

T.C.
KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTEP FISTIĞI (*P. vera* L.) KURU KIRMIZI KABUĞUNUN (PERİKARP)
FİTOKİMYASAL BİLEŞİMİ VE SAFLAŞTIRILAN SEKONDER
METABOLİTLERİN ANTİTÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gonca GÖKDEMİR

DANIŞMAN: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

OCAK 2016

KİLİS

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTEP FISTIĞI (*P. vera* L.) KURU KIRMIZI KABUĞUNUN (PERİKARP) FİTOKİMYASAL BİLEŞİMİ VE SAFLAŞTIRILAN SEKONDER METABOLİTLERİN ANTİTÜMÖR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gonca GÖKDEMİR

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

Yıl: 2016

Sayfa: 101

Bu çalışmada, antep fıstığı meyvelerinin dış yumuşak kabuklarından elde edilen etanol ekstresindeki toplam yedi metabolit Kolon ve İnce Tabaka Kromatografisi yöntemleri ile izole edildi. Saflaştırılan bu bileşiklerin kimyasal yapıları FT-IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR ve 2D-NMR yöntemleri ile, anacardic asit 15:1 (ginkgolic asit 15:1, PVK-1), anacardol 15:1 (Z)-3-(pentadek-8-enil)fenol, PVK-3), 4-hidroksianacardic asit (15:1) (PVK-4), anacardic asit 13:1 (PVK-6) ile shikimic asit (PVK-8) olarak belirlendi. İzole edilen metabolitlerin arasında PVK-5 ve PVK-7 olarak kodlanan iki metabolitin kimyasal yapısı safsızlıklar içerdiği için karakterize edilemedi. Etanol ekstresi ayrıca HPLC de yürütüldü ve ekstrenin %37 oranında shikimic asit ve %33 oranında ise anacardic asit 15:1 (PVK-8) içerdiği tespit edildi. Antep fıstığı kabuğunun endüstriyel önemi olan anacardic asitler ve shikimic asit bakımından zengin olduğu ve anacardic asitlerin ve shikimic asitin eldesi için yeni bir kaynak olduğu bu çalışma ile ilk kez ortaya konmuştur. Kabuk kısmından elde edilen etil asetat, etanol ve metanol ekstreleri ile saflaştırılan metabolitlerden anacardic acid 15:1 (PVK-1), anacardol 15:1 (PVK-3), anacardic asit 13:1 (PVK-6) ile shikimic asit (PVK-8) A549 kanser hücre hattı ile sağlıklı epitel hücrelerine (HUVEC) karşı sitotoksik etkileri test edildi. Tüm ekstreler A549 ve HUVEC hücrelerinin canlılık oranlarını artırırken, EtOAc ekstresinin 50µM konsantrasyonu A549 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermiştir. Saf maddeler arasında PVK-3 (anacardol 15:1), PVK-6 (anacardic asit 13:1) ve PVK-8 (shikimic asit) A549 kanser hücre hatlarına karşı değişik oranlarda inhibisyon sergileyerek sitotoksik etki sergilemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia vera*, dış kabuk, antitumoral aktivite, anacardic asit, ginkgolic asit, shikimic asit, HPLC

ABSTRACT

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTITUMORAL ACTIVITIES OF SECONDARY METABOLITES OF SHELL (PERICARP) OF ANTEPFISTIĞI (*P. vera* L.)

Gonca GÖKDEMİR

Kilis 7 Aralık University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

Year: 2016

Page: 101

In the present study, seven metabolites were isolated using column and thin layer chromatographic methods from the ethanolic extract of the shells (pericarp) of *P. vera* nuts. The chemical structures of the metabolites were characterized as anacardic acid 15:1 (ginkgolic acid 15:1, PVK-1), anacardol 15:1 [(Z)-3-(pentadec-8-enil)phenol, PVK-3], 4-hydroxyanacardic acid (15:1), PVK-4), anacardic acid 13:1 (PVK-6) and shikimic acid (PVK-8) via FT-IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR and 2D-NMR methods. Among the isolated metabolites, chemical structures of the two metabolites, coded as PVK-5 and PVK-7 could not be characterized since they contained some impurities. The ethanolic extract was also analyzed by HPLC and it has been determined that it contains anacardic acid 15:1 (PVK-1) and shikimic acid (PVK-8) with %33 and %37 relative amount, respectively. In the present study, for the first time, it has been demonstrated that the shells of *P. vera* nuts are rich in shikimic acid and anacardic acids, which are important materials in drug and polymer industry, and the shells is a new source in terms of these compounds. Cytotoxic activities of ethyl acetate, ethanol and methanol extracts of shells, and pure metabolites, anacardic acid 15:1 (PVK-1), anacardol 15:1 (PVK-3), anacardic acid 13:1 (PVK-6) and shikimic acid (PVK-8) were tested against A549 cancer cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). While all extracts increased the viability of A549 and HUVEC, 50µM concentration of ethyl acetate extract showed cytotoxic activity against A549 cancer cells. Among the pure metabolites, PVK-3 (anacardol 15:1), PVK-6 (anacardic acid 13:1) and PVK-8 (shikimic acid) were exhibited cytotoxic activity with various inhibition rates against A549 cancer cells.

Key Words: *Pistacia vera*, Shell, antitumoral activity, anacardic acid, ginkgolic acid, shikimic acid, HPLC

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesi, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve yardımını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR' a teşekkür ederim.

Ekstrelerin ve saflaştırılan metabolitlerin antitümöral etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmaları gerçekleştiren Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Didem Işık KARAGÖZ ve çalışma ekibine,

HPLC kromatogramlarının alınması ve etanol ekstresinin kantitatif analizindeki yardımlarından dolayı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi öğretim elemanı Arş. Gör. Eyüp KARAOĞUL'a,

Saflaştırılan metabolitlerin NMR spektrumlarının alınması konusunda katkı sağlayan Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Cavit KAZAZ ve Uzman Barış ANIL'a,

DeneySEL çalışmalarım sırasında benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her aşamasında bilgisiyle yol gösterip tezimin tamamlanmasında büyük katkısı olan değerli hocalarım, Sayın Arş. Gör. Evrim BARAN'a ve Sibel KOÇER' e,

Ayrıca eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitkilerle Tedavide Tarihsel Gelişim.....	3
1.2. Kanser.....	7
1.3. <i>Pistacia</i> Cinsi.....	11
1.3.1. <i>Pistacia vera</i>	12
1.4. Çalışmanın Amacı.....	17
2. MATERYAL ve YÖNTEM	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	18
2.1.3. Sarf Malzemeler.....	18
2.1.4. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar.....	20
2.2. Yöntem.....	20
2.2.1. Antep Fıstığı (<i>P. vera</i> L.).....	20
2.2.2. Antep Fıstığı (<i>P. vera</i> L.) Kabuğunun Ekstraksiyon İşlemleri.....	20
2.2.3. Antep Fıstığı (<i>P. vera</i> L.) Kabuğu Etanol Ekstresi Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar.....	21
2.2.4. Ekstrelerin Preperatif İTK ve HPLC ile Kantitatif ve Kalitatif Analizi.....	23
2.2.5. Hücre Kültüründe Yapılan Antitümöral Çalışmalar.....	24
2.2.5.1. Saf metabolit ve Ekstrelerin Çözeltilerinin Hazırlanması.....	24
2.2.5.2. Hücre Kültürü.....	24
2.2.5.3. Hücre Soylarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması.....	25
2.2.5.4. Hücre Soylarının Stoklanması (Hücrelerin Dondurulması (Freezing Medium).....	25
2.2.5.5. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması.....	26

2.2.5.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı Materyaller	26
2.2.5.7. MTT Canlılık Metodu	26
3. BULGULAR	29
3.1. Safılaştırılan Metabolitlere Ait Deneysel Bulgular	29
3.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi Sonuçları	29
3.1.2. Ekstrelerin HPLC ile Kantitatif ve Kalitatif Analiz Bulguları.....	32
3.1.3. Safılaştırılan Metabolitlere Ait Spektral Bulgular	33
3.1.4. Antitümöral Aktivite Sonuçları.....	78
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	82
5. KAYNAKLAR	85



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1. Simgeler

^{13}C	: Karbon-13 izotopu
^1H	: Hidrojen-1 izotopu
C	: Karbon
O	: Oksijen
Na	: Sodyum
Sn	: Kalay
K	: Potasyum
S	: Kükürt
ppm	: Milyonda bir kısım
nm	: Nanometre
m/z	: Kütle
MHz	: Mega Hertz
M^+	: Moleküler İyon
%	: Yüzde
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
sn	: Saniye
g	: Gram
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
mm	: Milimetre
mmol	: Milimol
rpm	: Dakikada devir sayısı

2. Kısaltmalar

A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
CNSL	: Kaju kabuğundan elde edilen sıvı madde
COSY	: Two dimensional ¹ H- correlation spectroscopy
DEPT	: Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EDTA	: Ethilendiamin tetraasetik asit
E.N.	: Erime noktası
HMBC	: Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HMQC	: Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HUVEC	: Human umbilical vein endothelial cells
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KK	: Kolon Kromatografisi
<i>m</i>	: Multiplet
M.Ö.	: Milattan önce
M.S.	: Milattan sonra
MS	: Kütle Spektroskopisi
MTT bromide	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PVC	: Polivinil klorür
<i>s</i>	: Siglet
<i>t</i>	: Triplet
UV	: Ultraviole (mor ötesi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Salisilik asitten aspirin eldesi.....	2
Şekil 1.2. Önemli alkoloitlerin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.3. Digitoxin'in kimyasal yapısı.....	7
Şekil 1.4. Porsuk ağacı ve etken maddesinin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.4. Ülkemizde yayılış gösteren <i>Pistacia</i> türleri.....	11
Şekil 1.6. Antep fıstığı meyveleri (ham, ağaç dalında ve kurutulmuş).....	12
Şekil 2.1. Kullanılan HPLC-UV cihazı.....	24
Şekil 2.2. MTT'in Tepkime şeması.....	27
Şekil 3.1. Ekstre ve metabolitlerin Hekzan-EtOAc (6:4) sisteminde a) UV ₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı.....	30
Şekil 3.2. Ekstre ve metabolitlerin CH ₂ Cl ₂ -EtOAc (8:2) sisteminde a) UV ₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı.....	30
Şekil 3.3. Ekstre ve metabolitlerin EtOH-EtOAc (8:2) sisteminde a) UV ₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı.....	31
Şekil 3.4. Ekstre ve metabolitlerin EtOAc-MeOH (6,5:3,5) sisteminde a) UV ₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı.....	31
Şekil 3.5. Kabuk etanol ekstresinin ve saf shikimic asitin (PVK-8) HPLC kromatogramı .	32
Şekil 3.6. PVK-1'in (Ginkgolic asit) FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış).....	34
Şekil 3.7. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) kütle spektrumu.....	34
Şekil 3.8. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) ¹ H-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	35
Şekil 3.9. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu	36
Şekil 3.10. PVK-1'in (Ginkgolic asit) DEPT-135 ve DEPT-90 ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	37
Şekil 3.11. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) ¹ H, ¹ H-COSY (CDCl ₃) spektrumu.....	38
Şekil 3.12. PVK-1'in (Ginkgolic asit) HMQC (CDCl ₃) spektrumu	39
Şekil 3.13. PVK-1'in (Ginkgolic asit) HMBC (CDCl ₃) spektrumu.....	41
Şekil 3.14. PVK-1'in iki veya üç bağ üzerinden heteronükleer (H→C) bağ korelasyonları	41
Şekil 3.15. PVK-3 (anacardol 15:1)'ün FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	43
Şekil 3.16. PVK-3'ün (anacardol 15:1) ¹ H-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	44
Şekil 3.17. PVK-3'ün (anacardol 15:1) ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu	45

Şekil 3.18. PVK-3'ün (anacardol 15:1) DEPT-135 ve DEPT-90 (CDCl ₃) spektrumları	46
Şekil 3.19. PVK-3'ün (anacardol 15:1) ¹ H, ¹ H-COSY (CDCl ₃) spektrumu.....	47
Şekil 3.20. PVK-3'ün (anacardol 15:1) HMQC (CDCl ₃) spektrumu	49
Şekil 3.21. PVK-3'ün (anacardol 15:1) HMBC (CDCl ₃) spektrumu.....	50
Şekil 3.22. PVK-3'ün iki veya üç bağ üzerinden heteronükleer (H→C) bağ korelasyonları.....	51
Şekil 3.23. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1)) FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmıştır)	52
Şekil 3.24. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1)) kütle spektrumu.....	53
Şekil 3.25. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1)) ¹ H-NMR (CDCl ₃) spektrumu	54
Şekil 3.26. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1)) ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu	55
Şekil 3.27. PVK-5'in FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	56
Şekil 3.28. PVK-5'in ¹ H-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	57
Şekil 3.29. PVK-5'in ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	57
Şekil 3.30. PVK-5'in DEPT-135 (CDCl ₃) spektrumu	58
Şekil 3.31. PVK-5'in DEPT-90 (CDCl ₃) spektrumu	58
Şekil 3.32. PVK-6'ın FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	60
Şekil 3.33. PVK-6'ın Kütle spektrumu.....	60
Şekil 3.34. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) ¹ H-NMR (CDCl ₃) spektrumu	61
Şekil 3.35. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu	62
Şekil 3.36. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) DEPT-135 ve DEPT-90 (CDCl ₃) spektrumu.....	63
Şekil 3.37. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) ¹ H, ¹ H-COSY (CDCl ₃) spektrumu.....	64
Şekil 3.38. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) HMQC (CDCl ₃) spektrumu	65
Şekil 3.39. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) HMBC (CDCl ₃) spektrumu	66
Şekil 3.40. PVK-7'in FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)	67
Şekil 3.41. PVK-7'in ¹ H-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	68
Şekil 3.42. PVK-7'in ¹³ C-NMR (CDCl ₃) spektrumu.....	68
Şekil 3.43. PVK-7'in DEPT-135 ve DEPT-90 (CDCl ₃) spektrumu	69
Şekil 3.44. PVK-7'in ¹ H, ¹ H-COSY (CDCl ₃) spektrumu	70
Şekil 3.45. PVK-7'in HMQC (CDCl ₃) spektrumu	70
Şekil 3.46. PVK-8'in (Shikimic asit) FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış).....	72

Şekil 3.47. PVK-8'in (Shikimic asit) ¹ H-NMR (DMSO-d ₆) spektrumu.....	73
Şekil 3.48. PVK-8'in (Shikimic asit) ¹³ C-NMR, DEPT-135 and DEPT-90 (DMSO-d ₆) spektrumları.....	74
Şekil 3.49. PVK-8'in (Shikimic asit) ¹ H, ¹ H-COSY (DMSO-d ₆) spektrumu.....	75
Şekil 3.50. PVK-8'in (Shikimic asit) HMQC (DMSO-d ₆) spektrumu	76
Şekil 3.51. PVK-8'in (Shikimic asit) HMBC (DMSO-d ₆) spektrumu	77
Şekil 3.52. (A) A549 Hücreleri (B) HUVEC Endotelial Hücreleri	78
Şekil 3.53. (A) A549 Hücrelerinde; (B) HUVEC Endotelial Hücrelerinde Formazan Kristalleri.....	78
Şekil 3.54. <i>P.vera</i> MeOH, EtOH ve EtOAc ekstralarının sitotoksikite grafikleri.....	79
Şekil 3.55. Saf metabolitlerin sitotoksikite grafikleri.....	80
Şekil 4.1. Kabuktan saflaştırılan metabolitlerin kimyasal yapısı.....	84
Şekil 4.2.Shikimic asidin eldesi ve oseltamir sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılması.....	87
Şekil 4.3. Kaju kabuğundan üretilmiş CNSL ham maddeleri	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Safılaştırılan maddelerin farklı çözücü sistemlerinde Rf değerleri 29



1. GİRİŞ

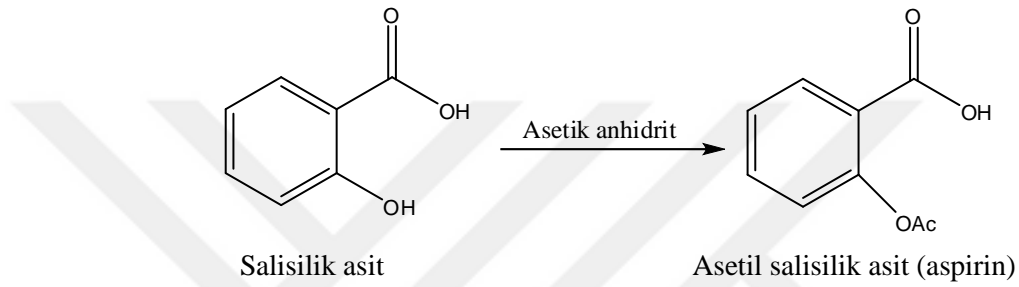
Tıbbi ve aromatik bitkiler içerdikleri etken maddeler bakımından hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkiler olarak tanımlanırlar. Tıbbi ve aromatik bitkiler değişik hastalıkların tedavisinde kullanımının insanlık tarihinin başlaması ile başladığı tahmin edilmektedir. Yazılı kaynaklara göre M.Ö 3000 yıllarında hüküm süren Sümer, Akad ve Asur Medeniyetlerinde tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanıldıkları bildirilmiştir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

Savaşlar, doğal afetler ve doğal faktörler gibi dış etkenler ile bağışıklık sistemindeki zayıflıklar insanları ve diğer canlıları çeşitli hastalıklara karşı savunmasız bırakmıştır. İnsanlar hastalık anında zekalarını kullanarak tedavi olmak amacıyla çareler aramış ve çareyi yine doğanın kendisinde bulmuşlardır. Yakalandıkları hastalıkları tedavi etmek için ya sihir yada doğal kaynakları kullanmışlardır. İnsanlar insanlığın varoluşundan beri doğa üstü olaylardan ve güçlerden medet umarak sihir ve büyünün yanı sıra aklını ve zekasını kullanarak toprak, kum, çamur, çeşitli mineraller, hayvansal ve bitkisel droglarla da tedavi olma olanaklarını kullanmışlardır. Bu doğal kaynakların içerisinde şüphesiz bitkiler önemli yer tutmaktadır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

Bitkilerin tedavi edici etkileri ya merak sonucu ya da tesadüfen keşfedilmiştir. Daha sonraki dönemlerde ise doğal ilaçların etkisi kulaktan kulağa yayılmıştır. Yıllar geçtikçe çeşitli bitkilerin farklı hastalıklara karşı deva olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraki dönemlerde bitkiler beslenme, tat ve aroma verici, iştah açıcı, tedavi edici etkileri nedeniyle kültüre alınmış ve üretimlerine geçilmiştir (İlisulu, 1992; Tanker ve Tanker, 1990; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

Bitkilerle tedavi konusunda bilgiler yazılı ve yazılı olmayan kaynaklara kuşaktan kuşağa aktarıldığı gibi insanların gözlemleri sonucu ya da deneme yanılma yoluyla daha da geliştirilmiştir. İnsanların merak duygusu, tesadüfi ve bilimsel gözlemleri sonucu elde ettikleri bilgiler kuşaktan kuşağa aktarılarak modern tıbbın gelişmesine de önemli katkılar sağlamıştır. Diğer bir ifadeyle modern tıbbın gelişmesine doğa ve bitkiler ilham kaynağı olmuştur. Örneğin romatizma hastalığından mustarip bir yaşlı söğüt ağacının

altında iken ıstırabının azaldığını, söğüt ağacının altından uzaklaştığında ise ağrıların yeniden arttığını gözlemlemiştir. Bu durum insanları söğüt ağacı üzerine araştırmalar yapmaya itmiştir. Bu araştırmaların sonucunda söğüt kabuğu ve yaprağından salisilik asit ve türevi maddeler izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar bu metabolitlerin ağrı giderici, antiromatizmal ve antienflematuvar etkilerinin olduğunu göstermiştir. Daha ileri çalışmalarla salisilik asitin yarı sentetik türevi sentezlenmiş ve bu maddenin daha da etkin olduğu ortaya konmuştur (Şekil 1.1.) (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).



Şekil 1.1. Salisilik asitten aspirin eldesi

Aspirin antienflematuvar ve antikoagulant (pıhtılaşma azaltıcı) reaktif olarak hala ilaç sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aspirin yüzyılın mucizesi olarak adlandırılmaktadır. Antikoagulant özelliğinden dolayı kalp ve damar rahatsızlıklarının tedavisinde hala kullanılmaktadır. Keşfinden günümüze kadar yüz yıl geçmesine rağmen önemini, tedavi edici özelliğini ve popülaritesini kaybetmeyen tek ilaçtır.

Bitkilerle tedavi konusunda ilk yazılı kaynak M.Ö.3000 yıllarında Çinliler tarafından yazılmıştır. Onu izleyen yıllarında Sümer ve Mısır kaynaklarında da bitkiler ile tedavi konusunda yazılmış eserler mevcuttur. Eski Mısır Uygarlığında (M.Ö.1550 yılları) tedavi amaçlı bitkilerin kullanımı üzerine bilgilere Cber Papiluslarında rastlanmıştır. Anadolu'da yaşamış ve efsaneleşmiş olan Lokman Hekim, İbn-i Sina, İbn-i Baytar, İbn-i Şerif gibi hekimlerde bitkileri kullanarak tedavi yöntemleri geliştirmiş ve bu konuda eserler bırakmış İslam hekimleridir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

1.1.Bitkilerle Tedavide Tarihsel Gelişim

Bitkilerle tedavi M.Ö ve M.S olmak üzere iki farklı dönemde incelenir. Daha önce de belirtildiği gibi bitkilerle tedavi konusunda ilk yazılı kaynak M.Ö.3000 yıllarına dayanmaktadır. Fakat çok eski kaynaklara ulaşım ve günümüze ulaşımında sıkıntılar yaşanmıştır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick,2002).

Antik Yunan döneminde yaşamış Hipokrat (M.Ö.460-377) hekimliğin ilk temsilcisi olarak kabul edilmiştir. Hipokrat tıbbın kurucusu olmamasına karşın tıp ile dini esasları (sihir, büyü) birbirinden ayıran ilk hekim olarak kabul görmüştür. Hipokrat bu yönü ile hekimliğe ilk bilimsel bakışı getiren kişidir. Hipokrat ilmi ve ahlaki değerleri yüksek bir hekimdi. Hipokrat tedavi yöntemlerini eserinde toplamış ve bu eserinde 400 kadar drogtan bahsetmiştir. Hipokratın bahsettiği 400 drogun çoğunluğu da bitkisel kaynaklıdır. Hipokrat müshil ilacı olarak “mahude”, “hint yağı”, “ebucehil karpuzu” ve “çöplemeyi” kuvvetli müshil ilacı olarak ancak mecbur kalması durumunda kullanmıştır. Çünkü bu bitkiler aynı zamanda zehirli bitkilerdir. Diğer taraftan “sütleğen”, “defne”, “lahana” ve “kavun” gibi hafif müshilleri ise daha sık kullanılmıştır. Hipokrat idrar artırıcı (diüretik) olarak “sarımsak”, “soğan”, “pırasa”, “salatalık”, “kavun”, “karpuz” ve “rezene” kullanılmıştır. Uyutucu ve sakinleştirici olarak ise “haşhaş”, “adamotu”, “afyon” ve “banotu tohumu” nu önermiş ve kullanılmıştır. Boğaz hastalıklarında “kekik”, “nane”, “kereviz” gibi bitkilerden hazırlanan gargaraları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. Hipokrat aynı zamanda zeytinyağında bekletilmiş (mesarasyon) “mersin yaprağı”, “gül”, “akzambak çiçeği” gibi bitkilerden hazırladığı merhemi yara iyileştirici ve ağrı azaltıcı olarak kullanılmıştır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992 ;Baytop, 1999).

Portus Kralı Eupator Mithridates (M.Ö.132-163) kendi ismini taşıyan bir antidote (pan zehir) geliştirmiştir. Mithridates küçük yaşta annesinin de ihaneti ile babası zehirlenerek öldürülmesinden dolayı 7 yıl Pontus dağları-Doğu Karadeniz Bölgesindeki dağlarda yaşamış ve yabancı bitkiler üzerine Pratik bilgiler edinmiştir. Daha sonraki yıllarda Pontus kralı olduktan sonra zehirlenmelere karşı kendini korumak için bir panzehir geliştirmiştir. Bu panzehirin terkinde 48 bitkisel drog bulunduğu bildirilmiştir. Daha sonraki Romalı hekimler bu panzehirin terkinde bazı değişiklikler yapmış ve bu panzehir “Tiryak” (Theriacal) adıyla meşhur olmuştur. Tiryak geliştirildikten sonra

uzun zamanlar boyunca zehirli hayvan sokmalarına karşı kullanılmıştır. Avrupa' nın Venedik, Napoli, Paris, Madrid gibi şehirlerinde belli günlerde özel törenler ile Tiryak hazırlanmış ve eczanelere satılmıştır. Tiryak Osmanlı döneminde de eczanelerde yerini almıştır. Özellikle “Venedik Tiryak” ı daha çok tercih edilmiştir. Manisa da Merkez Efendi tarafından yapılan “nesir macunu” da bir nevi Tiryak olup terkinde 41 drog bulunmaktadır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).

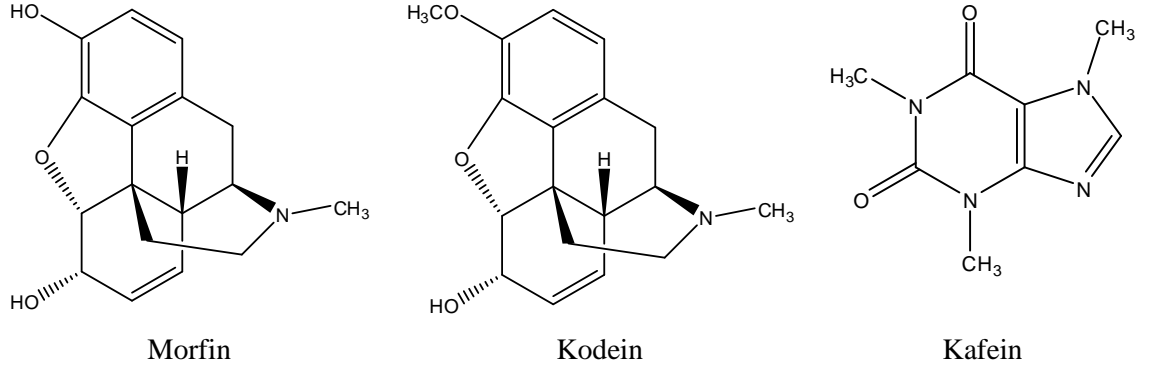
Müslümanlar tarafından ilk hastane El-velid bin Abdülmelik tarafından o zamanlar Dımaşk olarak bilinen Şam'da kurulmuştur. Sonradan Mısır, Suriye, Irak ve Anadolu 'da birçok hastane yapılmaya çalışılmıştır. İslam ülkelerinde tıp daha çok Yunan ve Hint Hekimliğine dayanmaktadır. İslam dünyasındaki hekimlerde bitkisel droglarla tedaviye büyük önem vermişlerdir. İslam ülkelerinde tıbbın gelişmesinde İbn-I Sina ve Razi gibi Türk asıllı hekimlerin de önemli katkıları olmuştur. Bu hekimler tarafından birçok eserler yazılmış ve sonraki kuşaklara önemli birer kaynak olarak bırakılmıştır. Müslüman tıp bilimcileri arasında şüphesiz en çok dikkati İbn-i Sina (M.S. 980-1037) çekmiş olup, tıp alanında iki önemli eser yayınlamıştır. Bunlar 18 ciltlik “Şifa” ve 5 ciltlik “Kanun fit tıb” eserleridir. Bunlardan ikinci eser daha çok insan vücudunun tarifi, anatomisi, fizyolojisi, basit ilaçlar, genel sağlık hastalıklarının tedavisi ve ilaç tertipleri üzerinedir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).

Diğer bir İslam alimi İbn-i Baytar (1197-1248) ise, 1400 kadar drogün tedavi amaçlı kullanılması üzerine bilgiler yayınlamıştır. Osmanlı dönemindeki tıbbi bitkiler ile ilgili en mühim kaynak İbn Baytar'ın ‘Kitab al-Cami Al-Müfredat Al-Adviye vel-Agdiye’ isimli eserinin Türkçe çevirileri olmuştur. Sonradan Hipokrat (Hippocrate), Galen (Calinos), İbn Sina, İbn Baytar ve Razi gibi yazarların eserlerinden de yararlanılarak yeni Türkçe eserler ortaya konmuş ve tedavide kullanılmıştır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).

Tedavi etmek amacıyla tıbbi bitkilerin değişik kısımları kullanılmaktadır. Bu amaçla yaprak, kök, çiçek, tohum, kabuk, toprak üstü kısımlara yada bitkinin tamamı kullanılabilir. Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımları oldukça geniş hastalık türünü kapsamaya karşın genel olarak kan temizleyici, sakinleştirici (sedatif), hazmı kolaylaştırıcı, idrar söktürücü ve artırıcı (diüretik), ter söktürücü, iştah açıcı, kanamayı durdurucu (koagülent), gaz giderici, spazm giderici, balgam söktürücü, öksürük

giderici, ağrı kesici ve ateş düşürücü (antipiretik), parazit düşürücü (antihelmintik), nefes açıcı, mikrop öldürücü (antiseptik, antimikrobiyal), böcek kovucu ve öldürücü (insektisidal), müsil, antiprotozoal, antiromatizmal olarak kullanılmalarının yanı sıra, astım, sıtma, dizanteri, tifo, şeker ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmışlardır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).

Tıbbi ve aromatik bitkiler üzerinde yapılan deneysel araştırmalar, bitkisel droglarda bulunan bileşikler hakkındaki bilgi sahibimize katkı sağlamıştır. Droglarda selüloz, nişasta, pektin, protein, şeker vb. tedavi yönünden etkisiz maddelerin yanı sıra, çok az miktarda bile, farmakolojik etkilere sahip bileşikler de bulunmaktadır. Bu bileşiklere “etken madde” veya “etkili madde” gibi isimler verilmektedir. Droglara tedavi özelliğini veren bu maddelerin birçoğu glikozit (enzim veya seyreltik asitler etkisiyle şeker olmayan aglikon kısım ile şeker moleküllerine ayrılan bileşikler) yapılıdır. Örneğin Yüksükotu yaprağında bulunan kalp rahatsızlıklarında kullanılan dioxin veya digoxin türü maddeler glikozit sınıfı maddelerdir. Glikozitlerin yanı sıra organik asitler (bitkilerde karbonhidratların oksidasyonu ile meydana gelen organik bileşiklerdir), tanenler (fenolik yapılu bileşikler olup antiseptik ve kabız yapıcı etkilere sahiptir) alkaloidler (yapılarında azot bulunan bazı karakterli bileşikler) de bitkilerin farmakolojik özelliğe sahip sekonder metabolitleridir. İlk alkaloid 1803 yılında eczacı Derosne tarafından elde edilen “morfin” olup halen morfin, kodein, kafein, atropi vb. bir çok alkaloid sınıfı etken madde (Şekil 1.2.) tedavi alanında kullanılmaktadır. Bitkilerde bulunan sabit yağlar gliserin ve yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu meydana gelen organik bileşikler olup yemeklik yağ olarak da kullanılırlar. Uçucu yağlar terpenler, alifatik bileşikler ve fenilpropanoidlerin karışımından oluşmuş olup bitkilere koku veren maddelerdir. Bazı bitkilerde önemli miktarda bulunan reçineli bileşikler ise daha karmaşık kimyasal yapılu katı veya sıvı maddelerin bir karışımıdır.

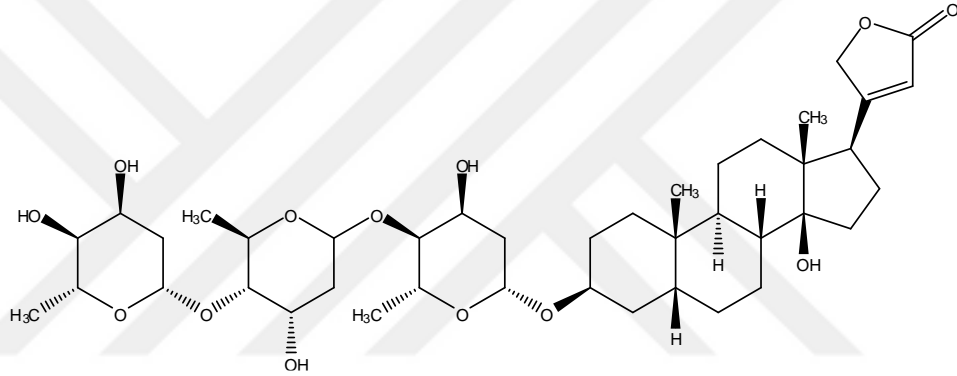


Şekil 1.2. Önemli alkaloitlerin kimyasal yapısı

XVIII. yüzyıldan sonra bitkiler ile tedavi modern tıbbın gelişimi ile şekil değiştirmiştir. Kromatografik yöntemlerin ve saflaştırma tekniklerinin gelişmesi ile doğrudan bitki kısımlarından ziyade bitkilerden elde edilen tanen, uçucu yağ, alkaloid, flavonoid, fenolik asitler, stilbenoidler vb. saf metabolitler direkt olarak tedavi etmek amacıyla ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu maddelerden şurup, merhem, tablet olarak kullanmak üzere uygun preparatlar hazırlanarak ticari olarak kullanılmış ve kullanılmaktadır. Bitkilerden ilk elde edilen etken madde Alman kimyacı Serturme tarafından 1805 yılında izole edilen afyon alkaloitlerinden morfindir. Morfin çok güçlü ağrı kesici ve anestetik bir madde olarak ilaç sanayinde kullanılan alkaloid sınıfı etken madde olup afyon bitkisi %10-12 oranında morfin içermektedir. Bunu 1820 yılında “Kına kına” (*Cinchona officinalis*) bitkisinin kabuklarında kinin maddesinin, 1868 yılında ise “yüksük otu” (*Digitalis* türleri) türlerinden kalp yetmezliğinde kullanılan digitoksin maddelerinin izolasyonu takip etmiştir. Bunları ise Felix Hoffman tarafından 1890 yılında söğüt ağacı kabuklarından (*Salix*) antienflamatuar, ağrı kesici etken madde salisilik asitin izolasyonu takip etmiştir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).

Ülkemiz florasında da yayılış gösteren *Digitalis* türleri çok eski zamanlardan beri kalp rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmış tıbbi bitkiler olmasına karşın, ilk defa İskoç bilim insanı Withering tarafından 1785 yıllarında kalp rahatsızlıklarında kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraları Fransız bilim insanı Nativelle *D. purpurea* türünden digitaline (digitoxin) ismini verdiği kristal yapılı, steroidal glikozit (Şekil 1.3.) izole etmiş ve bu madde daha sonra birçok kalp ilacının etken maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu türlerin ilaç sanayinde kalp yetmezliği rahatsızlığında kullanılan

digoxin veya dioxin adıyla bilinen etken maddelerin en önemli kaynağıdır (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999). Ancak bu etken maddeler ülkemizde üretilmemekte ve bu ilaçlar ithal edilmektedir. *Digitalis* türleri ayrıca benzer etkiye sahip benzer yapılı steroidal bileşikleri de içermektedir (Şekil 1.3.). *D. lananatae* türünün içerdiği benzer yapılı glikozitler lanatozitler olarak sınıflandırılmış olup kalp yetmezliğinde etken madde olan kullanılan önemli metabolitlerdir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999). Birçok farklı *Digitalis* türü yetişmekte olmasına karşın kalp yetmezliğinde kullanılan etken maddelerin izolasyonu için en çok tercih edilen türler *D. purpurea* ve *D. lananatae* türleridir. Bunlardan *D. lananatae* türü daha kolay kültüre alınan türdür (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999).



Şekil 1.3. Digitoxin'in kimyasal yapısı

1.2. Kanser

Hayatımızın birçok alanında kolaylık sağlayan teknolojinin gelişmesiyle artan radyasyon; sanayi ve endüstrinin gelişmesi sonucu hayatımızın her alanında yer alan kimyasal ajanlar gibi çevresel faktörler kanser başta olmak üzere birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Günümüzde kanser görülme sıklığının artmasına paralel olarak yeni tedavi yöntemlerinin bulunması veya mevcut bulunan yöntemlerin geliştirilmesi için araştırmalar hızla devam etmektedir. Özellikle en sık uygulanan tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapinin geliştirilmesinde sentetik ilaçların kullanımından doğan tehlikeli yan etkilerin önüne geçmek amacıyla tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen sekonder metabolitlerden yararlanılmaktadır.

Kanser, Latince yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiş olup, Hipokrat, hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek bu

tanımlamayı yapmıştır. Kanser vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile kendini gösteren istilacı bir hastalık grubudur (Karaca, 2008). Normalde hücrelerin büyümesi, çoğalması ve ölümü kompleks genetik sistemlerinin denetiminde bir düzen içerisinde olmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde bu mekanizmalarda bozukluklar görülmektedir. Bu bozukluklara bağlı olarak hücrelerin davranışının değişimi ile anahtar düzenleyici genlerdeki (tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler) mutasyonlar, düzensiz çoğalmayı ve apoptozun inhibisyonunu sağlayarak malignansiye katkıda bulunmaktadır. Hücrelerin anormal şekil ve hızda büyümeye ve çoğalmaya başlamaları sonucunda ise tümör adı verilen kitleler oluşmaktadır.

Kanser multifaktöriyel bir hastalık olup, bakteriler, virüsler, radyasyona maruz kalma, kalıtsal özellikler, çevre kirliliği, beslenme alışkanlığı, kullanılan ve maruz kalınan kimyasallar gibi değişik faktörlerin sonucunda oluşmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012). Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha düşük olmakla birlikte aktarılan hasarlı genlere kanserojenik çevresel faktörlerin de eklenmesi kanserleşme riskini arttırmaktadır. Ayrıca vücutta bulunan serbest radikallere bağlı oluşan DNA hasarları da kanserleşme sürecinde önemli rol oynamakla beraber serbest radikaller sinyal iletimini, onkogen aktivasyonunu ve tümör baskılayıcı genleri inaktive ederek tümör oluşumu ve gelişimini hızlandırmaktadır. Her ne kadar çevresel faktörler kanser için hızlandırıcı bir rol üstlense de olumlu çevresel faktörler ve beslenme alışkanlıkları kanser hastalığından korunma için hayati önem taşımaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar düşük oranda yağ ve yüksek oranda lif içeren tam tahıllı ürünler ile sebze ve meyve tüketiminin meme, akciğer, kolon ve prostat gibi birçok kanser türüne yakalanma riskini azalttığını göstermiştir (IARC, 2002; Beliveau ve Gingras, 2007; Stewart ve Kleihues, 2007; Guha, 2009).

Günümüzde kanser başta endüstrileşmiş toplumlar olmak üzere dünyanın pek çok ülkesinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra mortalitesi yüksek en büyük halk sağlığı problemlerinden biridir (Lu ve ark., 2010). Çağımızın vebası olarak adlandırılan kanser üzerine yapılan son çalışmalarla günümüzde pek çok antikanser ilaç ile tümörlü hücrenin DNA sentezine ve hücre bölünmesine etki ederek, apoptoz indüksiyonu sağlanmaktadır. Ayrıca halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitki türevleri ve

bileşiklerinin tedavi edici potansiyel etkileri de kanser tedavisi için yeni ilaç araştırmalarının birçoğuna konu olmaktadır. Özellikle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçların miyelosupresyondan kardiyotoksisiteye kadar geniş bir spektrumda yer alan yan etkilerinin olması araştırmacıları tedavide yan etkisi olmayan ya da daha az oranda toksisiteye sahip yeni terapötik ajan arayışına yöneltmiştir. Son yirmi yıldan beri doğal ürünlerde bulunan koruyucu maddelerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde kanserden korunmak için doğal ürünlerin kullanımının kansere yakalanma sıklığını azalttığı görülmektedir (Erenoğlu, 2012).

Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla meydana gelen bir hastalıktır. Hücrelerdeki kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları istila etmeleri veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları (metastaz) ile sürmekte ve bu durum sonucunda akciğer tümörleri oluşmaktadır (Zeren, 2000). Akciğer kanserinin %80'i küçük hücreli olmayan akciğer kanserleridir (Bajard ve ark., 2004; Metintaş ve ark., 2004). Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender karşılaşılan bir hastalık olmasına rağmen günümüzde görülme sıklığı artan bir sağlık problemidir. Genel ölüm nedenleri arasında akciğer kanseri kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alırken, kanser vakalarından kaynaklanan ölümlerin ise %28'ine tekabül etmektedir (Bozkurt ve ark., 2004). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre akciğer kanseri her yıl, 1,3 milyon civarında insanın ölümüne neden olmaktadır. Dünyada, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür (WHO, 2004, 2008).

