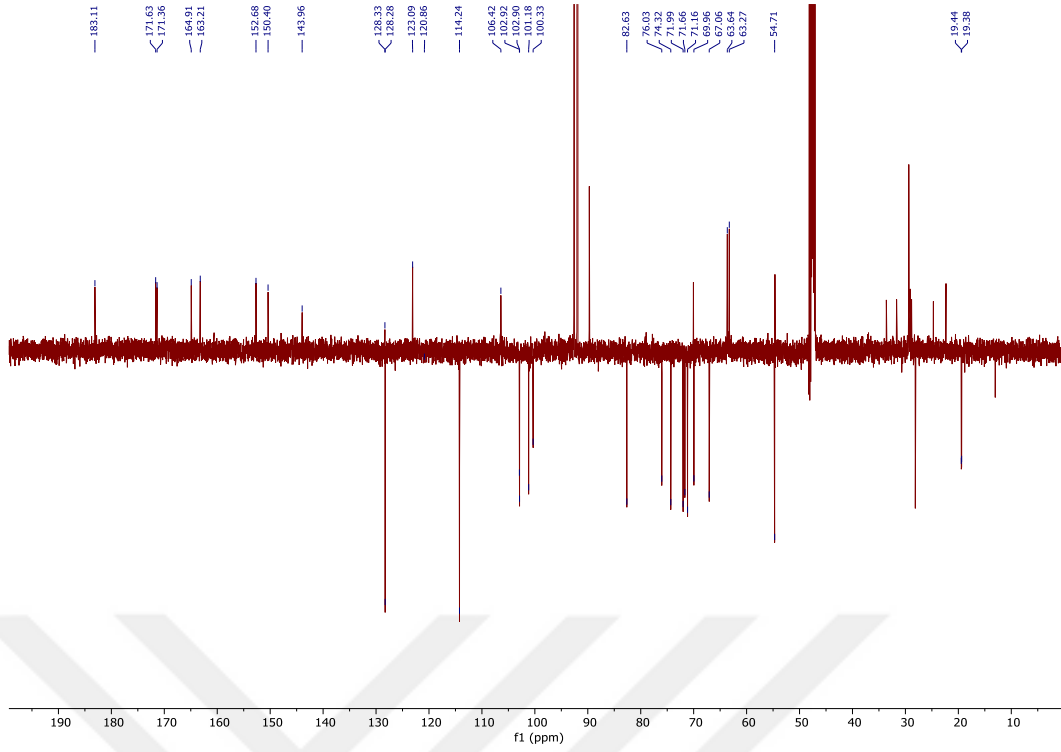
EK G: 4'-O-methylisoscutellarein-7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside Maddesinin Spektral Verileri (F3)



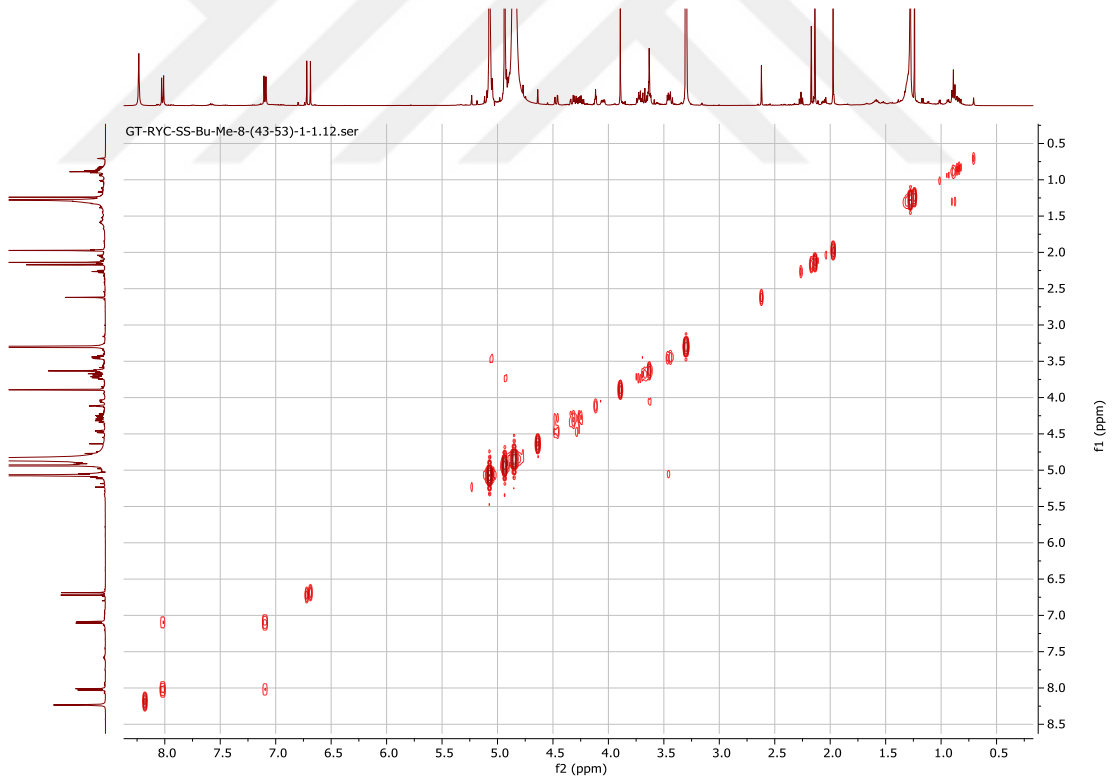
Şekil G.1 : F3 molekülü kütle spektrumu



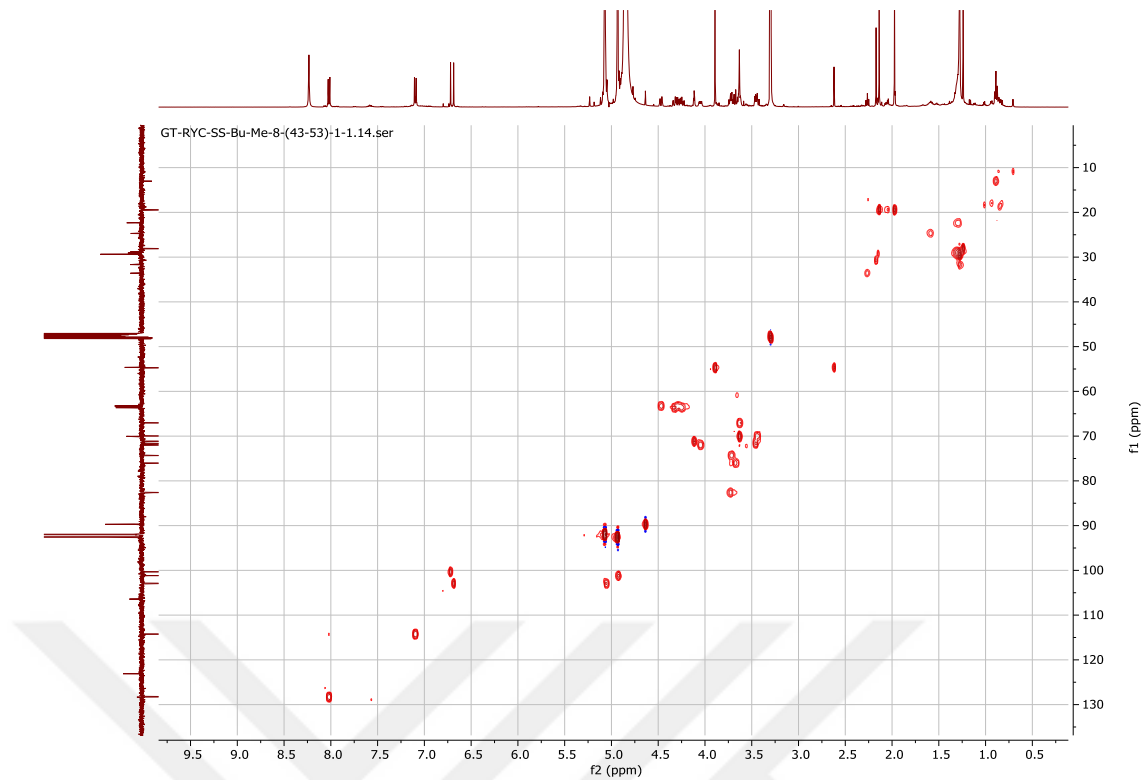
Şekil G.2 : F3 molekülü ^1H -NMR spektrumu



Şekil G.3 : F3 molekülü ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil G.4 : F3 molekülü COSY spektrumu



