

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst. ve *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr.
KARAYOSUNU EKSTRELERİNİN C6 VE HeLa HÜCRELERİNE KARŞI
ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Muhammet Şamil YAĞLIOĞLU

ORMAN MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Muhammet Şamil YAĞLIOĞLU tarafından hazırlanan “*Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst. ve *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. Karayosunu Ekstrelerinin C6 ve HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Orman Mühendisliği Anabilim Dalı’nda (YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabule dılmıştır.

Danışman : Prof. Dr. Gökhan ABAY

İkinci Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Gökhan ABAY	:.....
Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ	:.....
Doç. Dr. Tamer KEÇELİ	:.....
Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM	:.....
Yrd. Doç. Dr. Ömer Cem KARAKOÇ	:.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Rhytidiadelphus triquetrus (Hedw.) Warnst. ve *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr.
KARAYOSUNU EKSTRELERİNİN C6 VE HeLa HÜCRELERİNE KARŞI
ANTİPROLİFERATİF VE SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Muhammet Şamil YAĞLIOĞLU

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Orman Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gökhan ABAY

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu çalışmada, *Rhytidiadelphus triquetrus* ve *Tortella tortuosa* karayosunu materyalleri, Çankırı ili Yapraklı ilçesindeki ormanlık alandan toplandı. Toplanan materyallerin tür teşhisi gerçekleştirildi. Bu karayosunları oda sıcaklığında (25 °C) gölgede kurutuldu ve sıvı azotla parçalandı. Bu materyallerin sırasıyla hekzan, kloroform, etil asetat, metanol, su, su/etil asetat ve su/ n-bütanol ekstraktları hazırlandı. Hekzan ekstraktının sabit yağları GC-MS ile ve diğer ekstraktlardaki fenolik bileşikler ise HPLC-TOF/MS ile belirlendi. Elde edilen tüm ekstraktların antiproliferatif aktiviteleri HeLa ve C6 hücrelerine karşı BrdU ELISA metoduyla belirlendi. Yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olan her iki karayosunun Hekzan, Kloroform, Etil asetat ekstraktlarının ve *Tortella tortuosa* Su/EtOAc ekstraktının sitotoksik aktiviteleri tespit edildi. Bu ekstraktların (*Tortella tortuosa* Su/EtOAc hariç) standart olarak kullanılan 5-fluorourasilden daha az toksik olduğu belirlendi.

2014, 79 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: Briyofitler, karayosunları, antiproliferatif etki, sitotoksik etki, biyolojik aktivite, HeLa, C6, BrdU metodu, hücre kültürü, GC-MS, HPLC-TOF/MS

ABSTRACT

Master Thesis

ANTIPROLIFERATIVE AND CYTOTOXIC EFFECTS OF *Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst. AND *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. MOSS EXTRACTS AGAINST HeLa AND C6 CELLS

Muhammet Şamil YAĞLIOĞLU

Çankırı Karatekin University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Forest Engineering

Supervisors: Prof. Dr. Gökhan ABAY

Co-Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this study, the moss materials *Rhytidiadelphus triquetrus* and *Tortella tortuosa* were collected in forest area from the Yapraklı town of Çankırı. Species identification of the collected materials were performed. These mosses were dried at room temperature (25 °C) in the shade and disintegrated with liquid nitrogen. Hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol, water, water / ethyl acetate and water / n-butanol extracts of the materials were prepared, respectively. Fatty acids of hexane extracts by GC-MS and other phenolic compounds in extracts by the HPLC-TOF/MS were performed. Antiproliferative activity of all obtained extracts was determined by BrdU ELISA method against HeLa and C6 cells. The hexane, chloroform, ethyl acetate extract of two the mosses and the Water / EtOAc extract of *Tortella tortuosa* which have higher antiproliferative activity were detected cytotoxic activities. The extracts (exceptional Water / EtOAc extract of *Tortella tortuosa*) were found to be less toxic than 5-fluorouracil used as a standard.

2014, 79 pages

Key Words: Bryophytes, mosses, antiproliferative effect, cytotoxic effect, biological activity, HeLa, C6, BrdU assay, cell culture, GC-MS, HPLC-TOF/MS

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her safhasında her türlü desteği sağlayan, fikir veren, yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Gökhan ABAY'a şükranlarımı sunarım.