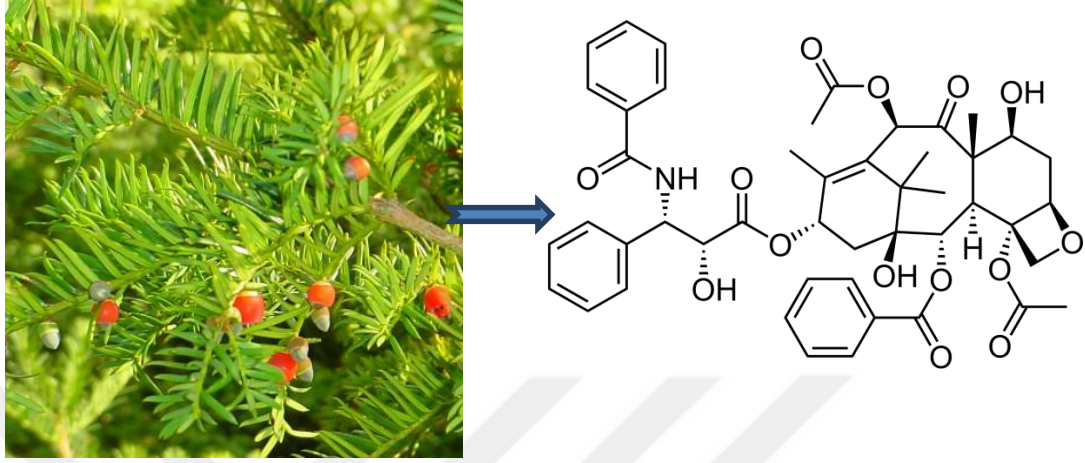
Akciğer kanseri için birçok risk faktörü belirlenmiştir. Bunların arasında sigara içimi akciğer kanseri olgularının %85-90'ından sorumludur. Akciğer kanseri olgularının kadınlarda %78, erkeklerde ise yaklaşık %90 oranında direkt sigara içimi ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Alberg ve Samet, 2003; Özlü ve Bülbül, 2005). Akciğer kanseri gelişimi, sigara için bireylerde içmeyenlere oranla 10-25 katlık bir artış göstermekte ve sigara kullanımı, akciğer kanserinin tüm histopatolojik tiplerinin gelişme riskini arttırmaktadır. İçilen sigara miktarı ve süresi, erken yaşlarda sigaraya başlamış olmak, sigaradaki katran ve nikotin içeriği akciğer kanseri gelişimine ilişkin yüksek risk faktörleridir (Loeb ve ark., 1984; Palmarini ve Fan, 2001; Thun ve ark.,

2008). Pasif sigara içiciliği de akciğer kanseri açısından bir risk faktörüdür. Bununla beraber akciğer kanseri, sigara içmeyenlerde de görülebilmektedir. Akciğer kanserli erkeklerin %10 ve kadınların ise %20-25' inde gelişen kanser sigara ile ilişkili değildir (Palmarini ve Fan, 2001; Thun ve ark., 2008). Sigara kullanımı dışında hava kirliliği, diyet, genetik ve mesleki faktörler akciğer kanserinde potansiyel risk faktörleridir (Doll ve Peto, 1981; Kabir ve ark., 2007; Gorlova ve ark., 2007). Mesleki faktörlere bağlı olarak gelişen akciğer kanserli olguların yarısından fazlası asbest ile ilişkilidir (Craighead ve Mossman, 1982; O'Reilly ve ark., 2007; Attanoos, 2010). Asbest; gemi, uçak, otomobil, inşaat ve tekstil sektöründe kullanılmakta olan doğada bulunan, ısıya ve kimyasal maddelere dayanıklı bir grup fibröz silikatın genel adıdır. Asbestin dışında mesleki olarak radon, krom, nikel, kömür, kadmiyum, uranyum parçalanma ürünleri, demir, arsenik, alüminyum, polisiklik hidrokarbonlar ve formaldehite maruz kalmak da akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (Ruano-Ravina ve ark., 2003).

A549 kanser hücreleri küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattıdır (Kreja ve Seidel, 2002). Tüm akciğer kanseri tiplerinin %15'ini ise küçük hücreli akciğer kanseri oluşturmaktadır (Hann ve Rudin, 2008; Li ve ark., 2012; Liu ve ark., 2013). Küçük hücreli akciğer kanseri hızlı büyümekte, vücuttaki diğer organlara çok daha çabuk yayılmaktadırlar. (Alberts ve ark., 2004; Bayram, 2013). Küçük hücreli karsinomlarda hücreler birbirlerine yaslanmış görünümündedir. Fuziform, poligonol hücre şekilleri görülebilir. Bol mitoz, yaygın nekroz gösterirler ve sitolojik olarak dar sitoplazmalı, organelden fakir hücrelerdir. İnce sitoplazmik uzantıları mevcuttur.

Halk arasında tedavi amaçlı kullanılan bitki türleri ve bileşiklerinin tedavi edici potansiyel etkileri de kanser tedavisi için yeni ilaç araştırmalarının birçoğuna konu olmaktadır. Günümüzde değişik kanser türlerinin tedavisinde kullanılan ilaçların %70 civarında doğal bileşikler olduğu tahmin edilmektedir. Örneğin *Taxus baccata* (porsuk ağacı) kabuklarından ve yapraklarından izole edilen taxol (Şekil 1.4.) en önemli kanser ilaçlarından birisidir. Bununla beraber, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan mevcut kemoterapötik ilaçların miyelosupresyondan kardiyotoksisteye kadar geniş bir spektrumda yer alan yan etkilerinin olması araştırmacıları tedavide yan etkisi olmayan ya da daha az oranda toksisteye sahip yeni terapötik ajan arayışına yöneltmiştir. Son yirmi yıldan beri doğal ürünlerde bulunan koruyucu maddelerin değerlendirilmesi

amacıyla yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde kanserden korunmak için doğal ürünlerin kullanımının kansere yakalanma sıklığını azalttığı görülmektedir (Erenoğlu, 2012).



Porsuk ağacı

Taxol (Paclitaxel)

Şekil 1.4. Porsuk ağacı ve etken maddesinin kimyasal yapısı

1.3. *Pistacia* Cinsi

Pistacia cinsi Anacardiaceae familyasına ait tohumlu bitkilerdir. Dünya florasında 10-20 türün yetiştiği tahmin edilmekte olup Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika kıtalarında yayılış göstermektedirler. En önemli türleri *P. vera*, *P. terebinthus* ve *P. lentiscus* türleridir. Ülkemizde de bu türler yaygın olarak yetişmekte olup *P. vera* meyvelerinden dolayı Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kültürü yapılan türdür (Şekil 1.5.).



P. vera

P. terebinthus

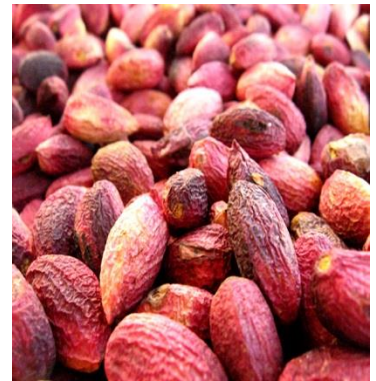
P. lentiscus

Şekil 1.5. Ülkemizde yayılış gösteren *Pistacia* türleri

1.3.1. *Pistacia vera*

Pistacia vera Anacardiaceae familyasının (sakız ağacıgiller) bir üyesi olup yenebilir meyvelere sahip bir ağaçtır. Bu ağacın meyveleri “Antepfıstığı” ve “Şamfıstığı” gibi isimlerle bilinir ve tatlıcılıkta yaygın bir kullanıma sahip bir meyvedir. Eczacılıkta ayrıca öksürük şurubu yapımında kullanılır. *P. vera* sıcak iklime çok iyi adapte olmuş olup dünyada Antepfıstığı yetiştiriciliğinin en yaygın yapıldığı ülkeler sırasıyla İran, ABD ve Türkiye’dir. Ülkemizde en çok yetiştirildiği iller ise Şanlıurfa, Gaziantep, Kilis, Siirt, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Diyarbakır’ dır.

Antep fıstığı yöresel olarak “cumba” ismiyle bilinen salkım şeklinde meyvelere sahiptir. Hasat işlemi olgun meyvelerin silkelmesi veya salkımın el ile koparılması yöntemi ile yapılır. Toplanan salkımlı meyveler yine el ile sap ve yaprak kısımlarından ayrılır. Antep fıstığı meyvelerinde içteki sert kabuk dışta yumuşak bir kabuk ile kaplanmıştır. Meyve ham iken bu kabuk, sert ve sarımsı renkli, olgunlaştıkça ise kırmızımsı bir renge dönüşür. Dış kabuğun olgunlaşmamış haline “boz fıstık” denir ve tatlıcılıkta özellikle baklava yapımında tercih edilen meyvedir (Şekil 1.6.). Bu kısım taze iken el ile kendiliğinden soyulurken, kurutulması sonucu soyulması güçleşir. Antep fıstığının hasat sonrası işlenmesi esnasında antepfıstığının sap, yaprak ve dış kabuk kısımları uzaklaştırılır ve bu işlemlerin sonrasında kuruyemiş olarak veya tatlıcılıkta kullanılır. Antep fıstığının işlenmesi sırasında önemli oranda atık madde ortaya çıkmakta olup bu atık maddeler yakıt haricinde ekonomik olarak değerlendirilememektedir.



Şekil 1.6. Antep fıstığı meyveleri (ham, ağaç dalında ve kurutulmuş)

Antepfıstığı ilk olarak Etiler zamanında Anadolu'da kültüre alınmıştır (Açar, 1997). *Pistacia* türleri dünyada kuzey ve güney yarımkürelerinin 30-45° paralellerinin uygun mikro iklimlerinde yetişebilmektedir (Ak ve ark., 1999). Vavilov' un belirttiği gibi Ayfer (1959)'a göre; antepfıstığının iki gen merkezi bulunmaktadır. İlki Orta Asya gen merkezi (Hindistan'ın kuzeyi, Afganistan, Tacikistan), diğeri ise Yakın Doğu Gen Merkezi (Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan)'dır (Anonim, 2007). *P. vera*'nın yabani çeşidi doğal olarak, Doğu Akdeniz'de Türkiye'den Filistin ve Suriye'ye kadar olan bölge ve Orta Asya (Türkmenistan, Özbekistan, Afganistan, Tacikistan ve Kırgızistan)'nın doğusunda yayılış göstermektedir (Parfitt, 1997). Günümüzde dünyada yıllık üretimi 250.000 tona ulaşan antepfıstığı, özellikle Türkiye, İran ve ABD'de yetiştirilmektedir. Ülkemiz genelinde 56 ilde üretilmekte olan antepfıstığının en yoğun olarak yetiştirildiği il Gaziantep'tir. 1995 yılı verilerine göre Türkiye antepfıstığı ağaç sayısı 42,7 milyondur. Türkiye'de yaygın olarak çeşitleri Siirt, Kırmızı, Uzun, Halebi ve Ohadi çeşididir (Anonymous, 2007).

Yapılan farklı bilimsel çalışmalarda Antep fıstığı ve fındık gibi yüksek düzeylerde oleik asit içeren besinlerin günlük olarak tüketilmesi durumunda önemli hastalıklara yakalanma riskini azaltarak sağlıklı beslenme açısından önemi bilimsel olarak ortaya konmuştur (Yıldız ve ark., 1998; Küçüköner ve Yurt, 2003; Satil ve ark., 2003; Bellomo ve Fallico, 2007).

Pala ve ark., (1994), yaptıkları çalışmada, Türkiye de yetiştirilen ve ekonomik önemi olan 4 çeşit Antep fıstığının fiziksel ve kimyasal analizini yapmış ve yapılan analizlerle Antep fıstığının nem, yağ, protein, karbonhidrat, selüloz, vitamin ve mineral madde niceliklerini saptamış ve ayrıca yağ asitleri bileşimleri ile amino asit dağılımlarını incelemişlerdir. Ülkemizde yetiştirilen Antep fıstığının tüm analiz bulguları ile değerlendirilmiş ve Antepfıstığının enerji değerinin 625 kkal/100g, protein yağ ve toplam karbonhidrat içeriğinin ise sırasıyla % 19,54, %58,94, %15,72 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, meyvenin B grubu vitaminlerinden B1 ve B2 vitaminleri ve minerallerden ise kalsiyum, magnezyum, potasyum ve demir bakımından zengin olduğunu tespit etmişlerdir.

Pala ve ark., (1994), Türkiye'de üretilen Antepfıstığının çeşitlerinin bileşimini inceleyerek, çalışma kapsamında alınan Antep fıstığının çeşitlerinin yağ içeriğinin

ortalama % 58.94 olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir. Örnekler içerisinde en çok yağ içeren % 61,93 ile uzun kırmızı kabuklu çeşidinin olduğunu, yağ asitleri bileşimi incelendiğinde Antep fıstığında, fındıkta olduğu gibi tek çift bağlı doymamış yağ asidi oleik asidin yüksek oranlarda (ortalama %67,30) bulunduğunu ve çeşitler arasında en yüksek oleik asitin, % 69,47 ile Siirt sert kabukluya ait olduğunu belirlemişlerdir.

Antepfıstığı meyvesi fındık, badem ve yer fıstığı gibi yağlı meyvelerle mukayese edildiğinde; protein bakımından (%22,6), karbonhidrat bakımından (%15,6) ve kalori değeri bakımından (3250 kalori) ile birinci, yağ oranı bakımından (%54,5) fındıktan sonra ikinci sırayı almaktadır. Bu kadar yüksek besin değeri ve çerez olarak her yerde aranılan bir meyve, ayrıca dünya da kültürünün yayıldığı yerlerin sınırlı oluşu nedeniyle antepfıstığı, iç ve dış pazarlarda hep alıcı bulabilir duruma gelmiştir (Altuntaş ve Mutlu, 2007).

Antep fıstığının meyve, yaprak ve reçinesinin kimyasal bileşimi ve bazı biyolojik aktiviteleri üzerine literatürde bazı kayıtlara rastlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda genellikle yaprak, reçine ve meyveleri üzerine araştırmalar yapılmış olup yumuşak endokarp üzerine herhangi bir ciddi kayda rastlanmamıştır. Özellikle bu kısımlardaki metabolitlerin izolasyonu, kimyasal yapılarının belirlenmesi ve antitümör özelliklerinin belirlenmesine yönelik hiçbir kayda rastlanmamıştır. Antep fıstığı meyve, yaprak, reçine ve endokarp üzerine yapılan kimyasal bileşim ve biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Tokusoglu (2011) *P. vera*' in meyvelerinden elde edilen yağın oksidatif kararlılığı, lipid profili ve toplam fenolik içeriği üzerine bir araştırma raporu yayınlamıştır. Araştırmasında toplam lipid içeriği, doymamış yağ içeriği oranını, tokoferol ve steroid içeriğinin yanı sıra oksidatif kararlılığını ölçmek üzere peroksit değerini de araştırmıştır.

Bisignano ve ark. (2013) *P. vera* meyvelerinin kavrulmuş ve kavrulmamış örneklerinden elde ettiği polifenolik maddelerce zengin ekstresini gıda ve klinik izolatlardan *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* (gram negatif bakteriler), *L. monocytogenes*, *E. hirae*, *E. faecium*, *B. subtilis*, *S. epidermis*, *S. aureus* (Gram-pozitif

bakteriler), *C. albicans* ve *C. parapsilosis* (maya türleri) mikroorganizmalara karşı test etmiş ekstrenin gram pozitif türlere karşı daha aktif olduğunu rapor etmiştir.

Martorana ve ark. (2013) hem meyveden hem de meyve endokarp kısmından polifenolik maddelerce zengin ekstreler elde etmiş ve ışık koruyucu etkisini araştırmıştır. Araştırmacılar endokarptan elde edilen ekstrenin tüm meyveden elde edilen ekstreya göre polifenolik madde bakımından daha zengin olduğunu ve aynı ekstrenin iyi bir antioksidan ve UV-B ışığı koruyucu etkisine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Hosseinzadeh ve ark. (2012) *P. vera* meyve, yaprak ve reçineden elde ettikleri etanol, sulu-etanol ve etanol ekstrelerinin antioksidan özelliklerini rapor etmişlerdir. Raporlarında ekstrelerin iyi birer radikal süpürücü etkiye ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Hosseinzadeh ve ark. (2011) de yaptıkları farklı bir çalışmada *P. vera* yapraklarının su ve etanol ekstrelerinin antioksidan özelliğini farelerde test etmiş ve LD₅₀ değerlerini etanol ve su ekstreleri için 0,80 g/kg ve 0,79 g/kg olarak belirlemişlerdir.

Mansouri ve ark. (2011) yaptıkları bilimsel çalışmada *P. vera* L. türünün reçinesinden elde edilen ekstrenin iyi bir nöroprotective (sinir hücreleri koruyucusu) özelliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir.

P. vera' in antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşenleri üzerine benzer bir çalışmada Tomaino ve ark. (2010) ve Ozturk ve ark. (2010) tarafından yayınlanmıştır. Tomaino ve ark. (2010) araştırmalarında endokarp ekstresinin fenolik içeriğini HPLC ile tayin etmiş ve perikarpın gallic asit, kateşin, eriodictyol-7-*O*-glucoside, naringenin 7-*O*-neohesperidoside, quercetin 3-*O*-rutinoside, eriodictyol, genistein 7-*O*-glucoside, genistein, daidzein ve apigenin içerdiğini bulmuştur. Meyve perikarp ve meyvelerinden elde edilen ekstreleri dört farklı antioksidan ölçüm yöntemi ile antioksidan özelliğini araştırmış ve perikarp ekstresinin meyve ekstresine göre daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ozturk ve ark. (2010) bizim çalışmamızda da kullanılacak olan kırmızımsı-pembemsi dış kabuğu su ile uzaklaştırmış ve kuruttuktan sonra metanol, etanol ve su ile ayrı ayrı özütlemişlerdir. Elde ettikleri bu ekstrelerin antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal özelliklerini belirlemiş ve bu özellikleri ile toplam fenolik madde içeriği ile olan ilişkisini ortaya koymuşlardır.

Araştırmacılar bulgularında en yüksek antioksidan ve antiradikal aktivitenin metanol ekstresinde en düşük aktivitenin ise etanol ekstresinde olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca tüm ekstrelerin *Listeria monocytogenes* (6-38 mm inhibisyon zonu) ve *Escherichia coli* O157: H7 (8-28 mm inhibisyon zonu) türlerine karşı aktif olduğunu belirlemişlerdir.

Pistacia vera ve diğer *Pistacia* türlerinin değişik kısımlarından elde edilen çeşitli ekstreler ayrıca değişik kanser hücre hatlarına karşı test edilmiştir (Giaginis ve Theocharis, 2011; Almehdar ve ark., 2012; Bibi ve ark., 2012; Paraschos ve ark., 2012; Rezaei ve ark., 2012a,b; Vlastos ve ark., 2013) . Bu konuda Vlastos ve ark. (2013) *P. lentiscus* reçinesinin sulu ekstresinin antigenotoksik özelliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar bulgularında ekstrenin dikkate değer oranda genotoksik özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

Rezaei ve ark. (2012a) *P. atlantica* türünün perikarplarından elde ettikleri polifenolik maddelerce zengin metanol ekstresinin insan meme kanseri türü olan T47D hücre hatlarında apoptotik özelliği ile önemli bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Rezaei ve ark. (2012b) ayrıca, *P. atlantica* türünün polifenolik maddelerce zengin perikarp ekstresinin insan kolon HT29 kanser hücre hatlarında antiproliferatif, apopitoz uyarıcı ve hücre devir değişiklikleri özelliklerine belirlemeye yönelik testler yapmış etmiş ve ekstrenin güçlü antitümör özelliğinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Benzer olarak Bibi ve ark. (2012) *P. integerrima* türünün köklerinden elde ettikleri metanol ekstresinin Michinan Cancer Foundation-7 cell line meme kanser türüne karşı iyi bir antitümör aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca metanol ekstresini suda çözdükten sonra kloroform ve etil asetat fazına almış ve bu fazların çok güçlü bir sitotoksik özellik sergilediğini belirlemişlerdir.

Yapılan bilimsel çalışmalar *Pistacia* türlerinin yaprak ve dış kabuk kısımlarının genellikle fenolik maddelerin yanı sıra triterpenler, steroidler ve quinic acid türevleri bakımından zengin olduğunu göstermiştir (Romani ve ark., 2002; Baratto ve ark., 2003; Rodriguez-Perez ve ark., 2013).

1.4. Çalışmanın amacı

Antep fıstığının yumuşak kabukları Eczacılıkta öksürük şurubu yapımında kullanılmaktadır. Ekibimizin henüz yayınlanmamış araştırma bulgularına göre bu kısım shikimic asitin yanı sıra anacardic asit türevleri ve terpenik yapılı moleküller içermektedir. Antep fıstığının meyve, yaprak ve reçinesinin kimyasal bileşimi ve bazı biyolojik aktiviteleri üzerine literatürde bazı kayıtlara rastlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda genellikle yaprak, reçine ve meyveleri üzerine araştırmalar yapılmış olup yumuşak endokarp üzerine herhangi bir ciddi kayda rastlanmamıştır. Bu nedenle, mevcut çalışmada antep fıstığı meyvelerinin kırmızı-pembemsi görünümlü dış yumuşak kabuklarının (dış endokarp) etanol ekstresindeki sekonder metabolitlerin kromatografik yöntemlerle izolasyonu, kimyasal yapılarının UV, FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D ve 2D-NMR teknik ve yöntemleri ile belirlenmesi ve A549 kanser hücre hattı ile sağlıklı hücre hattına (HUVEC) karşı sitotoksik aktivitelerinin test edilmesi hedeflenmiştir. Mevcut çalışmada, ayrıca kabuk kısmının etanol ve etil asetat ekstraktlarının kimyasal bileşimi kantitatif olarak HPLC ile analiz edilmesi de amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kromatografik yöntemlerle yapılan izolasyon sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Merck, Aldrich ve Tekkim gibi firmalardan temin edilmiştir. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve tedarik firmaları aşağıda verilmiştir.

- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Sigma
- Fetalsıgırserumu (FBS), Pan Biotech
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000U/ml penisilin,10mg/ml streptomisin), Pan Biotech
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Pan Biotech
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Pan Biotech
- 0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Sigma
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Triton X-100, Roth
- Tripan mavisi(%0,5), Roche
- SDS,Roth
- HCl, Tekkim
- L-Glutamin, Pan Biotech

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı	: Precisa, Series XB ve Denver Instrument, TP 214
Magnetik Karıştırıcılar	: WiseTis,
Kompresör	: KNF lab Laborport
Döner Buharlaştırıcı (Evaporatör)	: He-i-Vap Advantage Heidolp
Buzdolabı	: Beko No Frost D29459 NME
Saf Su Cihazı	: GFL-2001/4
UV Lambası 254 nm–366 nm	: Model Mineralight
FT-IR Spektrofotometresi	: Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR
¹ H- ve ¹³ C-NMR Spektrometresi	: Bruker 400 MHz Spektrometre

Erime Noktası Tayini	: Thermo Scientific 9200
LC-MS/MS	: Agilent 6470 Triple quadrupole
HPLC-UV	: Shimadzu class LC
Spektrofotometre	: Thermo Scientific, Multiskan Go Type 1510
CO ₂ inkübatörü	: Heal Force, HF-90
Steril kabin	: Thermo Scientific, MSC- Advantage
Multipipet cihazı	: Multipette eppendorf,
Inverted mikroskop	: Nikon, ECLİPSE TS-100
Santrifüj Cihazı	: HETTICH, Unwersal 320R
Pipet seti (10µl, 100µl ve 1000µl)	: Ependorf , Reference-2
Su banyosu	: BS-11, Lab Compatıon
Pipetör	: CAPP, Brand, Accu-jet Pro

2.1.3. Sarf Malzemeler

- 25cm² ve 75cm²'lik flask (TPP)
- 5-10 ml'lik enjektör (Hayat inject)
- 10µl'lik pipet uçları (Certified)
- 100µl'lik pipet uçları (Certified)
- 1000µl'lik pipet uçları (Certified)
- 0,2 µm çapında steril tek kullanımlık filtre (Merck)
- Steril santrifüj tüpü (15ml- 50ml) (TPP)
- Thoma lamı, Bright –Line (Hausser Scientific Horsham, PA, USA)
- 2 ml'lik kroviyal tüp (TPP)
- 1-2 ml'lik steril plastik pipet, Disposable (TPP)
- 5 ml steril plastik pipet, Pyrogen Free (CAPP)
- 10 ml steril plastik pipet, Pyrogen Free (CAPP)
- 25 ml steril plastik pipet (Costar)
- 2 ml cam pasteur pipeti (Isolab)
- 96'lık Hücre Kültür Kapları (Cytoone)
- 1,5 ve 2 ml'lik ependorf tüpler (Isolab)

2.1.4. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar

Kromatografik yöntemlerle yapılan fraksiyonlama, izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında kullandığımız adsorbanlar şunlardır:

Kolon Kromatografisi için; Silika jel (Kieselgel 60, 70-230 mesh, Merck).

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK); Silika jel (Hazır plaka, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm, Merck).

İTK da ayrılmış olan maddelere ait lekeler ayrıca UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm de belirlendi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Antep Fıstığı (*P. vera* L.)

Bu araştırmada çalışma materyali Antep Fıstığı (*P. vera* L.) olarak isimli türün meyvelerinin dış kısmındaki yumuşak kabuk (ben kabuğu) tercih edildi. Antep Fıstığının (*P. vera* L.) kabukları 2014 Eylül döneminde meyveleri ticari olarak satın alındı ve yumuşak kabuk kısmı çıkarıldı ve gölgede oda şartlarında kurutuldu.

2.1.5. Antep Fıstığı (*P. vera* L.) Kabuğunun Ekstraksiyon İşlemleri

P. vera L. (Antep fıstığı)'nın kuru dış kabuğu bir blenderde öğütüldü ve 200 gram örnek EtOH ile mesarasyona bırakılarak, 5 kez ekstrakte edildi. Elde edilen ekstreler süzgeç kağıdı ile süzüldü ve süzüntüler birleştirildi. EtOH bir döner buharlaştırıcıda düşük sıcaklık ve basınçta (Rotary evaporatör) uzaklaştırılarak konsantre hale getirildi. Bu işlemin sonunda kıvamlı sıvı bir ekstre elde edildi ve ekstre tartıldı (20,60 gram, verim %10,30).

Antep fıstığı meyve kabuklarından etil asetat ekstresini elde etmek üzere 100 gram öğütülmüş kuru kabuk 250 ml etil asetat ile 24 saat boyunca bekletilerek ekstrakte edildi. Ekstre süzüldü ve üzerine tekrar etil asetat ilave edildi. Bu işlem toplamda 5 kez tekrarlandı. Elde edilen ekstreler birleştirildi ve döner buharlaştırıcı ile düşük sıcaklık ve basınçta etil asetat uzaklaştırıldı. Bu işlemin sonunda sıvı kısmen daha akıcı bir ekstre elde edildi. Etil asetat tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tartıldı (21,98, verim %10,99).

Benzer şekilde meyve kabuklarından metanol ekstresini elde etmek üzere 50 gram öğütülmüş kabuk 200 ml metanol ile 5 kez birer gün arayla oda şartlarında bekletilerek

ekstrakte edildi. Birleştirilen ekstrelerdeki metanol döner buharlaştırıcı kullanarak düşük sıcaklık ve basınçta tamamen uzaklaştırıldı ve bu işlemin sonunda etanol ekstresinde olduğu gibi kıvamlı-akıcı sıvı bir ekstre elde edildi (13,53 gram, verim % 27,07).

Metanol ve etanol ekstrelerindeki shikimic asiti diğer maddelerden ayırmak üzere iki ekstre birleştirildi ve yeterli miktar saf suda çözüldü. Bu karışımın üzerine yeterli miktar etil asetat eklendi ve etil asetat fazı bir ayırma hunisi ile ayrıldı. Ekstraksiyon işlemi 5 kez tekrarlandı ve etil asetat fazları birleştirildi. Etil asetat fazı İTK da (silika jel) etil asetat ekstresi ile beraber yürütüldü. Bu işlem için hareketli faz olarak $CHCl_3$ -etil asetat (8:2) kullanıldı ve aynı maddeleri içerdiği gözlemlendi. Aynı maddeleri içerdiği belirlendikten sonra etil asetat ekstresi ile etil asetat fazları birleştirildi. Shikimic asit maddesinin ise su fazında kaldığı belirlendi. Su evaporatörde düşük sıcaklık ve basınç altında uzaklaştırıldı.

2.2.3. Antep Fıstığı (*P. vera* L.) Kabuğu Etanol Ekstresi Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar

Ekstre alınarak uygun bir çözücüde çözüldü ve değişik hareketli faz sistemlerinde İTK yöntemi ile yürütüldü. Yapılan kontrollerin sonucunda elde edilen ekstredeki metabolitleri saflaştırmak üzere kromatografik çalışmalarda uygun hareketli faz sisteminin ise diklorometan-etil asetat (6:4) sistemi olduğu belirlendi. *P. vera* L.'den elde edilen etanol ekstresini fraksiyonlamak üzere silika jel KK yapıldı. Bu amaçla 250 g silika jel (Kiesel gel 60,70-230 mesh, Merck) diklorometan-etil asetat (6:4) sistemi ile süspansiyon haline getirilerek kolona tatbik edildi. Ekstre bir damlalık ile kolonun üst kısmından yüklendi ve aynı sistem ile elüe edildi. Fraksiyonlar 25 ml hacimler halinde toplandı ve İTK da aynı sistemde kontrol edildi. Aynı lekeleri içeren fraksiyonlar kendi arasında birleştirildi ve birleştirme işlemlerinin sonunda toplamda ekstre altı fraksiyona bölündü. Bu fraksiyonlar: PVKA (7-31 fraksiyon) , PVKB (32-58 fraksiyon), PVKC (59-63 fraksiyon), PVKD (64-69 fraksiyon), PVKE (70-74 fraksiyon), PVKF (75-80 fraksiyon).

PVKA Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: İTK ile yapılan kontrolde **PVKA** fraksiyonunun majör 3 madde içerdiği belirlendi. Bu maddeyi

saflaştırmak üzere 150 g silika jel (Kieselgel 60,70-230 mesh, Merck) diklorometan çözücü sisteminde süspansiyon haline getirilerek kolona yüklendi. Fraksiyonlar 25 ml hacimler halinde toplandı ve İTK ile yapılan kontrollerde 5. fraksiyonda majör maddenin saf olduğu gözlemlendi. Saflaştırılan bu madde **PVK-3** (100 mg) olarak kodlandı.Yapılan kontrollerde 12 ve 13. Fraksiyonların da saf olduğu gözlemlendi ve bu madde de **PVK-4** (25 mg) olarak kodlandı. İTK ile yapılan kontrollerde diğer majör maddenin 16-32. fraksiyonlarda olduğu tespit edildi. PVKA fraksiyonundaki bu maddeyi saflaştırmak üzere 16-32. fraksiyon diklorometan:etilasetat (8:2) çözücü sisteminde 85 gr silika jel (Kieselgel 60,70-230 mesh, Merck) kolon kromatografisine tabii tutuldu. İTK ile yapılan kontrollerde ilk iki fraksiyonun saf olduğu gözlemlendi ve bu madde **PVK-5** (40 mg) olarak kodlandı.

PVKC Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Bu fraksiyonun İTK ile yapılan kontrolünde 2 majör madde içerdiiği gözlemlendi. Bu fraksiyondaki maddeleri almak üzere silika jel KK (75 g silika jel, 70-230 mesh) yapıldı. PVKC fraksiyonu (846 mg) hekzan-aseton (1:1) sisteminde çözüldü ve kolona tatbik edildi. Kolon aynı sistemle elüe edildi ve alınan fraksiyonlar İTK ile aynı sistemde kontrol edildi. Bir maddenin 3-9. fraksiyonda saf olduğu İTK ile yapılan kontrolde gözlemlendi ve saflaştırılan bu yeni madde **PVK-6** (370 mg) olarak kodlandı. Diğer taraftan aynı kolon kromatografisinde 11-17 fraksiyonunda yapılan kontroller sonucu saf bir madde içerdiiği tespit edildi ve bu madde **PVK-7** (95 mg) olarak kodlandı.

PVKD Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Bu fraksiyonun İTK ile yapılan kontrolünde 1 majör madde içerdiiği gözlemlendi. Bu fraksiyondaki maddeleri almak üzere silika jel KK (65g silika jel, 70-230 mesh) yapıldı. Hekzan-etilasetat (1:1) sisteminde çözüldü ve kolona tatbik edildi. Kolon aynı sistemle elüe edildi, alınan fraksiyonlar İTK ile aynı sistemde kontrol edildi ve 5-12 fraksiyonların saf bir madde içerdiiği belirlendi. Saflaştırılan bu madde hem kokusu hem de Rf değeri aynı olmasına karşın NMR ile kontrol edilene kadar **PVK-7** ile birleştirilmedi ve **PVK-7b** (115 mg) olarak kodlandı.

PVKE Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Bu fraksiyonun İTK ile yapılan kontrolünde 1 majör madde içerdiiği gözlemlendi. Bu fraksiyondaki maddeleri almak üzere silika jel KK (70g silika jel, 70-230 mesh) yapıldı. PVKE

fraksiyonu (4.51 g) etilasetat:metanol (65:35) sisteminde çözüldü ve kolona tatbik edildi. Kolon aynı sistemle elüe edildi ve alınan fraksiyonlar İTK ile aynı sistemde kontrol edildi. 12-18 fraksiyonu saf olarak geldiği gözlemlendi. Saflaştırılan yeni madde **PVK-8** (903 mg) olarak kodlandı.

PVKF Fraksiyonu üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar: Bu fraksiyonun İTK ile yapılan kontrolünde majör miktarda PVK-8 içerdiği gözlemlendi. Bu fraksiyondaki maddeleri almak üzere silika jel KK (80g silika jel, 70-230 mesh) yapıldı. PVKE fraksiyonu (3.1957g) etilalkol:etilasetat (8:2) sisteminde çözüldü ve kolona tatbik edildi. İTK ile yapılan kontrolde 8-23. fraksiyonların saf bir madde içerdiği gözlemlendi. Saflaştırılan madde **PVK-8** (765 mg) üzerine eklendi. Bu işlemlerin sonunda PVKE ve PVKF fraksiyonundan toplam 1668 mg **PVK-8** saflaştırıldı.

2.2.4. Ekstrelerin Preperatif İTK ve HPLC ile Kantitatif ve Kalitatif Analizi

P. vera meyvelerindeki saflaştırılan sekonder metabolitlerin Rf değerlerini ve bağıl oranlarını belirlemek üzere etil asetat, etanol ve metanol ekstreleri ile saflaştırılan bileşikler farklı mobil faz sistemlerinde yürütüldü. Bu amaçla hekzan-EtOAc (8:2), EtOH-EtOAc (8:2), CH₂Cl₂-EtOAc (8:2) ve EtOAc-MeOH (6,5:3,5) mobil faz sistemleri kullanıldı.

Ekstreler ve saf metabolit, shikimic asit HPLC-UV de yürütülerek içerdiği maddeler birbirinden ayrıldı. Bu amaçla, ODS Hypersil, 250x4,6 mm uzunluğunda (partikül boyut genişliği 5µm) bir kolon kullanıldı. Kolon sıcaklığı 35 °C olup, mobil fazın akış hızı 0,8 mL/dakikadır. Mobil faz olarak %1 asetik asit-deiyonize su (A fazı) ve asetonitril (B fazı) karışımı gradient mobil faz tercih edilmiştir. Bu amaçla 0,1-35 dakika aralığında % 8 asetonitril içeren mobil faz, 35-45 dakika aralığında ise % 22 asetonitril içeren mobil faz olarak kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µl iken, UV dedektörünün dalga boyu olarak da 278 nm tercih edildi.



Şekil 2.1. Kullanılan HPLC-UV cihazı

2.2.5. Hücre Kültüründe Yapılan Antitümöral Çalışmalar

2.2.5.1. Saf metabolit ve Ekstrelerin Çözeltilerinin Hazırlanması

PVK-1, PVK-3, PVK-6 ve PVK-8 saf maddelerinin stok çözeltisi 10mM, *P. vera* kabuklarından elde edilen Metanol, etanol ve etil asetat ekstralarının stok çözeltisi ise 100mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülen saf maddeler ve ekstralar +4°C'de saklandı. Hücelere uygulanacak en yüksek doz saf maddeler için 100µM iken ekstralar için 100µg/ml olarak hazırlandı. Besiyeri ile 1:1 oranda seyreltme yapıldı.

2.2.5.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak ATCC'den alınan HUVEC ve A549 hücre soyları kriyovial tüpler içerisinde -80° C dolaplarda saklandı. Kullanılan hücre soylarının özellikleri aşağıda belirtilen şekildedir:

HUVEC Hücre Soyu:

- ▶ Onkogenik değildir
- ▶ Koloni yapılar
- ▶ Adherenttirler
- ▶ Faktör VIII (+)

A549 Hücre Soyu:

- ▶ Fuziform, polygonal hücre şekilleri

- ▶ Adenokarsinom
- ▶ Yaygın nekroz
- ▶ Dar sitoplazma

2.2.5.3. Hücre Soylarının Yetiştirilmesi ve Pasajlanması

Deneilerde kullanılan hücre soyları, flask yüzeyini % 80 konfluent olduklarından flask içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücrelerin serumdan arındırılması için 25cm²'lik flask içerisine 3-4 ml 1X PBS (Pan Biotech) ilave edildi ve hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması için 0.5ml %0,05Tripsin-EDTA (Sigma) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li ortamda 4 dakika inkübe edildi. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için 2 ml kadar besiyeri ilave edildi. Böylece tripsinin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlaması engellenmiş oldu.

Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800rpm'e 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre pelleti 2ml hücre besiyerinde çözüldükten sonra içerisinde 5ml besiyeri bulunan 25cm²'lik flasklara alınarak 37°C'de, %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

2.2.5.4. Hücre Soylarının Stoklanması (Hücrelerin Dondurulması (Freezing Medium))

Hücreler flask yüzeyini tamamen kapladıklarında flask içerisindeki besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 3-4 ml, 1X PBS ile hafifçe yıkandıktan sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücrelerin flask yüzeyinden kalkmalarını sağlamak için %0,05 Tripsin-EDTA (Sigma) solüsyonu eklendi. Hücreler 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 4 dakika inkübasyona bırakıldı. Mikroskopla bakıldığında flask yüzeyinden ayrıldığı kabul edilen hücrelere, tripsinin inhibe edilmesi için 2 ml kadar besiyeri ilave edildi. Flask içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 15ml'lik

falkon tüp (Isolab) içerisine alındı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve pellet üzerine her bir kriyovial için 2.5ml dondurucu medium (freezing medium) (5ml DMSO + 5ml FBS + 40ml DMEM) karanlık ortamda ilave edildi. Hücre süspansiyonu kriyovialler içerisine dağıtılarak -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.5.5. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

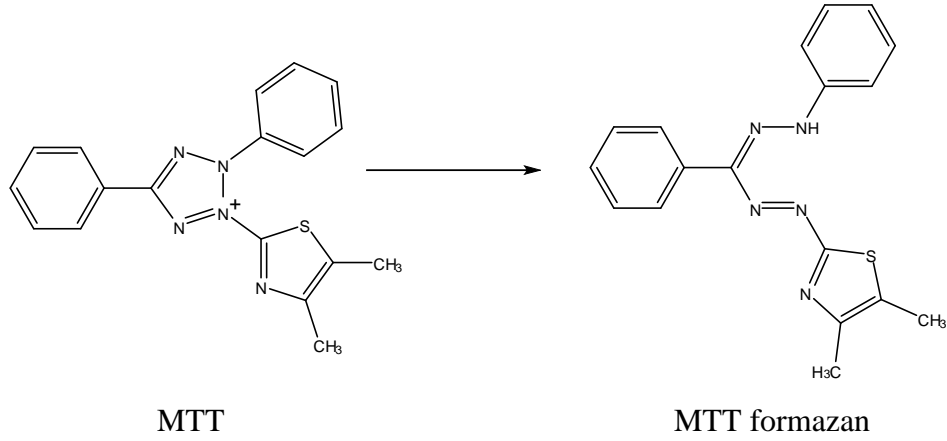
HUVEC ve A549 hücre soylarının yetiştirilmesi için; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren 5ml RPMI: Ham's F12 (1:1) besiyeri kullanılmıştır.

2.2.5.6. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 10µl alındı ve 1:1 oranda %0,5'lik tripan mavisi (Roche) konarak iyice karışması sağlandı. Hafifçe pipetaj yapılarak yaklaşık 10 µl thoma lamına damlatıldı ve mikroskopta bu lam üzerinde alt ve üst şeklinde olmak üzere beş alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

2.2.5.7. MTT Canlılık Metodu

MTT yöntemi, ilk kez Mosmann (1983) tarafından belirlenmiş olup canlı hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenaz enzim aktivitesinin kolorimetrik ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Ortama konulan bileşiğe yanıt olarak eğer hücreler ölürse enzim aktivitesinin azaldığı veya kaybolduğu görülmektedir. Bu nedenle hücreler mitokondriyel dehidrogenaz enziminin değişime uğrattığı MTT maddesine (tetrazolyum (3-(4,5-dimetiltiyazol-2)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) maruz bırakılırlar. MTT, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzu olup canlı hücreler tarafından alınır ve mitokondriyel süksinat dehidrogenaz enzimleri tarafından suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür (Şekil 2.2). Dolayısıyla indirgenme ve formazan kristallerinin oluşum bölgelerinin mitokondri olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 2.2. MTT'in Tepkime Şeması

Sitotoksik bileşiklerin hücrelere zarar vermesi MTT tetrazoliumun formazana indirgenmesini azaltmaktadır. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mavi-mor renkte boyanmakta, ölü veya mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır. MTT kimyasalı, 5mg/ml PBS tamponu içerisinde pH=7,2 olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi filtre edilerek steril hale getirildi. MTT testi için, HUVEC ve A549 hücreleri sayılarak 100µl besiyeri içerisinde 5×10^3 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. PVK-1, PVK-3, PVK-6 ve PVK-8 saf metabolitlerin 6,25-100µM konsantrasyonları, metanol, etanol ve etil asetat ekstraktlarının ise 100-6.25µg/ml konsantrasyonları, 100µl hacimde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına uygulandı. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık, MO) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 100µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 48 saat 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda HUVEC ve A549 hücrelerine her bir kuyucuğa 40µl MTT eklendikten sonra hücreler 37 °C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakıldı (Watjen ve Beyersmann, 2004). Oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine %10'luk SDS solüsyonundan 80µl eklenerek 18 saat 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede (Thermo Scientific) 570nm dalga boyunda ölçüldü ve okunan absorbans değerleri kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlendi.

% Canlılık hesabı: İlaç uygulanmamış kontrol hücre (MO) canlılığı %100 olarak kabul edilerek, ilaç uygulanan hücrelerin canlılık oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

$\%Canlılık = [100 \times (\text{Bileşik ile muamele edilen hücre absorbanısı ortalaması} - \text{kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbanısı ortalaması} - \text{kör ortalama})]$ olarak hesaplandı.



3. BULGULAR

3.1. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Deneysel Bulgular

3.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi Sonuçları

P. vera meyvelerindeki saflaştırılan sekonder metabolitlerin Rf değerlerini ve bağlı oranlarını belirlemek üzere etil asetat, etanol ve metanol ekstraktları ile saflaştırılan bileşikler farklı mobil faz sistemlerinde yürütüldü. Bu amaçla hekzan-EtOAc (8:2), EtOH-EtOAc (8:2), CH₂Cl₂-EtOAc (8:2) ve EtOAc-MeOH (6,5:3,5) mobil faz sistemleri kullanıldı. *P. vera* meyvelerinin kabuk kısımlarının etanol ekstresinden izole edilen 6 metabolitin İTK ile değişik hareketli faz sistemlerinde belirlenen Rf değerleri Çizelge 3.1. de sunulmuştur. Yapılan kontroller esnasında PVK-4'ün küçük safsızlık içerdiği tespit edilirken, PVK-5 ve PVK-7'in ise saf olmadığı hem İTK da mobil fazın değiştirilmesi, hem de NMR verilerinden anlaşılmıştır.