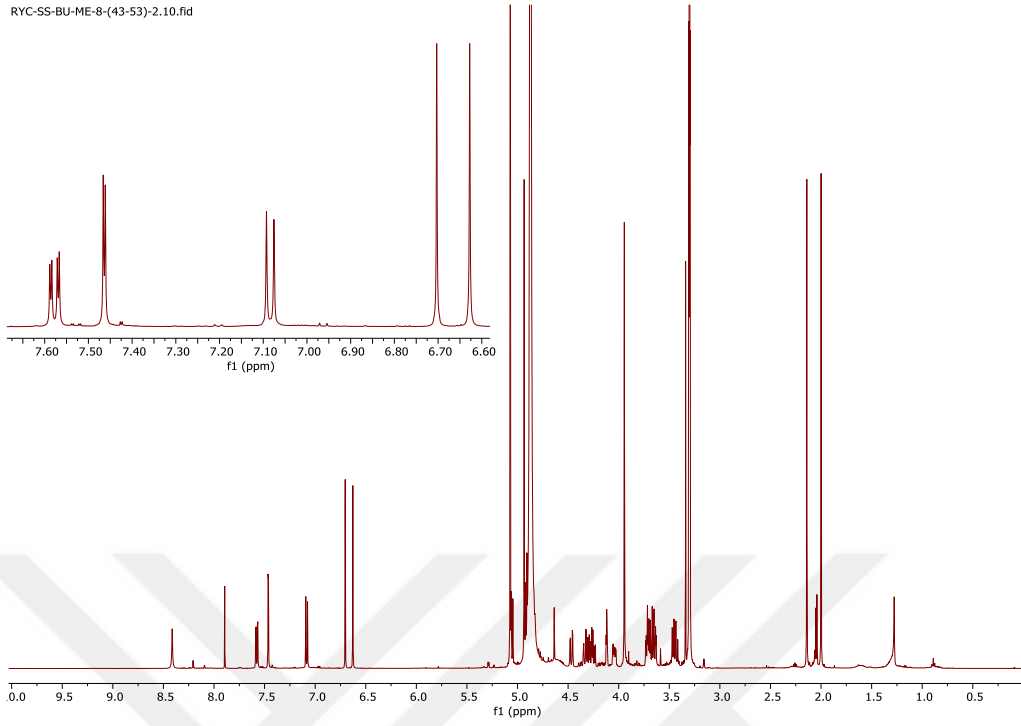
Şekil G.5 : F3 molekülü HSQC spektrumu

EK H: 3'-O-methylhypolaetin -7-O-[6'''-O-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- 6''-O-acetyl- β -D-glucopyranoside] Maddesinin Spektrel Verileri (F4)