Tez projesi kapsamındaki değerli fikir ve laboratuvar çalışmaları noktasındaki üstün katkılarından dolayı ikinci tez danışmanım sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ hocam'a,

Hücre kültür çalışmaları, elde edilen verilerin yorumlanması ve tez yazım çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli eşim Yrd. Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na

Geç saatlere kadar süren laboratuvar çalışmalarımda, her türlü maddi ve manevi yardımlarını gördüğüm, Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ, Uzman Fatih GÜL, yüksek lisans öğrencileri Nahide Tosyalıoğlu ve Fatma Bulut'a,

2013/21 nolu projeye destek sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Üyelerine,

T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Milli Parklar Dairesi Başkanlığı, Eğitim Tanıtım Halkla İlişkiler Şube Müdürlüğü ve T.C Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarım Araştırmaları Genel Müdürlüğü (TAGEM)' ne bitkisel mateyallerin toplanma izni noktasındaki desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tez çalışmalarım boyunca moral ve yaşam kaynağım canım oğlum Ali Kerem YAĞLIOĞLU'na sevgi ve şükranlarımı tüm kalbimle sunarım.

Muhammet Şamil YAĞLIOĞLU

Çankırı, Haziran 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1. Karayosunu Materyali.....	15
3.2. Arazi Çalışması ve Herbaryum Örneklerinin Hazırlanması.....	16
3.3. Karayosunu Türlerinin Teşhisi.....	17
3.4. Karayosunlarının Kurutulması ve Öğütülmesi.....	17
3.5. Ekstraksiyon İşlemi.....	19
3.5.1. Hekzan ektresinin eldesi.....	19
3.5.1.1. RT nin hekzan ektresinin eldesi.....	19
3.5.1.2. TT nin hekzan ektresinin eldesi.....	19
3.5.2. Kloroform (CHCl ₃) Ektresinin Eldesi.....	20
3.5.2.1. RT nin kloroform ektresinin eldesi.....	20
3.5.2.2. TT nin kloroform ektresinin eldesi.....	20
3.5.3. Etilasetat (EtOAc) Ektresinin Eldesi.....	21
3.5.3.1. RT nin etilasetat ektresinin eldesi.....	21
3.5.3.2. TT nin etilasetat ektresinin eldesi.....	21
3.5.4. Metanol (MeOH) Ektresinin Eldesi.....	22
3.5.4.1. RT nin metanol ektresinin eldesi.....	22
3.5.4.2. TT'nin metanol ektresinin eldesi.....	22
3.5.5. Su Ektresinin Eldesi.....	23
3.5.5.1. RT nin su ektresinin eldesi.....	23
3.5.5.2. TT'nin su ektresinin eldesi.....	25
3.5.6. RT ve TT Ekstrelerinin Etil Asetat ve n-Bütanol İle Ekstraksiyon İşlemi.....	27
3.6. Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analizi.....	28
3.6.1. Hekzan ekstrelerinin esterleştirilmesi işlemi.....	28
3.6.2. Gaz kromatografisi (GC) programı.....	29
3.6.3. Gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi (GC/MS) programı.....	30
3.7. Kloform, Etil Asetat (EtOAc), Metanol (MeOH), Su, Su/EtOAc ve Su/n-Bütanol Ekstrelerinin HPLC/TOFF-MS analizi.....	31
3.7.1. HPLC/TOF-MS programı.....	31
3.8. Antiproliferatif Aktivite.....	35
3.8.1. HeLa ve C6 hücrelerinin hücre kültürü işlemi.....	35
3.8.2. Hücrelerin dondurulması ve saklanması.....	37
3.8.3. Hücrelerin sayılması işlemi.....	37
3.8.4. Testler için ekstrelerden stok çözeltilerin hazırlanması.....	38
3.8.5. BrdU cell ELISA testininin yapılışı.....	39

3.9.	Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı.....	43
3.10.	İstatistiksel Analiz.....	45
3.11.	IC ₅₀ ve IC ₇₅ Değerlerinin Hesaplanması.....	45
4.	BULGULAR.....	46
4.1.	Karayosunlarının Tartılması.....	46
4.2.	Ekstraksiyon İşlemi Sonuçları.....	46
4.3.	Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları.....	47
4.4.	Kloform, Etilasetat (EtOAc), Metanol (MeOH), Su, Su/EtOAc ve n-Bütanol Ekstrelerinin HPLC/TOFF-MS Analizleri.....	51
4.4.1.	RT ekstrelerinin HPLC/TOFF-MS analiz sonuçları.....	51
4.4.2.	TT ekstrelerinin HPLC/TOFF-MS analiz sonuçları.....	56
4.5.	Antiproliferatif Aktivite Sonuçları.....	61
4.5.1.	TT ekstrelerinin Hela hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	61
4.5.2.	RT ekstrelerinin Hela hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	63
4.5.3.	TT ekstrelerinin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	64
4.5.4.	RT ekstrelerinin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları.....	66
4.6.	Sitotoksik Aktivite Sonuçları.....	68
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	69
	KAYNAKLAR.....	75
	TERMINOLOJİK TERİMLER.....	82
	ÖZGEÇMİŞ.....	85