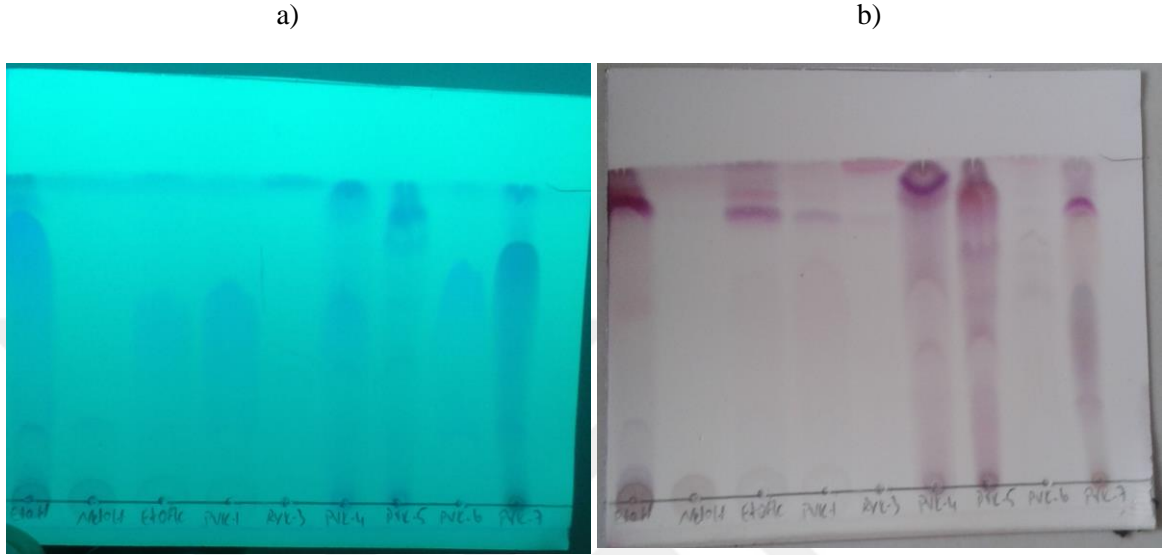
Çizelge 3.1. Saflaştırılan maddelerin farklı çözücü sistemlerinde Rf değerleri

	Hekzan-EtOAc (8:2)	EtOH-EtOAc (8:2)	CH ₂ Cl ₂ -EtOAc (8:2)	EtOAc-MeOH (6,5:3,5)
PVK-1	0,35	0,85	0,74	-
PVK-3	0,88	0,87	0,98	-
PVK-4	0,69	0,85	0,95	-
PVK-5	0,37	0,83	0,86	-
PVK-6	-	0,87	-	-
PVK-7	-	0,77	-	-
PVK-8	-	-	-	0,66

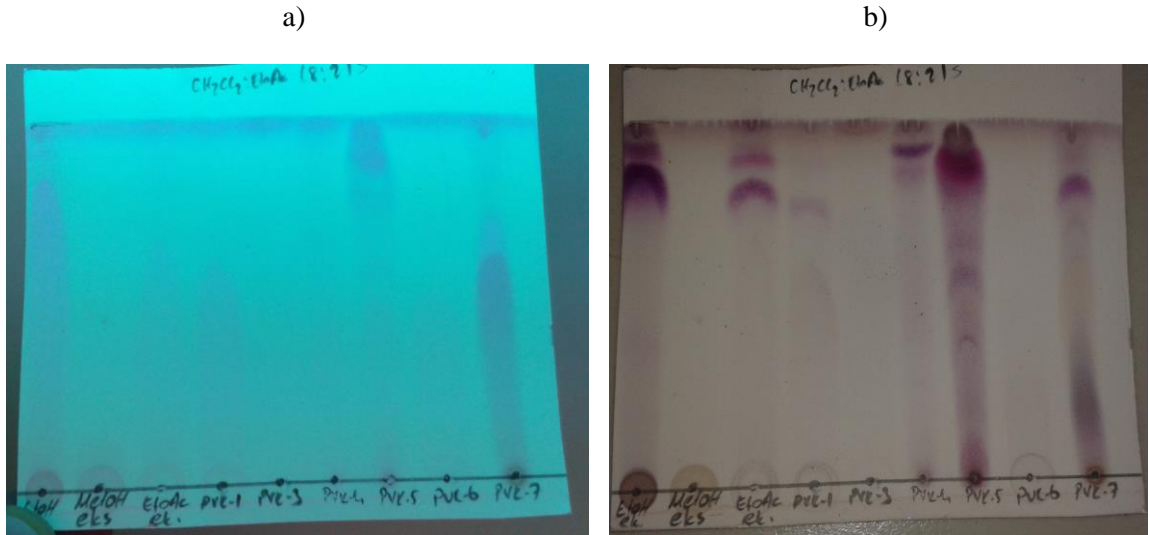
- : Yürümediği için belirlenmedi

Ekstre ve saflaştırılan metabolitlerin preparatif İTK sonuçları Şekil 3.1.-3.4 de verilmiştir. Bu şekillerden görüleceği üzere kabuk etil asetat ekstresi PVK-1 bileşimini yüksek oranda içermektedir. PVK-1 UV₂₅₄ nm de hafif mor renk vermekte olup bu ekstrede majör maddelerden birisi olduğu için yayvan bir şekilde yürümüştür. Etanol ekstresi ise (Şekil 3.3.) hem PVK-1 ve diğer metabolitlerin yanı sıra PVK-8 de içermektedir. Yine aynı kromatogramından (Şekil 3.4) görüleceği üzere kabuk metanol

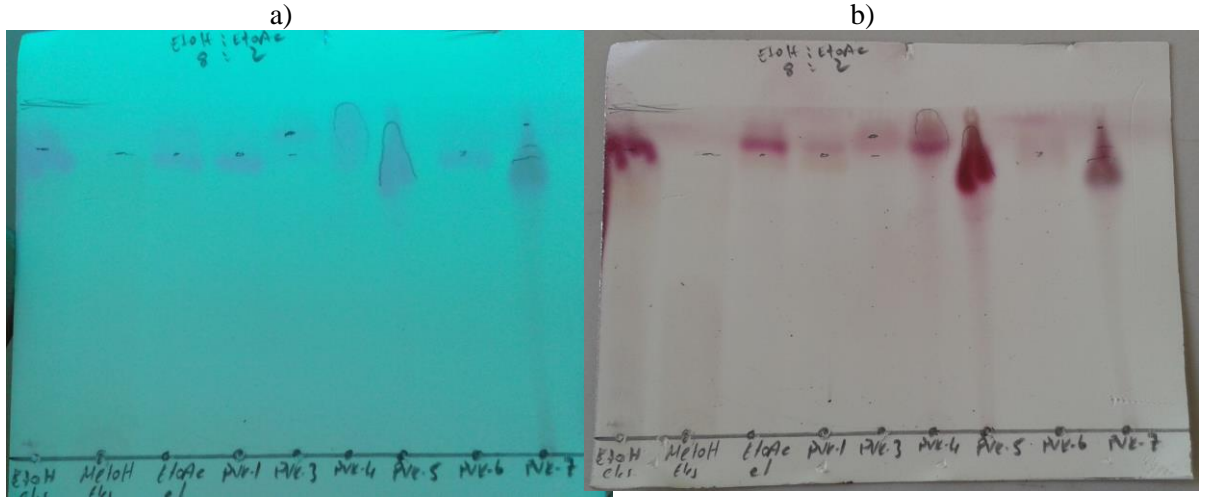
ekstresi PVK-8 bakımından daha zengin bir ekstredir. Bu sonuçlar bize PVK-8'in kabuktan metanol ve su gibi daha polar çözücülerle daha iyi tüketilebileceğini göstermektedir. Metanol ekstresinde ise PVK-1 ve diğer maddelerin oranı PVK-8 hariç az oranda belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Ekstre ve metabolitlerin Hekzan-EtOAc (6:4) sisteminde a) UV₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı

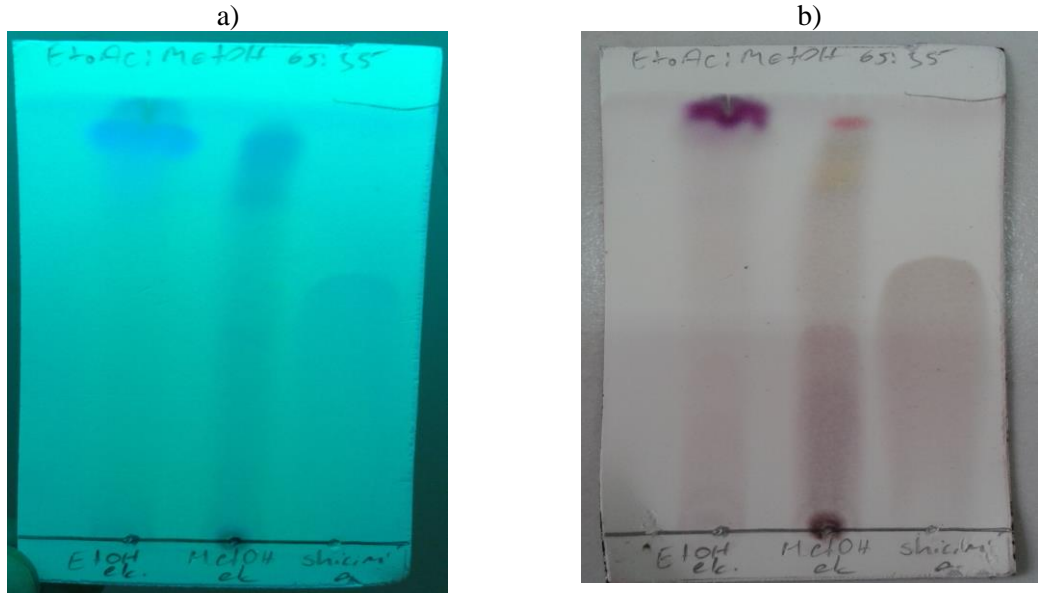


Şekil 3.2. Ekstre ve metabolitlerin CH₂Cl₂-EtOAc (8:2) sisteminde a) UV₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogra



Şekil 3.3. Ekstre ve metabolitlerin EtOH-EtOAc (8:2) sisteminde a) UV₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı

Şekil 3.3. den görüleceği üzere EtOH-EtOAc (8:2) sistemi polar bir sistem olduğu için tüm maddeler yukarıya kadar yürümüş olup R_f değerleri büyüktür. Diğer taraftan reaktif püskürtülmesi sonucu kabuk EtOH ve MeOH ekstralarında altta PVK-8'e ait lekeler zayıf bir şekilde de olsa görünmektedir.

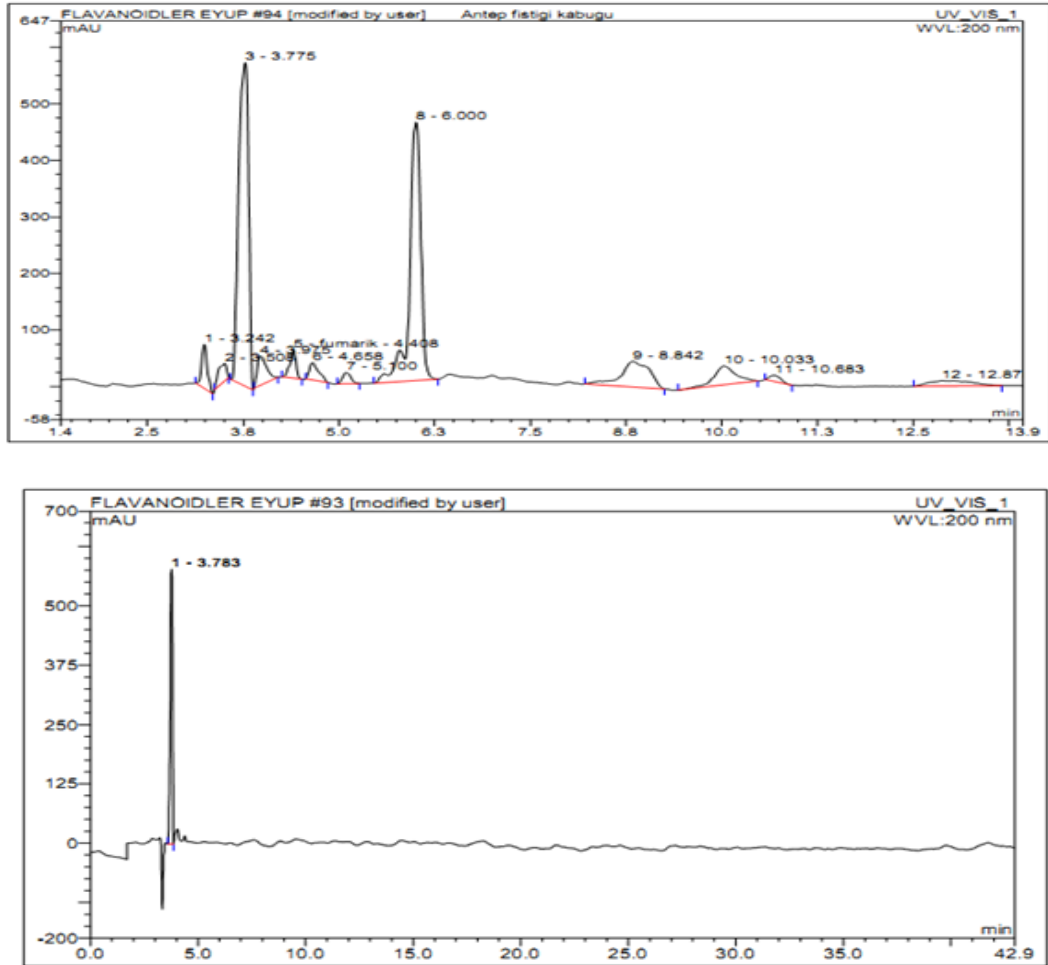


Şekil 3.4. Ekstre ve metabolitlerin EtOAc-MeOH (6,5:3,5) sisteminde a) UV₂₅₄ nm de ve b) reaktif püskürtülmesi sonucu İTK kromatogramı

Şekil 3.4. den görüleceği üzere kabuk EtOH ekstresindeki PVK-8 (Shikimic asit) miktarı düşük iken MeOH ekstresinde bu maddeye ait leke daha belirgindir. Bu sonuçlarda polarite arttıkça kabuktan PVK-8'in daha iyi tüketildiğini göstermektedir.

3.1.2. Ekstrelerin HPLC ile Kantitatif ve Kalitatif Analiz Bulguları

Kabuktan elde edilen etanol ekstresi İTK'nın yanı sıra HPLC-UV de yürütülerek kimyasal bileşimi ortaya konmaya çalışıldı. Analizler sonucunda etanol ekstresinin İTK analiz sonuçları ile uyumlu olarak iki majör madde içerdiği tespit edildi (Şekil 3.5). HPLC kromatogramından görüleceği üzere 3,375. dakikada gelen madde shikimic asit (PVK-8) olup ekstredeki bağıl oranı %37,0 olarak belirlendi. Gelme zamanı 6,00 dakika olan diğer majör madde PVK-1'in bağıl oranı ise %33,0 olarak belirlendi. Bu bulgular hem İTK hem de Kromatografik yöntemlerle saflaştırma çalışmaları ile tam bir uyum içerisindedir.

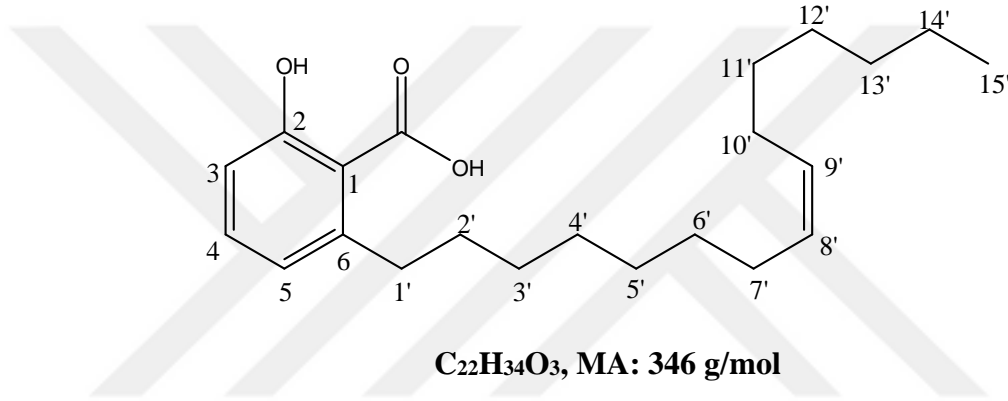


Şekil 3.5. Kabuk etanol ekstresinin ve saf shikimic asitin (PVK-8) HPLC kromatogramı

3.1.3. Saflaştırılan Metabolitlere Ait Spektral Bulgular

Bu bölümde *P. vera* meyvelerinin kabuk kısmından izole edilen 7 bileşiğin molekül yapılarını aydınlatmak üzere alınan IR, UV ve NMR yöntemleriyle elde edilen spektral bulgular değerlendirilmiştir. Yapılan analizler neticesinde yapısı belirlenen bileşikler aşağıdaki gibidir.

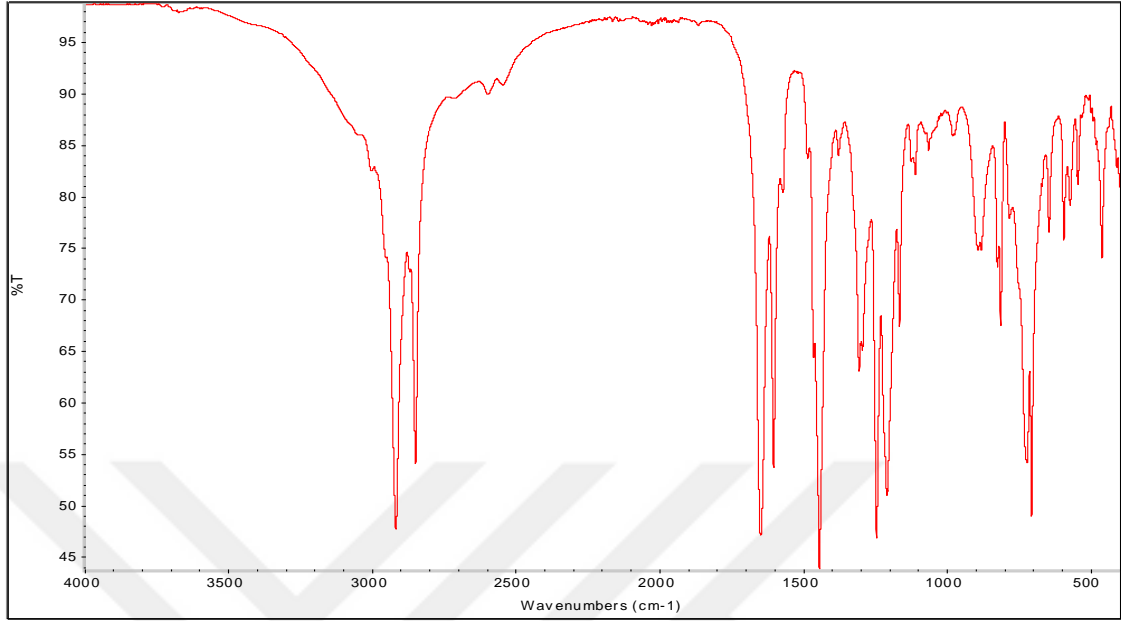
PVK-1 Kodlu Metabolit (Ginkgolic acid 15:1, Anacardic asit 15:1, (Z)-2-Hidroksi-6-(pentadek-8-enil) benzoik asit)



PVK-1 bileşiği, UV₃₆₆ nm de parlak, UV₂₅₄ nm de mor renk veren kırmızı renkli katı bir madde olarak izole edildi. Maddenin UV₂₅₄ nm de mor renk vermesi fenolik karakterli bir madde olduğunu göstermektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Erdik, 1998; Fessenden and Fessenden, 2001). Vanilin/H₂SO₄ (105 °C) reaktifi ile zor görünen hafif sarımsı bir renk vermektedir.

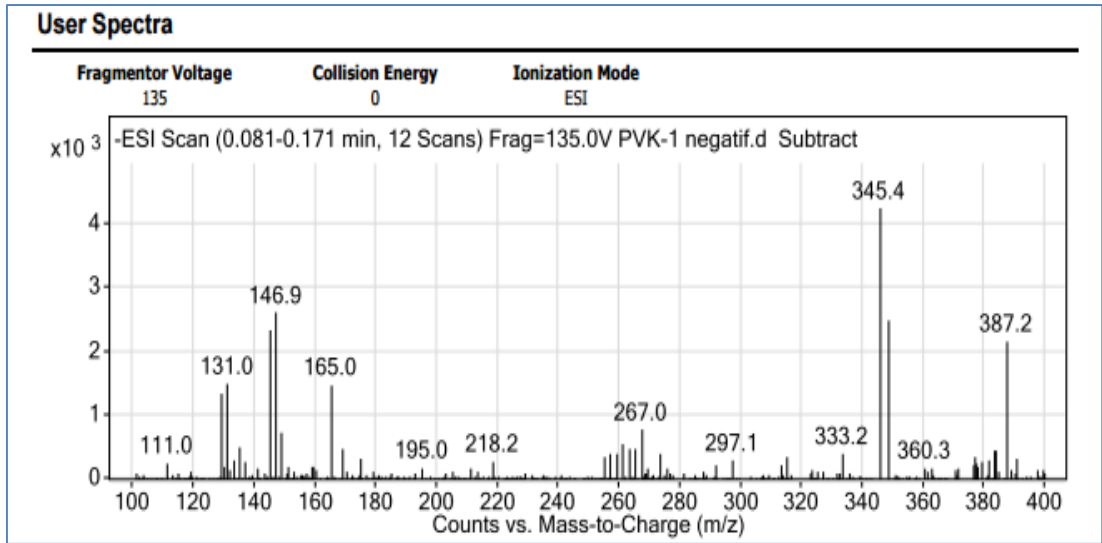
PVK-1 bileşiğinin molekül yapısı IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT ¹³C-NMR, HMQC, ¹H-¹H COSY ve HMBC spektral verileri ile “**Ginkgolic asit (15:1) veya Anacardic acid (15:1)**” olarak aydınlatılmıştır. Anacardic asitler lipidik karakterli fenolik bileşikler olup kaju meyvelerinin kabukları gibi meyve kabuklarında bulunan doğal metabolitlerdir. PVK-1 bileşiğinin IR spektrumunda (Şekil 3.6.) 2800-3000 cm⁻¹ dalga boyunda gözlenen kuvvetli absorban bantları C-H titreşim bantları olup molekülün alifatik gruplar taşıdığına işaret etmektedir. C=O titreşim bandı 1650 cm⁻¹ civarında kuvvetli bir absorban bandı olarak gözlemlenirken, aromatik halkadaki C=C bağ titreşim bantları ise 1400-1600 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gözlenmiştir. Sözü geçen

titreşim bantları molekülün aromatik karakterli alifatik gruplar taşıyan bir bileşik olduğuna işaret etmektedir (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998).



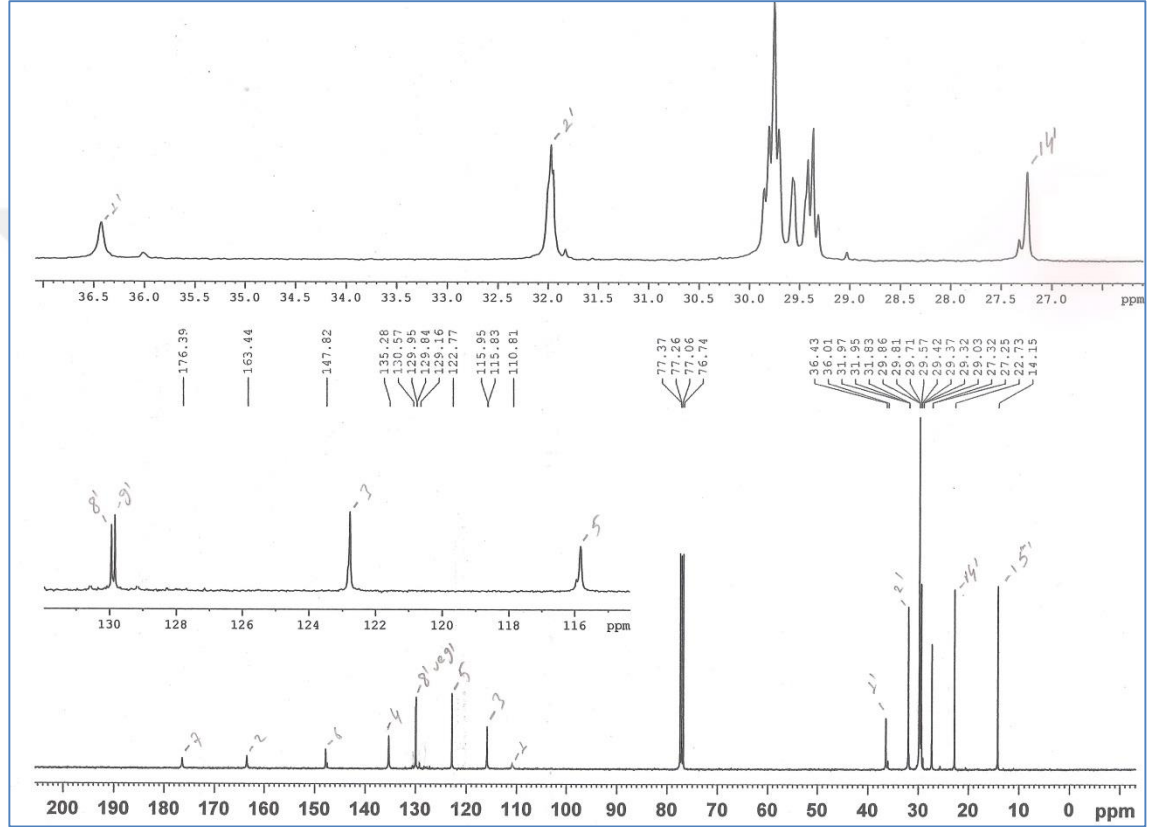
Şekil 3.6. PVK-1'in (Ginkgolic asit) FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

Antep fıstığı kabuğunun özellikle etil asetat ekstresinin ve diğer ekstralarının majör bileşeni olan PVK-1'in MS spektrumundan (Şekil 3.7.) $m/z=345$ ve $m/z=346$ da gözlenen M^{+1} pikleri molekülün ginkgolic asit (anacardic acid 15:1) olduğunu doğrulamaktadır (Ahlemeyer ve ark., 2001; Fukuda ve ark., 2009).



Şekil 3.7. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) kütle spektrumu

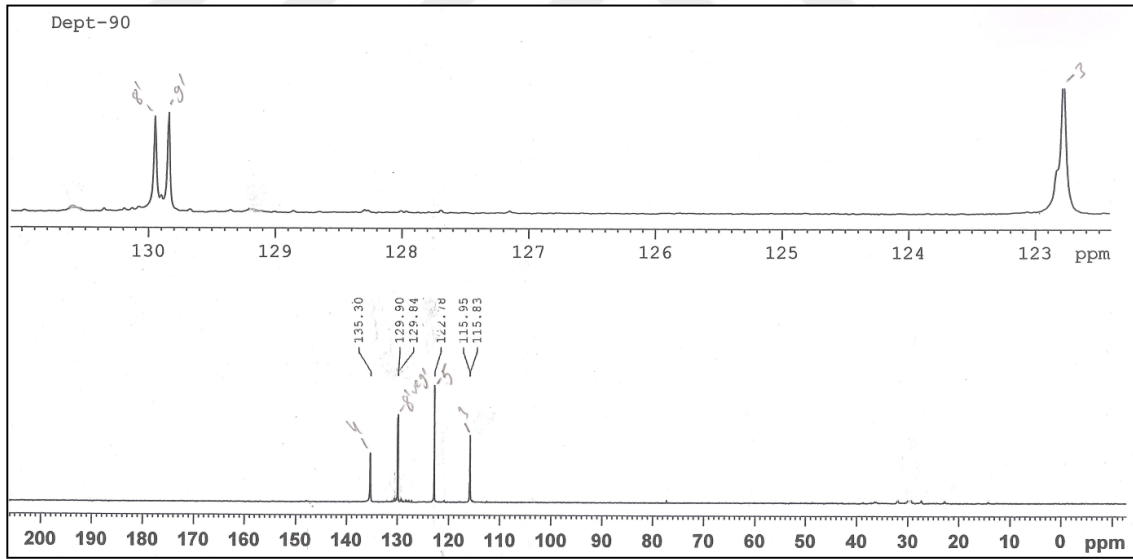
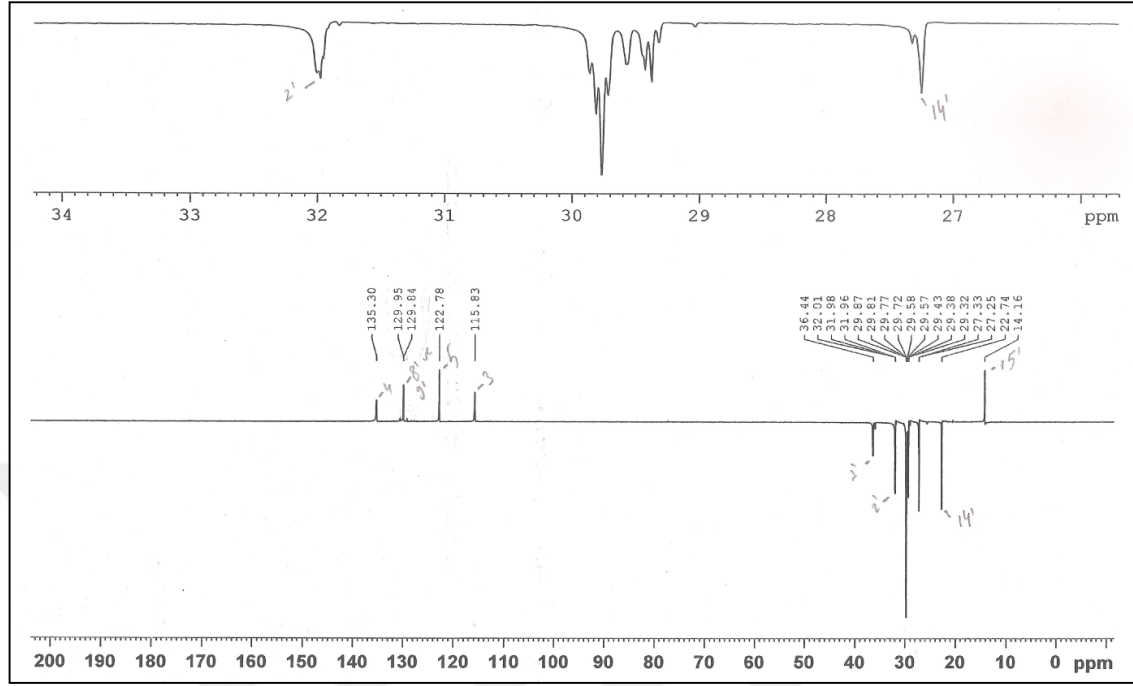
ise birbirine çok yakın bölgede $\delta=130,0$ ve $\delta=129,8$ ppm de rezonans olmuşlardır. Spektrumda alifatik bölgede ise çok fazla sayıda C sinyali gözlemlenirken $\delta=36,4$ ppm de ki sinyalin C-1'e, $\delta=32,0$ ppm deki sinyalin C-2' e, $\delta=22,7$ ppm deki sinyalin C-14' e ve $\delta=14,1$ ppm de gözlenen sinyalin ise C-15'e ait olduğu belirlenmiştir (Erdik, 1998;Balcı, 2000). Diğer sinyaller ise C atomlarının rezonanslarının birbirine çok yakın olmasından dolayı iyi belirlenememiştir.



Şekil 3.9. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) ^{13}C -NMR (CDCl_3) spektrumu

PVK-1'in DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (Şekil 3.10) da molekülün önerilen kimyasal yapısı ile tam bir uyum halindedir. DEPT-135 spektrumunda H atomu taşıyan C atomları rezonans olur ve spektrumda metilen karbonları ($-\text{CH}_2$) negatif sinyal, metin karbonları ($-\text{CH}$) ile metil karbonları ($-\text{CH}_3$) pozitif sinyal verir (Balcı, 2000; Erdik, 1998). Molekülün DEPT-135 spektrumunda beklenildiği gibi bir adet pozitif $-\text{CH}_3$ sinyali ($\delta=14,1$ ppm) ve 5 adet C-3, C-5, C-8', C-9' ve C-4'e ait $-\text{CH}$ sinyali gözlemlenmiştir. Bu veriler sadece $-\text{CH}$ sinyallerinin gözlemlendiği DEPT-90

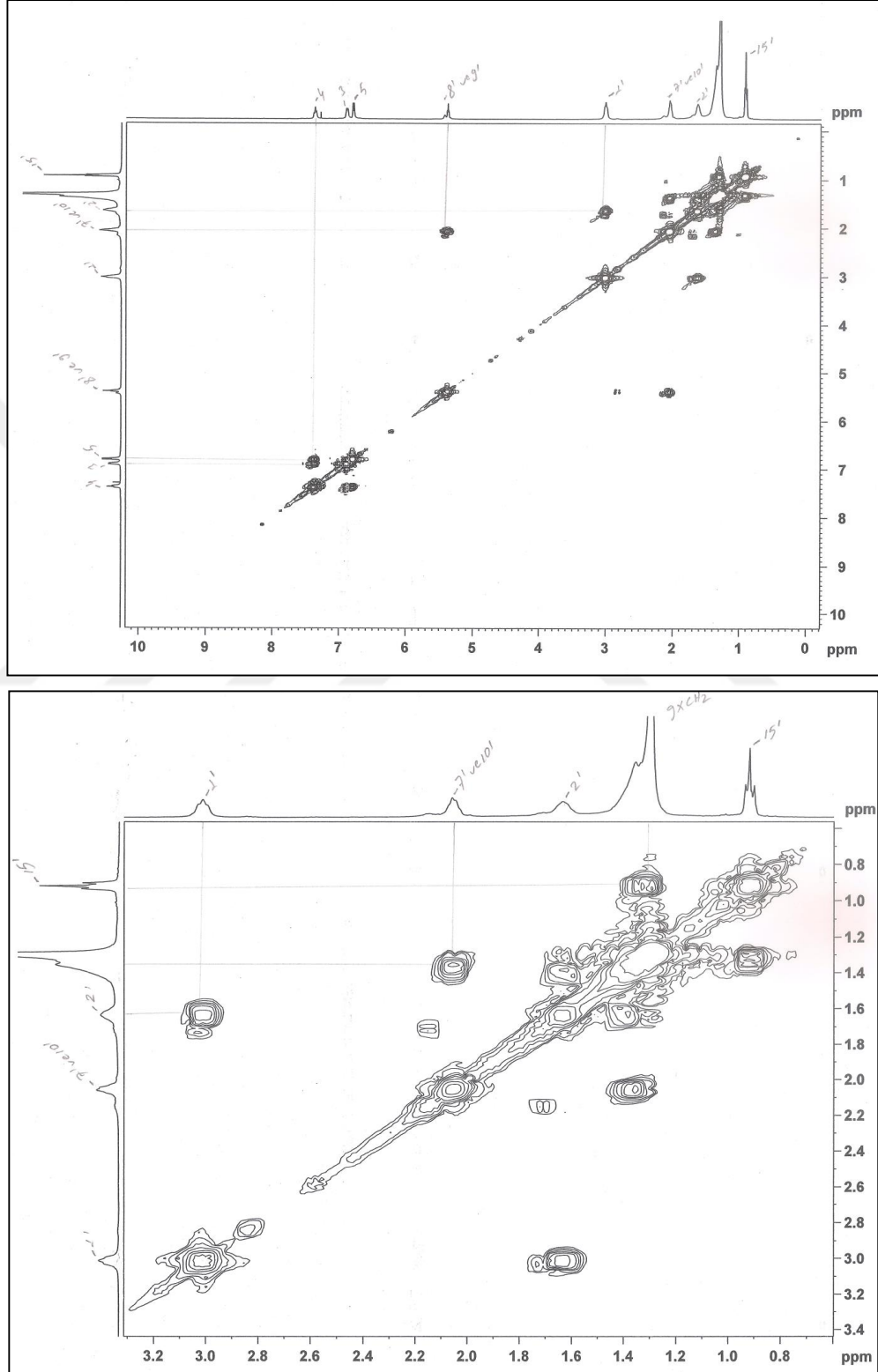
spektrumu ile de doğrulanmaktadır. Bu spektrumda gözlenen toplam 5 adet –CH sinyali önerilen yapı ile uyum halindedir.



Şekil 3.10. PVK-1'in (Ginkgolic asit) DEPT-135 ve DEPT-90 ¹³C-NMR (CDCl₃) spektrumu

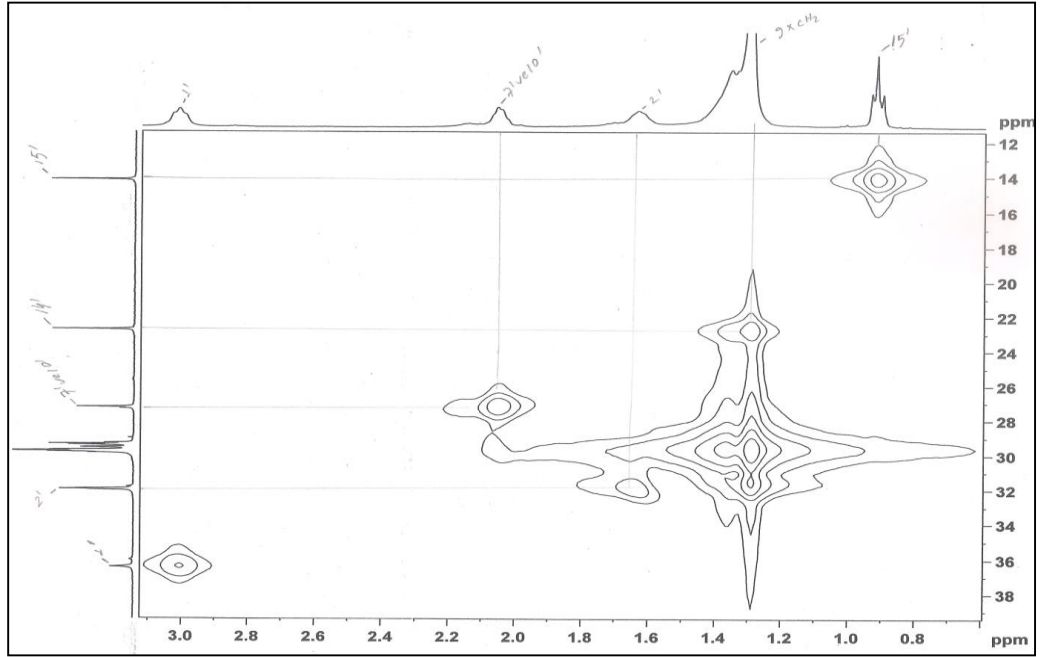
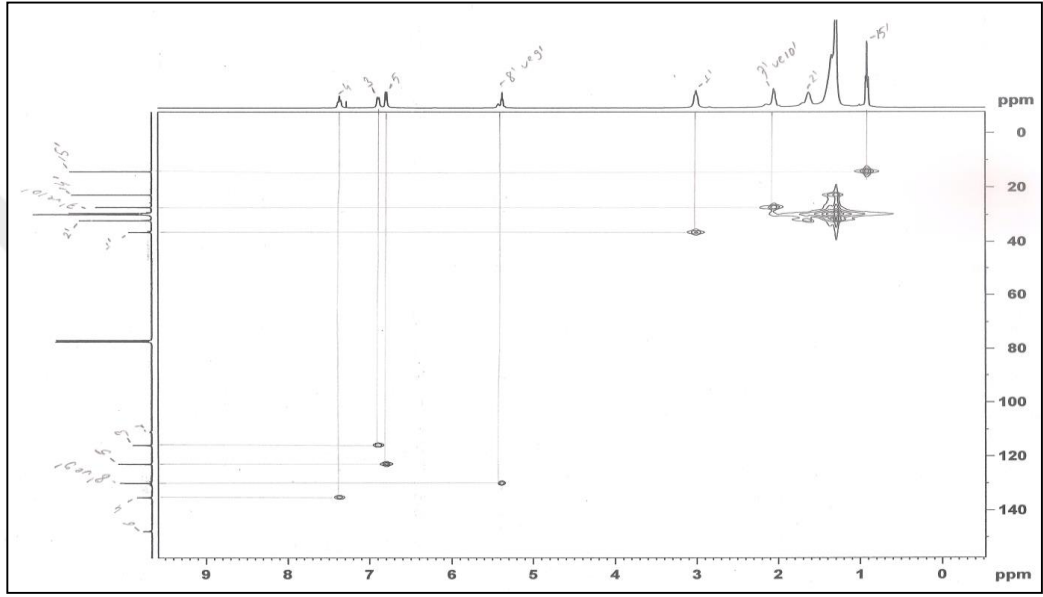
PVK-1'in ¹H-¹H-COSY spektrumunda (Şekil 3.11) $\delta=3,00$ ppm deki H sinyali (H-1') $\delta=1,63$ ppm deki (H-2') sinyal ile, H-8' ve H-9'' a ait olan $\delta=5,40$ ppm civarında gözlenen *dt*'e benzer sinyal ise $\delta=2,05$ ppm deki H-7' ve H-10''e ait sinyallerle, $\delta=7,37$ ppm deki H-4'e ait sinyal ise $\delta=6,89$ ppm ve $\delta=6,80$ ppm deki sırasıyla H-3 ve

H-5'e ait sinyallerle korale olmuştur. Bu koralasyonlar önerilen yapı ile tam bir uyum halindedir.