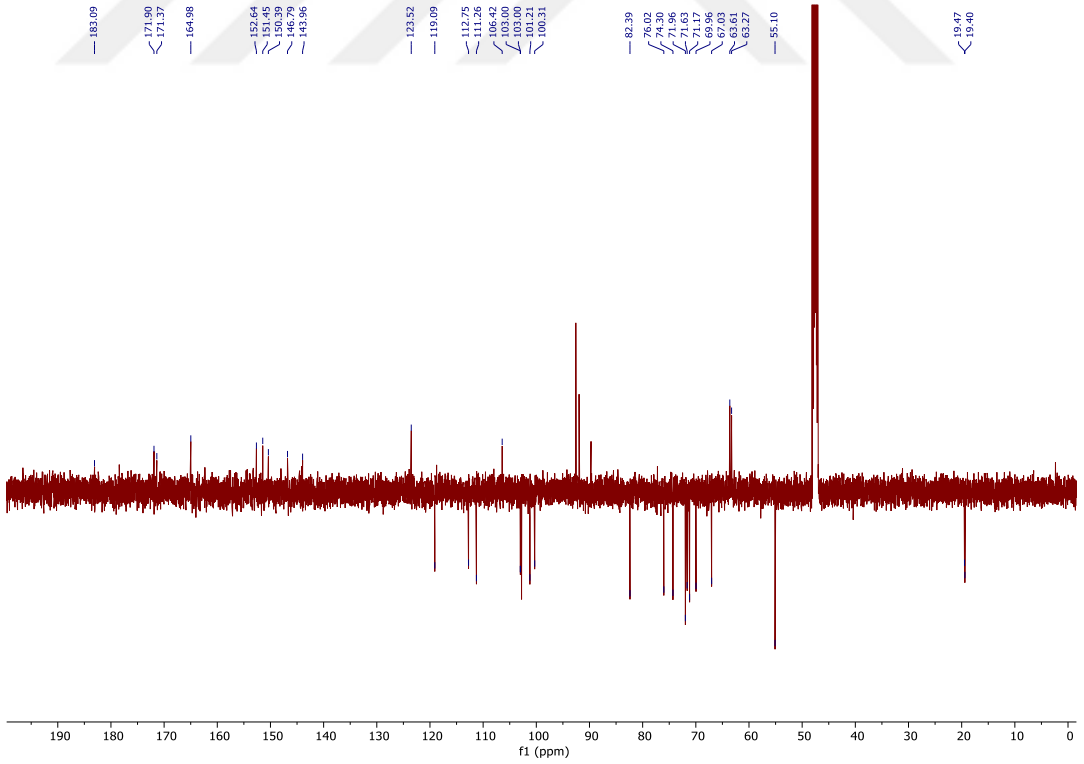


Şekil H.1 : F4 glikozit molekülü kütle spektrumu

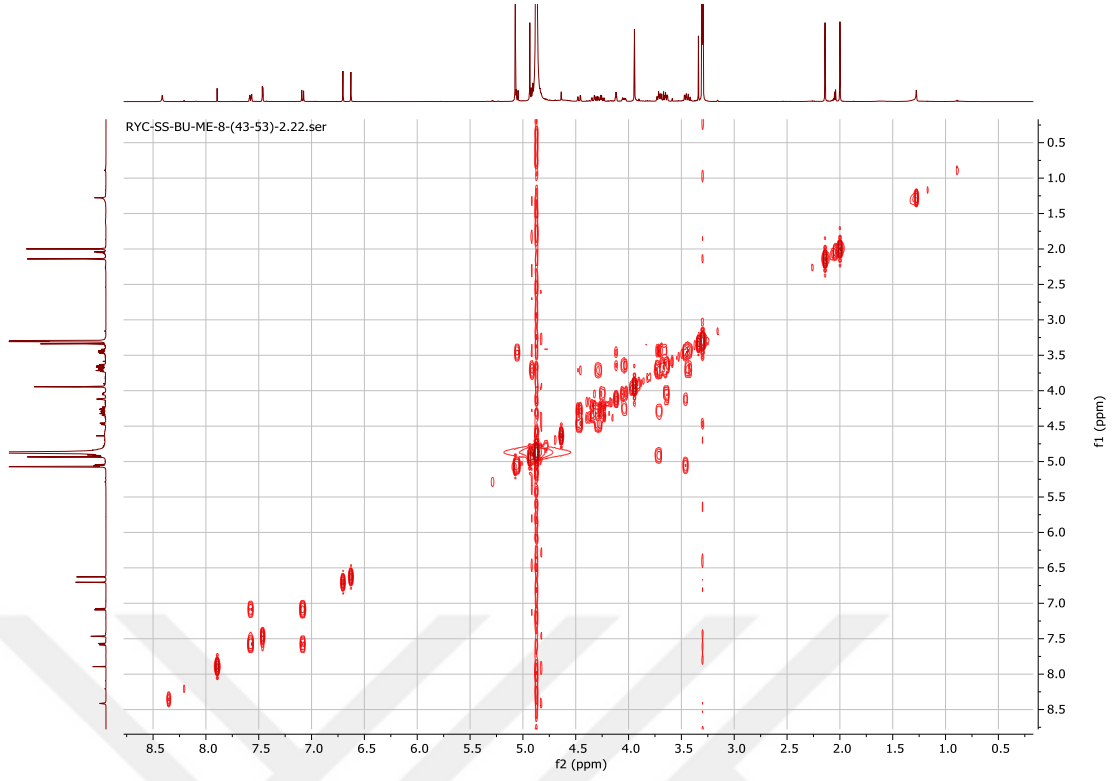
RYC-SS-BU-ME-8-(43-53)-2.10.fid



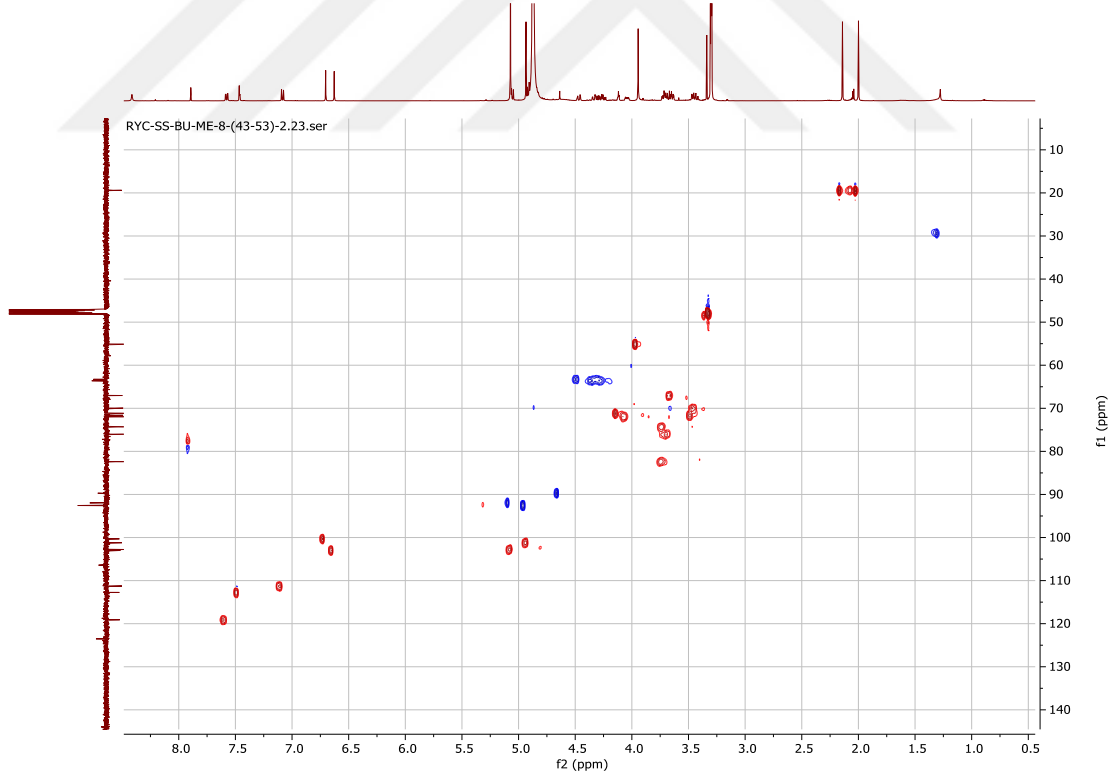
Şekil H.2 : F4 molekülü ¹H-NMR spektrumu



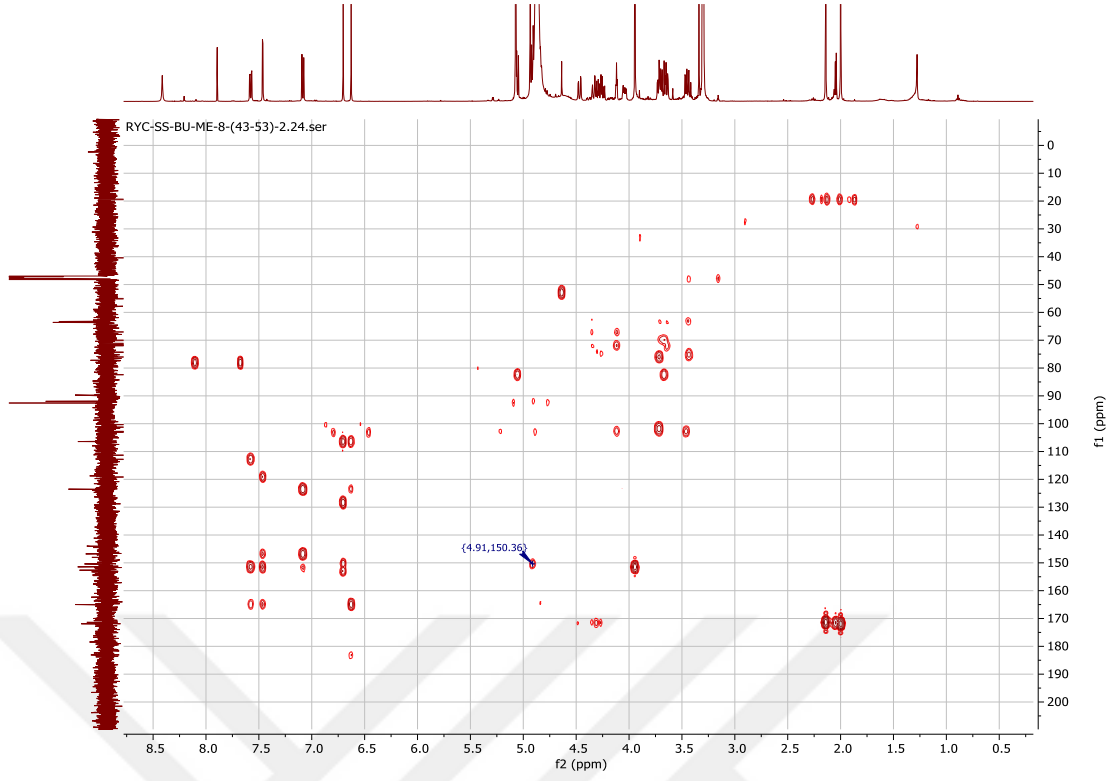
Şekil H.3 : F4 molekülü ¹³C-NMR spektrumu