SİMGELER DİZİNİ

RT	<i>Rhytidiadelphus triquetrus</i>
TT	<i>Tortella tortuosa</i>
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektroskopisi
HPLC / TOF-MS	Yüksek Başınçlı Sıvı Kromatografi
HeLa	İnsan Rahim Kanseri Hücresi
C6	Sıçan Beyin Tümör Hücresi
μ	Mikron
EtOAc	Etil asetat
5 - FU	5- florourasil
MeOH	Metanol
IC ₅₀	Hücre Bölünmesini %50 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu
IC ₇₅	Hücre Bölünmesini %75 İnhibe Eden İlaç Konsantrasyonu
%	Yüzde
n-BuOH	n-Bütanol
EA	Etil asetat
mg	Miligram
g	Gram
μL	Mikrolitre
°	Derece
DMEM	Dulbecco's Modifiyeli Eagle's Medium
nm	Nanometre
L	Litre
DMSO	Dimetil sülfoksit
rpm	Rotation per minute (Santrifüj işleminde dakikadaki devir sayısı)
mL	Mililitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Karayosunu, <i>Atrichum undulatum</i> (Foto: G. Abay).....	2
Şekil 1.2	Talluslu Ciğerotu, <i>Conocephalum conicum</i> (Foto: G. Abay).....	2
Şekil 1.3	Boynuzsu ciğerotu, (Foto: T. Keçeli).....	3
Şekil 1.4	Toprak üzerinde karayosunu, <i>Campylopus pyriformis</i> (Foto: G. Abay).....	4
Şekil 1.5	Kaya üzerinde karayosunu, <i>Grimmia ovalis</i> (Foto: G. Abay).....	4
Şekil 1.6	Tatlı suda gömülü vaziyette karayosunu, <i>Fontinalis antipyretica</i> (Foto: G. Abay).....	4
Şekil 1.7	Canlı ağaç üzerinde epifit karayosunu, <i>Neckera complanata</i> (Foto: G. Abay).....	5
Şekil 1.8	Ölü ağaç üzerinde epifit karayosunu, <i>Leucobryum juniperoideum</i> (Foto: G. Abay).....	5
Şekil 1.9	Beton üzerinde gelişen karayosunu (Foto: G. Abay).....	5
Şekil 1.10	Karayosunlarında gametofit ve sporofit yapılar, <i>Barbula unguiculata</i> (Foto: G. Abay).....	7
Şekil 3.1	<i>Rhytidiadelphus triquetrus</i> (Foto: G. Abay).....	15
Şekil 3.2	<i>Tortella tortuosa</i> (Foto: G. Abay).....	16
Şekil 3.3	Karayosunlarının safsızlıklardan arındırma işlemi.....	17
Şekil 3.4	Karayosunlarının kurutulması işlemi.....	18
Şekil 3.5	Karayosunlarının sıvı azotla parçalanma işlemi.....	18
Şekil 3.6	RT ve TT hekzan ekstreleri.....	19
Şekil 3.7	RT ve TT kloroform ekstreleri.....	20
Şekil 3.8	RT ve TT etil asetat ekstreleri.....	21
Şekil 3.9	RT ve TT metanol ekstreleri.....	22
Şekil 3.10	RT bitki posası.....	23
Şekil 3.11	RT bitki posasının kaynatılmaya hazırlanması.....	23
Şekil 3.12	RT sulu fazın geri soğutucu altında kaynatılması işlemi.....	24
Şekil 3.13	RT sulu fazın süzme işlemi.....	25
Şekil 3.14	TT bitki posası.....	25
Şekil 3.15	TT bitki posasının kaynatılmaya hazırlanması.....	26
Şekil 3.16	TT sulu fazın geri soğutucu altında kaynatılması işlemi.....	26
Şekil 3.17	TT sulu fazın süzme işlemi.....	27
Şekil 3.18	TT sulu fazın ekstraksiyon işlemi.....	28
Şekil 3.19	Hekzan ekstrelerinin esterleştirilmesi işlemi.....	29
Şekil 3.20	Esterleştirilmiş hekzan ekstrelerinin viallere alınışı.....	29
Şekil 3.21	Örneklerin GC-MS analizi.....	30
Şekil 3.22	HPLC/TOF-MS cihazı.....	35
Şekil 3.23	C6 tümör hücresi...	35
Şekil 3.24	HeLa kanser hücresi.....	35
Şekil 3.25	Pasajlama işlemi.....	36
Şekil 3.26	Inverted (ters) mikroskop.....	37
Şekil 3.27	Mikroskop.....	38