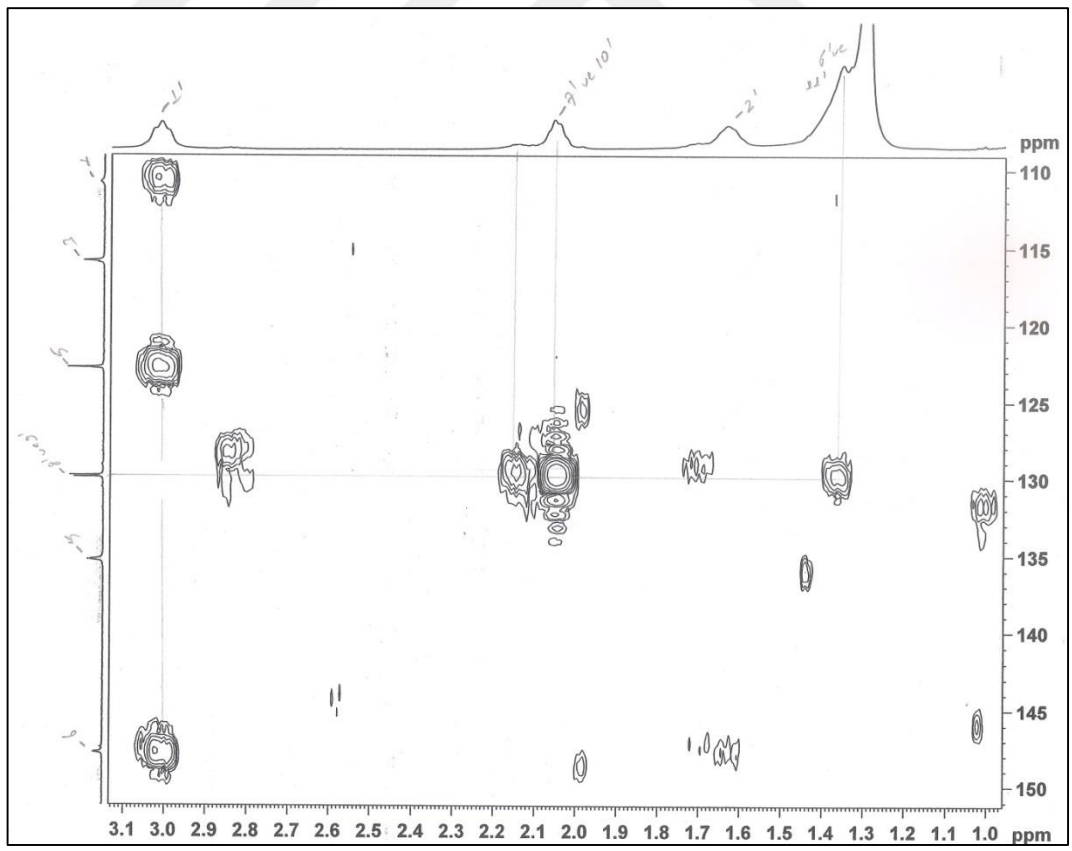
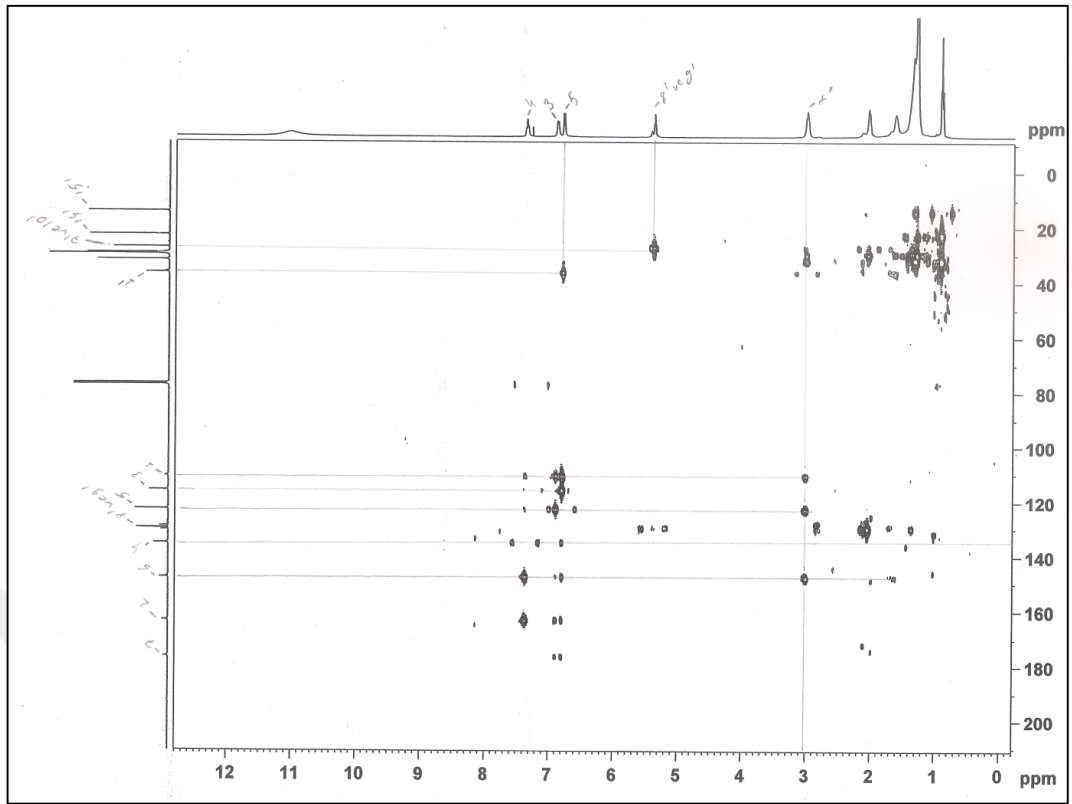


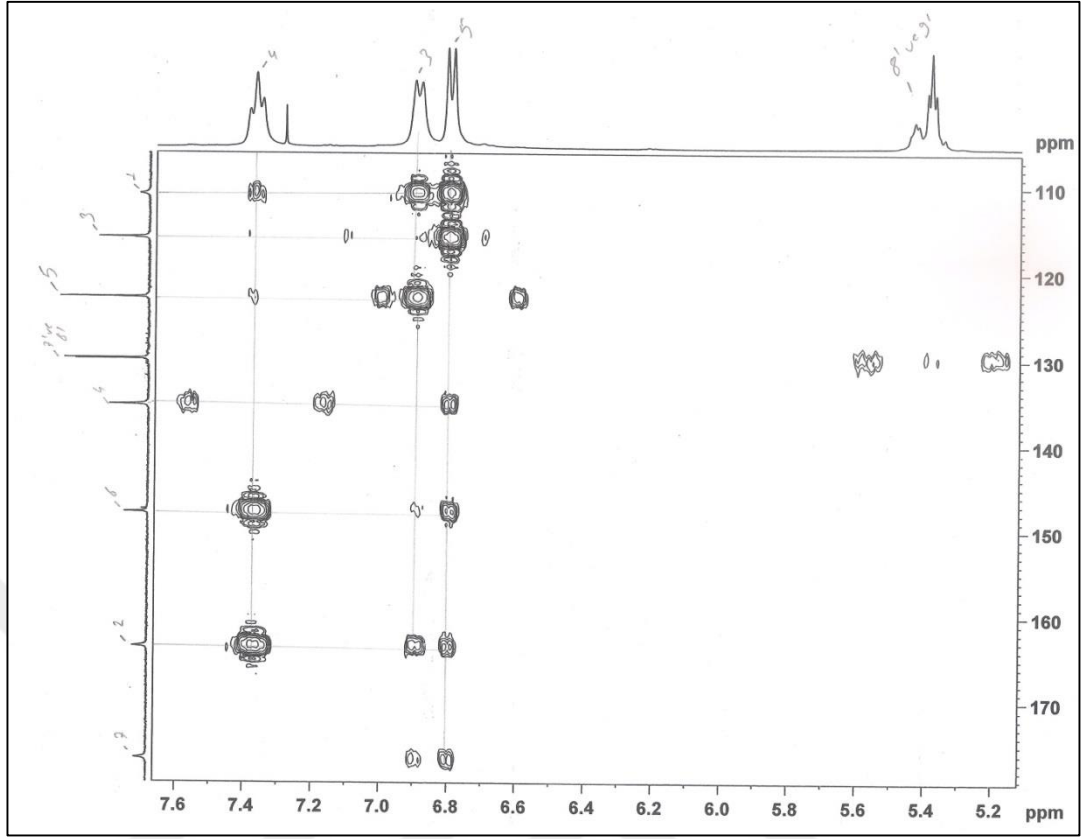
Şekil 3.11. PVK-1'in (Ginkgolic asit 15:1) $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (CDCl_3) spektrumu

PVK-1'in HMQC (Şekil 3.12) ve HMBC (Şekil 3.13) spektrumlarında gözlenen korelasyonlar yorumlanarak spektrumda gözlenen C ve H sinyallerinin hangi C ve H atomlarına ait olduğu başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Bu korelasyonlar önerilen yapı ile tam bir uyum halinde olup PVK-1'in kimyasal yapısının **Ginkgolic asit (Anacardic asit 15:1)** olduğunu doğrulamaktadır. Molekülün HMBC spektrumundan (Şekil 3.14) moleküldeki heteronükleer iki ve üç bağ üzerinden olan etkileşimler Şekil 3.13'de gösterilmiştir.

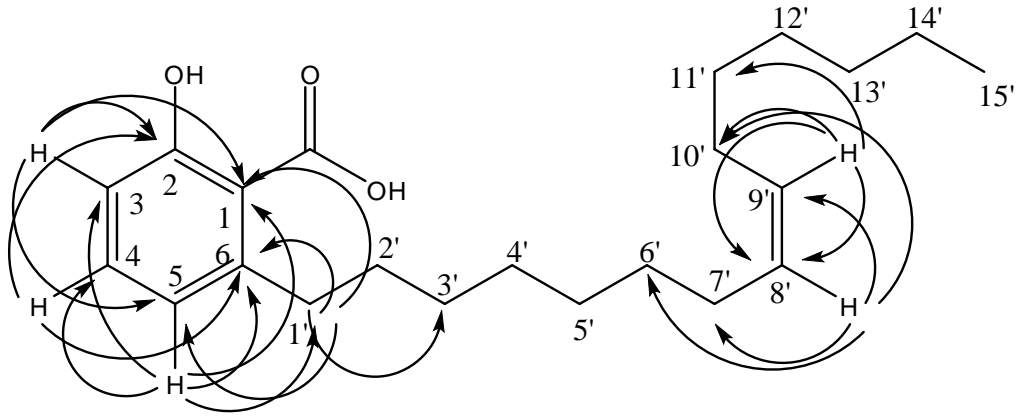


Şekil 3.12. PVK-1'in (Ginkgolic asit) HMQC (CDCl₃) spektrumu



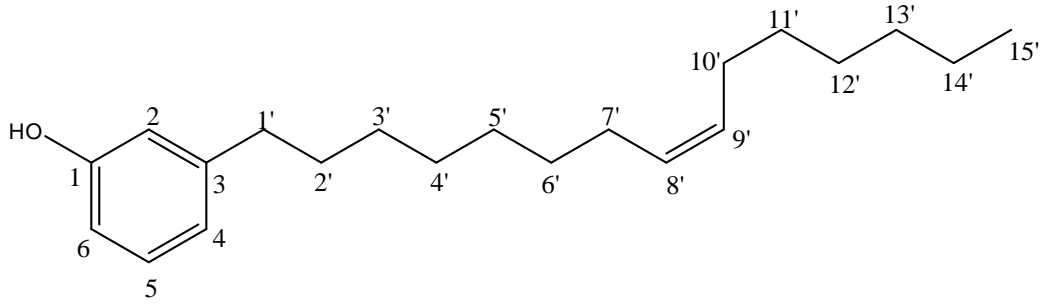


Şekil 3.13. PVK-1'in (Ginkgolic asit) HMBC (CDCl₃) spektrumu



Şekil 3.14. PVK-1'in iki veya üç bağ üzerinden heteronükleer (H→C) bağ korelasyonları

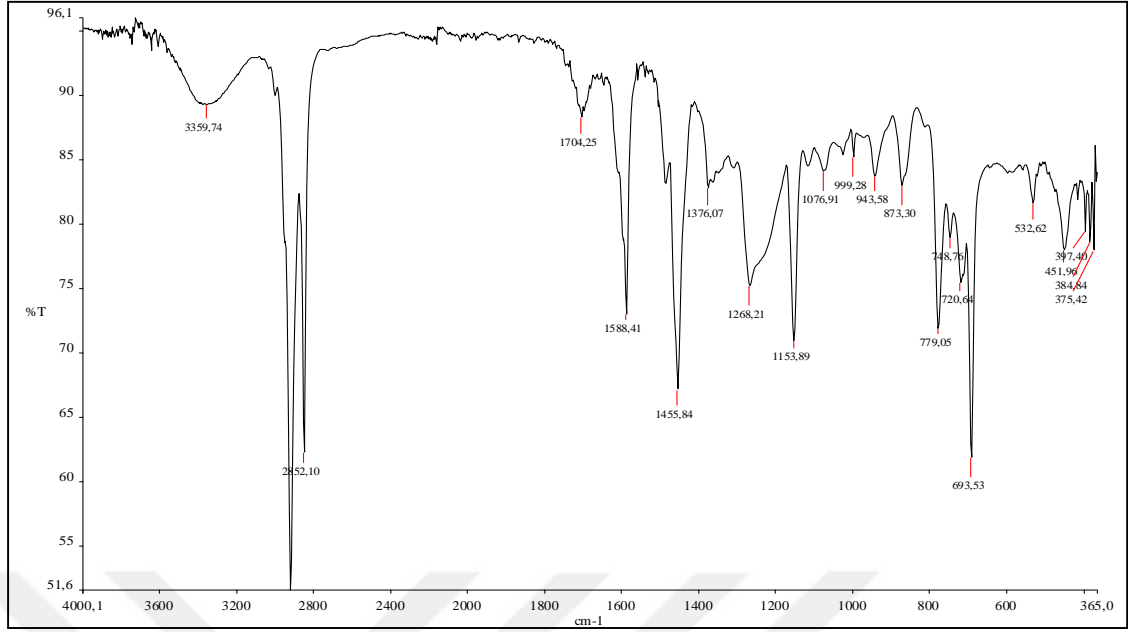
PVK-3 Kodlu Metabolit (Anacardol 15:1, (Z)-3-(pentadek-8-enil)fenol)



C₂₁H₃₄O, MA:302 g/mol

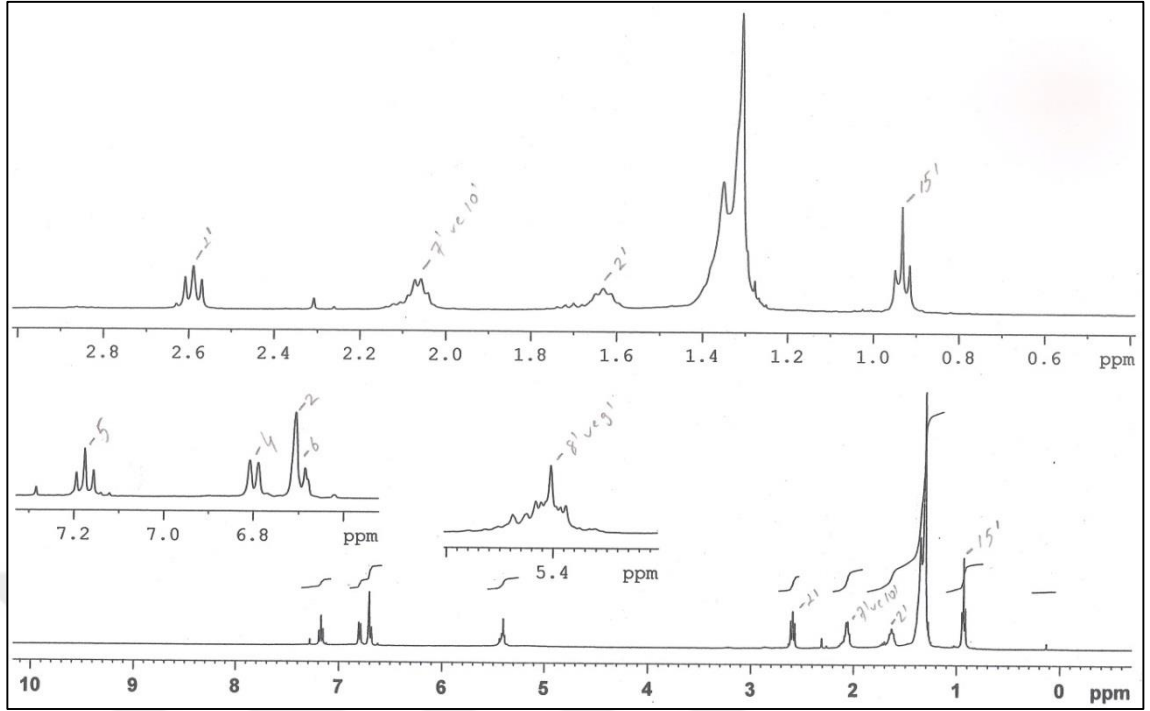
PVK-3 bileşiği, UV₃₆₆ nm de parlak, UV₂₅₄ nm de mor renk veren kırmızımsı renkli viskoz bir madde olarak izole edildi. PVK-3 vanilin/H₂SO₄ (105 °C) reaktifi ile de hafif pembemsi bir renk vermektedir. Maddenin UV₂₅₄ nm de mor renk vermesi fenolik karakterli bir madde olabileceğine işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998).

IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT ¹³C-NMR, HMQC, ¹H-¹H COSY ve HMBC gibi spektral veriler ile PVK-3'ün moleköl yapısı anacardol sınıfı bir madde olarak **anacardol (15:1)** türevi, **(Z)-3-(pentadek-8-enil)fenol** olarak aydınlatılmıştır. Anacardol sınıfı bileşikler doğal, lipidik karakterli fenolik bileşikler olup, anacardic asitlerin ısıtılması ile sentetik olarak da elde edilebilirler. Rf değerine göre PVK-3 PVK-1'e göre daha az polar bir bileşik olup bu durum kimyasal yapıları ile de uyumludur. PVK-3 bileşiğinin IR spektrumunda (Şekil 3.15.) 3351 cm⁻¹ civarında gözlenen absorbands bandı -OH titreşim bandı olup molekülde -OH grubunun olduğuna işaret etmektedir (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998). Aromatik halkadaki C=C bağ titreşimleri, 1400-1600 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gözlenirken, moleküldeki fazla sayıdaki C-H titreşim bantları ise 2800-3000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında şiddetli absorbands bantları gözlemlenmiştir. Bu gözlenen titreşim bantları molekülün aromatik karakterli alifatik gruplar taşıyan lipidik-fenolik bir bileşik olduğuna işaret etmektedir (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998).



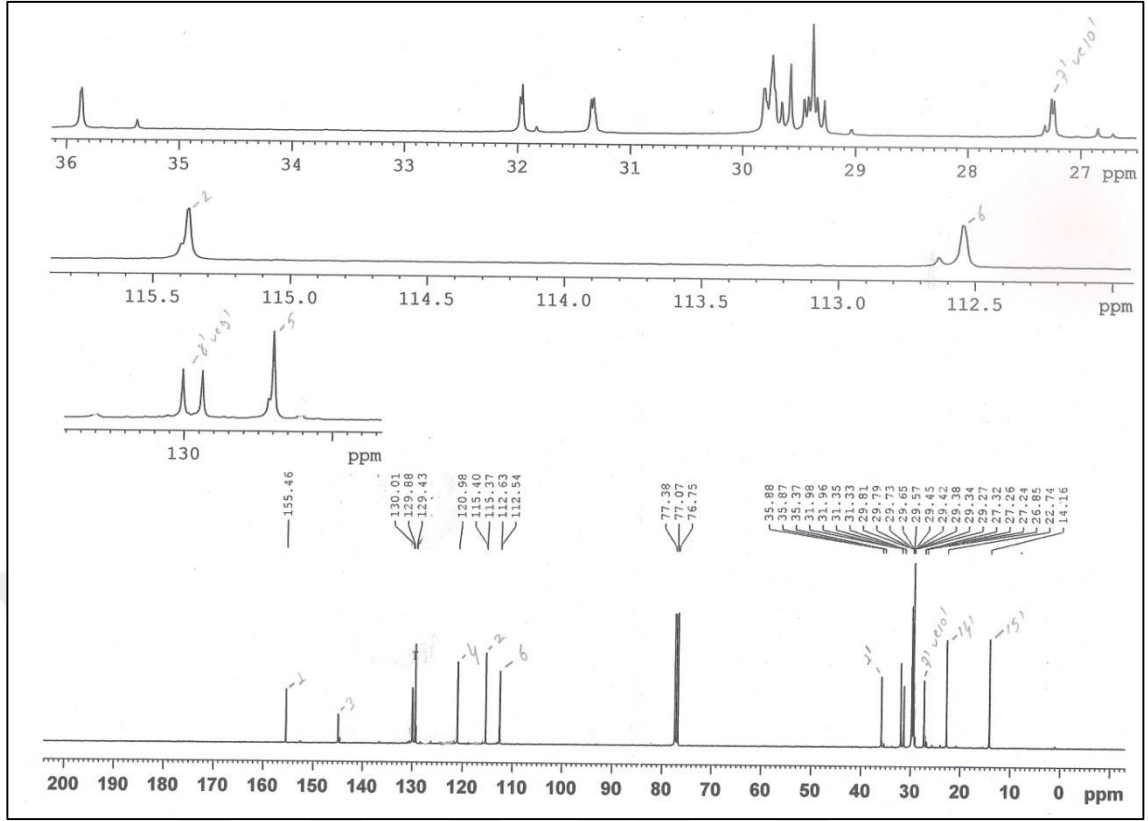
Şekil 3.15. PVK-3 (anacardol 15:1)'ün FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

PVK-3 kimyasal yapı bakımından PVK-1'e çok benzer olup tek fark $-COOH$ grubunun PVK-3 molekülünde olmamasıdır. Bu nedenle bu iki molekülün spektral verileri de birbirine çok benzemektedir. PVK-3'ün ^1H-NMR spektrumunda (Şekil 3.16) önerilen yapı ile tamamen uyumlu rezonans sinyalleri gözlemlenmiştir. Molekülün ^1H-NMR spektrumunda (Şekil 3.16) aromatik H atomlarına ait sinyaller $\delta=6,50-7,50$ ppm arasında gözlenmiş ve bu sinyallerin integrasyon ile dört H atomuna karşılık geldiği belirlenmiştir. H-5 $\delta=7,18$ ppm de *t* ($J=7,64$ Hz) sinyal verirken H-4 ise $\delta=6,80$ ppm de *d* ($J=7,52$ Hz) sinyal vererek rezonans olmuştur. Diğer taraftan H-2 ve H-6' ın kimyasal kayma değerleri birbirine çok yakın bölgede gözlemlenmiş olup H-6' a ait *d* sinyal $\delta=6,70$ ppm de ($J=8,08$ Hz), H-2'e ait *s* sinyal ise $\delta=6,71$ ppm de belirlenmiştir. H-8' ve H-9' a ait olan rezonans sinyalleri $\delta=5,40$ ppm civarında belirlenmiştir. Aromatik halkaya bağlı olan alifatik H-1' $\delta=2,61$ ppm de *t* bir sinyal vermiş olup etkileşme sabitleri $J=7,48$ Hz ve $J=8,04$ Hz olarak tespit edilmiştir. Moleküldeki uç H-15' metil hidrojenleri ise beklenildiği gibi $\delta=0,93$ ppm de rezonans olarak bir *t* sinyal ($J=6,56$ Hz ve $7,00$ Hz) vermiştir. Moleküldeki 9 adet $-CH_2$ hidrojenleri (18 x H) aynı yerde rezonans olarak $\delta=1,30$ ppm de kuvveli *s* sinyal vermiştir (Balcı, 2000; Erdik, 1998).



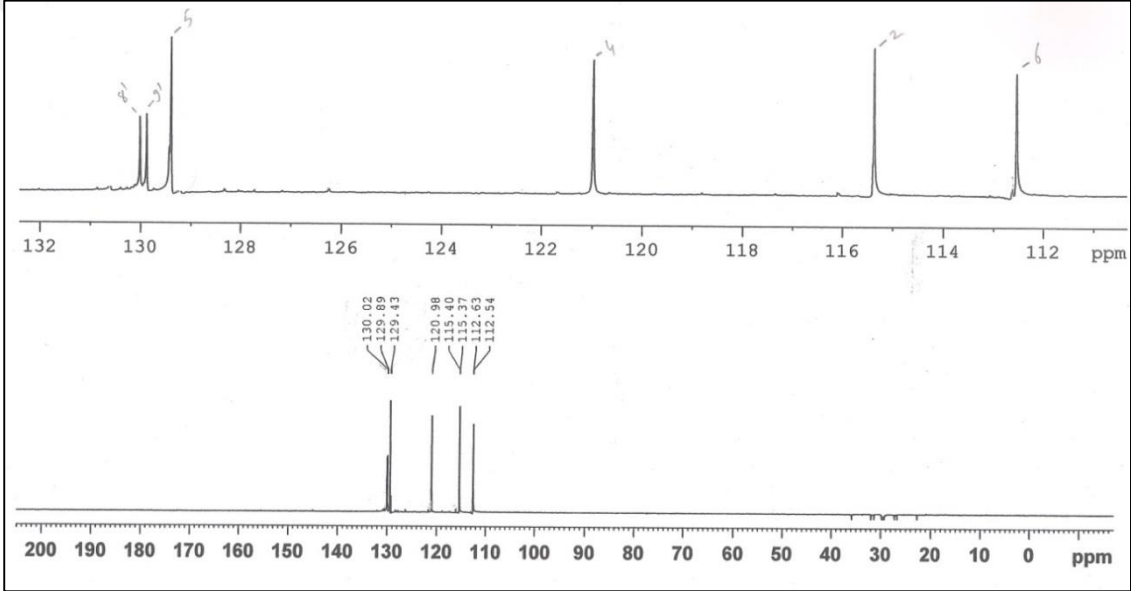
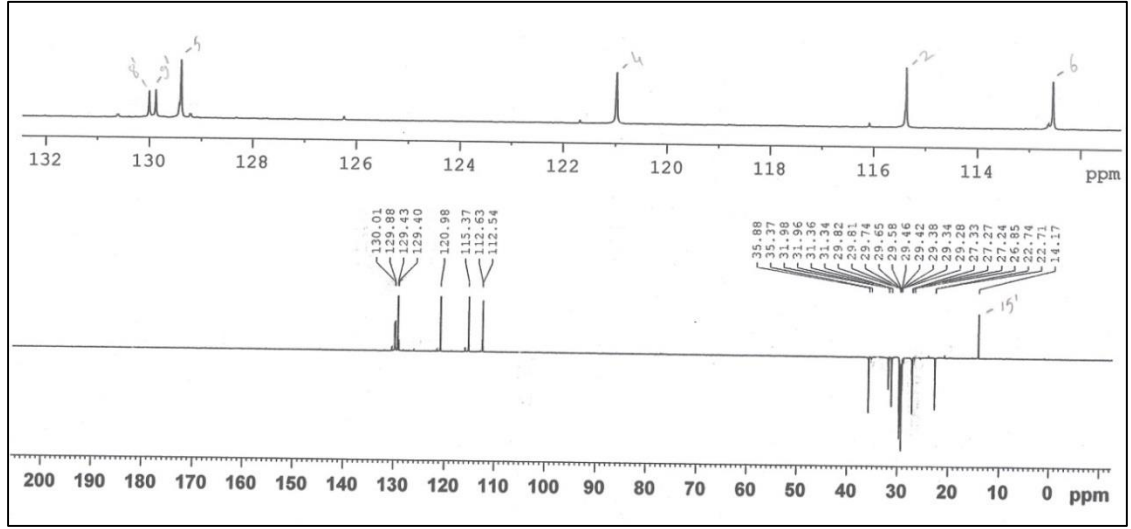
Şekil 3.16. PVK-3'ün (anacardol 15:1) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu

PVK-3'ün $^{13}\text{C-NMR}$ verileri (Şekil 3.17) PVK-1'in NMR verilerine çok benzemekte olup sadece karboksilli asit ($-\text{COOH}$) piki PVK-3 de gözlemlenmemiştir. Bu durum her iki molekülün $-\text{COOH}$ grubu dışında kimyasal yapısının aynı olduğuna işaret etmektedir. PVK-3'ün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.17) molekülün kimyasal yapısı ile uyumlu olarak $\delta=110-160$ ppm aralığında (olefinik ve aromatik bölgede) toplam sekiz C sinyali gözlemlenmiştir. Bu sinyallerden $\delta=155,5$ ppm ve $\delta=145,6$ ppm de gözlenen sinyaller sırasıyla $-\text{OH}$ grubu taşıyan C-1 ve C-3' e ait sinyallerdir. PVK-3'ün DEPT $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.18) da bu sinyaller gözlemlenmemiş olup bu C atomlarının kuarterner C atomları olduğuna delildir. Moleküldeki C-8' ve C-9' olefinik karbonlara ait sinyaller ise PVK-1' in spektral verilerine benzer bir şekilde birbirine çok yakın bölgede $\delta=130,0$ ve $\delta=129,9$ ppm de rezonans olmuşlardır.



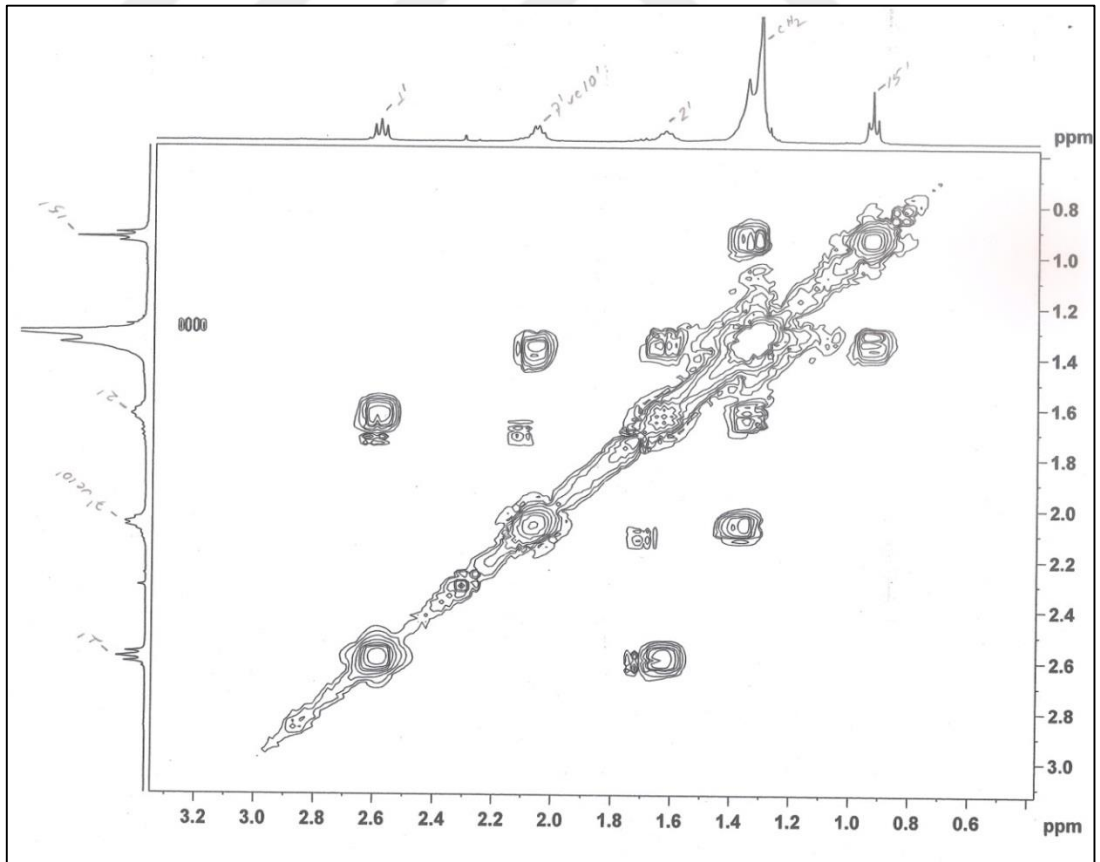
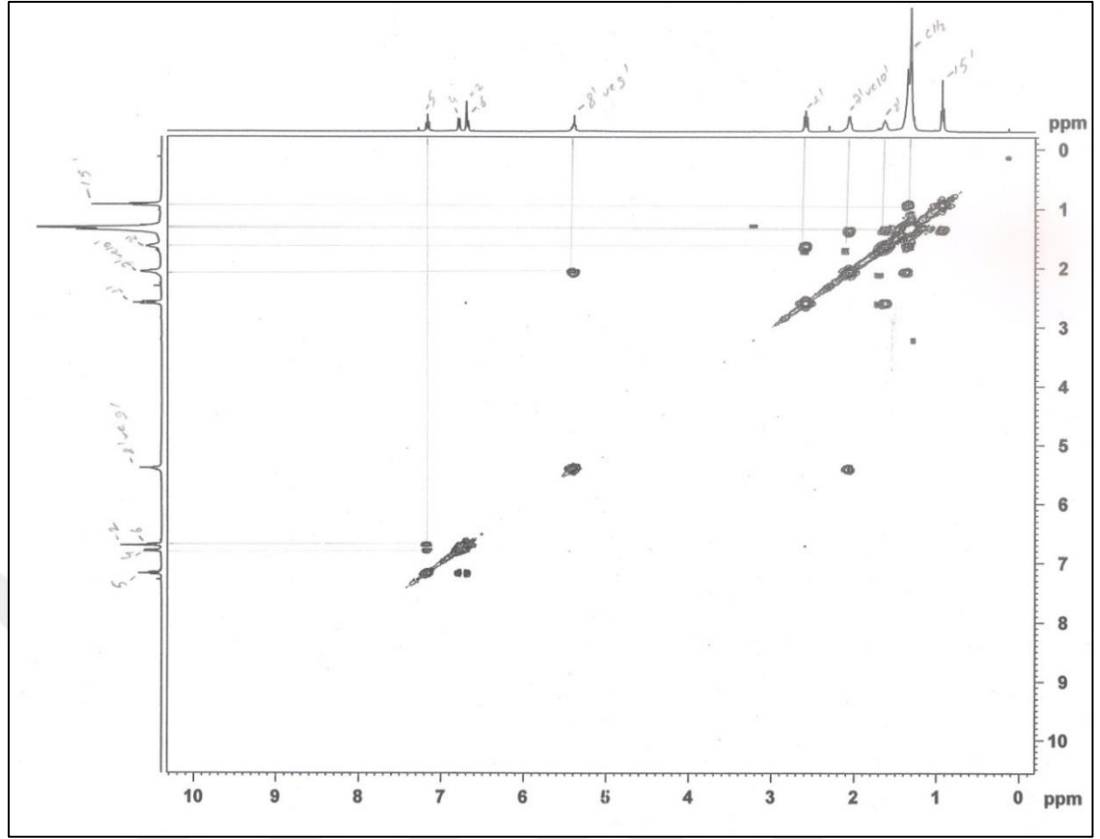
Şekil 3.17. PVK-3'ün (anacardol 15:1) $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu

Molekülün DEPT-90 spektrumunda altı adet CH sinyali gözlemlenmiş olup bu veriler molekül yapısı ile uyumludur. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.17) alifatik bölgede ise çok fazla sayıda C sinyali gözlemlenirken $\delta=35,9$ ppm de ki sinyalin C-1'e, $\delta=22,7$ ppm deki sinyalin C-14' e ve $\delta=14,2$ ppm de gözlenen sinyalin ise C-15'e ait olduğu belirlenmiştir. Molekülün DEPT-135 spektrumundan (Şekil 3.18) da görüleceği üzere alifatik bölgedeki ($\delta=20-40$ ppm) çok fazla sayıdaki C sinyalleri negatif pik vermiş olup tümünün molekül yapısı ile uyumlu olarak $-\text{CH}_2$ gruplarına ait olduğuna delildir (Balci, 2000; Erdik, 1998).



Şekil 3.18. PVK-3'ün (anacardol 15:1) DEPT-135 ve DEPT-90 (CDCl₃) spektrumları

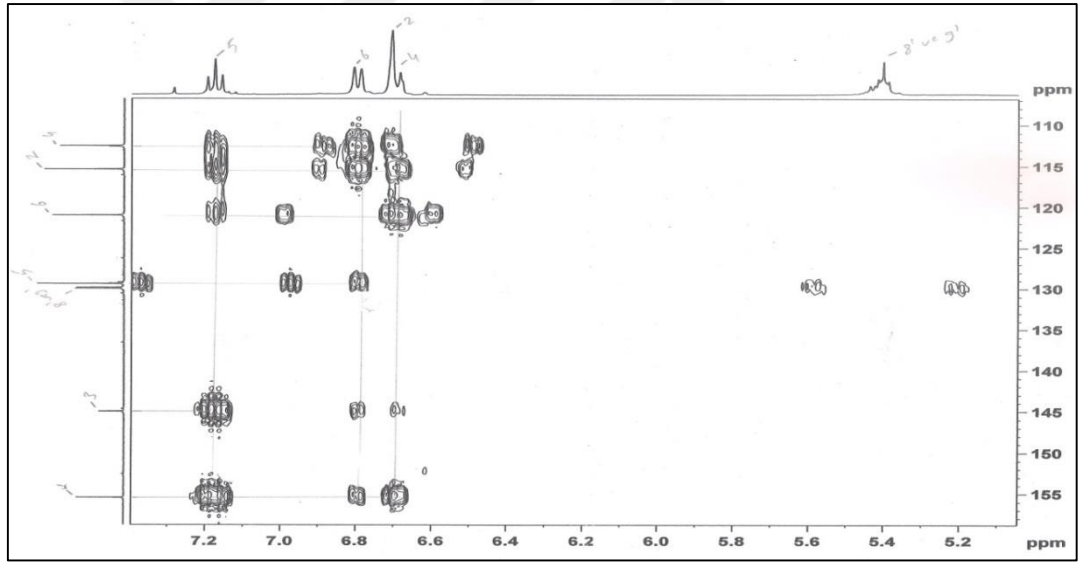
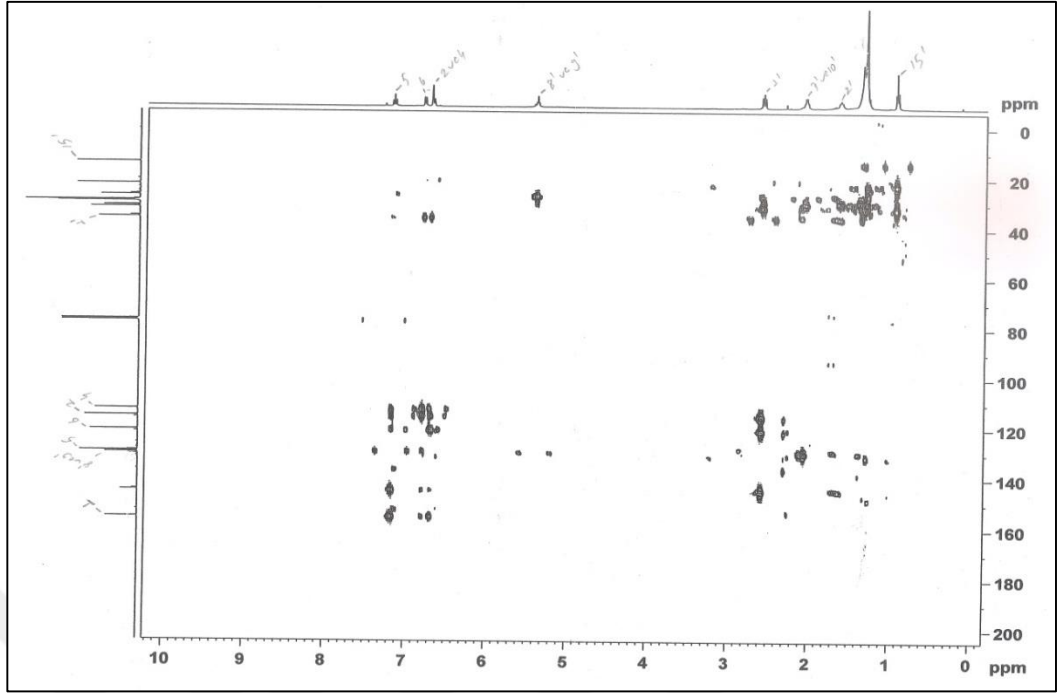
PVK-3'in ¹H,¹H-COSY spektrumunda (Şekil 3.19) $\delta=2,61$ ppm deki H sinyali (H-1') $\delta=1,60-1,73$ ppm aralığındaki *m* (H-2') sinyal ile, H-8' ve H-9'' a ait olan $\delta=5,40$ ppm civarında gözlenen *m* sinyal $\delta=2,07$ ppm deki H-7' ve H-10''e ait sinyallerle, $\delta=7,18$ ppm deki H-5'e ait sinyal ise $\delta=6,70$ ppm ve $\delta=6,80$ ppm deki sırasıyla H-6 ve H-4'e ait sinyallerle korale olmuştur. Bu korulasyonların yanı sıra gözlenen diğer korulasyonlar da molekülün kimyasal yapısını doğrulamaktadır.



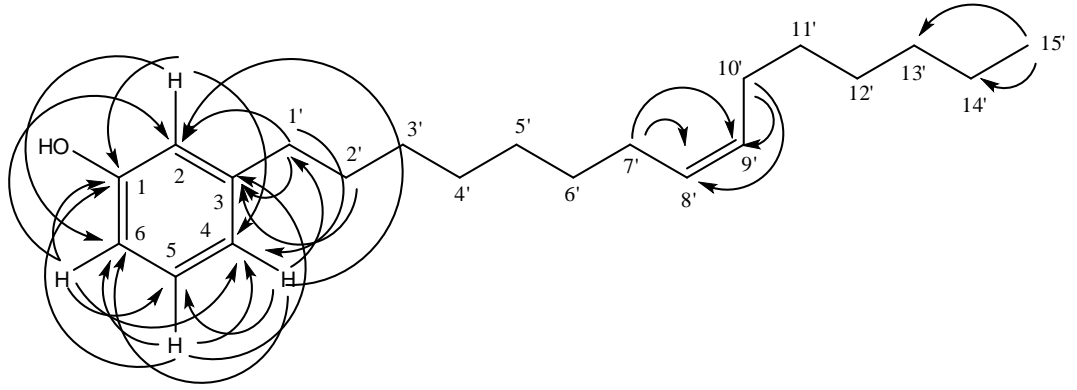
Şekil 3.19. PVK-3'ün (anacardol 15:1) ^1H , ^1H -COSY (CDCl_3) spektrumu

PVK-3'ün HMQC (Şekil 3.20) ve HMBC (Şekil 3.21) spektrumlarında gözlenen korelasyonlar dikkatli bir şekilde yorumlanarak PVK-3'ün ^1H - ve ^{13}C -NMR spektrumlarında gözlenen C ve H sinyalleri analiz edilerek sinyallerin hangi C ve H atomlarına ait olduğu başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Bu korelasyonlar da önerilen yapıyı doğrulayarak PVK-3'ün kimyasal yapısının **anacardol (15:1)** türevi, **(Z)-3-(pentadek-8-enil)fenol** olduğunu doğrulamaktadır. Molekülün HMBC spektrumundan (Şekil 3.21) moleküldeki heteronükleer iki ve üç bağ üzerinden olan etkileşimler Şekil 3.23'de gösterilmiştir.