Şekil H.4 : F4 molekülü COSY spektrumu

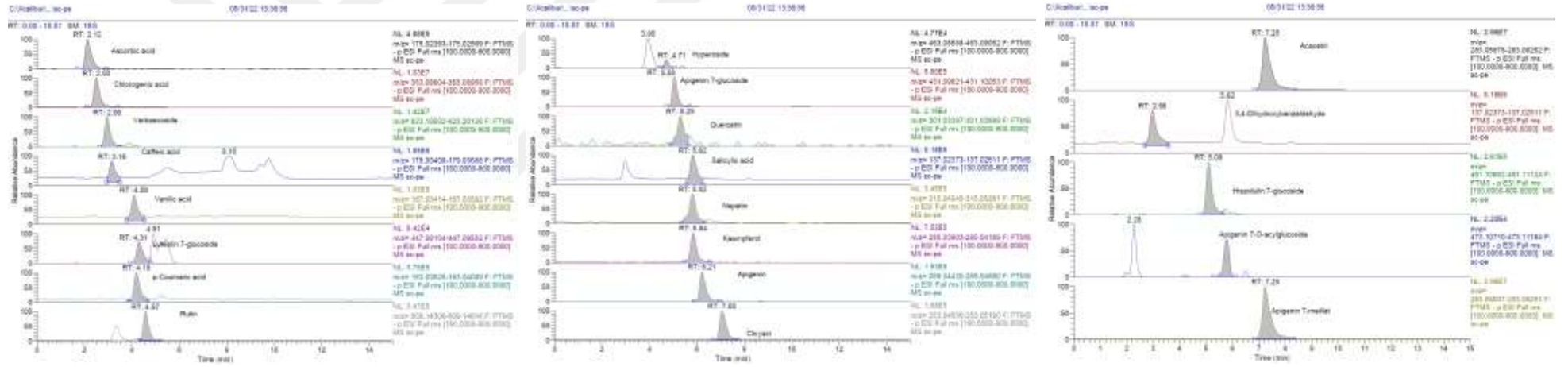


Şekil H.5 : F4 molekülü HSQC spektrumu

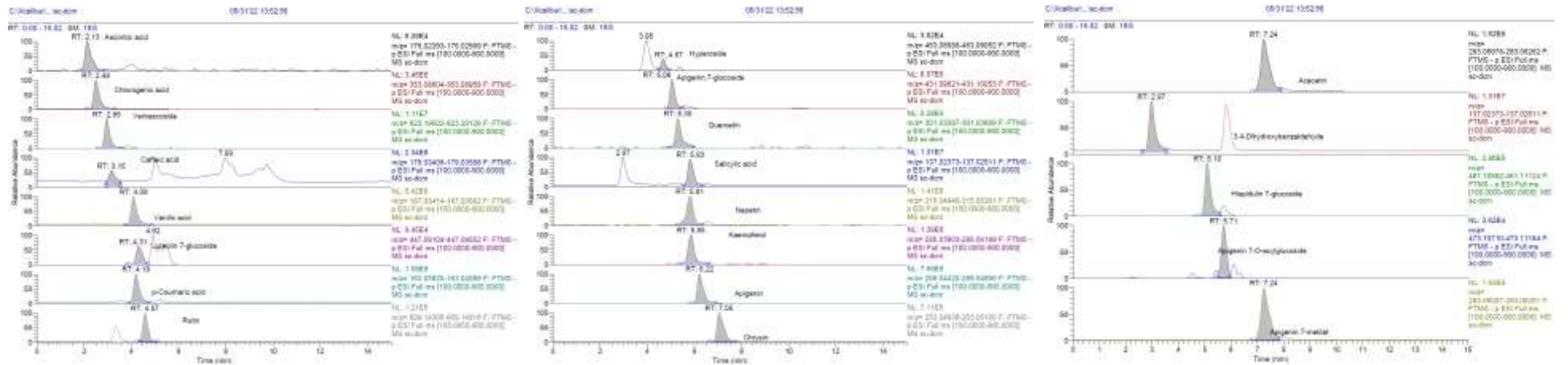


Şekil H.6 : F4 molekülü HMBC spektrumu

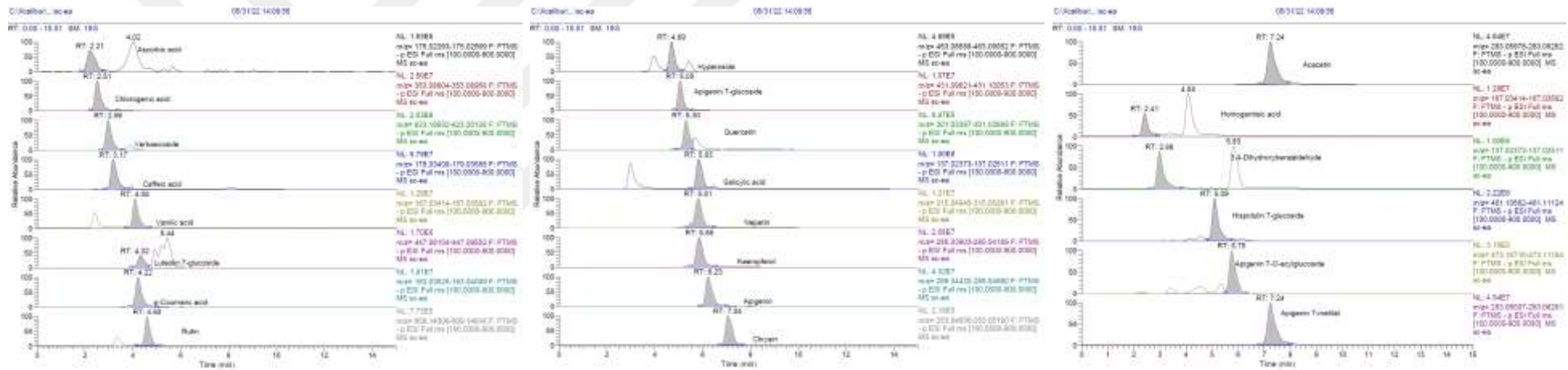
EK I: LC-HRMS kromatogramları



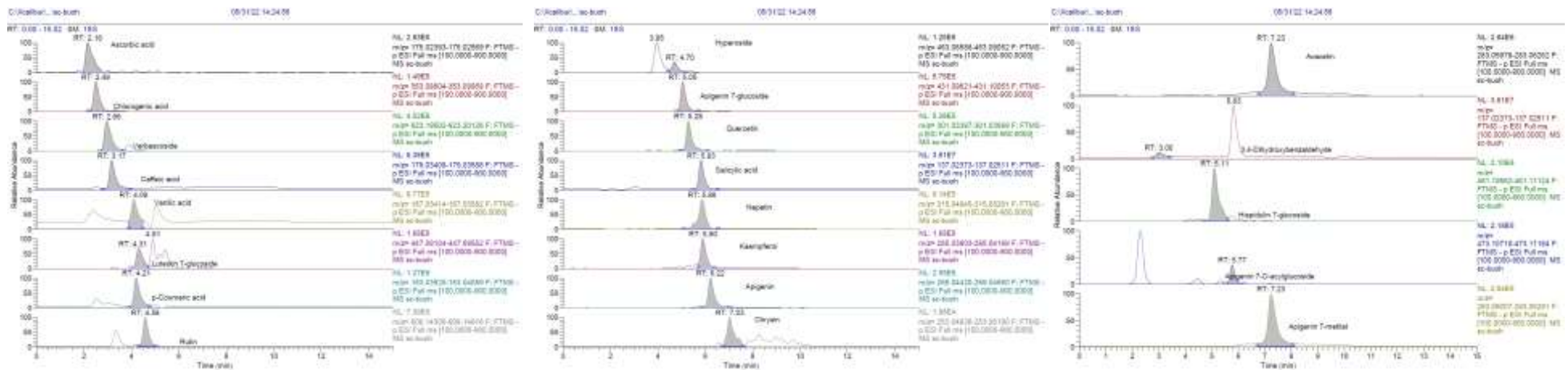
Şekil I.1: *S. congesta* PE ekstresi LC-HRMS kromatogramı



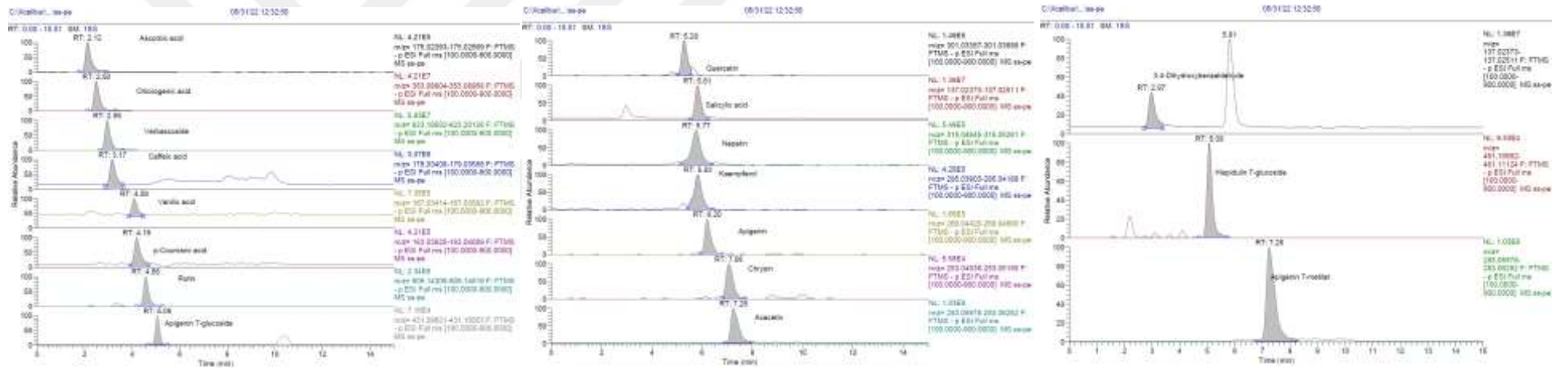
Şekil I.2: *S. congesta* DCM ekstresi LC-HRMS kromatogramı



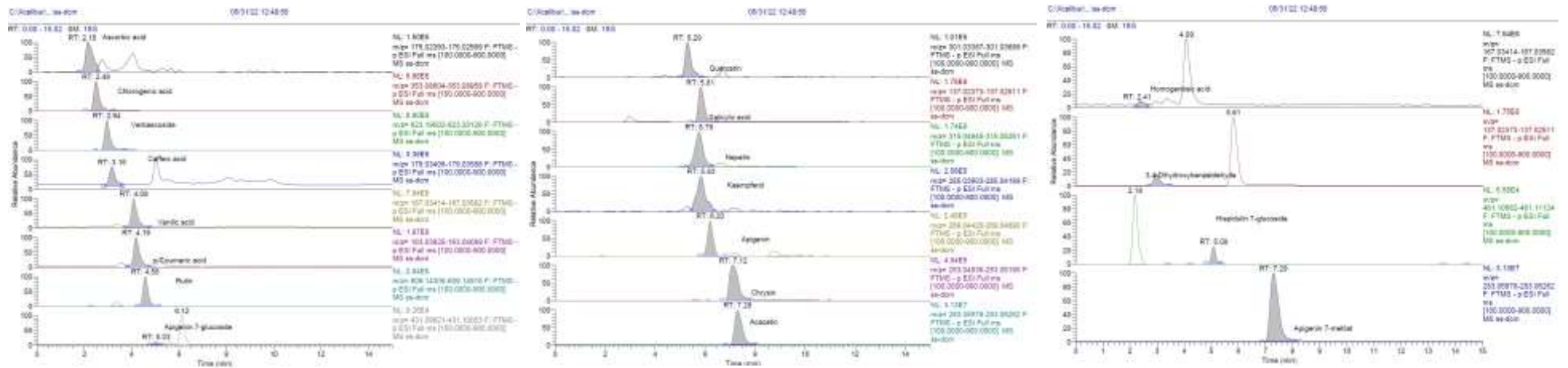
Şekil I.3: *S. congesta* EtOAc ekstresi LC-HRMS kromatogramı