Şekil 3.28	Örnekler ve DMSO.....	38
Şekil 3.29	İnkübatör.....	39
Şekil 3.30	Örneklerin pipetlenmesi.....	39
Şekil 3.31	BrdU etiketleme solüsyonunun eklenmesi.....	40
Şekil 3.32	FixDenat solüsyonunun eklenmesi.....	40
Şekil 3.33	Anti-BrdU-POD solüsyonunun eklenmesi.....	41
Şekil 3.34	Substrat solüsyonunun eklenmesi.....	41
Şekil 3.35	H ₂ SO ₄ çözeltisi eklenmesi.....	42
Şekil 3.36	ELISA mikroplate okuyucu.....	42
Şekil 3.37	Deney öncesi plate görünümü.....	44
Şekil 3.38	Deney sonrası plate görünümü.....	44
Şekil 4.1	RT ve TT Etil asetat ve n-Bütanol ekstre miktarları.....	47
Şekil 4.2.	RT hekzan ekstresinin ana bileşenleri.....	49
Şekil 4.3	RT nin GC-MS kromatogramı.....	50
Şekil 4.4	TT hekzan ekstresinin ana bileşenleri.....	50
Şekil 4.5	TT nin GC-MS kromatogramı.....	51
Şekil 4.6	RT kloroform ekstresinin fenolik içeriği.....	52
Şekil 4.7	RT EtOAc ekstresinin fenolik içeriği.....	52
Şekil 4.8	RT MeOH ekstresinin fenolik içeriği.....	53
Şekil 4.9	RT Su ekstresinin fenolik içeriği.....	54
Şekil 4.10	RT Su/EtOAc ekstresinin fenolik içeriği.....	55
Şekil 4.11	RT Su/n-BuOH ekstresinin fenolik içeriği.....	55
Şekil 4.12	TT Kloroform ekstresinin fenolik içeriği.....	57
Şekil 4.13	TT EtOAc ekstresinin fenolik içeriği.....	57
Şekil 4.14	TT MeOH ekstresinin fenolik içeriği.....	58
Şekil 4.15	TT su ekstresinin fenolik içeriği.....	59
Şekil 4.16	TT su/EtOAc ekstresinin fenolik içeriği.....	60
Şekil 4.17	TT su/n-BuOH ekstresinin fenolik içeriği.....	60
Şekil 4.18	TT ekstrelerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, 0.01.).....	62
Şekil 4.19	TT Su ekstrelerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)	62
Şekil 4.20	RT ekstrelerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)	63
Şekil 4.21	RT Su ekstrelerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)	64
Şekil 4.22	TT ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)	65
Şekil 4.23	TT Su ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)	65
Şekil 4.24	RT ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)	66
Şekil 4.25	RT Su ekstrelerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı, p<0.01)	67
Şekil 5.1	Çalışmanın Özeti.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Bazı tıbbi briyofitlerin kullanım alanları.....	9
Çizelge 3.1	Analizi gerçekleştirilen fenolik bileşenler.....	32
Çizelge 3.2	Proliferasyon denemeleri deney dizaynı (100 µg / mL).....	39
Çizelge 4.1	RT ve TT ekstre miktarları ve verimleri (%).....	46
Çizelge 4.2	RT ve TT karayosunlarının GC-MS analiz sonuçları.....	48
Çizelge 4.3	RT ekstrelerin fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik / 100 g kuru bitki)	56
Çizelge 4.4	TT ekstrelerin fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik / 100 g kuru bitki)	61
Çizelge 4.5	TT ve RT ekstrelerinin HeLa hücresine karşı IC ₅₀ ve IC ₇₅ değerleri.....	67
Çizelge 4.6	TT ve RT ekstrelerinin C6 hücresine karşı IC ₅₀ ve IC ₇₅ değerleri.	68
Çizelge 4.7	Etkili ekstrelerin % sitotoksosite değerleri.....	68
Çizelge 5.1	TT ve RT ekstrelerinin antiproliferatif aktiviteleri (100 µg / mL konsantrasyonda)	71