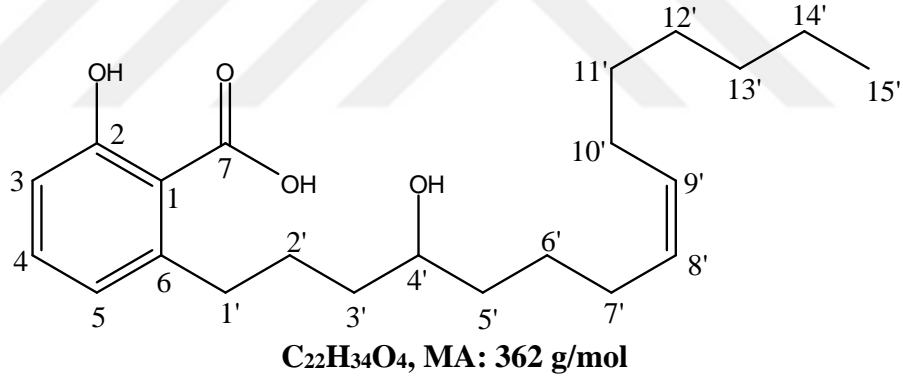


Şekil 3.21. PVK-3'ün (anacardol 15:1) HMBC (CDCl₃) spektrumu



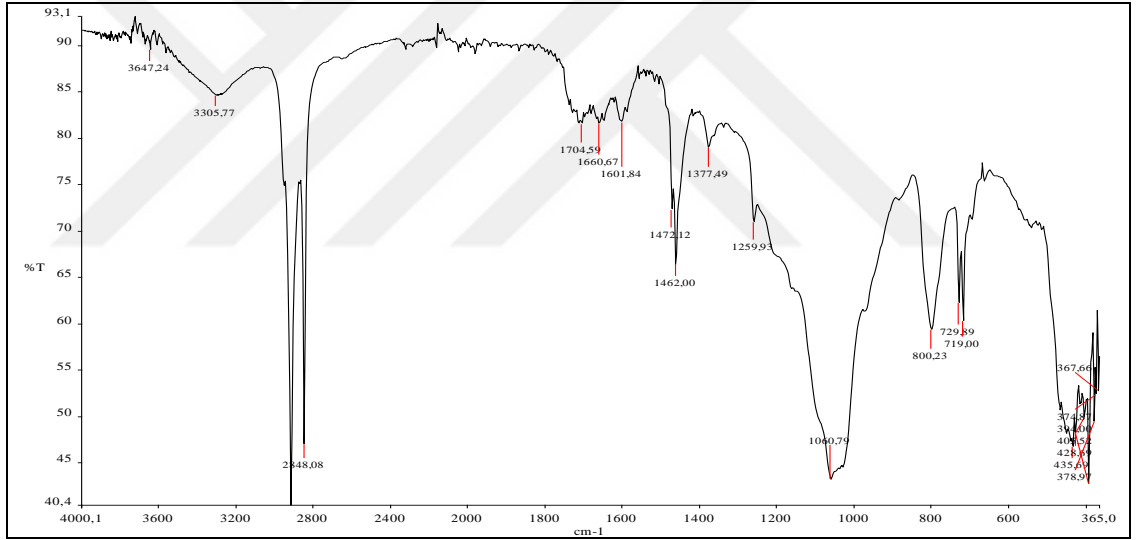
Şekil 3.22. PVK-3'ün iki veya üç bağ üzerinden heteronükleer (H→C) bağ korelasyonları

PVK-4 Kodlu Metabolit (4-Hydroxyanacardic asit 15:1, (Z)-2-Hidroksi-6-(4-hidroksipentadek-8-enil) benzoik asit)



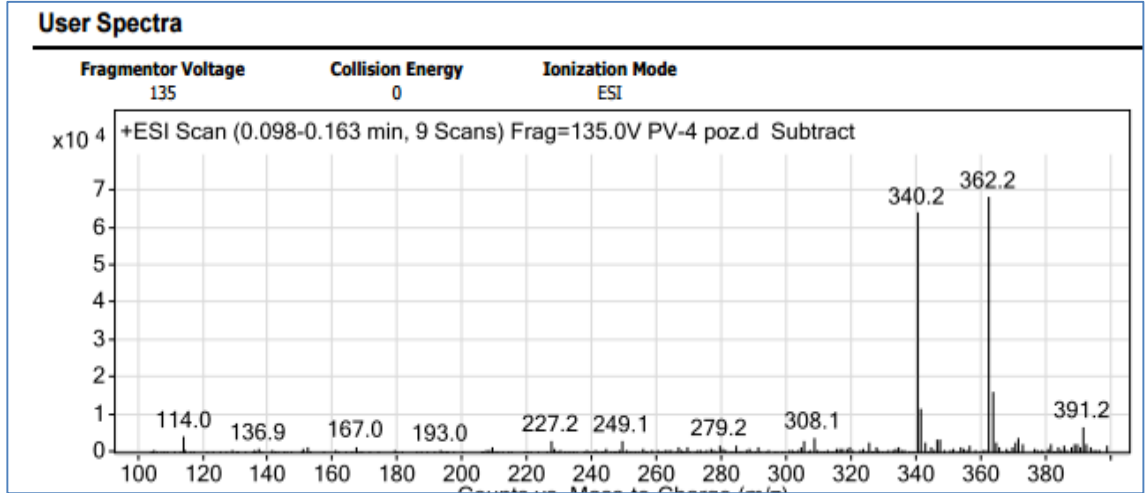
PVK-4 bileşiği, UV₃₆₆ nm de parlak, UV₂₅₄ nm de hafif morumsu renk veren beyaz renkli katı bir madde olarak izole edildi. PVK-4 vanilin/H₂SO₄ (105 °C) reaktifi ile de belirgin olmayan sarımsı bir renk vermektedir. PVK-4 maddesinin bu özellikleri ve R_f değeri bu maddenin de anacardic asit türevi bir bileşik olduğuna işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998). Madde miktarı çok düşük olduğundan maddenin erime noktası tespit edilememiştir.

IR, MS, $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ gibi spektral veriler ile PVK-4'ün molekül yapısı anacardic asit sınıfı bir madde olarak anacardic asit (15:1) türevi, **4-hidroksianacardic asit (15:1) ((Z)-2-hidroksi-6-(4-hidroksipentadek-8-enil) benzoik asit)** olarak aydınlatılmıştır. Daha öncede bahsedildiği gibi bu madde PVK-1'in 4- pozisyonunda –OH grubu taşıyan bir türevidir. PVK-4 bileşiğinin IR spektrumunda (Şekil 3.23) 3306 cm^{-1} civarında gözlenen absorbands bandı –OH titreşim bandı olup molekülde –OH grubunun olduğuna işaret etmektedir (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998). Aromatik karakterli alifatik gruplar taşıyan anacardic asit sınıfı bir bileşikten beklenileceği spektrumda 1400-1600 cm^{-1} dalga boyu aralığında aromatik halkadaki C=C bağ titreşim bantları ile 2800-3000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ise kuvvetli olarak C-H titreşim bantları, 1060 cm^{-1} de C-O titreşim bandı gözlemlenmiştir. (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998).



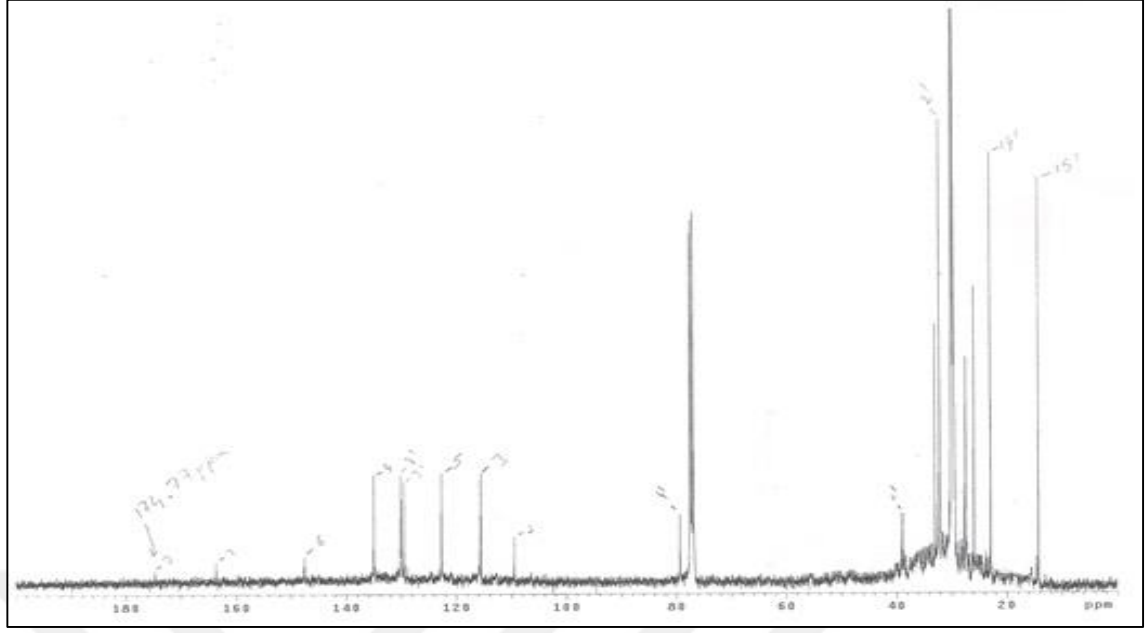
Şekil 3.23. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1)) FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

PVK-4'ün Kütle spektrumunda (Şekil 3.24) $m/z=362$ de gözlenen pik M^{+1} piki olup molekülün molekül kütesinin 362 g/mol olduğuna işaret etmektedir. Bu M^{+1} piki ise molekül yapısı ile uyumludur.



Şekil 3.24. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1) kütle spektrumu

PVK-4 miktar bakımından düşük olduğundan 2D-NMR spektrumları alınamamıştır. Diğer taraftan bileşiğin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektral verileri (Şekil 3.25 ve 3.26) çok küçük bir farklılıklarla PVK-1'in spektral verilerine çok benzemektedir. Bu bilgilerden ve de kütle spektrumundaki M⁺ pikinden yola çıkarak molekülün anacardic asitin (15:1) hidroksi türevi olduğu belirlendi. Spektral verilerle –OH grubunun pozisyonunu belirlemek oldukça zordur. Yapılan literatür taramasında anacardic asitlerin 4-hidroksi türevlerine doğada rastlanmış ve bileşiğin kimyasal yapısının muhtemelen 4-hidroksianakardik asit olduğu belirlenmiştir. Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.25) $\delta=7,15$ ppm de H-4 *t* sinyal ($J=7,64$ Hz) verirken, H-3 $\delta=6,86$ ppm de d ($J=7,44$ Hz) sinyal, H-5 ise $\delta=6,76$ ppm de d sinyal ($J=7,36$ Hz) vermişlerdir. H-8' ve H-9' olefinik hidrojenleri ise yine $\delta=5,38$ ppm civarında *m* sinyal vererek rezonans olmuştur. H-1'' e ait rezonans sinyali $\delta=2,97$ ppm de *t* ($J=7,76$ Hz ve 7,84 Hz) sinyal olarak gözlenirken, H-4'' e ait rezonans sinyali ise $\delta=3,20-3,30$ ppm aralığında *m* olarak gözlemlenmiştir. Moleküldeki bir adet –CH₃ sinyalleri (H-15') ise $\delta=0,90$ ppm de beklenildiği gibi *t* sinyal ($J=6,44$ Hz ve 7,00 Hz) verirken, fazla sayıdaki –CH₂ grubuna ait rezonans sinyali ise $\delta=1,28$ ppm de şiddetli bir sinyal olarak gözlemlenmiştir.

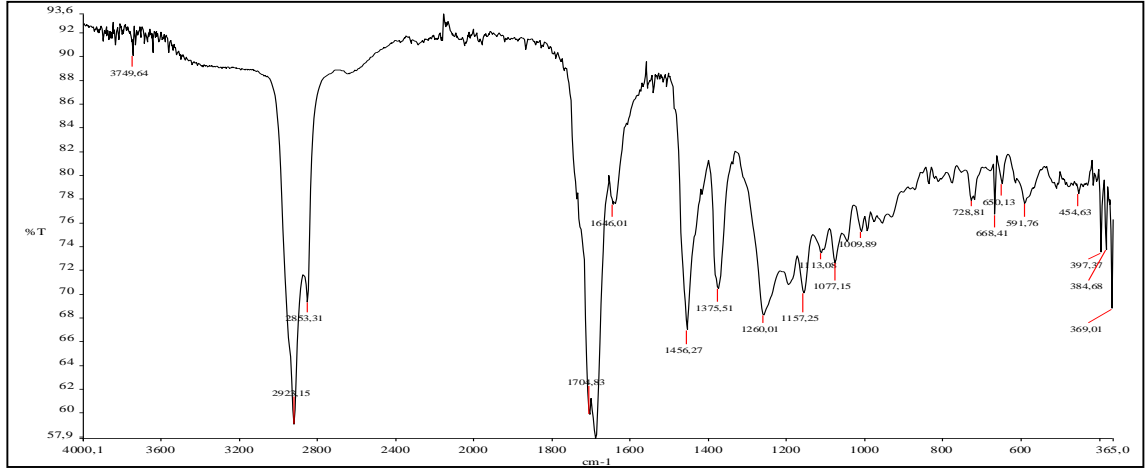


Şekil 3.26. PVK-4'ün (4-hidroksianacardic asit (15:1)) ^{13}C -NMR (CDCl_3) spektrumu

Diğer taraftan, IR, MS, ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR verilerinden bileşiğin kimyasal yapısı **4-hydroxycardic asit (15:1) veya (Z)-2-hidroksi-6-(4-hidroksipentadek-8-enil)**

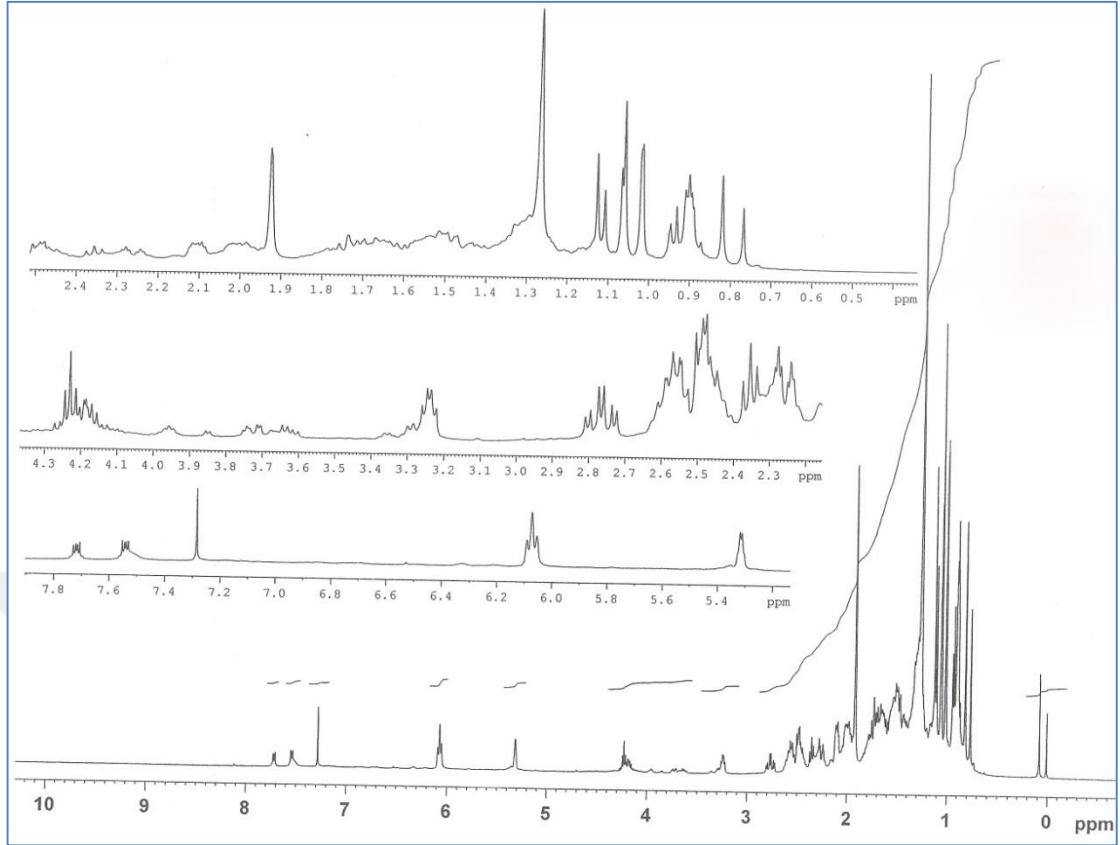
PVK-5 Kodlu Metabolit

PVK-5 UV_{366} nm de renk vermeyen, UV_{254} nm de hafif morumsu renk veren beyaz renkli katı bir madde olarak izole edildi. PVK-5 vanilin/ H_2SO_4 (105 °C) reaktifi ile pembe-kırmızımsı bir renk verdiği tespit edildi. Bu verilerden yola çıkarak PVK-5 maddesinin terpenik veya steroidal yapılu bir madde olabileceği düşünüldü (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998). PVK-5' in IR spektrumunda (Şekil 3.27) 3300 cm^{-1} de gözlenen çok küçük absorpsiyon bandı (-OH titreşim bandı), $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ aralığında -CH titreşim bantları ve 1705 cm^{-1} de karbonil grubu (C=O) titreşim bandı gözlemlenmiştir. Bu veriler bizde PVK-5'in karbonil grubu içeren bir terpen veya steroid sınıfı bir madde olabileceği düşüncesini doğurdu.

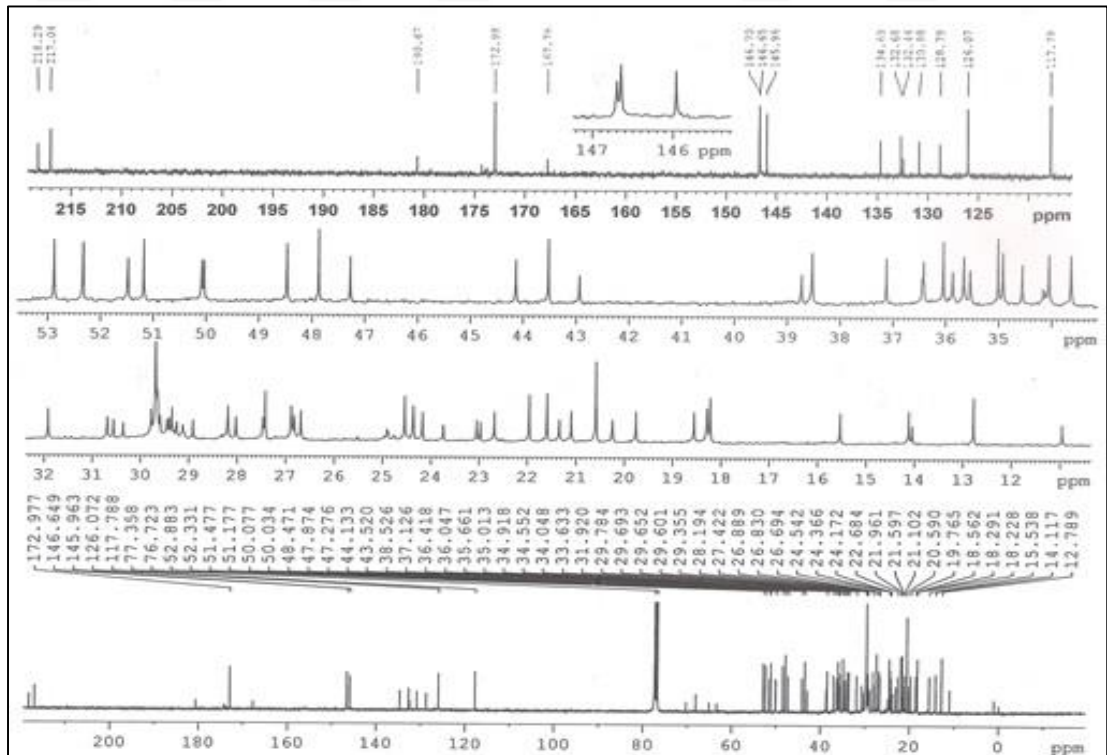


Şekil 3.27. PVK-5'in FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

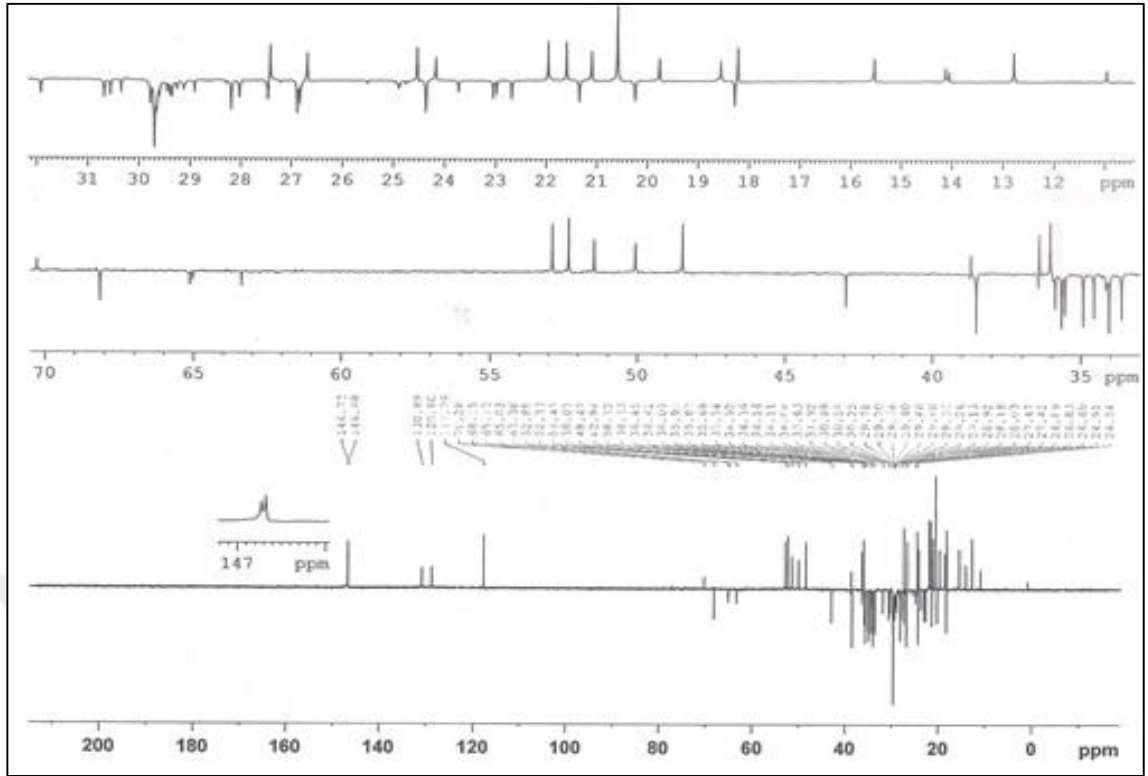
PVK-5'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.28) gözlenen rezonans sinyalleri de molekülün bir terpen veya steroid sınıfı bir bileşik olduğuna işaret etmektedir. Ancak PVK-5'in $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.29) fazla miktarda gözlenen C sinyalleri PVK-5 in saf bir madde olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde PVK-5'in DEPT-135 (Şekil 3.30) ve DEPT-90 (Şekil 3.31) spektrumlarında gözlenen sinyallerde PVK-5 saf olmayıp iki maddenin karışımı olduğunu göstermektedir. PVK-5'in NMR verileri üzerinde yapılan yorumlara dayanarak bu karışımın anacardic asit türevi bir bileşiğin yanı sıra terpenik veya steroidal sınıfı bir madde içerdiğini göstermiştir. PVK-5'in $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$, HMOC ve HMBC spektrumları alınmış ancak bir karışıma ait olduğu için tezde sunulmamıştır. Maddelerin birbirinden Kromatografik yöntemlerle veya kristallendirme yöntemi ile ayrılması ve yapılarının belirlenmesine yönelik çalışmalar devam ettirilecektir.



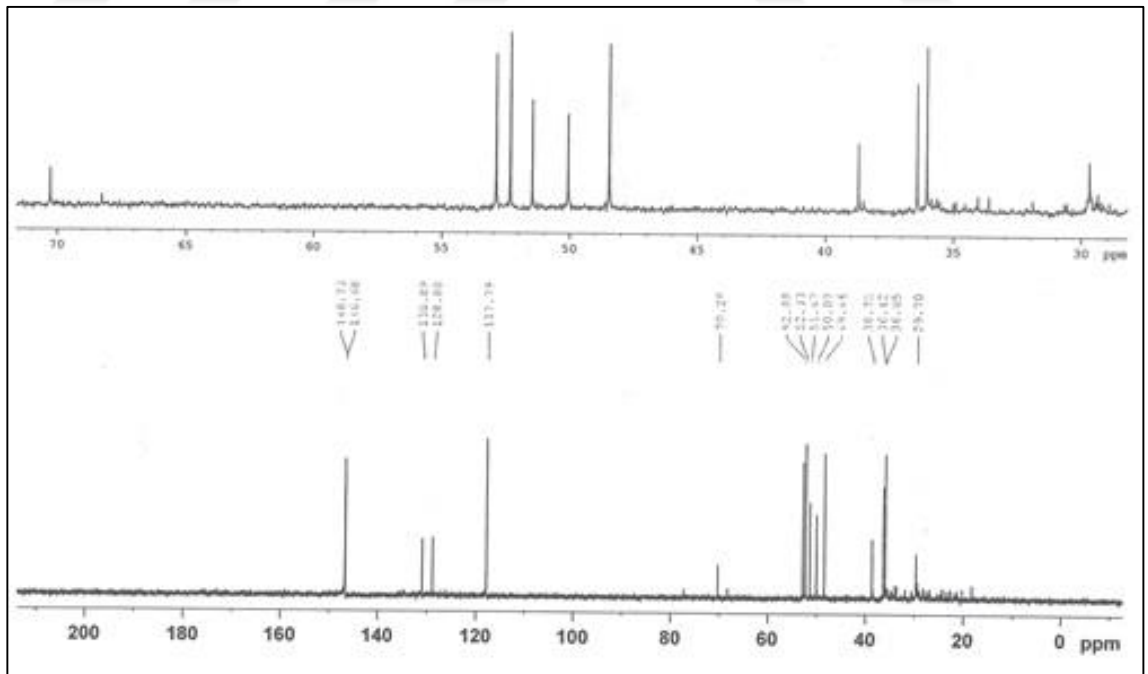
Şekil 3.28. PVK-5'in $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu



Şekil 3.29. PVK-5'in $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu

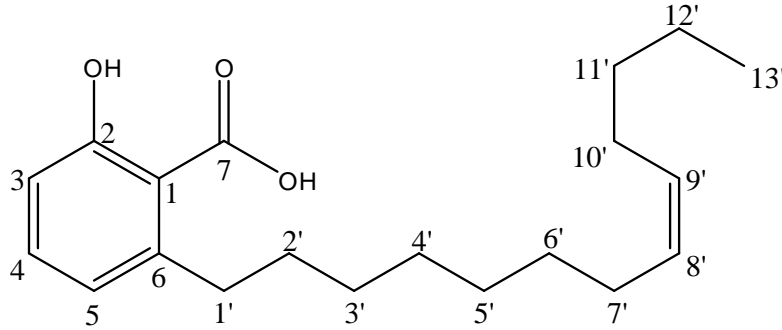


Şekil 3.30. PVK-5'in DEPT-135 (CDCl₃) spektrumu



Şekil 3.31. PVK-5'in DEPT-90 (CDCl₃) spektrumu

PVK-6 Kodlu Metabolit (Anacardic acid (13:1), (Z)-2-Hidroksi-6-[tridek-8-enil]benzoik asit)



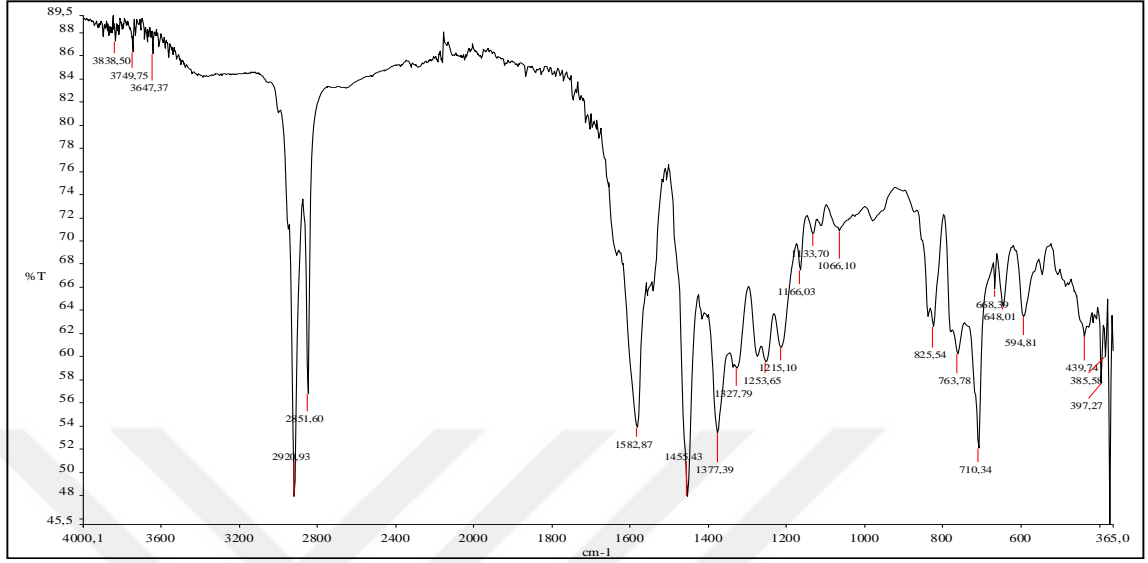
C₂₀H₃₀O₃, MA:318 g/mol

PVK-6 bileşiği, UV₃₆₆ nm de parlak, UV₂₅₄ nm de mor renk veren kahverengimsi görünlü bir katı madde olarak izole edildi. PVK-5 vanilin/H₂SO₄ (105 °C) reaktifi püskürttükten sonra ısıtılması durumunda ise pembe bir renk verdiği tespit edilmiştir. Maddenin UV₂₅₄ nm de mor renk vermesi fenolik karakterli bir madde olabileceğine işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998).

IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT ¹³C-NMR, HMQC, ¹H-¹H COSY ve HMBC gibi spektral veriler ile PVK-3'ün molekül yapısı anacardol sınıfı bir madde olarak **anacardic acid (13:1)** türevi, **(Z)-2-hidroksi-6-[tridek-8-enil]benzoik asit** olarak aydınlatılmıştır. Anacardic acid türevi bir bileşik olup kimyasal yapı bakımından PVK-1 ve PVK-4 metabolitlerine çok benzemektedir . CH₂Cl₂-EtOAc (8:2) mobil fazında yapılan İTK kromatogramında (Şekil 3.2) PVK-1 ile PVK-6'ın R_f değerleri birbirine oldukça yakın olduğu ve de PVK-6'ün biraz daha polar karakterli olduğu belirlenmiştir. Bu durum lipidik kısımdaki C zincirinin daha kısa olması ile açıklanabilir.

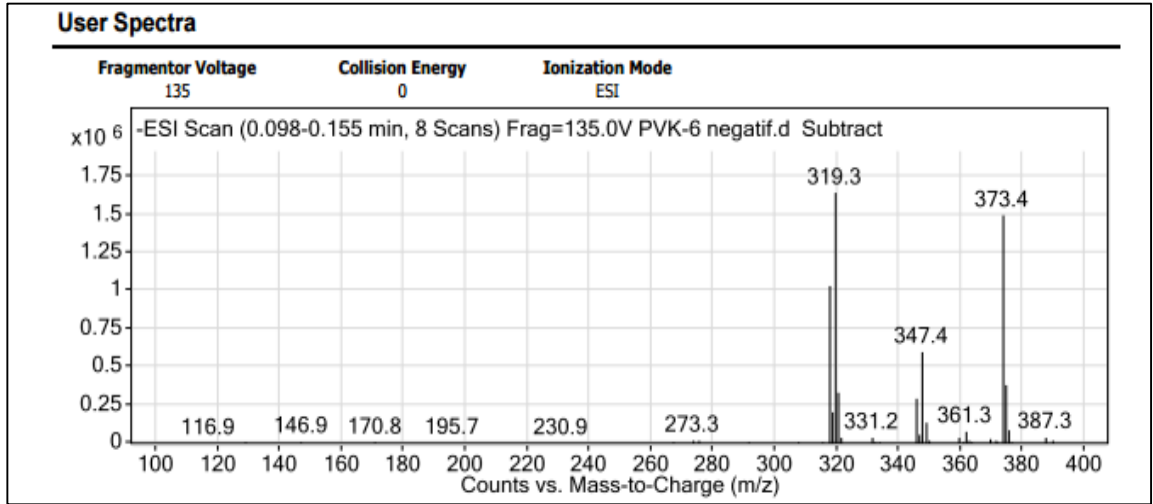
PVK-6 metabolitinin IR spektrumunda (Şekil 3.32) 3300 cm⁻¹ civarında gözlenen zayıf absorbands bandı moleküldeki -OH titreşiminden ileri gelmekte olup molekülde -OH grubunun olduğuna işaret etmektedir (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998). Aromatik halkadaki C=C bağ titreşimleri, 1400-1600 cm⁻¹ dalga boyu aralığında, lipidik zincirdeki C-H titreşim bantları ise 2800-3000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında şiddetli absorbands bantları halinde gözlemlenmiştir. Bu gözlenen titreşim bantları molekülün

aromatik karakterli alifatik gruplar taşıyan lipidik-fenolik bir bileşik olduğunu doğrulamaktadır (Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998).



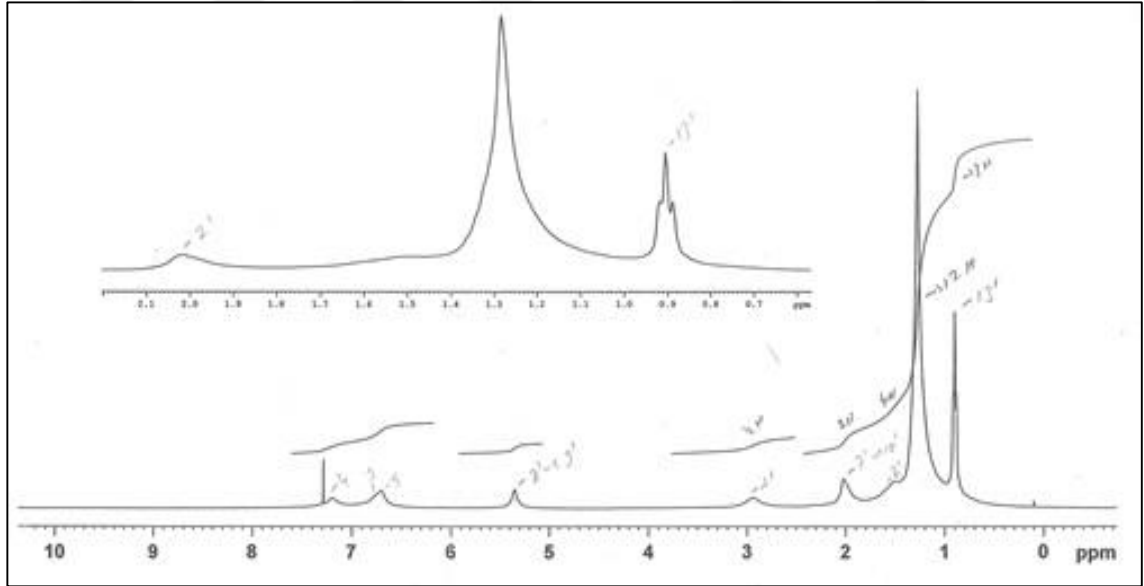
Şekil 3.32. PVK-6'nin FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

PVK-6'nin MS spektrumundan (Şekil 3.33) $m/z=318$ ve $m/z=319$ da gözlenen M^{+1} pikleri molekülün anacardic acid (13:1) türevi bir bileşik olduğuna işaret etmektedir (Ahlemeyer ve ark., 2001; Fukuda ve ark., 2009).



Şekil 3.33. PVK-6'nin Kütle spektrumu

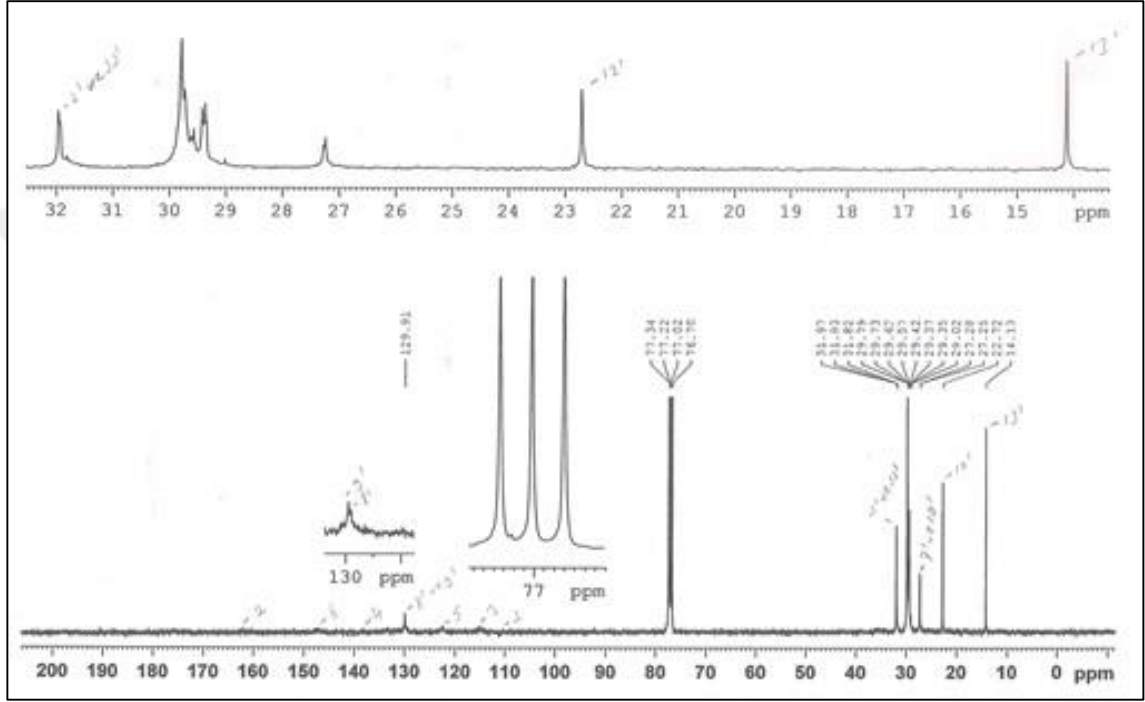
PVK-6'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.34) gözlenen rezonans sinyalleri ile PVK-1'in (anacardic acid 15:1) $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.8) gözlenen rezonans sinyalleri birbirine çok benzemektedir. Bu benzer rezonans sinyalleri de molekülün anacardic asit türevi bir bileşik olduğunu doğrulamaktadır. Ancak PVK-6'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu iyi alınmamış ve sinyallerdeki yarılmalar iyi bir şekilde görülmemiştir. H-4'e ait sinyal $\delta=7,19$ ppm de geniş bir singlet olarak gözlemlenirken, H-3 ve H-5 ise birbirine yakın bölgede $\delta=6,70$ ppm de birbirinden iyi ayrılmamış *d* sinyal vererek rezonans olmuşlardır. Olefinik hidrojenler H-8' ve H-9' e ait rezonans sinyaller ise $\delta=5,35$ ppm belirlenmiştir. $\delta=2,94$ ppm de gözlenen rezonans sinyali H-1''e aitken, H-7' ve H-10' ise $\delta=2,02$ ppm de rezonans olmuşlardır. Moleküldeki fazla sayıdaki $-\text{CH}_2-$ grubu hidrojenleri aynı kimyasal kayma değerlerine sahip olup $\delta=1,28$ ppm de şiddetli bir pik vermiştir. İntegrasyon ile bu piki veren H atomu sayısı oniki olarak belirlenmiş olup bu ise 6 adet $-\text{CH}_2-$ grubuna tekabül etmektedir. Bu bilgiler ışığında PVK-6'nin alifatik zincirinin uzunluğu on üç C atomlu olarak belirlenmiştir. Alifatik $-\text{CH}_3$ hidrojenlerine ait rezonans sinyalleri ise $\delta=0,91$ ppm de *t* ($J=6,84$ ve $6,92$ Hz) olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 3.34. PVK-6'nin (anacardic acid (13:1)) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu

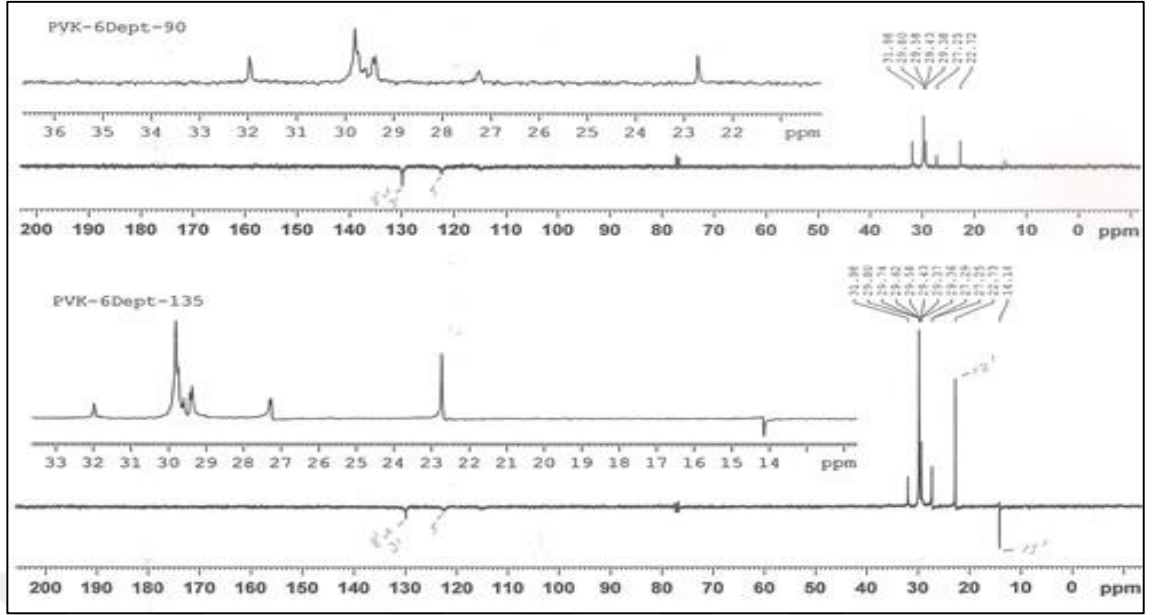
PVK-6'nin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.35) gözlenen rezonans sinyalleri ile PVK-1'in (anacardic acid 15:1) $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.9) gözlenen rezonans sinyalleri ile birbirine benzemektedir. Özellikle alifatik bölgede ($\delta=5-40$ ppm aralığı)

gözlenen C sinyalleri molekülün anacardic asit türevi bir metabolit olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır. Diğer taraftan Şekil 3.33'den görüleceği üzere aşağı alanda gözlenmesi gereken aromatik ve olefinik C atomlarına ait C sinyalleri iyi gözlenmemiştir. Bununla beraber PVK-1 ile kimyasal yapı benzerliğine dayanarak gözlenen küçük sinyaller dikkate alınarak kimyasal kayma değerleri her C atomu için belirlenmiştir.