Şekil I.4: *S. congesta* BuOH ekstresi LC-HRMS kromatogramı

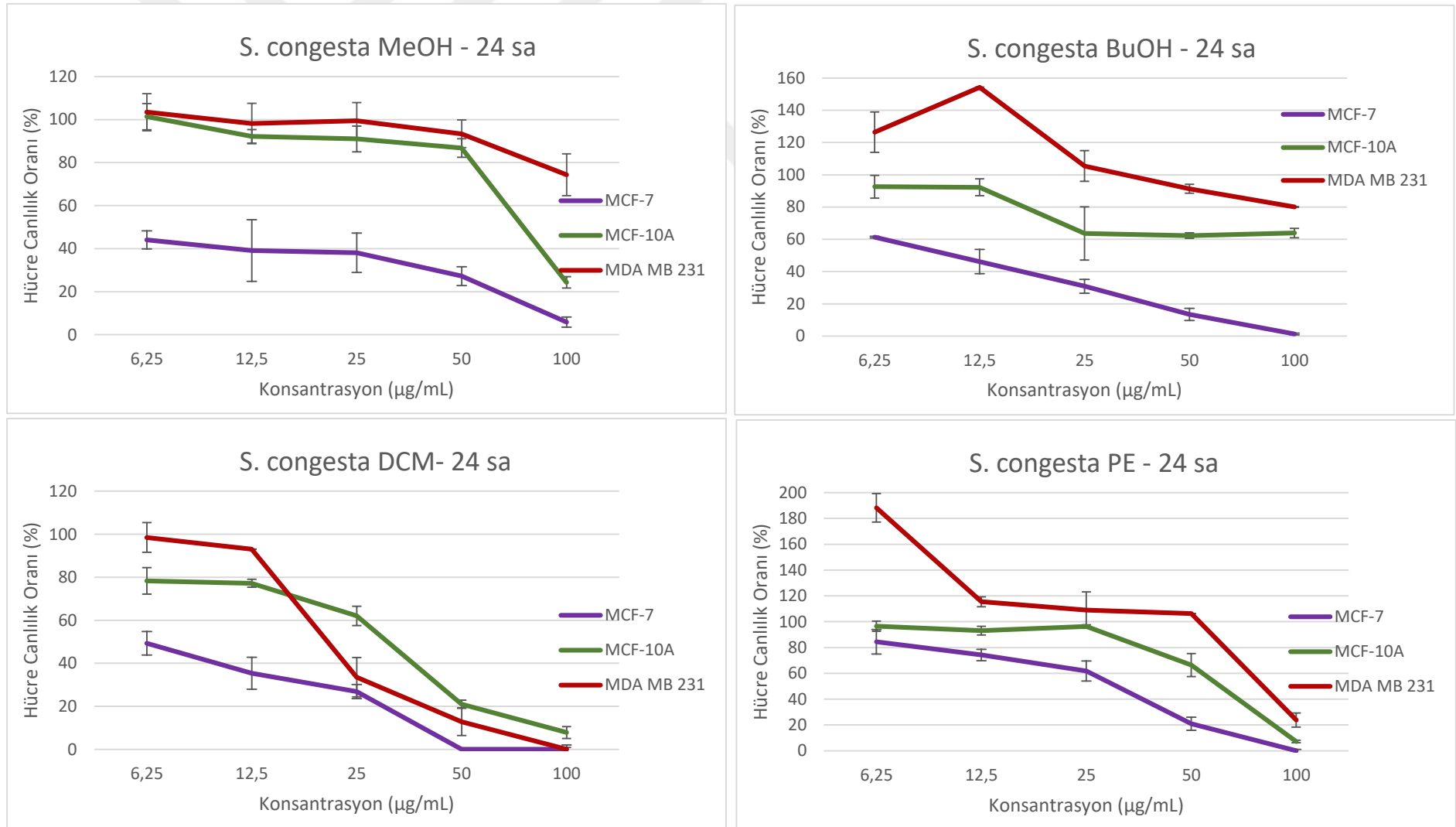


Şekil I.5: *S. stricta* PE ekstresi LC-HRMS kromatogramı

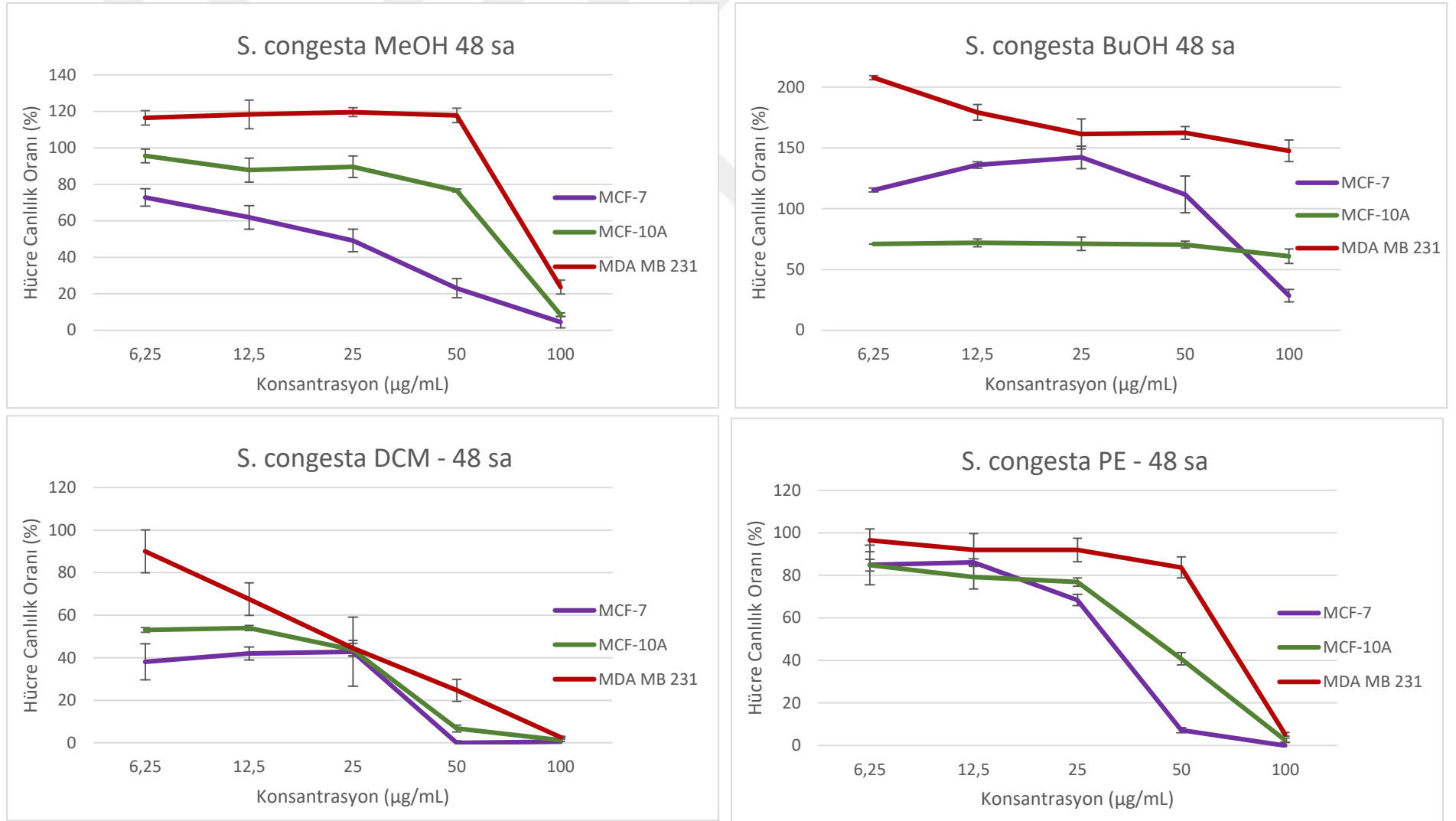


Şekil I.6: *S. stricta* DCM ekstresi LC-HRMS kromatogramı

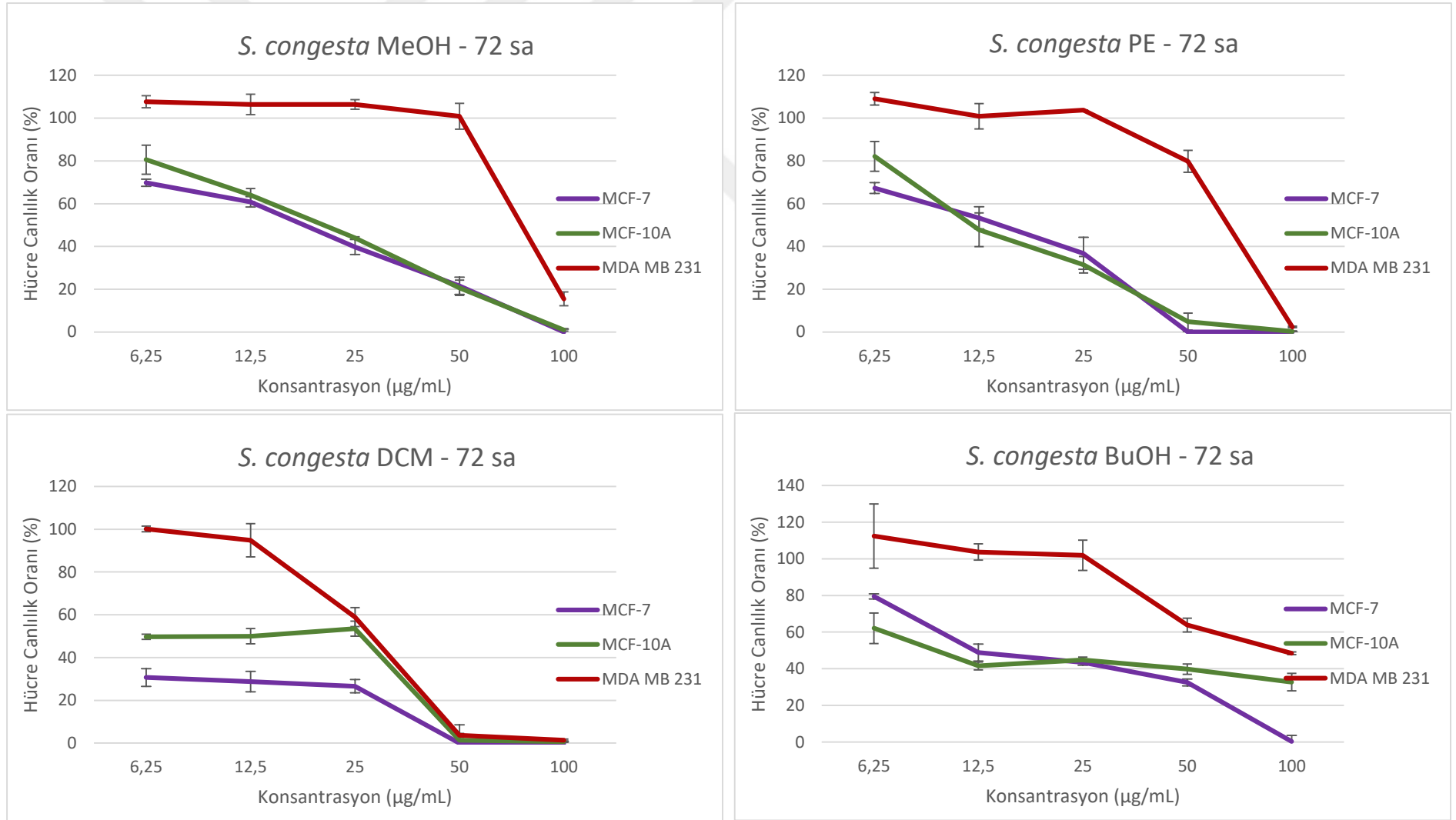
EK İ : WST-1 testi sonuçları



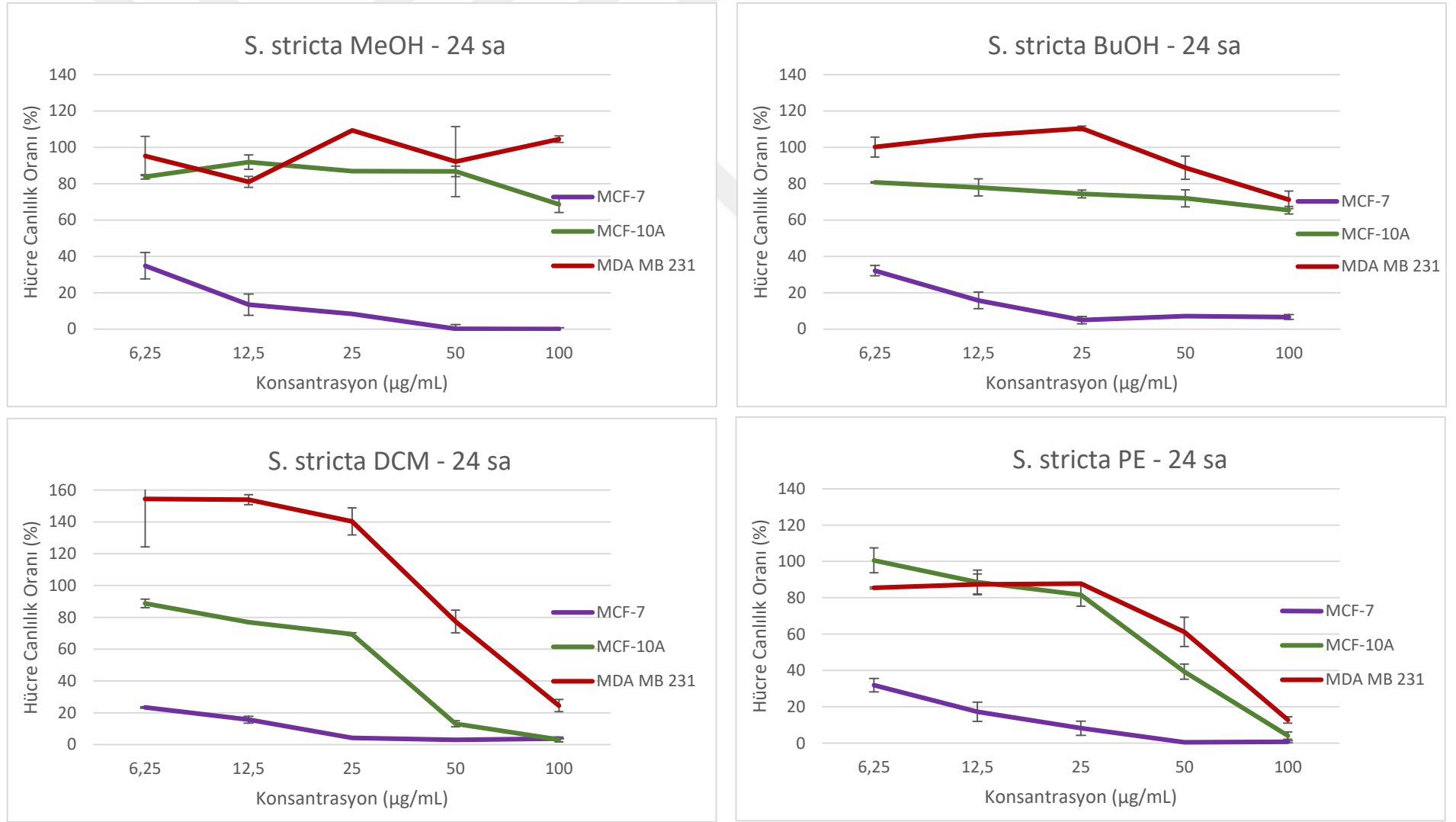