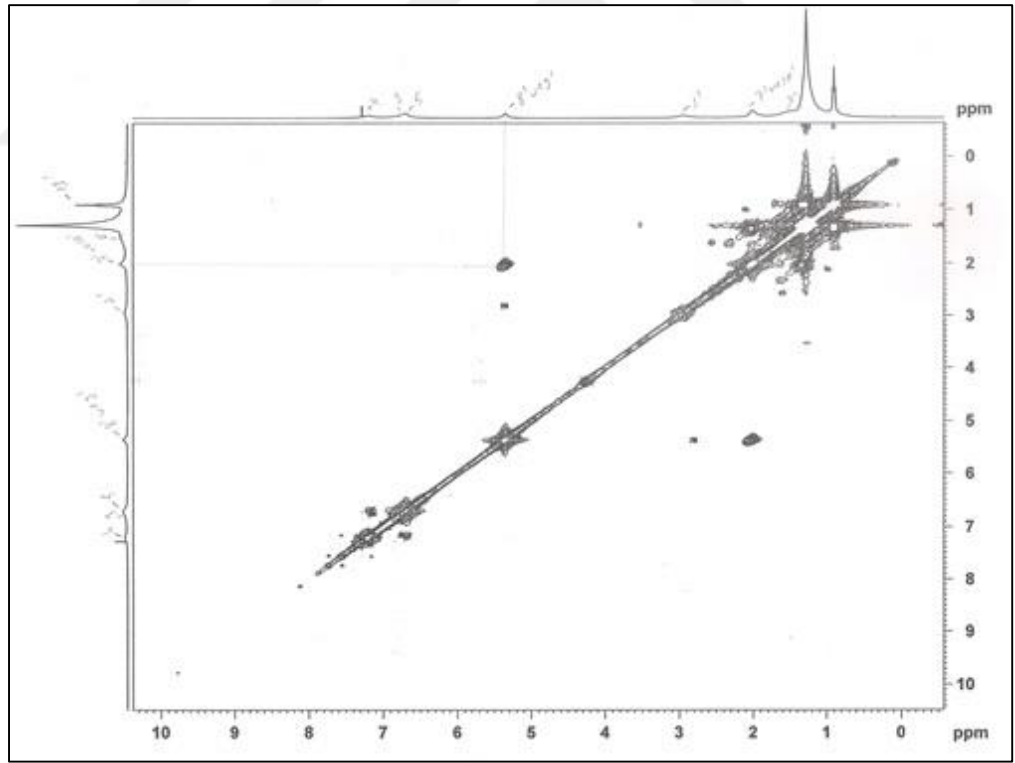
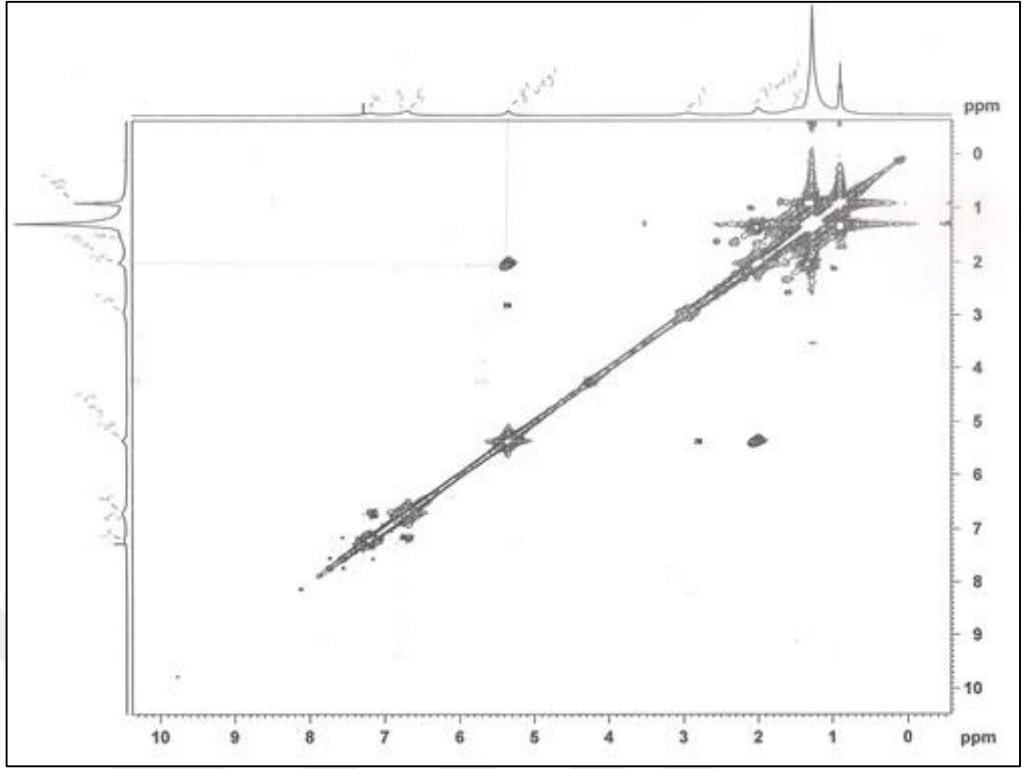
Şekil 3.35. PVK-6'ın (anacardic acid (13:1)) ^{13}C -NMR (CDCl_3) spektrumu

Benzer şekilde PVK-6'ın DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumlarında (Şekil 3.36) aşağı alandaki C sinyalleri iyi gözlemlenememiş olmasına karşın rezonans sinyalleri molekülün önerilen kimyasal yapısı ile uyum halindedir (Balcı, 2000; Erdik, 1998). Molekülün DEPT-135 spektrumunda beklenildiği gibi yukarı alanda ($\delta=5-50$ ppm arası) bir adet pozitif $-\text{CH}_3$ sinyali ($\delta=14,1$ ppm) gözlemlenirken diğer sinyallerin tümü pozitif olup $-\text{CH}_2$ grubuna ait kimyasal kayma değerleridir. Diğer taraftan aromatik C sinyalleri spektrumlarda iyi gözlemlenememiştir.

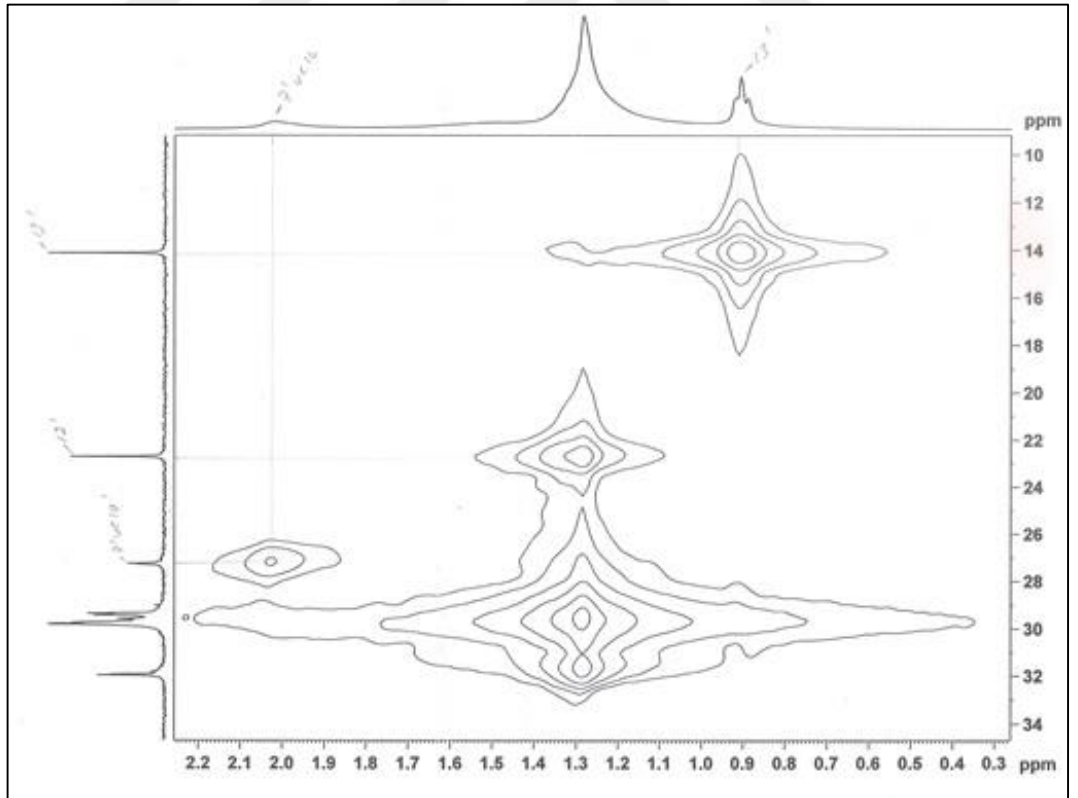
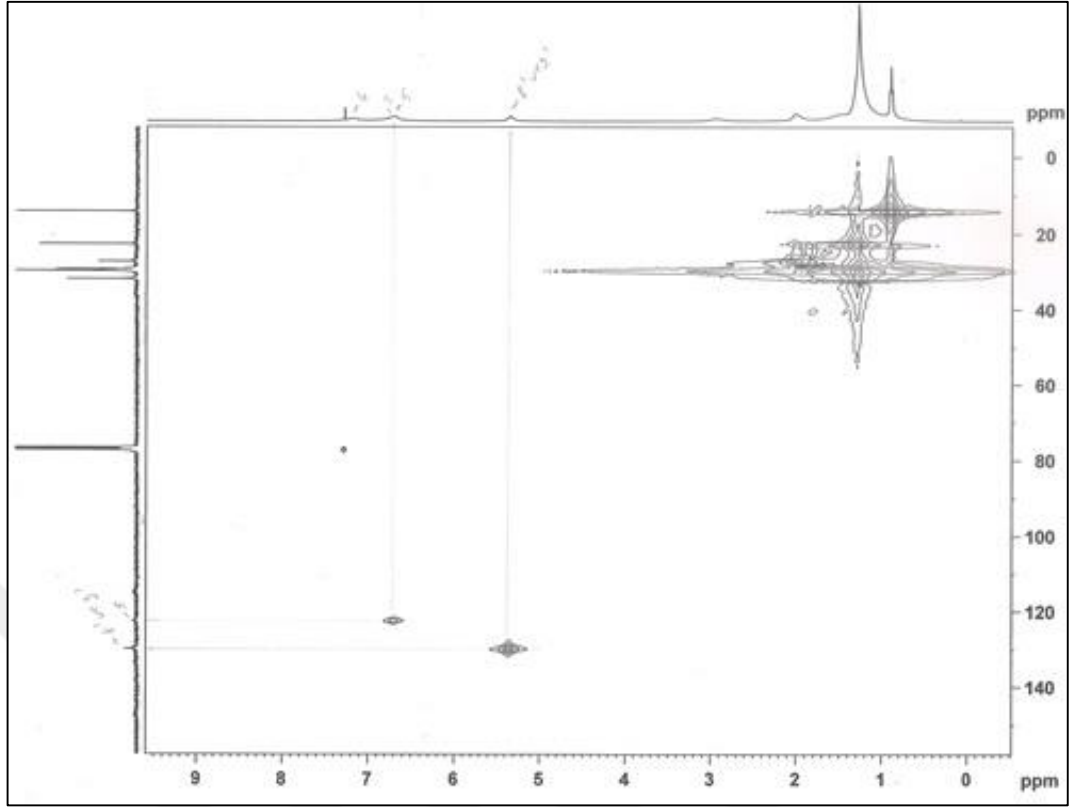


Şekil 3.36. PVK-6'nin (anacardic acid (13:1)) DEPT-135 ve DEPT-90 (CDCl₃) spektrumu

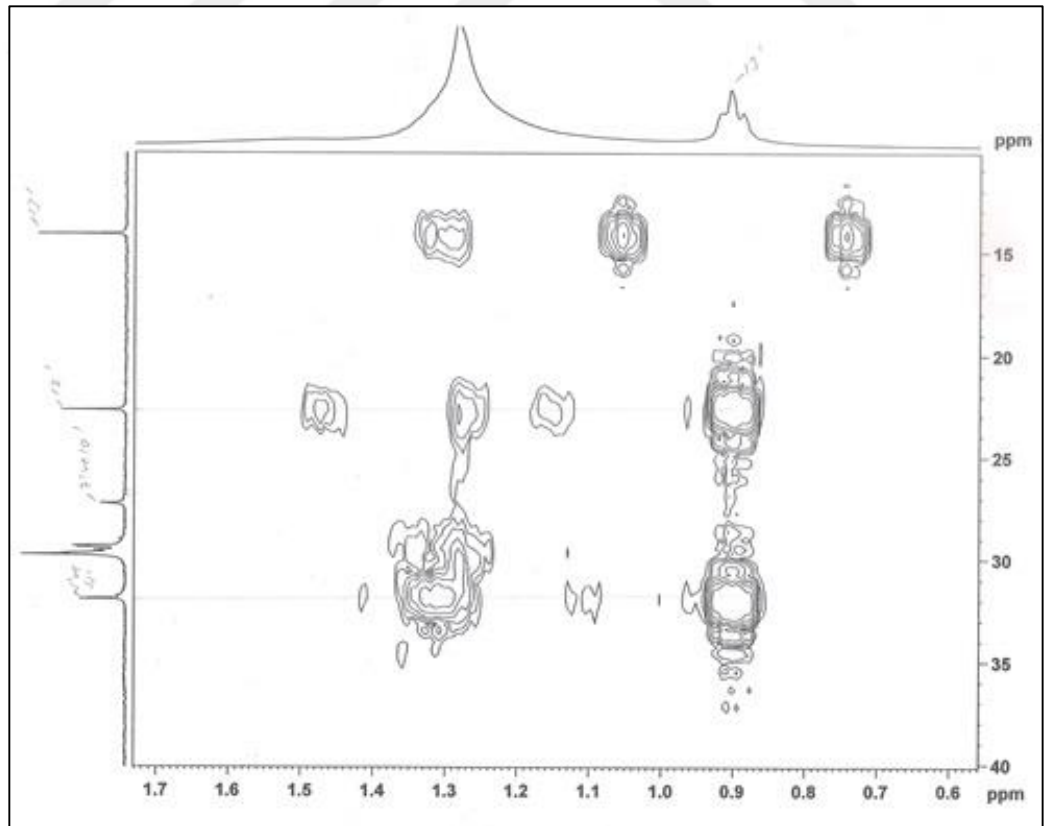
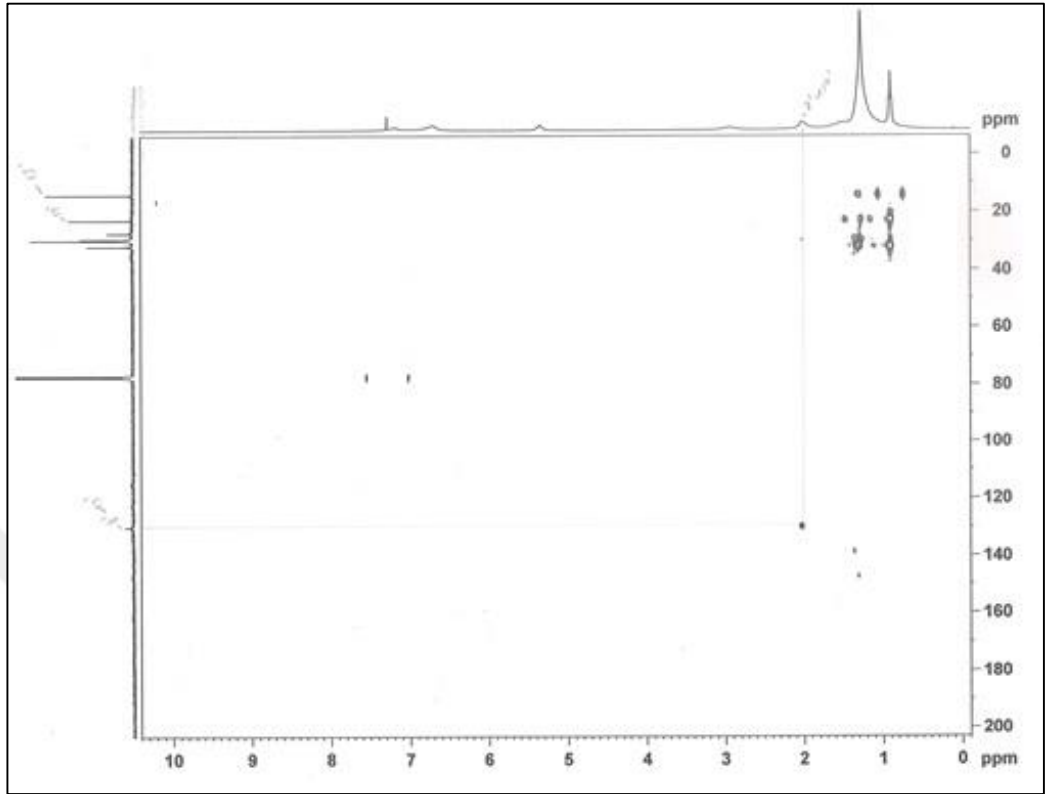
Aşağı alanda gözlenemeyen C sinyallerine rağmen PVK-6'nin ¹H, ¹H-COSY (Şekil 3.37), HMQC (Şekil 3.38) ve HMBC (Şekil 3.39) spektrumlarında gözlenen korelasyonlar yorumlanarak spektrumda gözlenen C ve H sinyalleri başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Tüm spektral veriler PVK-6'nin kimyasal yapısının **Anacardic acid (13:1), (Z)-2-Hidroksi-6-[tridek-8-enil]benzoik** asit olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 3.37. PVK-6'in (anacardic acid (13:1)) $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (CDCl_3) spektrumu



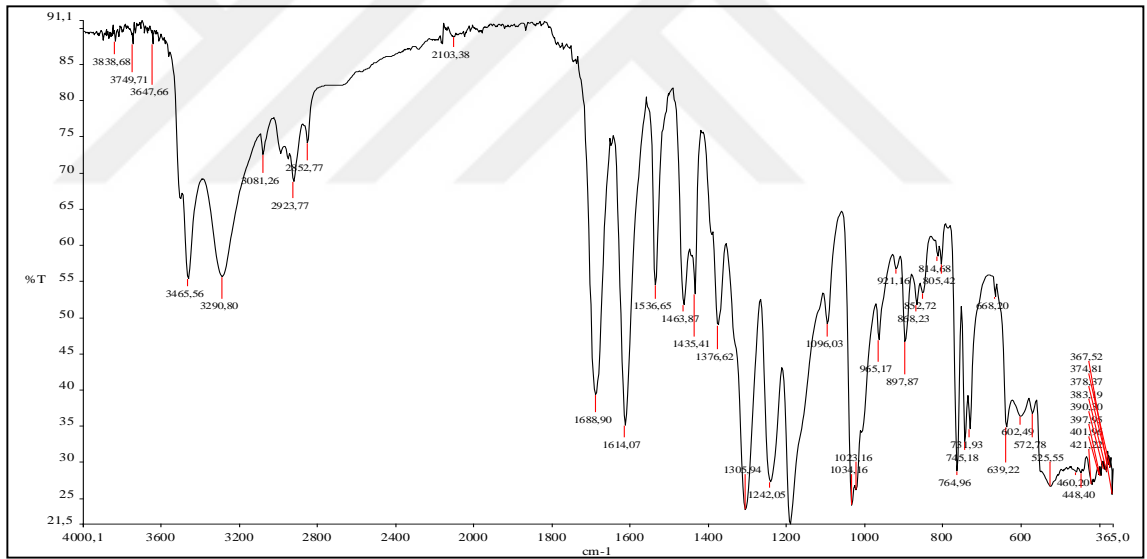
Şekil 3.38. PVK-6'n (anacardic acid (13:1)) HMQC (CDCl₃) spektrumu



Şekil 3.39. PVK-6'in (anacardic acid (13:1)) HMBC (CDCl₃) spektrumu

PVK-7 Kodlu Metabolit

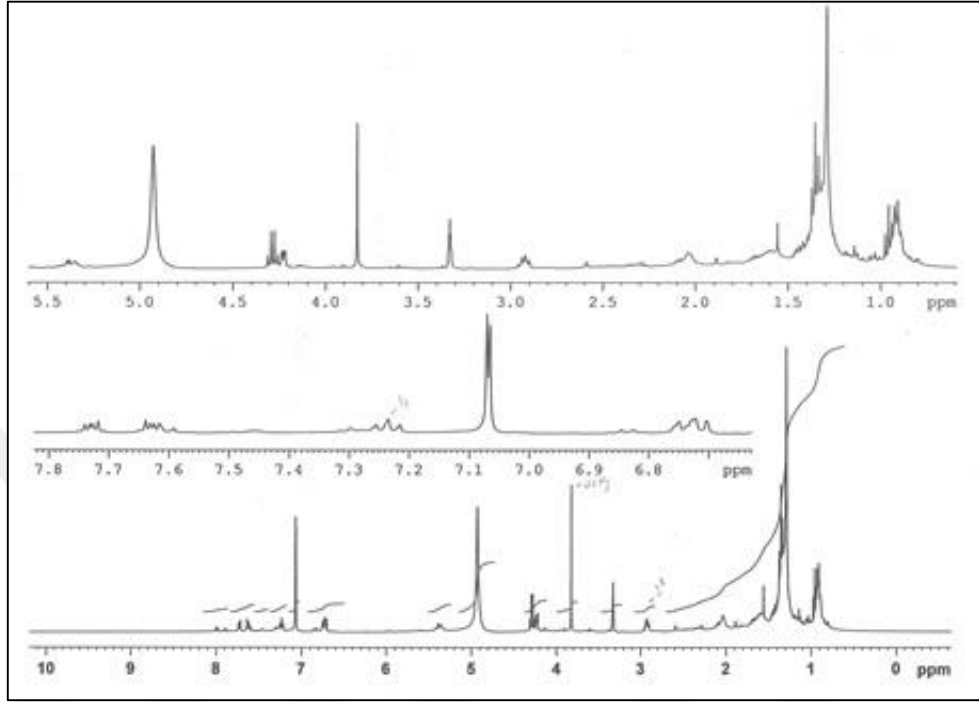
PVK-7 UV₃₆₆ nm de renksiz, UV₂₅₄ nm de morumsu renk veren kahverengi renkli katı bir madde olarak izole edildi. PVK-7'in vanilin/H₂SO₄ (105 °C) reaktifi ile hafif sarımsı bir renk verdiği tespit edildi. Ancak İTK ile yapılan kontrollerde PVK-7'in reaktif ile pembe-morumsu renk veren steroid veya terpen yapılı safsızlıklar içerdiği gözlemlendi. UV₂₅₄ nm de mor renk vermesi, reaktif ile de hafif sarımsı renk vermesi maddenin anacardic asit sınıfı bir bileşik olduğuna işaret etmektedir (Tanker ve Sakar, 1991; Wagner ve Brad, 1996; Fessenden and Fessenden, 2001; Erdik, 1998). PVK-7' in IR spektrumunda (Şekil 3.40) 3200 ve 3400 cm⁻¹ de gözlenen absorpsiyon bantları moleküldeki -OH gruplarından, 1688 ve 1614 cm⁻¹ de gözlenen iki adet kuvvetli absorpsiyon bandı ise moleküldeki iki adet karbonil grubundan kaynaklanmaktadır. Moleküldeki C-O bağlarına ait titreşim bantları ise 1034 cm⁻¹ de, C=C bağ titreşimleri ise 1200-1400 cm⁻¹ aralığında fazla sayıda titreşim bantları olarak gözlemlenmiştir.



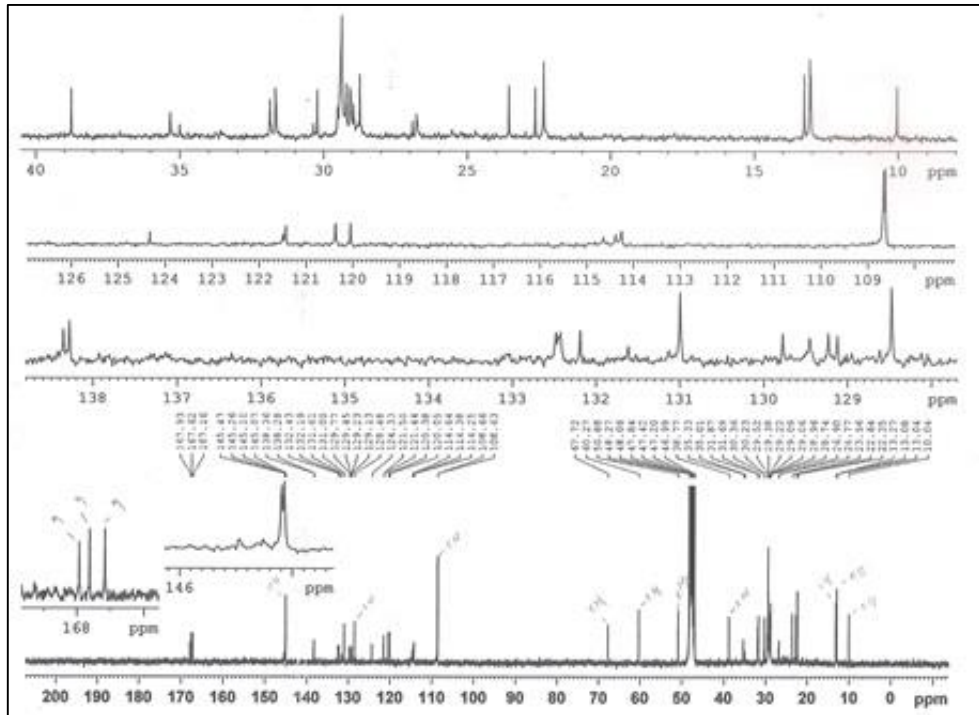
Şekil 3.40. PVK-7'in FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

PVK-7'in ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.41) gözlenen rezonans sinyalleri de PVK-7'in anacardic asit sınıfı bir maddenin yanı sıra trigliserit yapısında bir safsızlık içerdiğine işaret etmektedir. δ=4,20-4,40 ppm aralığında gözlenen sinyaller trigliseritin gliserol kısmına ait (-CH₂-O) H sinyalleridir. Benzer şekilde, PVK-7'in ¹³C-NMR spektrumunda da (Şekil 3.42) olefinik bölgede (δ=100-160 ppm) aralığında gözlenen C sinyalleri de PVK-7'in saf olmadığını göstermektedir. PVK-7 saf olmadığı için DEPT-135 ve DEPT-90 (Şekil 3.43), ¹H,¹H-COSY (Şekil 3.44) ve HMQC (Şekil 3.45)

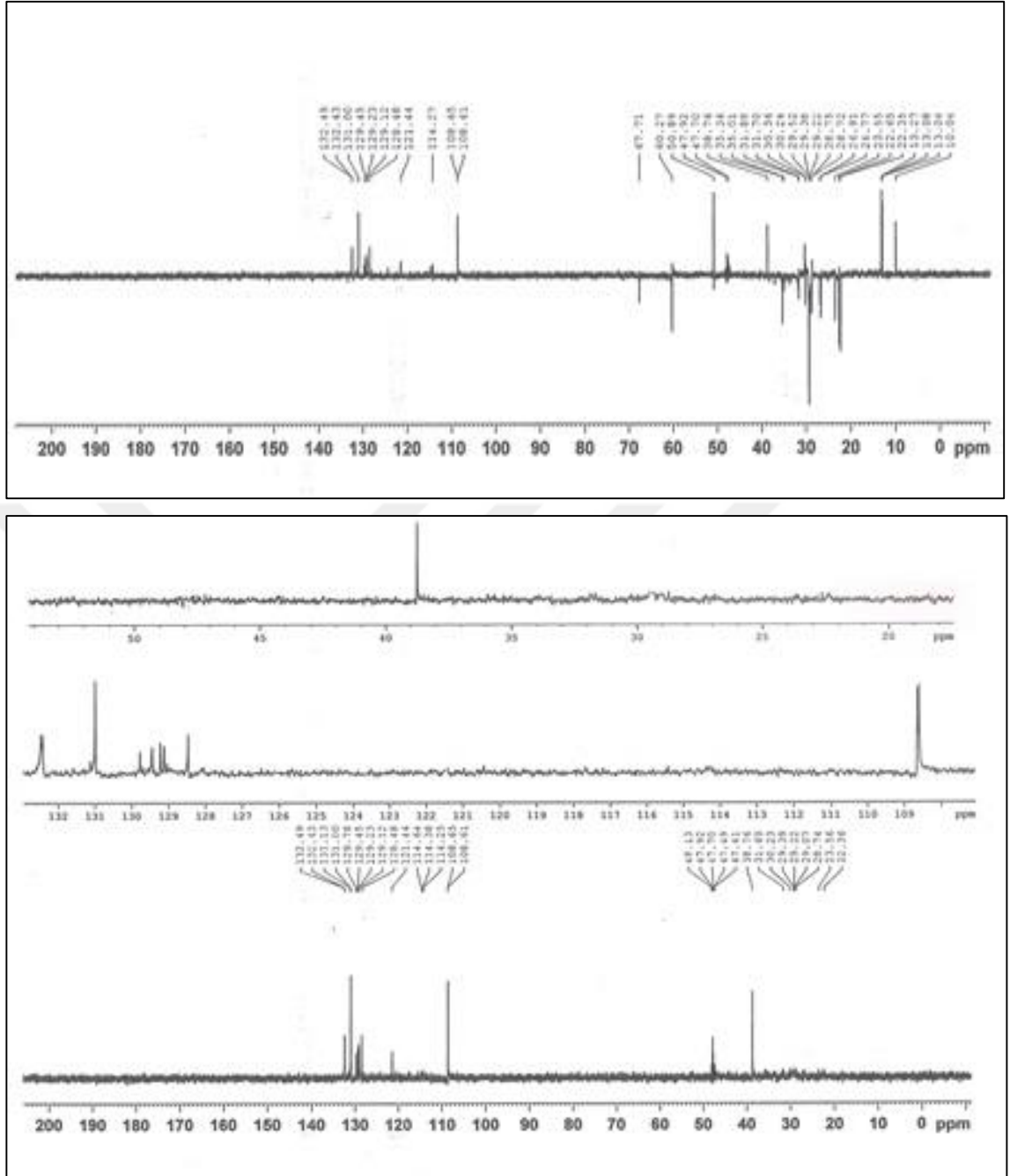
spektrumlarındaki sinyaller tam olarak analiz edilememiştir. Maddenin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması ve kimyasal yapısının belirlenmesine yönelik çalışmalar devam ettirilecektir.



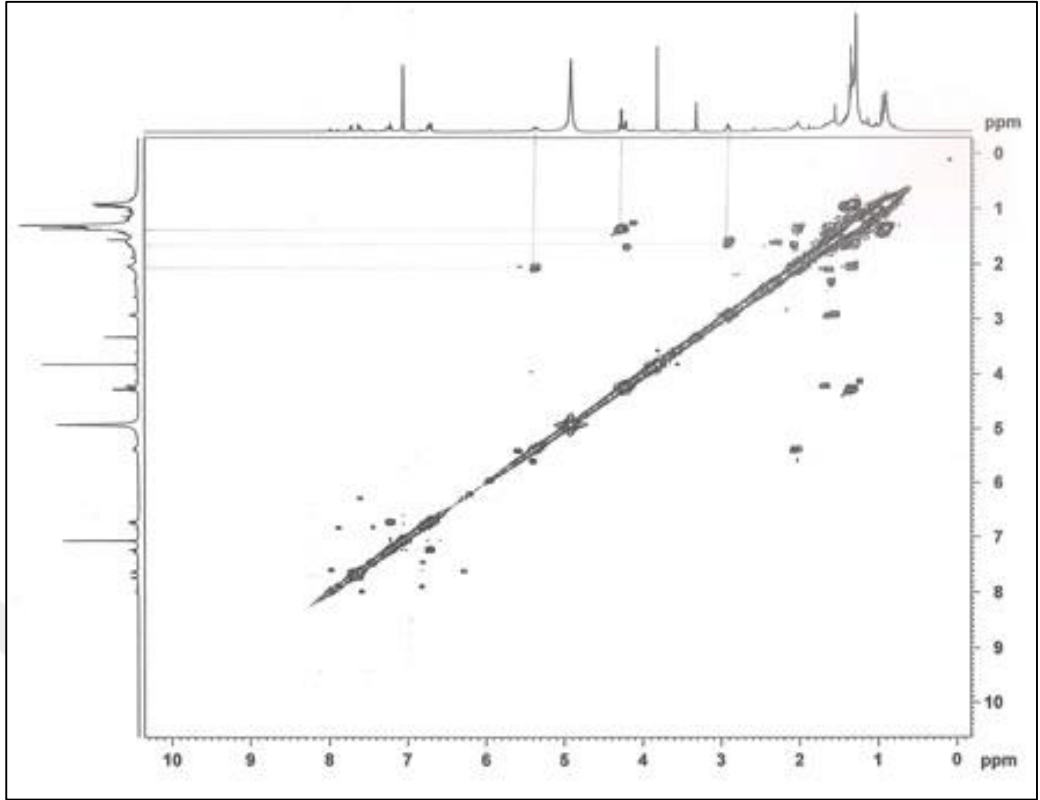
Şekil 3.41. PVK-7'in $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu



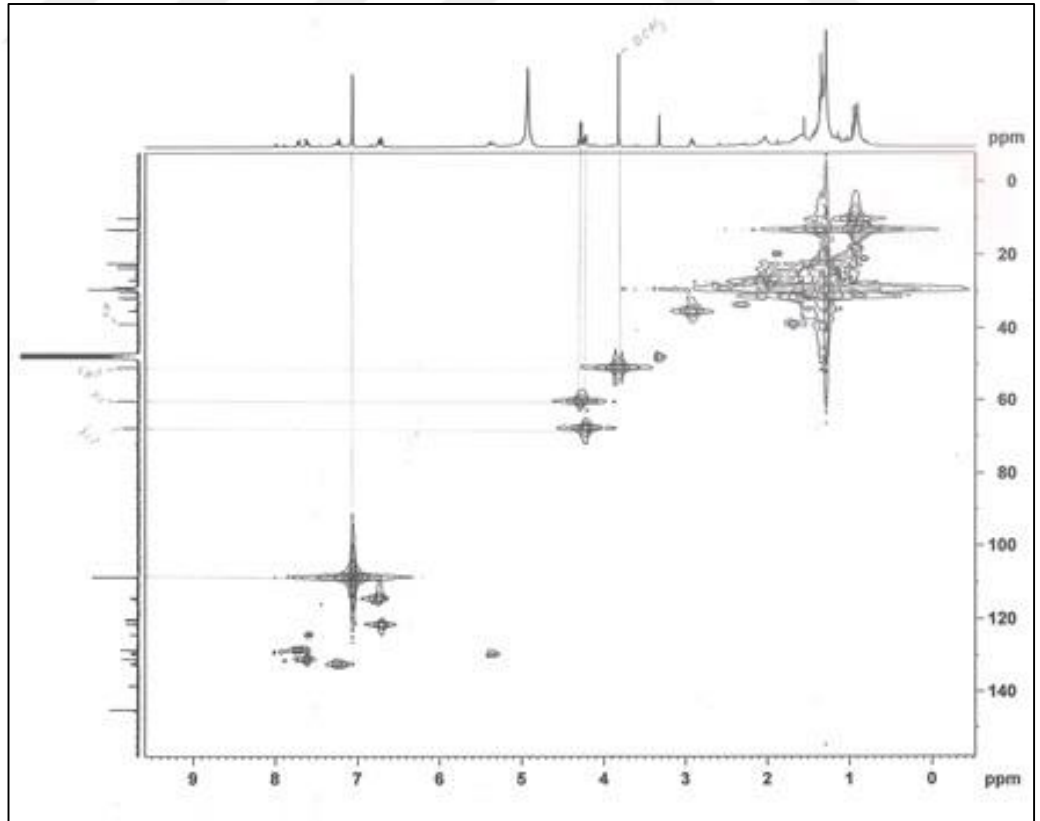
Şekil 3.42. PVK-7'in $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) spektrumu



Şekil 3.43. PVK-7'in DEPT-135 ve DEPT-90 (CDCl₃) spektrumu

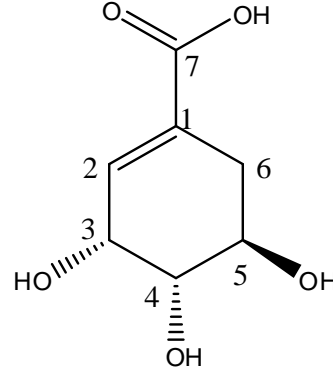


Şekil 3.44. PVK-7'in ^1H , ^1H -COSY (CDCl_3) spektrumu



Şekil 3.45. PVK-7'in HMQC (CDCl_3) spektrumu

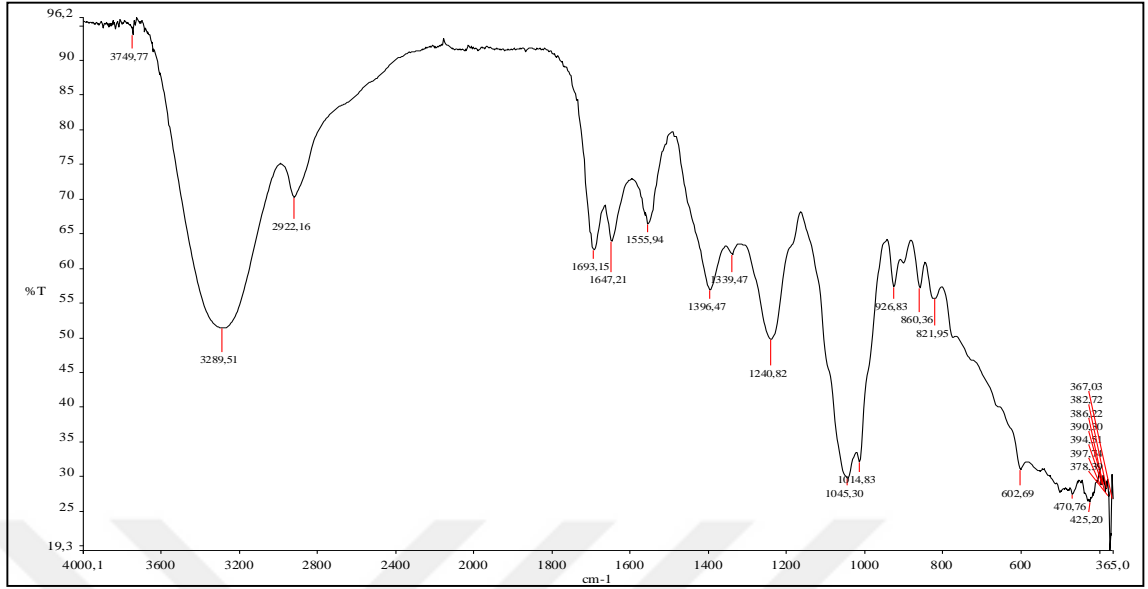
PVK-8 Kodlu Metabolit (Shikimic asit)



$C_7H_{10}O_5$, MA:174 g/mol

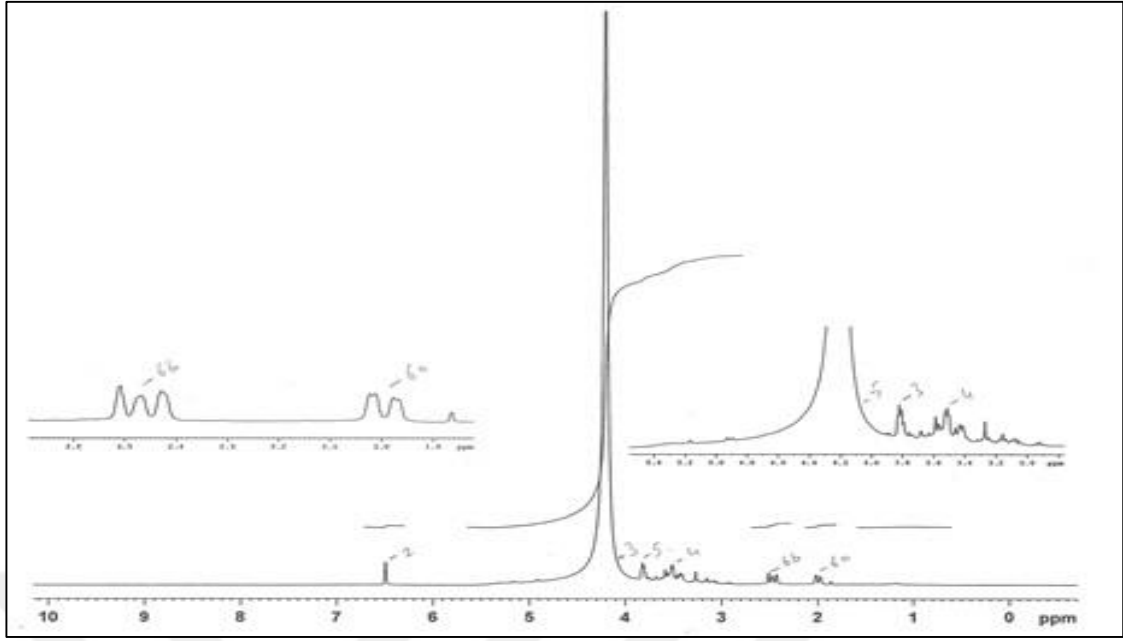
PVK-8 bileşiği, UV_{254} nm de renk vermeyen veren beyazımsı renkli amorf bir katı olarak izole edildi. PVK-8 vanilin/ H_2SO_4 (105 °C) reaktifi ile hafif zor görünen, grimsi veya yeşilimsi bir renk vermektedir. Polaritesi düşük mobil faz sistemlerinde R_f değeri düşük olması maddenin polar karakterli olduğuna işaret etmektedir. PVK-8 kabuktan izole edilen en polar karakterli metabolit olup aynı zamanda etanol ekstresinin miktarca da en fazla olan maddesidir.

PVK-8'in molekül yapısı IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT ^{13}C -NMR, HMQC, 1H - 1H COSY ve HMBC spektral verileri ile "**shikimic asit**" olarak aydınlatıldı. Shikimic asit bitkilerde ve bazı diğer canlılarda fenolik bileşiklerin sentezinde bir ara ürün veya bir sentez yoludur. Yıldız anasonu (*Illicium verum*) meyvelerinin yanısıra bazı bitkilerin değişik kısımlarının değişik oranlarda shikimic asit içerdiği önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir (Plouvier, 1961; Payne and Edmonds, 2005; Sui, 2008; Raghavendra ve ark., 2009; Wang ve ark., 2011; Ghos ve ark., 2012). Shikimic asit aynı zamanda antiviral ilaç etken maddesi oseltamivir sentezinde önemli bir çıkış maddesidir. Bu çalışma ile antep fıstığı kabuğunun etanol ekstresinin majör madde olarak (%37) shikimic asit içerdiği tespit edilmiştir. PVK-8' in IR spektrumunda (Şekil 3.46) 3291 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen kuvvetli absorbands bandı O-H titreşim bandı olup molekülde -OH grubu veya gruplarının olduğuna işaret etmektedir. Moleküldeki C=O titreşim bandı 1693 cm^{-1} civarında orta şiddetli absorbands bandı, moleküldeki C-O titreşim bantları ise 1045 cm^{-1} de kuvvetli absorbands bandı olarak gözlemlenmiştir (Erdik, 1998; Fessenden and Fessenden, 2001).



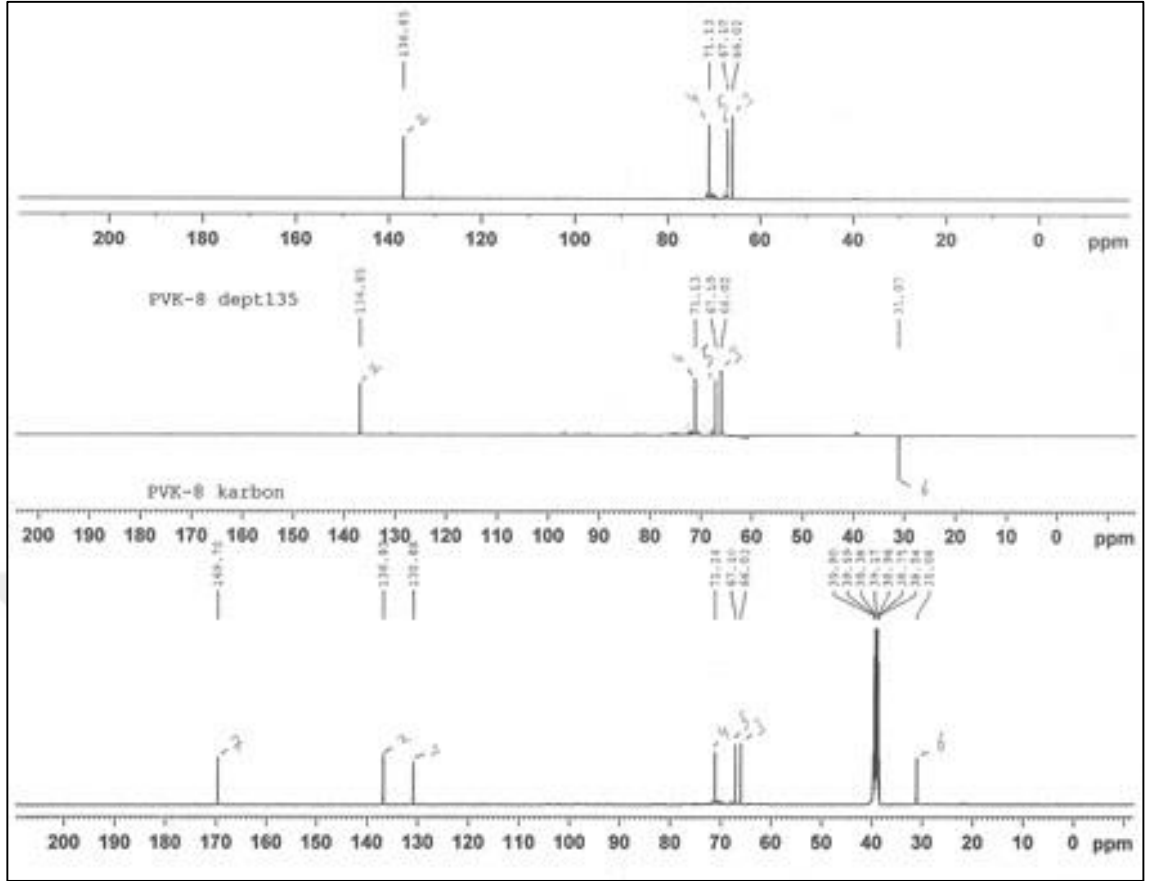
Şekil 3.46 PVK-8'in (Shikimic asit) FT-IR spektrumu (ATR tekniği ile alınmış)

PVK-8 bileşiğinin NMR spektral verileri de önerilen yapı ile tamamen uyumludur. Molekülün ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.47) $\delta=6,50$ ppm de gözlenen singlet sinyal olefinik H atomuna (H-2) ait sinyaldir. H-3, H-4 ve H-5 O atomunun indüktif etkisinden dolayı beklenildiği gibi $\delta=3-4$ ppm arasında rezonans olmuşlardır. Bu aralıkta gözlenen sinyallerden $\delta=3,81$ ppm de gözlenen *m* sinyal H-5'e, $\delta=3,52$ ppm de gözlenen *m* sinyal H-4'e aitken H-3'e ait rezonans sinyalleri DMSO'un içerisindeki suya ait şiddetli pikin altında kalmıştır. H-6a ve H-6b diastropik H atomları ise sırasıyla $\delta=2,00$ ppm de *dd* ($J_1=18,20$ Hz ve $J_2=3,92$ Hz) ve $\delta=2,47$ ppm de *m* sinyaller vererek rezonans olmuştur (Erdik, 1998; Balcı, 2000).



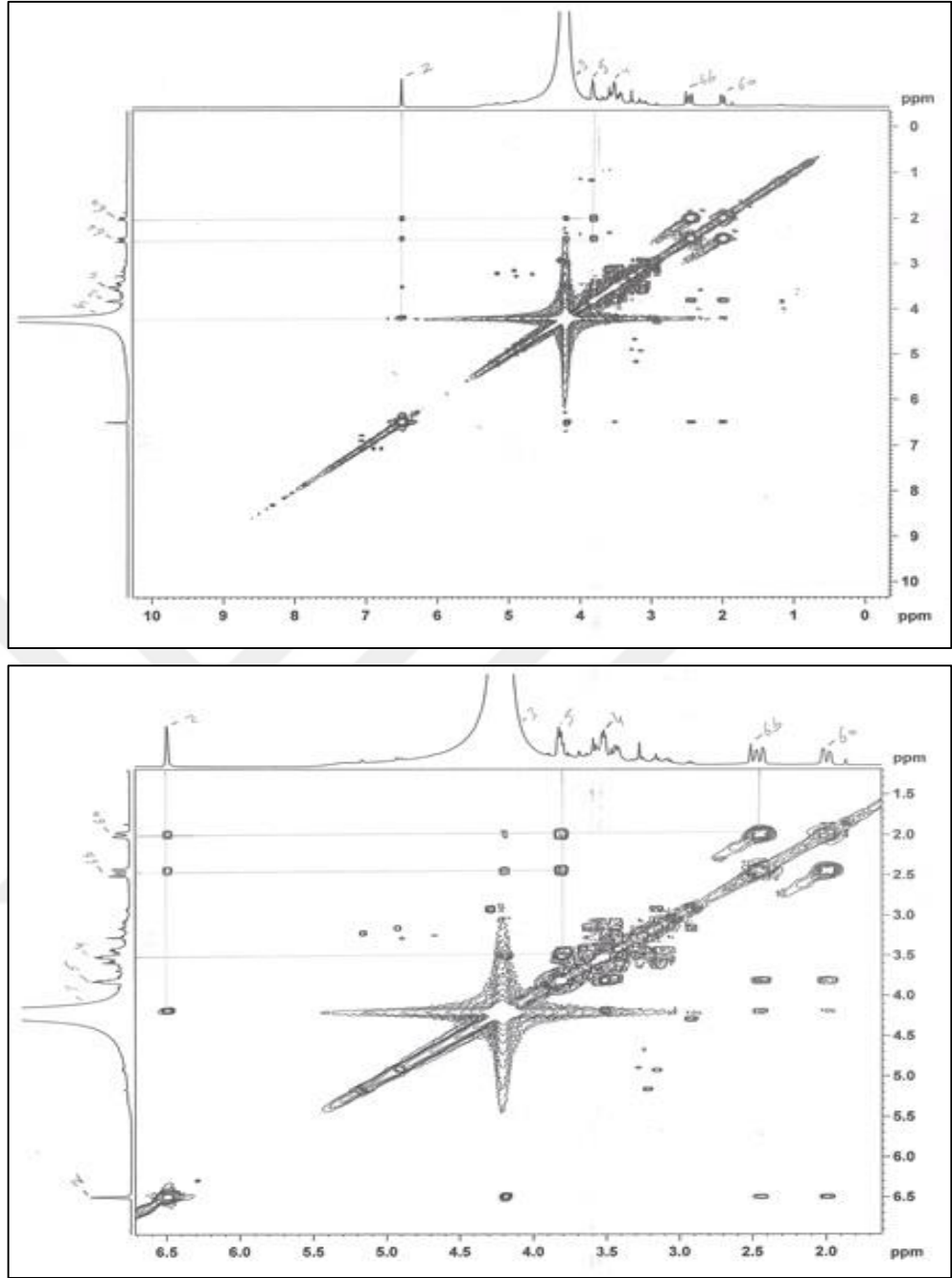
Şekil 3.47. PVK-8'in (Shikimic asit) $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) spektrumu

PVK-8'in decoupled $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT-135 ve DEPT-90 spektrumları (Şekil 3.48) da molekülün shikimic asit olduğunu doğrulamaktadır. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda toplam yedi adet C sinyali gözlemlenmiştir. Karbonil karbonu (C-7) $\delta=169,7$ ppm de, olefinik C atomları, C-1 ve C-2 ise sırasıyla $\delta=130,9$ ppm ve $\delta=136,8$ ppm de pik vermişlerdir. Hidroksil gruplarının bağlı olduğu C-3, C-4 ve C-5'e ait rezonans sinyalleri ise sırasıyla $\delta=66,0$ ppm, $\delta=71,1$ ppm ve $\delta=67,1$ ppm de belirlenmiştir. $\delta=31,1$ ppm de gözlenen rezonans piki ise C-6' a aittir. Molekülün DEPT-135 spektrumunda bir adet negatif sinyal gözlemlenmiş olup molekülde tek bir metilen karbonu (C-6) olduğunu göstermektedir. Molekülün $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda $\delta=169,7$ ppm (C-7) ve $\delta=130,9$ ppm de (C-1) gözlenen kuarterner C atomu sinyalleri beklenildiği gibi DEPT-135 spektrumunda gözlemlenememiştir. $\delta=60-80$ ppm aralığında gözlenen üç adet metin sinyalleri (C-3, C-4 ve C-5) ile $\delta=136,8$ ppm de gözlenen C-2 metin karbonuna ait sinyaller DEPT-135 spektrumunda pozitif sinyal vermiştir. DEPT-90 spektrumunda gözlenen aynı sinyaller molekülde toplam dört adet metin karbonu olduğunu doğrulamaktadır (Balcı, 2000; Erdik, 1998).



Şekil 3.48. PVK-8'in (Shikimic asit) ^{13}C -NMR, DEPT-135 and DEPT-90 (DMSO-d_6) spektrumları

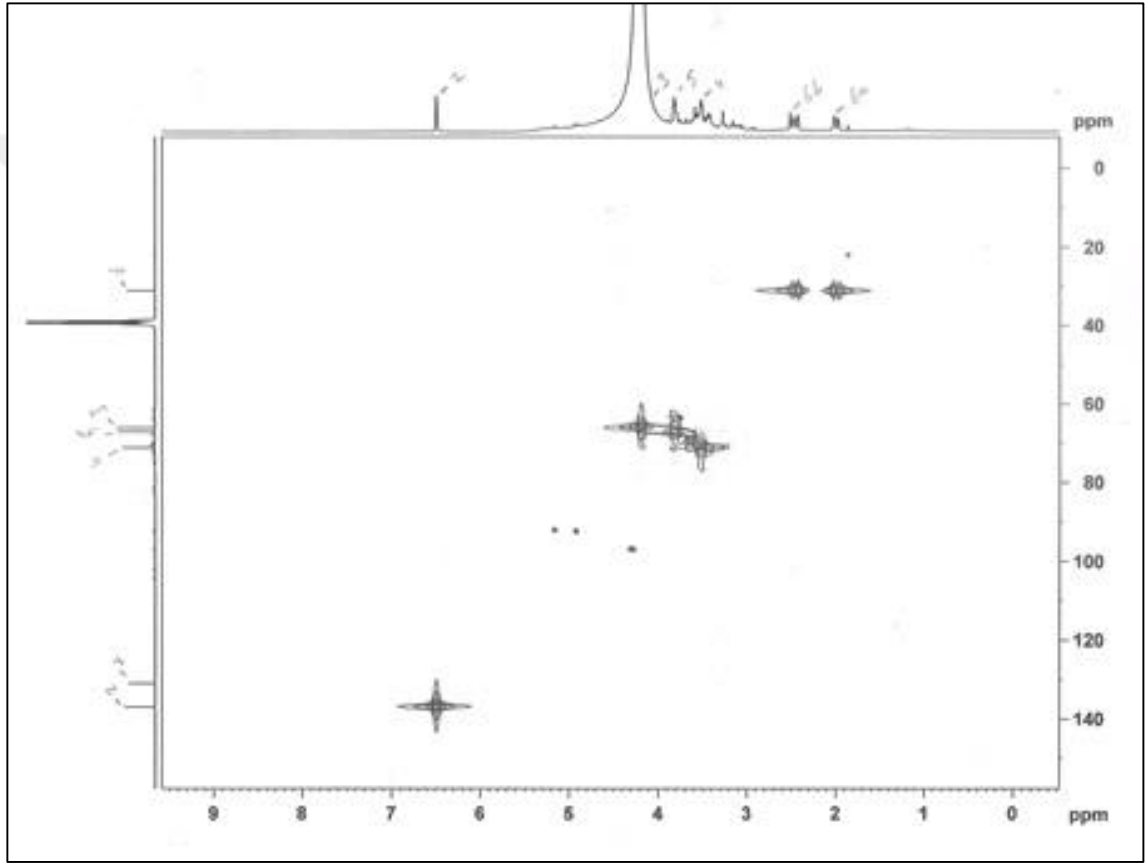
PVK-8'in ^1H , ^1H -COSY spektrumunda (Şekil 3.49) $\delta=6,50$ ppm deki H sinyali (H-2) $\delta=4,20$ ppm civarında rezonans olmuş ve şiddetli pikin altında kalmış olan H-3' e ait rezonans sinyali ile korale olmuştur. Diğer taraftan H-2' e ait sinyal uzak bağ etkileşimi ile $\delta=2,00$ ppm ve $\delta=2,47$ ppm de ki H-6a ve H-6b'e ait sinyallerle de etkileşmiştir. H-5'e ait $\delta=3,81$ ppm de gözlenen sinyal ise beklenildiği gibi H-6a ($\delta=2,00$ ppm), H-6b ($\delta=2,47$ ppm) ve H-4 ($\delta=3,52$ ppm) sinyalleri ile korale olmuştur. PVK-8'in ^1H , ^1H -COSY spektrumunda gözlenen tüm korelasyonlar (Şekil 3.49) shikimic asitin kimyasal yapısı ile tam uyumlu olup yapıyı doğrulamaktadır.



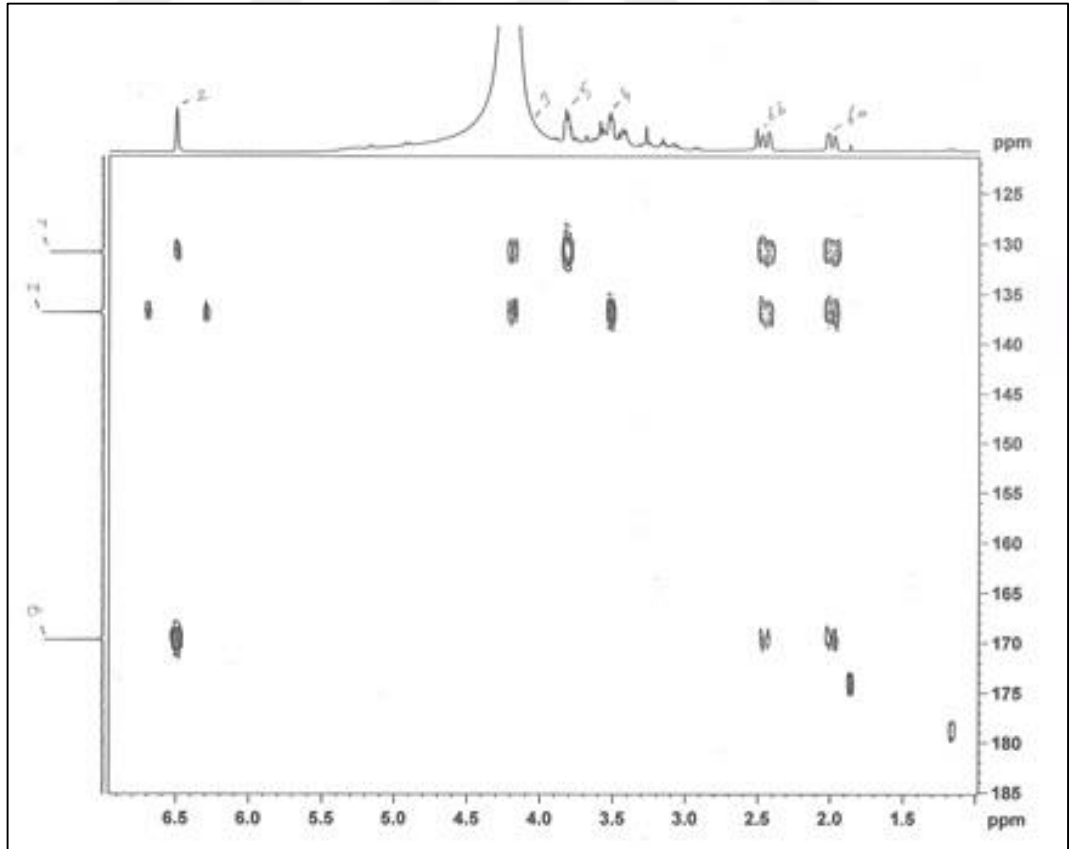
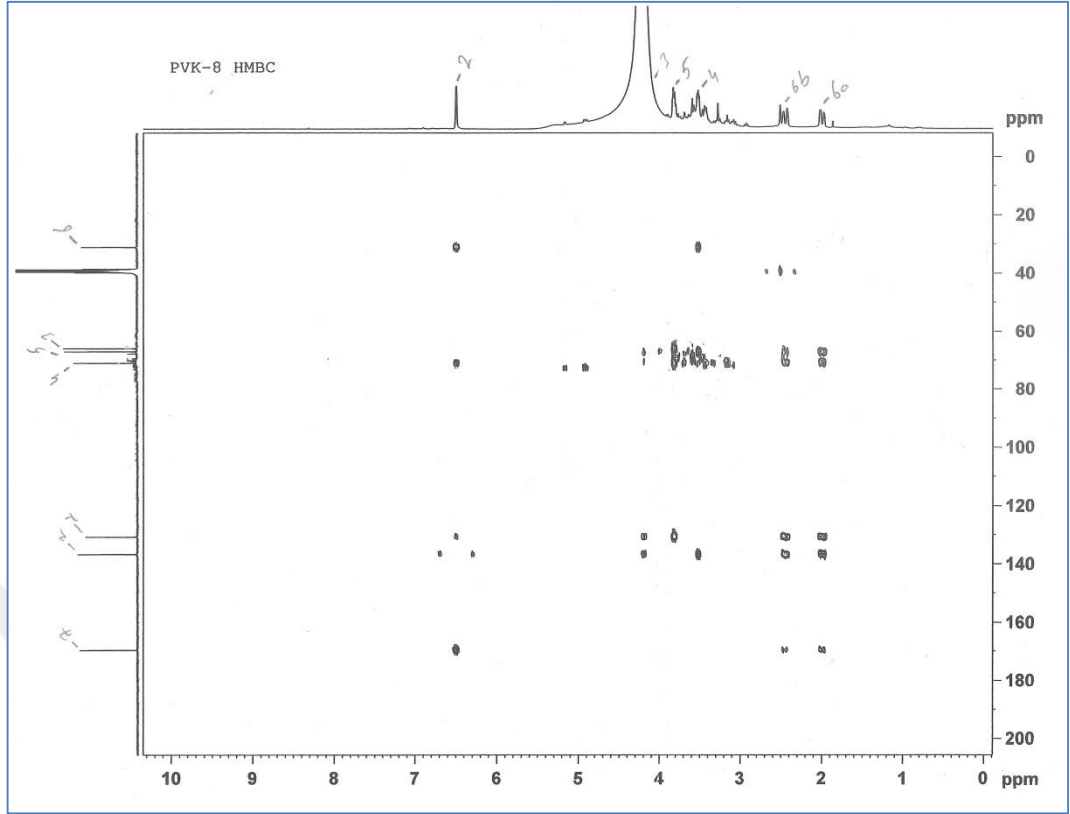
Şekil 3.49. PVK-8'in (Shikimic asit) $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY (DMSO- d_6) spektrumu

PVK-1'in HMQC (Şekil 3.50) ve HMBC (Şekil 3.51) spektrumlarında gözlenen korelasyonlar da shikimic asitin kimyasal yapısını doğrulamaktadır. Her iki spektrumdaki bu korelasyonlar yorumlanarak spektrumda gözlenen sinyaller tamamen analiz edilmiştir. PVK-8'in HMQC spektrumunda (Şekil 3.50) görüleceği üzere $\delta=31,1$ ppm de gözlenen C-6 sinyali $\delta=2,00$ ppm ve $\delta=2,47$ ppm de gözlenen H sinyalleri (H-6a ve H-6b) ile; $\delta=66,0$ ppm de gözlenen C-3 sinyali $\delta=4,20$ ppm civarında gözlenen H-3

sinyali ile; $\delta=67,1$ ppm de gözlenen C-5 sinyali $\delta= 3,81$ ppm de gözlenen H-5 sinyali ile; $\delta=71,1$ ppm de gözlenen C-4 sinyali $\delta=3,52$ ppm de gözlenen H-4 ile; $\delta=136,8$ ppm de gözlenen C sinyali (C-2) ise $\delta=6,50$ ppm de gözlenen H sinyali (H-2) ile korale olmuştur. Hem HMQC hem de HMBC spektrumunda gözlenen tüm korelasyonlar önerilen yapı ile tam bir uyum halinde olup PVK-8'in kimyasal yapısının **shikimic asit** olduğunu doğrulamaktadır. Molekülün HMBC spektrumundan moleküldeki heteronükleer iki ve üç bağ üzerinden olan etkileşimler Şekil 3.52'de gösterilmiştir.



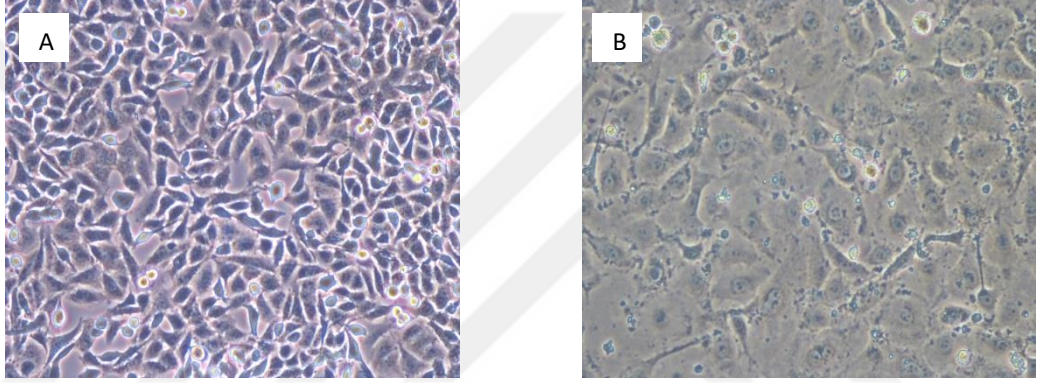
Şekil 3.50. PVK-8'in (Shikimic asit) HMQC (DMSO-d₆) spektrumu



Şekil 3.51. PVK-8'in (Shikimic asit) HMBC (DMSO-d₆) spektrumu

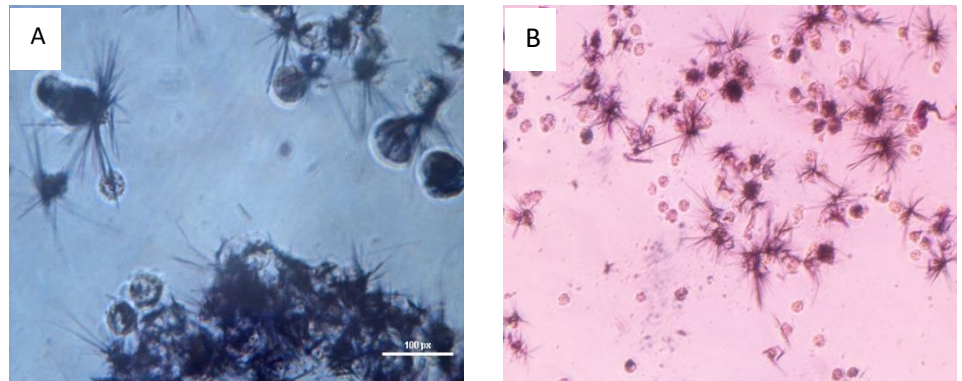
3.1.4. Antitümöral Aktivite Sonuçları

P.vera bitkisinin kabuklarından elde edilen MeOH, EtOH ve EtOAc ekstralarının ve EtOH ekstralarından elde edilen metabolitlerden dört tanesi (PVK-1, PVK-3, PVK-6 ve PVK-8) hücre kültür çalışmalarına dahil edilmiş ve bunların A549 akciğer kanser hücre hattı ve HUVEC normal epitel hücre hatlarının canlılıkları üzerine olan etkisini belirleyebilmek için MTT canlılık testi uygulanmıştır. Hücrelerdeki uygulamalar sonrası olabilecek değişimleri değerlendirmek ve hata oranlarını en aza indirebilmek amacıyla pozitif (max. canlılık) ve negatif (min. canlılık) kontrol hücreleri kullanılmıştır. A549 ve HUVEC hücrelerin genel görünüşleri Şekil 3.52’de verilmiştir.



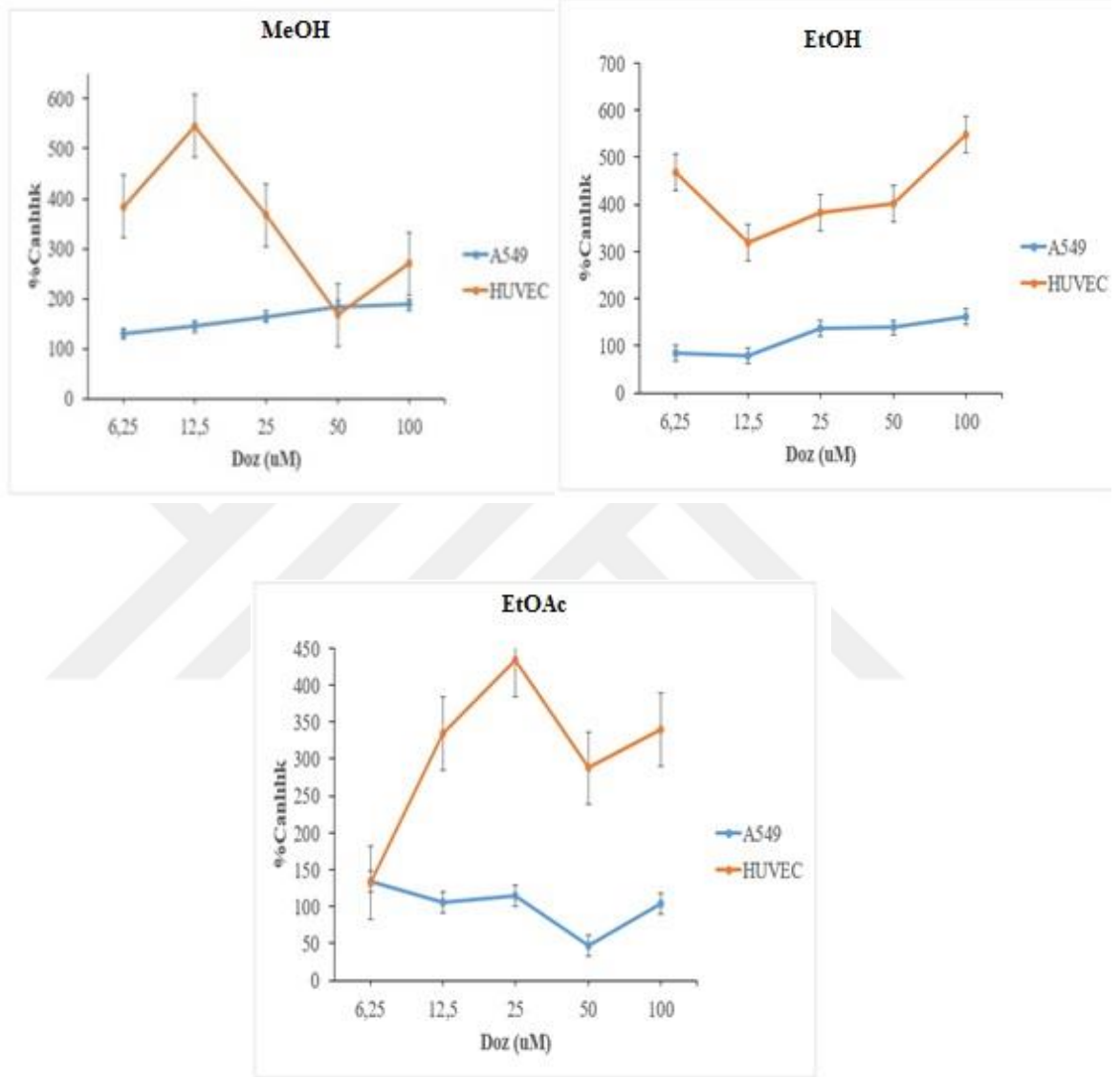
Şekil 3.52. (A) A549 Hücreleri (B) HUVEC Endotelyal Hücreleri

Ayrıca MTT uygulaması sonucunda oluşan formazan kristallerinin görünümü de Şekil 3.53’de gösterilmiştir.



Şekil 3.53. (A) A549 Hücrelerinde; (B) HUVEC Endotelyal Hücrelerinde Formazan Kristalleri

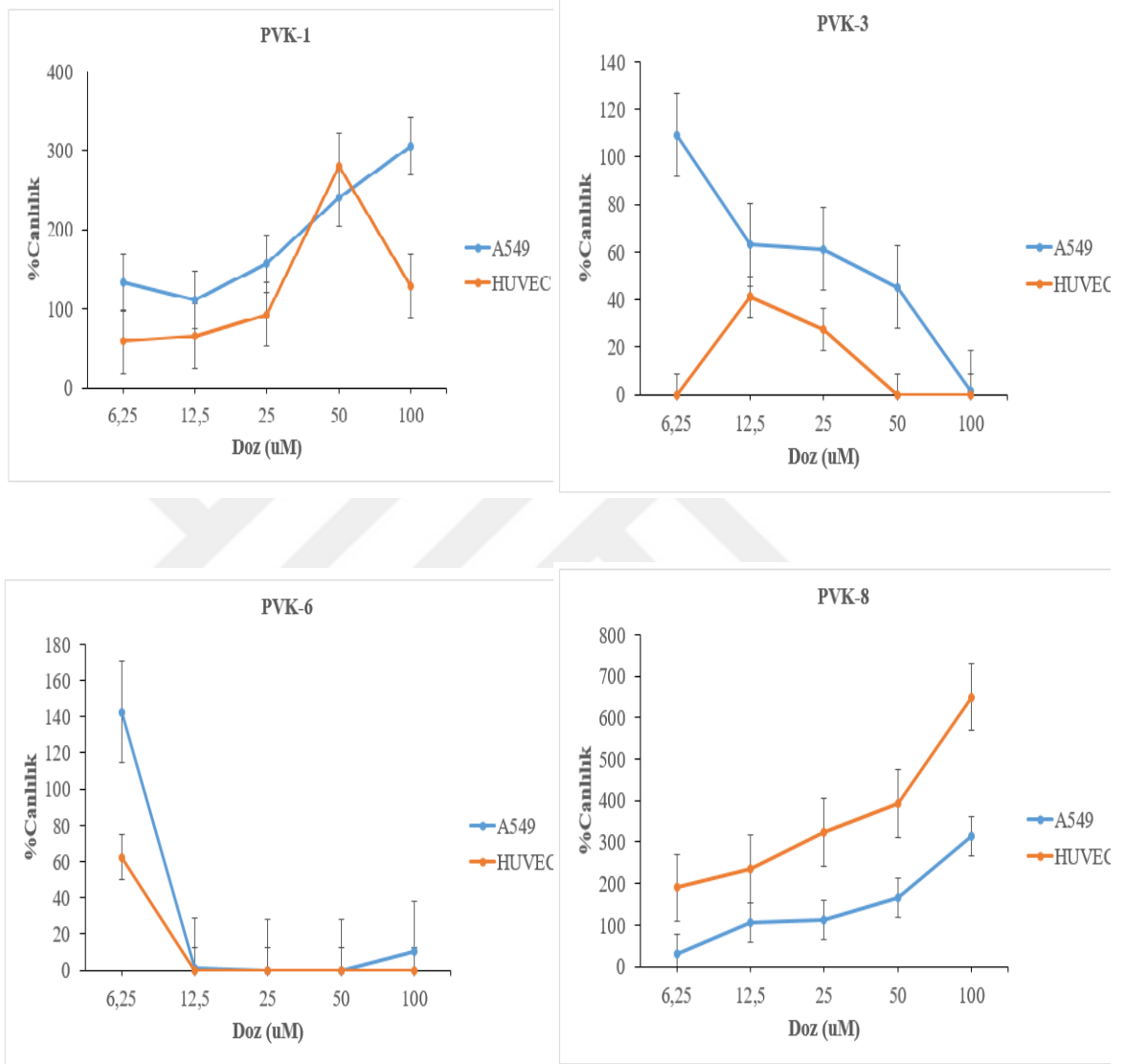
Hücre soylarına 48 saat süre ile ekstrelerin ve saf maddelerin uygulanması sonucunda meydana gelen hücre canlılık durumları Şekil 3.54 ve Şekil 3.55’de verilen grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 3.54. *P.vera* MeOH, EtOH ve EtOAc ekstrlerinin sitotoksosite grafikleri

Grafikten görüleceği üzere *P.vera* bitkisinin kabuklarından elde edilen MeOH, EtOH ve EtOAc ekstrlerinin A549 hücrelerinin ve HUVEC hücrelerinin canlılık oranlarını arttırdığı gözlenmiştir. Özellikle ekstrelerin HUVEC sağlıklı hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri A549 üzerine olan etkilerinden çok daha fazladır. Diğer taraftan EtOAc

ekstresi 50 μ M dozda A549 hücrelerinin canlılık aktivitesini %50 azaltarak sitotoksik etki göstermiştir.



Şekil 3.55. Saf metabolitlerin sitotoksosite grafikleri

Şekil 3.55’den görüleceği üzere uygulanan maddeler arasında PVK-3 ((anacardol 15:1), PVK-6 (anacardic asit 13:1) ve PVK-8 (shikimic asit) A549 kanser hücre hatlarına karşı değişik oranlarda inhibisyon sergileyerek sitotoksik etki sergilemiştir. Diğer taraftan, uygulanan PVK-1 maddesinin (anacardic asit 15:1) A549 hücrelerine karşı sitotoksik olmadığı görülmüştür. Shikimic asit (PVK-8) 6,25 μ M konsantrasyonunda A549

hücrelerinin canlılık oranının azaltırken doz arttıkça sitotoksik etkisi azalmıştır. Diğer taraftan, PVK-3 (anacardol 15:1) ve PVK-6 (anacardic asit 13:1) saf maddelerinin yüksek konsantrasyonlarında (100, 50, 25, 12,5µM) hem HUVEC hem de A549 hücrelerinin canlılık aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Özellikle, PVK-6 maddesinin yüksek dozlarına maruz bırakılan HUVEC hücrelerinin canlılıkları tamamen ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlar bize PVK-6 (anacardic asit 13:1) ve PVK-3 (anacardol 15:1) maddelerinin her iki hücre hattına karşı sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Şekil 3.55 den görüleceği üzere shikimic asit (PVK-8) hariç diğer saf metabolitler A549 hücre hatlarının canlılığı üzerine HUVEC hücre hatlarına nazaran daha baskılayıcıdır. Oysa ekstrelerde bunun tersi bir durum gözlemlenmiştir. Ekstreler A549 hücre hattına karşı daha toksik etkiye sahiptirler (Şekil 3.54). Benzer durum saf metabolitler arasında sadece PVK-8 (shikimic asit) için gözlemlenmiştir. Bu bulgular bize etanol ve metanol ekstrelerinin daha çok oranda shikimic asit içerdiğini ve bundan dolayı benzer etkilere sahip olduğuna işaret etmektedir. Mevcut sitotoksik araştırma sonuçları bize etanol ekstresinin sitotoksik olmamasına karşın bu ekstreden alınan saf metabolitlerin sitotoksik olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak ham ekstrelerle yapılan biyolojik aktivite araştırmalarının yeterli olmadığını söylenebilir. Biyolojik aktivite araştırmalarında mutlaka etken madde veya maddeler izole edilmeli ve biyolojik aktivite için test edilmelidir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tıbbi ve aromatik bitkiler içerdikleri etken maddeler bakımından hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkiler olarak tanımlanırlar. Savaşlar, doğal afetler ve doğal faktörler gibi dış etkenler ile bağışıklık sistemindeki zayıflıklar insanları ve diğer canlıları çeşitli hastalıklara karşı savunmasız bırakmıştır. İnsanlar hastalık anında zekalarını kullanarak tedavi olmak amacıyla çareler aramış ve çareyi yine doğanın kendisinde bulmuşlardır. Yakalandıkları hastalıkları tedavi etmek için ya sihir ya da doğal kaynakları kullanmışlardır. İnsanlar insanlığın varoluşundan beri doğa üstü olaylardan ve güçlerden medet umarak sihir, büyü yanı sıra aklını ve zekasını kullanarak toprak, kum, çamur, çeşitli mineraller, hayvansal ve bitkisel droglarla da tedavi olma olanaklarını kullanmışlardır. Bu doğal kaynakların içerisinde şüphesiz bitkiler önemli yer tutmaktadır (Tanker ve Tanker, 1990; Tanker ve Sakar, 1991; İlisulu, 1992; Wagner ve Brad, 1996; Baytop, 1999; Dewick, 2002). Tüm bu nedenlerden dolayı tıbbi ve aromatik bitkiler değişik hastalıkların tedavisinde kullanımı insanlık tarihinin başlaması ile başladığı tahmin edilmektedir. Yazılı kaynaklara göre M.Ö 3000 yıllarında hüküm süren Sümer, Akad ve Asur Medeniyetlerinde Tıbbi bitkilerin hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanıldıkları bildirilmiştir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

Bitkilerin tedavi edici etkileri ya merak sonucu ya da tesadüfen keşfedilmiştir. Daha sonraki dönemlerde ise doğal ilaçların etkisi kulaktan kulağa yayılmıştır. Yıllar geçtikçe çeşitli bitkilerin farklı hastalıklara karşı deva olduğu anlaşılmıştır. Daha sonraki dönemlerde bitkiler beslenme, tat ve aroma verici, iştah açıcı, tedavi edici etkileri nedeniyle kültüre alınmış ve üretimlerine geçilmiştir (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999; Dewick, 2002).