Şekil İ.1 : *S. congesta* metanol (MeOH), butanol (BuOH), diklorometan (DCM) ve petrol eteri (PE) ekstralarının 24 saatlik muamele ile MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



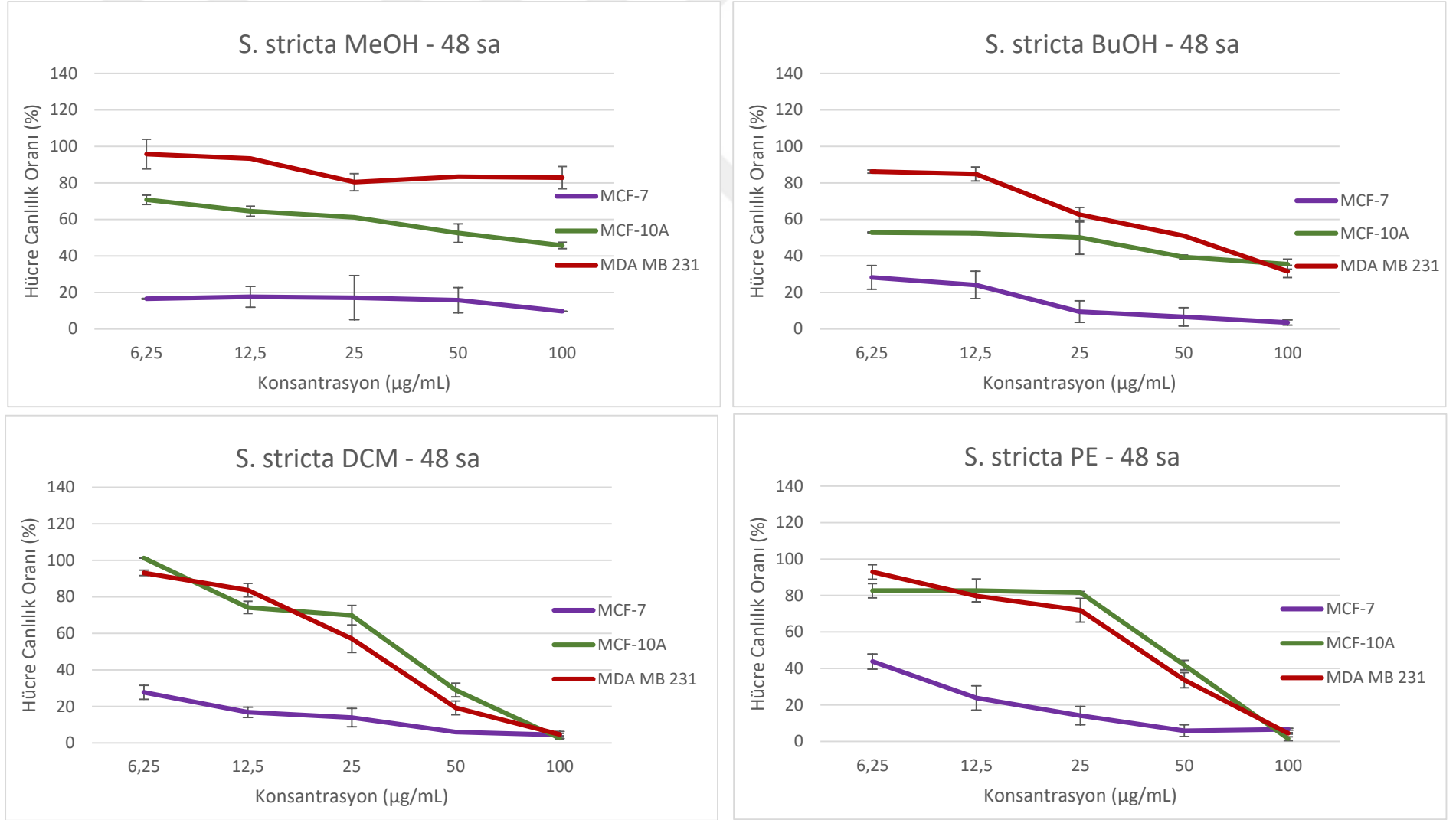
Şekil İ.2 : *S. congesta* metanol (MeOH), butanol (BuOH), diklorometan (DCM) ve petrol eteri (PE) ekstralarının 48 saatlik muamele ile MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



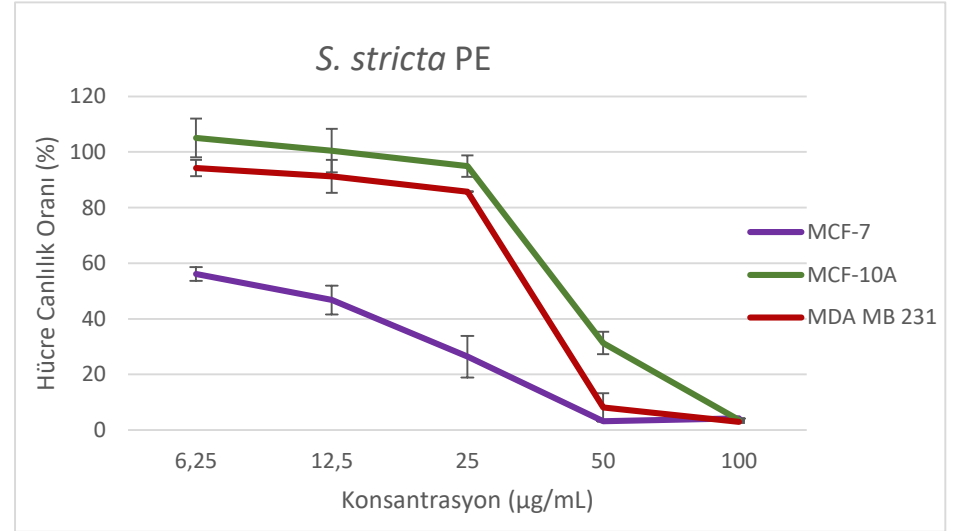
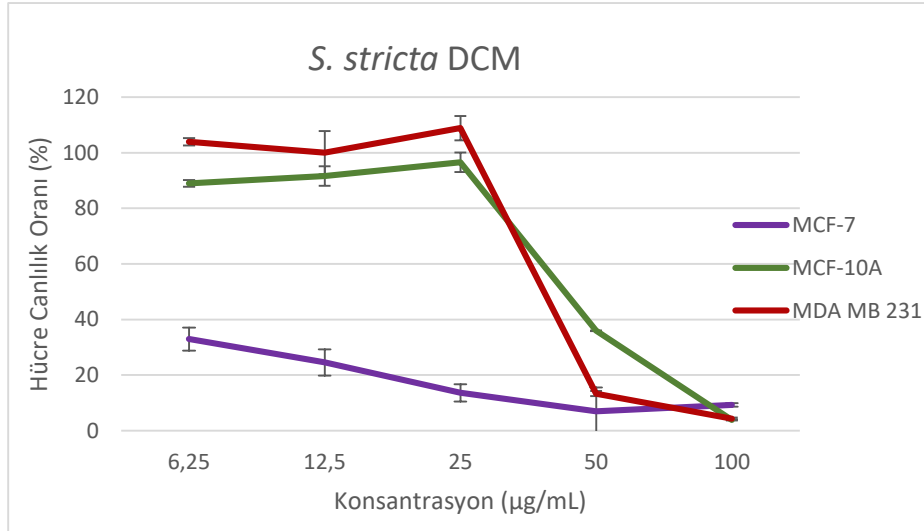
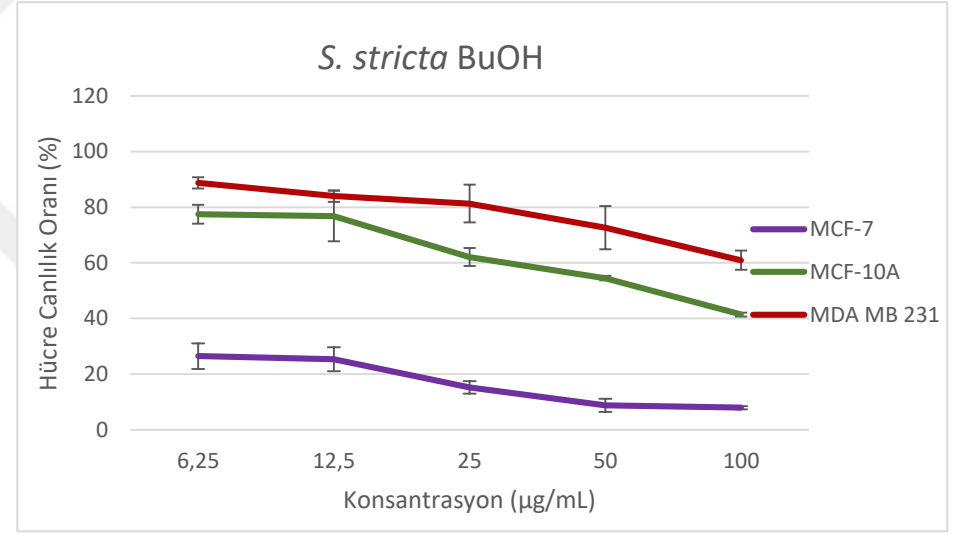
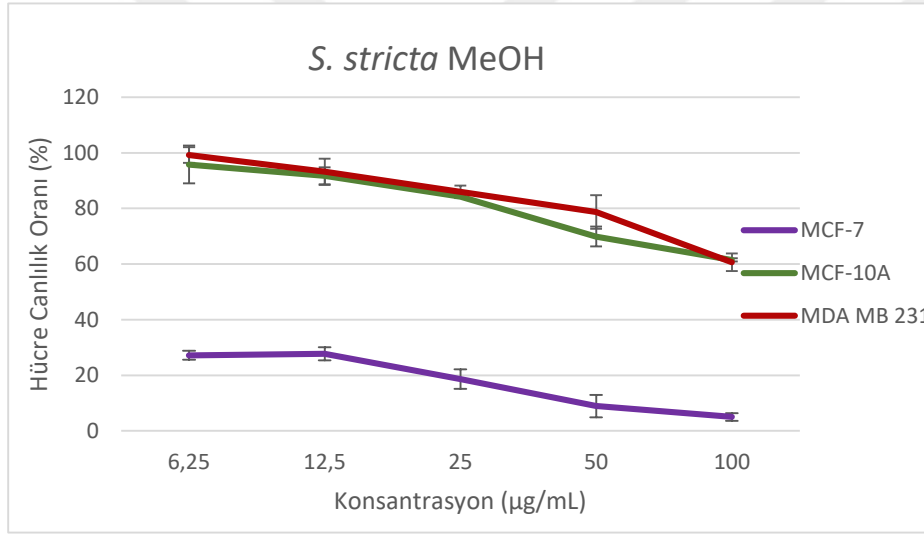
Şekil İ.3 : *S. congesta* metanol (MeOH), butanol (BuOH), diklorometan (DCM) ve petrol eteri (PE) ekstralarının 72 saatlik muamele ile MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