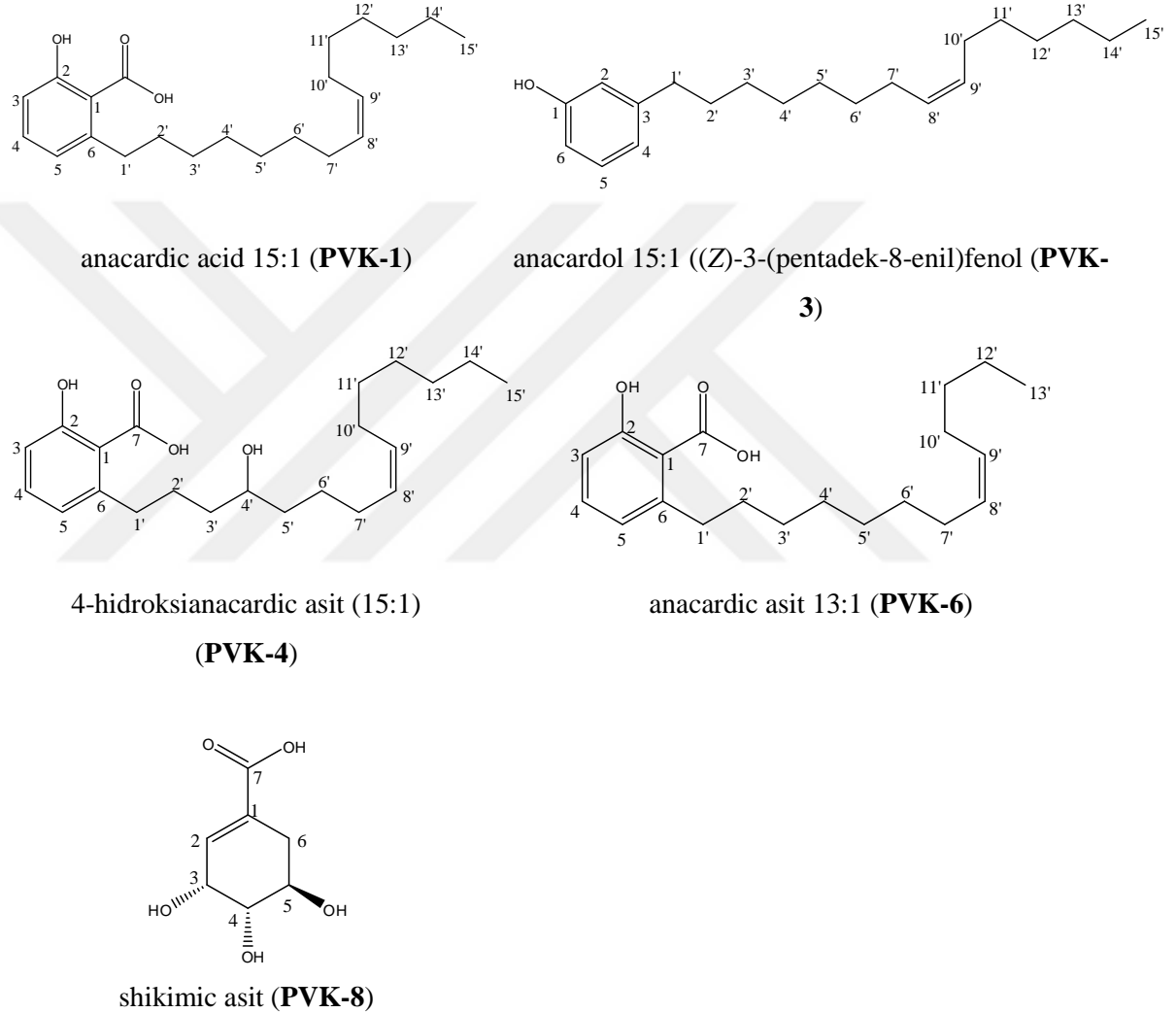
Bitkilerle tedavi konusunda bilgiler yazılı ve yazılı olmayan kaynaklara kuşaktan kuşağa aktarıldığı gibi insanların gözlemleri sonucu ya da deneme yanılma yoluyla daha da geliştirilmiştir. İnsanların merak duygusu, tesadüfi ve bilimsel gözlemleri sonucu elde ettikleri bilgiler kuşaktan kuşağa aktarılarak modern tıbbin gelişmesine de önemli katkılar sağlamıştır. (Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992; Baytop, 1999). Tedavi amacıyla tıbbi bitkilerin değişik kısımları kullanılmaktadır. Bu amaçla yaprak, kök, çiçek, tohum, kabuk, toprak üstü kısımlara ya da bitkinin tamamı kullanılabilir. Bitkinin tamamı kullanılabilmektedir.

Bitkilerin tedavi amaçlı kullanımları oldukça geniş hastalık türünü kapsamalarına karşın genel olarak kan temizleyici, sakinleştirici (sedatif), hazmı kolaylaştırıcı, idrar söktürücü ve artırıcı (diüretik), ter söktürücü, iştah açıcı, kanamayı durdurucu (koagülent), gaz giderici, spazm giderici, balgam söktürücü, öksürük giderici, ağrı kesici ve ateş düşürücü (antipiretik), parazit düşürücü (antihelmintik), nefes açıcı, mikrop öldürücü (antiseptik, antimikrobiyal), böcek kovucu ve öldürücü (insektisidal), müsil, antiprotozoal, antiromatizmal olarak kullanılmalarının yanı sıra, astım, sıtma, dizanteri, tifo, şeker ve deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmışlardır (Baytop, 1999; Tanker ve Tanker, 1990; İlisulu, 1992).

Pistacia cinsi Anacardiaceae familyasına ait tohumlu bitkilerdir. Dünya florasında 10-20 türün yetiştiği tahmin edilmekte olup Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika kıtalarında yayılış göstermektedirler. En önemli türleri *P. vera*, *P. terebinthus* ve *P. lentiscus* türleridir. Ülkemizde de bu türler yaygın olarak yetişmekte olup *P. vera* meyvelerinden dolayı Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kültürü yapılan türdür. Bu ağacın meyveleri “Antepfıstığı” ve “Şamfıstığı” gibi isimlerle bilinir ve tatlıcılıkta yaygın bir kullanıma sahip meyvedir. Eczacılıkta ayrıca öksürük şurubu yapımında kullanılır. *P. vera* sıcak iklime çok iyi adapte olmuş olup dünyada Antepfıstığı yetiştiriciliğinin en yaygın yapıldığı ülkeler sırasıyla İran, ABD ve Türkiye’dir. Ülkemizde en çok yetiştirildiği iller ise Şanlıurfa, Gaziantep, Kilis, Siirt, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Diyarbakır’dır.

Antep fıstığının meyve, yaprak ve reçinesinin kimyasal bileşimi ve bazı biyolojik aktiviteleri üzerine literatürde bazı kayıtlara rastlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda genellikle yaprak, reçine ve meyveleri üzerine araştırmalar yapılmış olup yumuşak endokarp üzerine herhangi bir ciddi kayda rastlanmamıştır. Özellikle bu kısımlardaki metabolitlerin izolasyonu, kimyasal yapılarının belirlenmesi ve antitümör özelliklerinin belirlenmesine yönelik hiçbir kayda rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında mevcut çalışmada antep fıstığının yumuşak meyve kabuklarının kimyasal bileşimi ortaya konmaya çalışılmıştır. Antep fıstığı kabuğunun etanol ekstresi üzerinde yapılan kolon ve ince tabaka kromatografi çalışmaları sonucu toplam yedi metabolit Kolon ve İnce Tabaka Kromatografisi yöntemleri ile izole edildi. Saflaştırılan bu bileşiklerin kimyasal yapıları FT-IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 1D-NMR ve 2D-NMR yöntemleri ile, **anacardic acid 15:1 (ginkgolic acid 15:1, PVK-1), anacardol 15:1 ((Z)-3-(pentadek-**

8-enil)fenol, **(PVK-3)**, **4-hidroksianacardic asit (15:1)** (PVK-4), **anacardic asit 13:1** (PVK-6) ile **shikimic asit (PVK-8)** olarak belirlendi. PVK-5 kodlu saflaştırılan maddenin karışım olduğu anlaşılırken, PVK-7'in kimyasal yapısı henüz aydınlatılamamıştır. Bu bilgiler ışığında kabuk etanl ekstresinin önemli oranda iki majör metabolit, **shikimic asit (PVK-8)** ve anacardic acid 15:1 (ginkgolic acid 15:1, PVK-1), içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 4.1. Kabuktan saflaştırılan metabolitlerin kimyasal yapısı

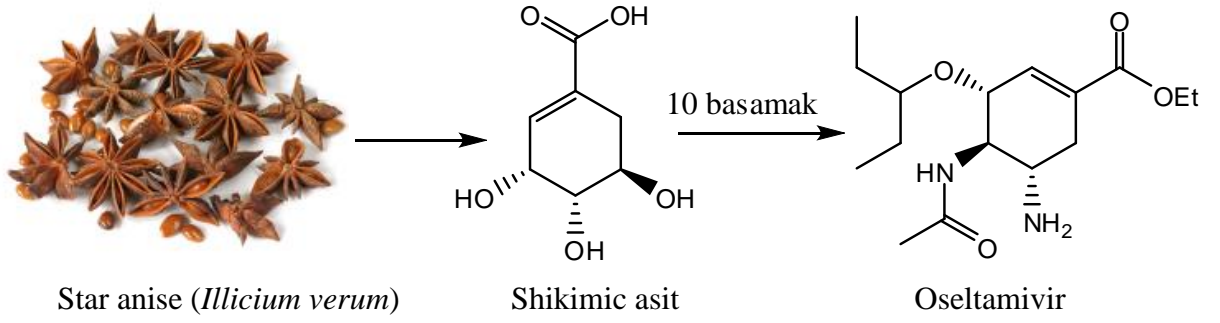
Martorana ve ark. (2013) hem meyveden hem de meyve endokarp kısmından polifenolik maddelerce zengin ekstratlar elde etmiş ve ışık koruyucu etkisini araştırmıştır. Araştırmacılar endokarptan elde edilen ekstratın tüm meyveden elde edilen ekstrate göre polifenolik madde bakımından daha zengin olduğunu ve aynı ekstratın iyi bir

antioksidan ve UV-B ışığı koruyucu etkisine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışma sonuçlarımız da bu bilgileri doğrulamakta olup eyve kabuk kısmının fenolik anacardic asit türevleri bakımından zengin olduğunu göstermektedir. Yapılan farklı bir çalışmada ise Hosseinzadeh ve ark. (2012) *P. vera* meyve, yaprak ve reçineden elde ettikleri etanol, sulu-etanol ve etanol ekstralarının antioksidan özelliklerini rapor etmişlerdir. Raporlarında ekstraların iyi birer radikal süpürücü etkiye ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu etki içerdiği fenolik karakterli anacardic asit türevlerine atfedilebilir. Hosseinzadeh ve ark. (2011) de yaptıkları farklı bir çalışmada *P. vera* yapraklarının su ve etanol ekstralarının antienflematuar özelliğini farelerde test etmiş ve LD₅₀ değerlerini etanol ve su ekstraları için 0,80 g/kg ve 0,79 g/kg olarak belirlemişlerdir. *P. vera*' in antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşenleri üzerine benzer bir çalışmada Tomaino ve ark. (2010) ve Ozturk ve ark. (2010) tarafından yayınlanmıştır. Tomaino ve ark. (2010) araştırmalarında endokarp ekstresinin fenolik içeriğini HPLC ile tayin etmiş ve perikarpın gallic asit, kateşin, eriodictyol-7-*O*-glucoside, naringenin 7-*O*-neohesperidoside, quercetin 3-*O*-rutinoside, eriodictyol, genistein 7-*O*-glucoside, genistein, daidzein ve apigenin içerdiğini bulmuştur. Meyve perikarp ve meyvelerinden elde edilen ekstraları dört farklı antioksidan ölçüm yöntemi ile antioksidan özelliğini araştırmış ve perikarp ekstresinin meyve ekstresine göre daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan bizim mevcut çalışmamızda sözü geçen metabolitlerin hiçbirisine rastlanmamıştır. Bu durum standard fenoliklerin gelme zamanlarının ekstralardaki farklı maddelerle aynı olması ve HPLC ile yanlış teşhislerin yapılmasıdır. Bitkilerin kimyasal içeriklerinin belirlenmesinde en etkili yöntem Kromatografik yöntemlerle metabolitlerin saflaştırılması ve spektroskopik yöntemlerle yapılarının belirlenmesidir. Bu çalışmada da bileşenler Kromatografik yöntemlerle saflaştırılmış ve kimyasal yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır.

Ozturk ve ark. (2010) kırmızımsı-pembemsi dış kabuğu (perikarp) su ile uzaklaştırmış ve kuruttuktan sonra metanol, etanol ve su ile ayrı ayrı özütlemişlerdir. Elde ettikleri bu ekstraların antioksidan, antiradikal ve antimikrobiyal özelliklerini belirlemiş ve bu özellikleri ile toplam fenolik madde içeriği ile olan ilişkisini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar bulgularında en yüksek antioksidan ve antiradikal aktivitenin metanol ekstresinde en düşük aktivitenin ise etanol ekstresinde olduğunu gözlemlemişlerdir.

Araştırmacılar ayrıca tüm ekstrelerin *Listeria monocytogenes* (6-38 mm inhibisyon zonu) ve *Escherichia coli* O157: H7 (8-28 mm inhibisyon zonu) türlerine karşı aktif olduğunu belirlemişlerdir. Önceki çalışmaların ışığında bizim sonuçlarımızı da dayanarak perikarptaki anacardic asit türevi metabolitlerin iyi birer antioksidan ve radikal süpürücü metabolitler olduğu söylenebilir.

Shikimic asit antiviral, antibakteriyel, antifungal, herbisidal ve bazı gıda maddelerinin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılan önemli bir maddedir. Bu madde bir biyosentez araürünü olup birçok fenolik yapılı bileşimin sentezinde kullanılır. Japon yıldız anasonu (*Illicium verum*) meyveleri önemli bir shikimic asit kaynağı olarak kullanılmaktadır (Payne ve Edmonds, 2005; Ohira ve ark., 2009; Wang ve ark., 2011; Ghosh ve ark., 2012) . Shikimic asitten sentezlenen (6S)-6-floroshikimic asit aromatik biyosentez inhibitörü özelliğinden dolayı antibakteriyel bir ajan olarak kullanılmaktadır. Shikimic asit ayrıca amino asit, indol türevleri ve geniş kullanım alanı olan kiral yapılı metabolitlerin biosentezinde öncül bir kimyasaldır. Son zamanlarda ABD’de yetişen *Liquidambar styraciflua* meyvelerinden de bu madde üretilmeye başlanmıştır (Enrich ve ark., 2008). Shikimic asit önemli bir antiviral ilaç olan oseltamivir (Tamiflu) etken maddesinin sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılmaktadır (Şekil 3.1). Oseltamivir neuraminidase enzimini inhibe eden bir ajan olup hem influenza A hem de influenza B viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılan yaygın bir ilaç hammaddesidir. Bu ilaç birçok kiral merkez içerdiği için laboratuvarlarda yüksek saflıkta sentezlenmesi çok güç olmakta olup oseltamivir sentezinde doğal kaynaklardan elde edilen shikimic asit daha çok tercih edilmektedir. Son zamanlarda biyoteknolojik yöntemlerle de shikimic asit sentezi üzerine de çalışmalar yoğunlaşmıştır. Mevcut çalışma ile antep fıstığı kabuklarının önemli oranda shikimic asit içerdiği tespit edilmiş olup bu sonuçlar atık kısımlarının ekonomik girdiye dönüştürülmesine yönelik önemli bilimsel bulgular içermektedir.



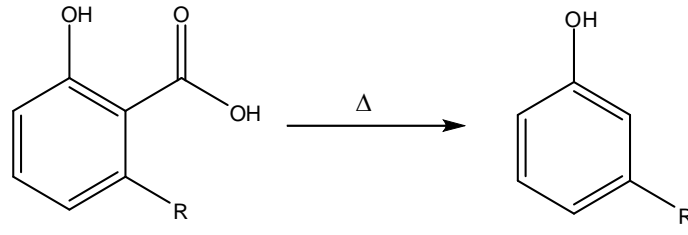
Şekil 4.2. Shikimic asitin eldesi ve oseltamivir sentezinde çıkış maddesi olarak kullanılması

Etanol ekstresi ayrıca HPLC de yürütülerek ekstrenin kimyasal bileşimi analiz edilmeye çalışılmıştır. HPLC analizleri sonucunda perikarptan elde edilen etanol ekstresinin %37 oranında shikimic asit (PVK-1) ve %33 oranında ise anacardic asit 15:1 (PVK-1) içerdiği tespit edildi. Yapılan literatür taramasında antepfıstığının kabuklarında shikimic asitin varlığı yönünde herhangi bir kayda rastlanmamıştır. Bu sonuçlar kolon ve ince tabaka kromatografisi ile yapılan kromatografik çalışma sonuçlarını da doğrulamaktadır. Shikimic asiti kabuktan metanol ve su gibi daha polar çözücüler kullanarak daha yüksek verimde elde edilebileceği düşünülmektedir. Bu durum ileri çalışmalarla ortaya konacak olup ekibimizin ileri hedeflerinden birisidir.

Ekstre ve saflaştırılan metabolitlerin preperatif İTK da beraber yürütülerek kimyasal bileşimi hakkında bilgi sağlanmaya çalışılmıştır. Preperatif İTK sonuçları bize kabuk etil asetat ekstresinin anacardic asit 15:1 (PVK-1) bileşimini yüksek oranda içerdiğini göstermiştir. PVK-1 UV₂₅₄ nm de hafif mor renk vermekte olup ekstrede majör madde olarak yayvan bir şekilde yürümüştür. Etanol ekstresi ise majör bileşenler hem anacardic asit 15:1 (PVK-1) hem de shikimic asit (PVK-8) içermektedir. Yine İTK sonuçlarına göre kabuk metanol ekstresinin shikimic asit (PVK-8) bakımından daha zengin bir ekstre olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar bize yukarıda da bahsedildiği gibi shikimic asitin (PVK-8) kabuktan metanol ve su gibi daha polar çözücülerle daha iyi tüketilebileceğini göstermektedir. Metanol ekstresinde ise anacardic asit 15:1 (PVK-1) ve diğer maddelerin oranı PVK-8 hariç az oranda belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak kabuğun önce etil asetat ile ekstrakte edilmesi durumunda anacardic asit sınıfı metabolitlerin bitkiden uzaklaştırılacağı söylenebilir. Bu tür maddelerin bitkiden

uzaklaştırılması bitkideki shikimic asitin yüksek verimde uygun bir yöntemle bitkiden ekstraksiyonunu mümkün kılabilir.

Anacardic asitler genellikle kaju meyvelerinin (*Anacardium occidentale*) yumuşak kabuklarından elde edilen uzun zincirli hidrokarbon zinciri taşıyan fenolik karakterli bileşiklerdir. Anacardic asitlerin molekül yapılarında bulunan karboksilli asit (-COOH) ve -OH grubu molekülün hidrofil kısmını, uzun zincirli hidrokarbon ucu ise hidrofob ucu oluşturduğundan bu maddeler yüzey aktif maddeler olarak davranırlar. Bu yönü ile deterjanlara çok benzerler. Bu moleküllerin gram pozitif bakterilere karşı etkili oldukları belirlenmiş olup bu özelliklerinden dolayı diş macunlarında katkı maddesi olarak kullanılmışlardır (Kubo ve ark., 1993; Paul ve Yeddanapalli, 1954). Anacardic asitler kimya endüstrisinde cardanol sınıfı bileşiklerin üretiminde kullanılan metabolitlerdir. Cardanol sınıfı bileşikler anacardic asitlerin ısıtılması sonucu dekarboksilasyon (CO₂ çıkışı) tepkimesi ile üretilirler. Cardanol sınıfı maddeler ise polimerik reçinelerin (özellikle fenol-formaldehit polimerik reçineler), yağlayıcı materyallerin hazırlanmasında ve de plastik kaplamada kullanılırlar (Patel ve Patel, 1936; Paul ve Yeddanapalli, 1954; Himejima ve Kubo, 1991; Tullo, 2008). Kaju kabuğundan elde edilen sıvı CNSL şeklinde kısaltılır ve geri dönüşümlü, doğal bir ham maddedir (Şekil 3.2). CNSL fenalkaminler olarak bilinen epoksi kürleştirme ajanlarının eşsiz bir tipinin sentezi için kullanılırlar. Fenalkaminler, yüzey toleranslı koruma sağlarken, epoksi reçineyi hızlıca kürleştirir ve kaplamaların çok düşük sıcaklıklarda kürleşmesine izin verir. Epoksi kaplamalara dayanarak fenalkaminler gemi inşaatı, inşaat mühendisliği ve ticari taşıtların üretim endüstrilerinde başarıyla uygulanmaktadır (Patel ve Patel, 1936; Paul ve Yeddanapalli, 1954; Himejima ve Kubo, 1991; Tullo, 2008).



Anacardic asit
(R: Bir veya daha fazla ikili bağ içeren 15 veya 17 C atomlu alkil zinciri)

Anacardol
(R: Bir veya daha fazla ikili bağ içeren 15 veya 17 C atomlu alkil zinciri)

Polar, düşük sıcaklık (0-5 °C) kürlenebilen ve yüzeye yapışma kabiliyeti olan uç



Su ile etkileşmeyerek düşük su alınımı ve polimere esneklik sağlar



Şekil 4.3. Kaju kabuğundan üretilmiş CNSL ham maddeleri

Bu maddeler genellikle kaju meyvelerinden elde edilen anacardic asitler ile yapılmaktadır. Bu çalışma ile antep fıstığı kabuklarının da önemli oranda anacardic asit

sınıfı bileşikler içerdiği tespit edilmiş olup cardanol türü maddelerin üretimine yönelik hammadde olarak kullanılabilir.

Antepfıstığı Rekolte Tespit Komisyonu tarafından hazırlanan tahmini rapora göre 2015 yılı hasat sezonunda Antepfıstığı rekoltesinin 110-150 bin ton civarında gerçekleşmesi ön görülmektedir. İlerleyen zamanlarda Antepfıstığı ihracatının diğer yıllara oranla 1'e 5 artacağı tahmin de dilmektedir. Diğer taraftan Antepfıstığı hasat edildikten sonra geriye kalan atık kısımlar (yaprak, sap ve yumuşak kabuk kısımları) genellikle atılmakta ve bunlardan hiçbir ekonomik kazanç sağlanamamaktadır. Çevreye atılan atık maddeler ise çevreyi kirletmekte olup çevreye atılan atık maddenin 25.000-50.000 ton civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışma ile Antepfıstığı kabuk kısımlarının hem anacardol üretiminde hem de shikimic asit üretiminde kullanılabileceği ilk defa ortaya konmuştur.

Pistacia vera ve diğer *Pistacia* türlerinin değişik kısımlarından elde edilen çeşitli ekstraktlar ayrıca değişik kanser hücre hatlarına karşı test edilmiştir (Giaginis ve Theocharis, 2011; Almehdar ve ark., 2012; Bibi ve ark., 2012; Paraschos ve ark., 2012; Rezaei ve ark., 2012a,b; Vlastos ve ark., 2013). Rezaei ve ark. (2012a) *P. atlantica* türünün perikarplarından elde ettikleri polifenolik maddelerce zengin metanol ekstresini insan meme kanseri türü olan T47D hücre hatlarında test etmiş ve apoptotik özelliği ile önemli bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Rezaei ve ark. (2012b) ayrıca, aynı türün polifenolik maddelerce zengin perikarp ekstresinin insan kolon HT29 kanser hücre hatlarında antiproliferatif, apoptoz uyarıcı ve hücre devir değişiklikleri özelliklerine belirleyerek ekstrenin güçlü antitümör özelliğinin olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Bibi ve ark. (2012) *P. integerrima* türünün köklerinden elde ettikleri metanol ekstresinin Michinan Cancer Foundation-7 cell line meme kanser türüne karşı iyi bir antitümör aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca metanol ekstresini suda çözdükten sonra kloroform ve etil asetat fazına almış ve bu fazların çok güçlü bir sitotoksik özellik sergilediğini belirlemişlerdir. Ancak tüm bu çalışmalarda ekstraktlardaki etken maddeler üzerine herhangi bir araştırma yapılmamış sadece ekstre-biyolojik aktivite sonuçları üzerine yoğunlaşmıştır.

Mevcut çalışmada, *P. vera* bitkisinin kabuklarından elde edilen MeOH, EtOH ve EtOAc ekstraktlarının ve EtOH ekstresinden elde edilen metabolitlerden PVK-1 (anacardic asit

15:1), PVK-3 (anacardol 15:1), PVK-6 (anacardic asit 13:1) ve PVK-8 (shikimic asit) bunların A549 akciğer kanser hücre hattı ve HUVEC normal epitel hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksikite çalışma sonuçlarına göre Antepfıstığının kabuklarından elde edilen MeOH, EtOH ve EtOAc ekstralarının A549 hücrelerinin ve HUVEC hücrelerinin canlılık oranlarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Özellikle ekstraların HUVEC sağlıklı hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri A549 üzerine olan etkilerinden çok daha fazla bulunmuştur. Ekstreler arasında sadece EtOAc ekstresinin 50µM dozda A549 hücrelerinin canlılık aktivitesini %50 azaltarak sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (**Şekil 3.54**). Kabuk etanol ekstresinden saflaştırılan maddeler arasında PVK-3 (anacardol 15:1), PVK-6 (anacardic asit 13:1) ve PVK-8 (shikimic asit) A549 kanser hücre hatlarına karşı değişik oranlarda inhibisyon etkisi göstermiştir. PVK-3 (anacardol 15:1) ve PVK-6 (anacardic asit 13:1) saf maddelerinin yüksek konsantrasyonlarında (100, 50, 25, 12,5µM) hem HUVEC hem de A549 hücrelerinin canlılık aktivitesini düşürmüştür. PVK-6 maddesine maruz bırakılan HUVEC hücrelerinin canlılıkları yüksek dozlarda tamamen ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlar bize PVK-6 (anacardic asit 13:1) ve PVK-3 (anacardol 15:1) maddelerinin hücre hattına karşı sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, PVK-1 (anacardic asit 15:1) bütün uygulama dozlarında A549 hücrelerinin canlılık değerlerini artırmıştır ve canlılık artışı bu maddenin 50 µM konsantrasyonu için maksimum seviyeye (~%250) çıkmıştır (**Şekil 3.55**). Shikimic asit (PVK-8) 6,25µM konsantrasyonunda A549 hücrelerinin canlılık oranının azaltırken doz arttıkça sitotoksik etkisi azalmış ve hücre canlılığı artırmıştır. Shikimic asit (PVK-8) ekstralarında olduğu gibi sağlıklı HUVEC hücrelerinin canlılığını daha da artırmıştır. **Şekil 3.55** den görüleceği üzere shikimic asit (PVK-8) hariç diğer saf metabolitler A549 hücre hatlarının canlılığı üzerine HUVEC hücre hatlarına nazaran daha baskılayıcıdır. Oysa ekstralarda bunun tersi bir durum gözlemlenmiştir. Ekstreler PVK-8 (shikimic asit) gibi A549 hücre hattına karşı daha toksik etkiye sahiptir (**Şekil 3.54**). Bu bulgular bize etanol ve metanol ekstralarının daha çok oranda shikimic asit içerdiğini ve bundan dolayı benzer etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara ilave olarak mevcut sitotoksik araştırma sonuçlarına göre, etanol ekstresinin A549 hücre hattına karşı sitotoksik olmamasına karşın ekstrelerden saflaştırılan metabolitlerin sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Bu veriler ham ekstrelerle dayanarak yapılan biyolojik aktivite araştırmalarının yeterli olmadığını göstermektedir. Bu nedenle,

ekstre-biyolojik aktivite araştırmalarında mutlaka etken madde veya maddeler izole edilmeli ve biyolojik aktivite için test edilmelidir.



5. KAYNAKLAR

- Ahlemeyer, B., Selke, D., Schaper, C., Klumpp, S., Krieglstein, J., 2001. Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *European Journal of Pharmacology* 430, 1–7.
- Ak, B.E., Kaşka, N., Açar, İ., 1999. Dünyada ve GAP Bölgesinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Üretimi, Yetiştirme ve İşleme Yöntemlerinin Karşılaştırılması. GAP I. Tarım Kongresi, 26–28 Mayıs 1999, Şanlıurfa.
- Alberg, A.J., Samet, J.M., 2003. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 123, 21-49.
- Alberts, S.R., Schroeder, M., Erlichman, C., Steen, P.D., Foster, N.R., Moore, D.F., Rowland, K.M., Nair, S., Tschetter, L.K., Fitch, T.R., 2004. Gemcitabine and ISIS-2503 for patients with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma: A north central cancer treatment group phase II trial. *Journal of clinical Oncology* 22, 4944-4950.
- Almehdar, H., Abdallah, H.M., Osman, A.M.M., Abdel-Sattar, E.A., 2012. In vitro cytotoxic screening of selected Saudi medicinal plants. *Journal of Natural Medicines* 66, 406-412.
- Altuntaş, E., Mutlu, A., 2007. Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Kabuklu ve iç meyvesinin bazı fiziksel özelliklerinin belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 24, 19-25.
- Anonim, 2007. Sulu Koşullarda Antepfıstığı (Siirt) İçin Uygun Anaç ve Dikim Aralıklarının Belirlenmesi. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, (Araştırma Projeleri Yıllık Çalışma Raporu 2006. S:30-34, Gaziantep.
- Anonymous, 2007. Antepfıstığı. http://bilgisitesi.cwrwgl.com/k/antep_fistigi.html.
- Attanoos, R.L., 2010. Asbestos-related lung disease. *Surgical Pathology Clinics* 3, 109-127.
- Bajard, A., Westeel, V., Dubiez, A., Jacoulet, P., Pernet, D., Dalphin, J.C., 2004. Multivariate analysis of factors predictive of brain metastases in localised non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 45, 317-23.
- Baratto, M.C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R., Pogni, R., 2003. Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free Radical Research* 37, 405-412.

- Bayram, H., 2013. Göğüs hastalıklarında in vitro araştırma yöntemleri. Türk Toraks Dergisi 14, 20-26.
- Baytop T., 1999. Türkiye’ de Bitkiler ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün. Nobel Tıp Kitabevleri Baskısı, 2. baskı, İstanbul.
- Beliveau R., Gingras D., 2007. Role of nutrition in preventing cancer. Can Fam Physician. 53, 1905–1911.
- Bellomo, M.G., Fallico, B., 2007. Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different geographic origin. Journal of Food Composition and Analysis 20, 352–359.
- Bibi, Y., Nisa, S., Zia, M., Waheed, A., Ahmed, S., Chaudhary, M. F., 2012. The study of Anticancer and antifungal activities of *Pistacia integerrima* extract in vitro. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 74, 375-379.
- Bisignano, C., Filocamo, A., Faulks, R.M., Mandalari, G., 2013. In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols. FEMS Microbiology Letters 341, 62-67.
- Bozkurt, B., Selçuk, T., Fırat, P., Kalyoncu, A.F., Artvinli, M., 2004. 1972-2002 döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde akciğer kanseri tanısı konulan hastaların histolojik ve epidemiyolojik değerlendirmesi. Toraks Dergisi 5, 148-153.
- Craighead, J.E., Mossman, B.T., 1982. The pathogenesis of asbestos-associated diseases. New England Journal of Medicine 306, 1446-1455.
- Dewick, P.M., 2002. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, II. Baskı, John Wiley & Sons Ltd. Yayınları, UK.
- Doll, R., Peto, R., 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. Journal of the National Cancer Institute 66, 1192-1308.
- Enrich, L.B., Scheuermann, M.L., Mohadjer, A., Matthias K.R., Eller, C.F., Newman, M.S., Fujinaka, M., Poon, T., 2008. *Liquidambar styraciflua*: a renewable source of shikimic acid. Tetrahedron Letters 49, 2503-2505.
- Erenoğlu, N., “Farklı İnsan meme kanseri Hücrelerinde Ellajik asidin sitotoksik etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2012.

- Fukuda, I., Ito, A., Hirai, G., Kawasaki, H., Saitoh, H., Kimura, K., Sodeoka, M., Yoshida, M., 2009. Ginkgolic Acid Inhibits Protein SUMOylation by Blocking Formation of the E1-SUMO Intermediate. *Chemistry & Biology* 16(2), 133-140.
- Ghosh, S., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2012. Production of shikimic acid. *Biotechnology Advances* 30, 1425-1431.
- Giaginis, C., Theocharis, S., 2011. Current Evidence on the Anticancer Potential of Chios Mastic Gum. *Nutrition and Cancer-An International Journal* 63, 1174-1184.
- Gorlova, O.Y., Weng, S.F., Zhang, Y., Amos, C.I., Spitz, M.R., 2007. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *International Journal of Cancer* 121, 111-118.
- Guha N., 2009. Dietary flavonoids and the risk of breast cancer and childhood leukemia. Doctora Theses. California University, Berkeley.
- Hann, C.L., Rudin, C.M., 2008. Management of small-cell lung cancer: incremental changes but hope for the future. *Oncology (Williston Park)* 22, 1486–1492.
- Himejima, M., Kubo, I., 1991. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nutshell oil. *Journal of Agricultural Food Chemicals* 39, 418-421.
- Hosseinzadeh, H., Behravan, E., Soleimani, M.M., 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Pistacia vera* leaf extract in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10, 821-828.
- Hosseinzadeh, H., Tabassi, S.A.S., Moghadam, N.M., Rashedinia, M., Mehri, S., 2012. Antioxidant activity of *Pistacia vera* fruits, leaves and gum extracts. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 11, 879-887.
- IARC. (2002). World health organization, international agency for research on cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Tobacco smoking and tobacco smoke (group 1) 5. Summary of data reported and evaluation, 83.
- İlisulu, K., 1992. İlaç ve Baharat Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:1256, Ankara.
- Kabir, Z., Bennett, K., Clancy, L., 2007. Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Irish Medical Journal* 100, 367-369.

- Karaca, T.D., “İnsan meme kanseri hücre kültüründe *Nerium oleander* bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2008.
- Kreja, L., Seidel, H.J., 2002. On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549. *Chemosphere* 49, 105-110.
- Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M., 1993. Structure - Antibacterial activity relationships of anacardic acids. *Journal of Agricultural food Chemicals* 41
- Küçüköner, E., Yurt, B., 2003. Some chemical characteristics of some *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *European Food Research and Technology* 217, 308-310.
- Li, F., Wang, Y., Wang, X., Li, J., Cui, H., Niu, M., 2012. Ganoderic acids suppress growth and angiogenesis by modulating the nf-kappab signaling pathway in breast cancer cells. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 50, 712-721.
- Liu, Y.T., Blumberg, J.B., Chen, C.Y.O., 2013. Quantification and bioaccessibility of California Pistachio bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1550-1556.
- Loeb, L.A., Ernster, V.L., Warner, K.E., Abbotts, J., Laszlo, J., 1984. Smoking and lung cancer: an overview. *Cancer Research* 44, 5940-5958.
- Lu, Y., Hong, T.G., Jin, M., Saucerneol, G., 2010. A new lignan, from *Saururus chinensis* inhibits matrix metalloproteinase-9 induction via a nuclear factor kappaB and mitogen activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33, 1944-1948.
- Mansouri, S.M.T., Naghizadeh, B., Hosseinzadeh, H., 2011. Evaluation the neuroprotective effect of *Pistacia vera* L. gum extract against cerebral ischemia-reperfusion model of rats. *Toxicology Letters* 205, S297-S297.
- Martorana, M., Arcoraci, T., Rizza, L., Cristani, M., Bonina, F.P., Saija, A., Trombetta, D., Tomaino, A., 2013. In vitro antioxidant and in vivo photoprotective effect of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seed and skin extracts. *Fitoterapia* 85, 41-48.

- Metintaş, M., Ak, G., Akcayir, I.A., Metintas, S., Erginel, S., Alatas, F., 2007. Detecting extrathoracic metastases in patients with non-small cell lung cancer: Is routine scanning necessary? *Lung Cancer* 58, 59-67.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival-application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63
- Ohira, H., Torii, N., Aida, T. M., Watanabe, M., Smith Jr., R.L., 2009. Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction. *Separation and Purification Technology* 69, 102-108.
- O'Reilly, K.M., Mclaughlin, A.M., Beckett, W.S., Sime, P.J., 2007. Asbestos-related lung disease. *American Family Physician* 75, 683-8.
- Ozturk, I., Ekici, L., Yetim, H., Sagdic, O., 2010. Antioxidative, antiradical, and antimicrobial activities of extracts from Antep Pistachio hulls. *Journal fur Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety* 5, 163-167.
- Özlü, T., Bülbül, Y., 2005. Sigara ve akciğer kanseri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 53, 200-209.
- Pala, M., Yıldız, M., Ackurt, F., Loker, M., 1994. Türkiye' de üretilen Antep Fıstığı çeşitlerinin Bileşimi. *Gıda* 19, 405-409.
- Palmarini, M., Fan, H., 2001. Retrovirus-induced ovine pulmonary adenocarcinoma, an animal model for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 603-14.
- Paraschos, S., Mitakou, S., Skaltsounis, A. L., 2012. Chios gum mastic: A Review of its biological activities. *Current Medicinal Chemistry* 19, 2292-2302.
- Patel, N.M., Patel, M.S., 1936. Cashew-nut shell oil and a study of the changes produced in the oil by the action of heat. *Journal of the University of Bombay, Science: Physical Sciences, Mathematics, Biological Sciences, Medicine* 5, 114-131.
- Paul, V.J., Yeddanapalli, L.M., 1954. Olefinic nature of anacardic acid from Indian cashew-nut Shell liquid. *Nature* 174, 604.
- Payne, R., Edmonds, M., 2005. Isolation of shikimic acid from star anise seeds. *Journal of Chemical Education* 82, 599-600.

- Plouvier, V., 1961. Sur la recherche des acides quinique et shikimique de la bergénine et des hétérosides chez quelques hamamelidacées. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 252, 599.
- Raghavendra, T.R., Vaidyanathan, P., Swathi, H.K., Ramesha, B.T., Ravikanth, G., Ganeshiah, K.N., 2009. Prospecting for alternate sources of shikimic acid, a precursor of tamiflu, a bird-flu drug. Current Science 96, 771-772.
- Rezaei, P.F., Fouladdel, S., Ghaffari, Seyed M., Amin, G., Azizi, E., 2012a. Induction of G1 cell cycle arrest and cyclin D1 down-regulation in response to pericarp extract of Baneh in human breast cancer T47D cells. DARU-Journal of Pharmaceutical Sciences 20, Article Number: 101.
- Rezaei, P. F., Fouladdel, S., Hassani, S., Yousefbeyk, F., Ghaffari, S.M., Amin, G., Azizi, E., 2012b. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by pericarp polyphenol-rich extract of Baneh in human colon carcinoma HT29 cells. Food and Chemical Toxicology 50, 1054-1059.
- Rodriguez-Perez, C., Quirantes-Pine, R., Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., 2013. A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 77, 167-174.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Tattini, M., 2002. Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. Phytochemical Analysis 13, 79-86.
- Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., Barros-Dios, J.M., 2003. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. Public Health 117, 149-156.
- Satıl, F., Azcan, N., Baser K. H. C., 2003. Fatty Acid Composition of Pistachio Nuts in Turkey. Chemistry of Natural Compounds 39, 322-324.
- Stewart, B.W., Kleihues, P., 2003. Fruit and vegetables. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, IARC.
- Sui, R.H., 2008. Separation of shikimic acid from pine needles. Chem. Eng. Technol. 31, 469-473.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 1990. Farmakognozi. II. cilt, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:65, Ankara.

- Tanker, M. ve Sakar, M.K., 1991. Fitokimyasal Analizler: Tanım, miktar tayini ve izolasyon. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları No.67, Ankara.
- Thun, M.J., Hannan, L.M., Adams-Campbell, L.L., Boffetta, P., Buring, J.E., Feskanich, D., Flanders, W.D., Jee, S.H., Katanoda, K., Kolonel, L.N., Lee, I.M., Marugame, T., Palmer, J.R., Riboli, E., Sobue, T., Avila-Tang, E., Wilkens, L.R., Samet, J.M., 2008. Lung cancer occurrence in never-smokers: an analysis of 13 cohorts and 22 cancer registry studies. PLoS Med. 5, 185.
- Tokusoglu, O., 2011. The oxidative stability, lipid profiles and total phenolics of almonds (*Prunus amygdalus* L.) and pistachios (*Pistacia vera* L.). V International Symposium on Pistachios and Almonds. Acta Horticulturae 912, 781-789
- Tomaino, A., Martorana, M., Arcoraci, T., Monteleone, D., Giovinazzo, C., Saija, A., 2010. Antioxidant activity and phenolic profile of pistachio (*Pistacia vera* L., variety Bronte) seeds and skins. Biochimie 92, 1115-1122.
- Tullo, A.H., 2008. A Nutty Chemical. Chemical and Engineering News 86 , 26–27.
- Wang, G.W., Hu, W.T., Huang, B.K., Qin, L.P., 2011. *Illicium verum*: review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 136, 10-20.
- Vlastos, D., Mademtzoglou, D., Drosopoulou, E., Efthimiou, I., Chartomatsidou, T., Pandelidou, C., Astyrakaki, M., Chalatsi, E., Mavragani-Tsipidou, P., 2013. Evaluation of the Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Chios Mastic Water by the In Vitro Micronucleus Test on Human Lymphocytes and the In Vivo Wing Somatic Test on Drosophila. Plos One 8, Article Number: e69494.
- Yıldız, M., Gürcan Ş. T., Özdemir, M., 1998. Oil composition of pistachio nuts (*Pistacia vera* L.) from Turkey. European Journal of Lipid Science and Technology 100, 84-86.
- Yokuş, B., Çakır D.Ü., 2012. Kanser Biyokimyası. Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 1, 7-18.
- Watjen, W., Beyersmann, D., 2004. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Influence of oxidative stress. Biometals 17,65-78.
- WHO, 2004. The World Health Report. <http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex>.
- WHO, 2008. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Zeren, E.H., 2000. Akciğer Kanserine Patolojik Yaklaşım, in: Hastürk, S., Yüksel, M. (Eds.), Akciğer Kanseri. Bilmedya Grup 2, İstanbul, pp. 29–45.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gonca GÖKDEMİR

Doğum Yeri : ADANA

Doğum Tarihi : 17.06.1991

E posta : goncagkdmr@hotmail.com

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans : Kilis 7 Aralık Üniversitesi,2013

PROJE : Liken Metaboliti Usnic Asitin 4-aminomorpholin ile Schiff Bazları Türevleri ve Metal Komplekslerinin Sentezi.

SERTİFİKALAR : İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP)

TS EN ISO 22000:2005 Gıda Yönetim Güvenlik Sistemi (HACCP)

İletişim, Beden Dili ve Mülakat Teknikleri

TS EN ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi

Uygulamalı Girişimcilik Eğitimi