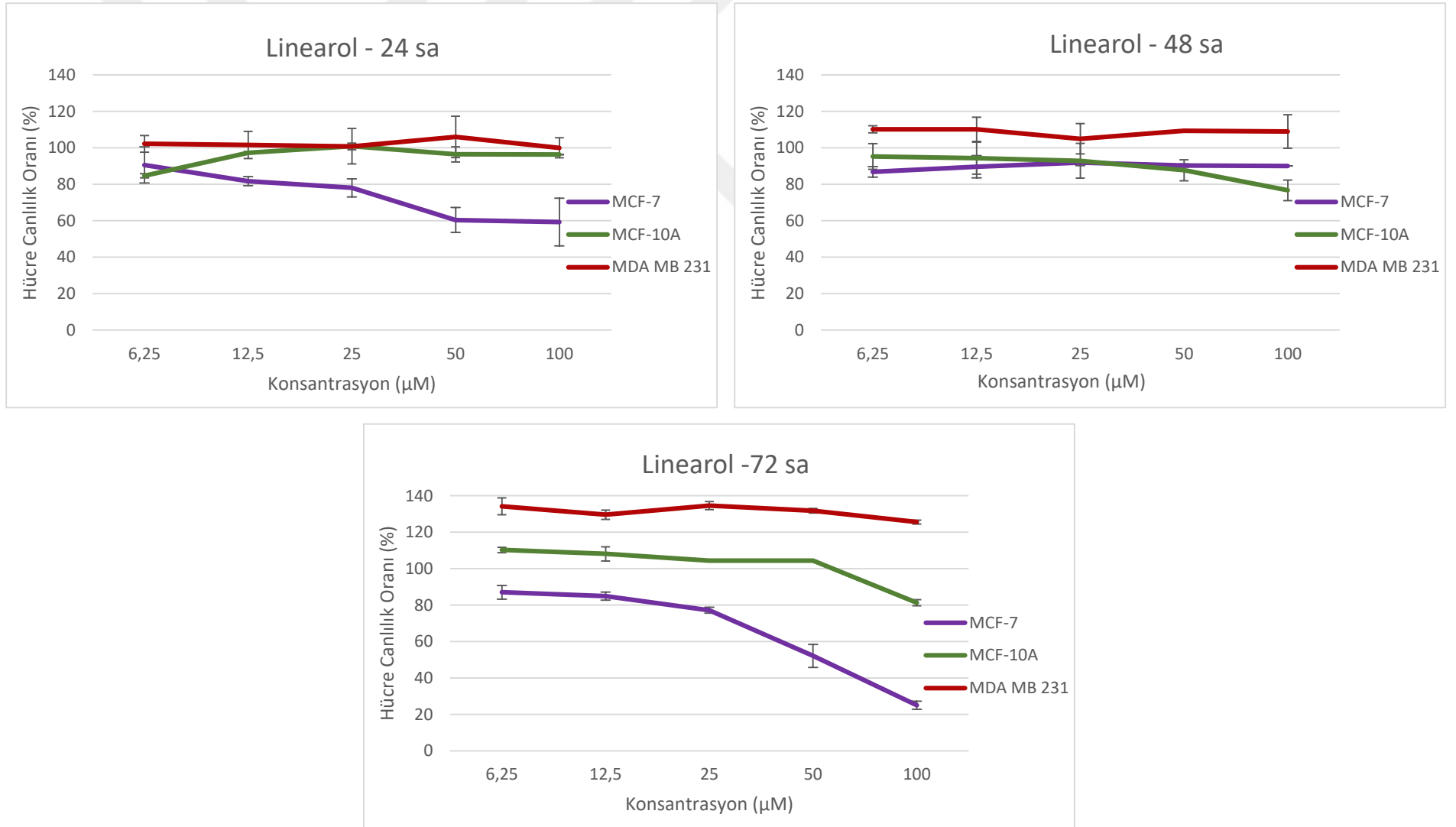
Şekil İ.4 : *S. stricta* metanol (MeOH), butanol (BuOH), diklorometan (DCM) ve petrol eteri (PE) ekstralarının 24 saatlik muamele ile MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



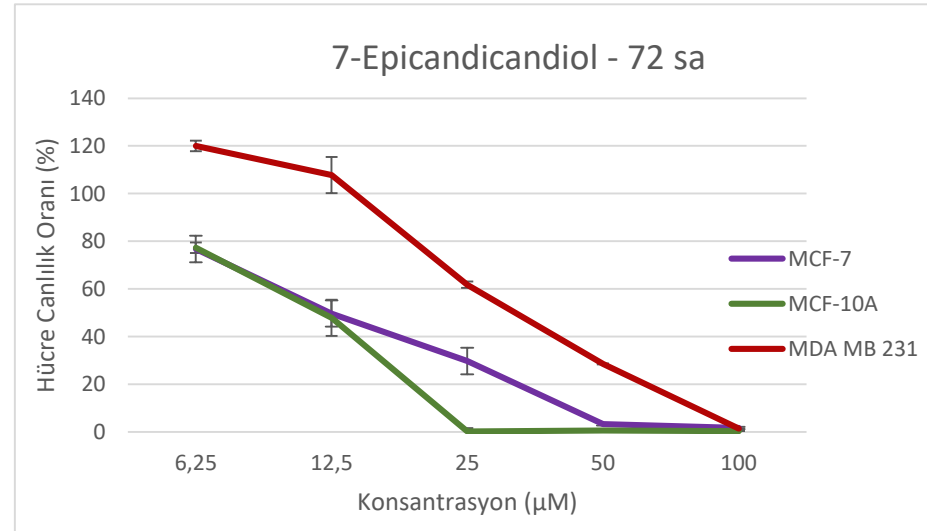
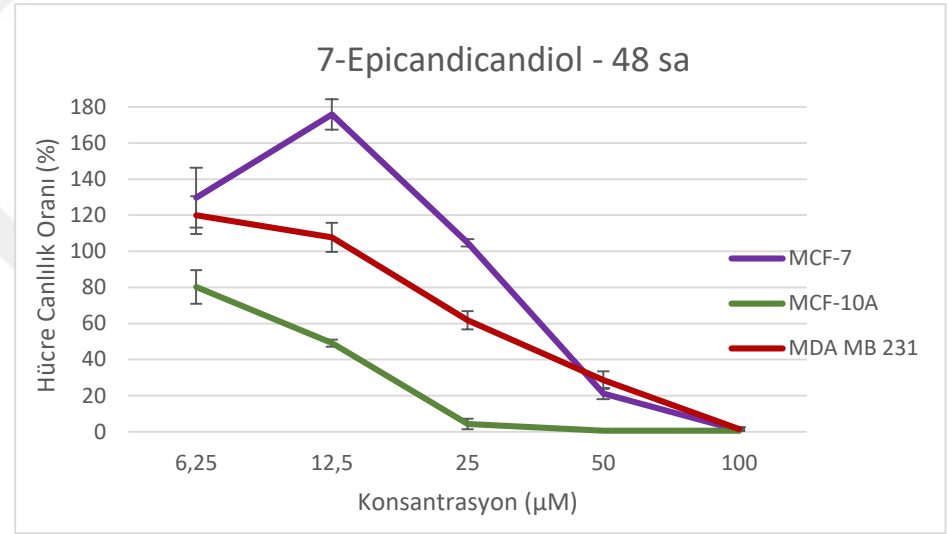
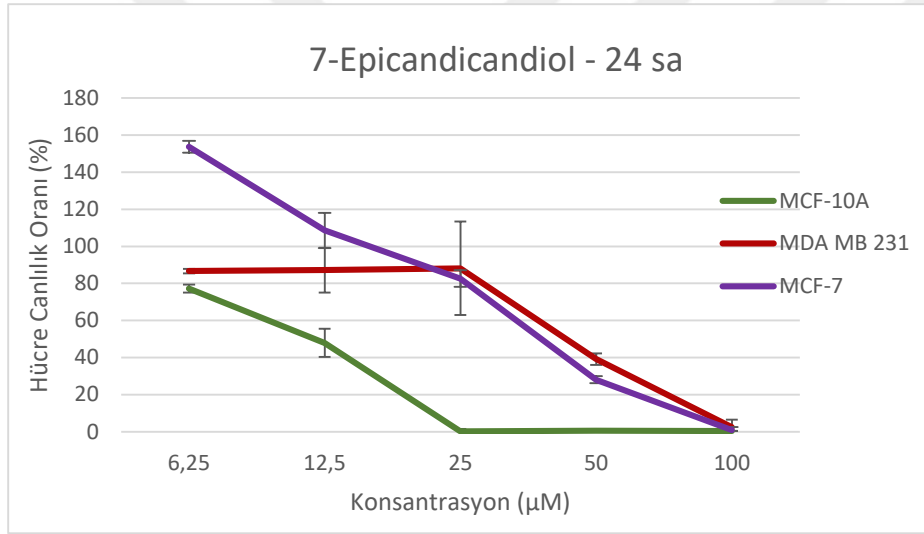
Şekil İ.5 : *S. stricta* metanol (MeOH), butanol (BuOH), diklorometan (DCM) ve petrol eteri (PE) ekstralarının 48 saatlik muamele ile MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



Şekil İ.6 : *S. stricta* metanol (MeOH), butanol (BuOH), diklorometan (DCM) ve petrol eteri (PE) ekstralarının 72 saatlik muamele ile MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



Şekil İ.7 : Linearol maddesinin MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi



EK İ.8 : 7-Epicandicandiol maddesinin MCF-7, MCF-10A ve MDA MB 231 hücre hatları üzerine etkisi

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Rümeyza Yücer
Doğum Tarihi ve Yeri :
E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2017-2022 Araştırma Görevlisi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi
- 2016-2017 Ena Farma, Ruhsatlandırma Uzmanı

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Yücer R., Çulhaoğlu B., Topçu G.** (2018) *Sideritis stricta* ve *Sideritis congesta* Bitkilerinin Antikolinesteraz Aktivitelerinin İncelenmesi. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 9-12 Nisan, Antalya, Türkiye

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Topçu, G., Yücer, R., & Şenol, H.** (2017). Bioactive constituents of Anatolian *Salvia* species. In *Salvia biotechnology* (pp. 31-132). Springer, Cham.
- **Saeed, M. E., Yücer, R., Dawood, M., Hegazy, M. E. F., Drif, A., Ooko, E., ... & Efferth, T.** (2022). In Silico and In Vitro Screening of 50 Curcumin Compounds as EGFR and NF-κB Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3966.
- **Yücer R. & Bitiş L.** (2016). Anti-Aging Etkili Kremlerin Formülasyonuna Giren Bitkilere Genel Bakış. 6. *Kozmetik Kimyası Üretimi Ve Standardizasyonu Kongresi*. 26-28 Şubat, Antalya, Türkiye.
- **Keles H. B., Yücer R., Başaran A. N. & Başaran A. A.** (2014). *Opuntia ficus indica* Bitkisi Üzerinde Yapılan Farmakognozik Araştırmalar. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*. 28 Mayıs - 1 Haziran, Antalya, Türkiye.