1. GİRİŞ

Günümüzde, bitkiler âleminin içinde ayrı bir konuma sahip olduğu düşünülen bryofitlerin kendi alt âlemi içerisinde (Bryobiotina) değerlendirilmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından ileri sürülmüştür. En son genetiksel bilgiler, bryofitlerin sınıflandırıldığı yolun yeniden düşünülmesi gerektiği konusunda bizlere ipucu vermiştir. Gerek morfolojik gerekse diğer bazı özellikleri bakımından, baskın gametofit ve bağımlı sporofit yapılarına sahip karayosunları ve ciğerotlarından farklı bir yapıya sahip olan Boynuzsu ciğerotları (Anthocerotophyta) çoğu sistematikçiler tarafından ayrı bir bölüm (phylum) olarak düşünülmüştür. Çoğu bryologlar da ciğerotlarının (Marchantiophyta) ve karayosunlarının (Bryophyta) ayrı bir bölüm olarak ele alınması gerektiği konusunda hem fikir olmuşlardır. Bununla birlikte karayosunları, ciğerotları ve boynuzsu ciğerotlarının “bryofitler” adı altında yaygın bir kullanımı da günümüzde hala kabul görmektedir (Glime 2006). Buna göre en son genetiksel bilgilere dayanılarak yapılacak bir sınıflandırmayı aşağıdaki şekilde verebiliriz:

Alt Âlem: Bryobiotina

Bölüm: Anthocerotophyta (boynuzsu ciğerotları)

Bölüm: Marchantiophyta (yapraksı veya tallussu ciğerotları, aynı zamanda Hepaticae sınıfı olarak bilinen)

Bölüm: Bryophyta (yapraklı karayosunları, aynı zamanda Musci sınıfı olarak bilinen)

Sayısal olarak tohumlu bitkilerden sonra ikinci en büyük grubu oluşturan Bryofitler, 15.000 (Gradstein *et al.* 2001) ile 25.000 (Crum 2001) arasında taksona sahip ve fotosentetik bitkilerin yaşaması için uygun lokasyonların olduğu bütün kıtalarda yaşamlarını sürdürebilirler (Renzaglia *et al.* 2000). Bryobiotina alt âlemi içerisinde yer alan Bryophyta (karayosunları, Şekil 1.1) bölümü, 6 sınıfa (Takakiopsida, Sphagnopsida, Andreaeopsida, Andreaebryopsida, Polytrichopsida ve Bryopsida) ayrılmakta (Glime 2006) ve en fazla taksonu (14000) içeren bölüm olma niteliğindedir

(Asakawa *et al.* 2013). Bu bölümü, sırasıyla Marchantiophyta (ciğerotları 6000 takson, Şekil 1.2) ve Anthocerotophyta (boynuzsu ciğerotları 300 takson, Şekil 1.3) takip etmektedir (Asakawa *et al.* 2013).



Şekil 1.1 Karayosunu, *Atrichum undulatum* (Foto: G. Abay)



Şekil 1.2 Talluslu ciğerotu, *Conocephalum conicum* (Foto: G. Abay)



Şekil 1.3 Boynuzsu ciğerotu (Foto: T. Keçeli)

Bryofitler nemli ortamlarda büyürler ve bütün bitkiler gibi hayatta kalmaları için suya ihtiyaç duyarlar. Buna karşın, bazı karayosunları tamamen suyunu kaybettikten uzun yıllar geçmesine rağmen yeniden canlanabilme özelliğine sahiptirler. Birkaç karayosunu denize yakın kesimlerde bulunmasına rağmen, bryofitlerin denizde yaşayan örnekleri bulunmaz. Bryofitler, yosunların paspas şeklinde yayılış gösterdiği turbalık alanların bulunduğu kesimlerde, toprak (Şekil 1.4) ve kaya (Şekil 1.5) üzerlerinde, tatlı sularda gömülü vaziyette (Şekil 1.6) ve canlı (Şekil 1.7) ve ölü odunsu bitkiler (Şekil 1.8) üzerinde epifit olarak yayılış gösterirler. Bu doğal ortamlarının dışında insan yapımı alanlarda da görülürler (Şekil 1.9). Nemli ormanların zeminlerinde halı şeklinde yayılış gösterirler. Ekstrem çevre koşullarının görüldüğü arktiklerde diğer bitkiler ve mantarların alana yerleşmeleri için uygun koşulları hazırlarlar ve toprak oluşumuna katkıda bulunurlar. Böyle yetişme ortamlarında bryofitler, diğer karasal organizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için gereklidir (Schofield 2001).



Şekil 1.4 Toprak üzerinde karayosunu, *Campylopus pyriformis* (Foto: G. Abay)



Şekil 1.5 Kaya üzerinde karayosunu, *Grimmia ovalis* (Foto: G. Abay)



Şekil 1.6 Tatlı suda gömülü vaziyette karayosunu, *Fontinalis antipyretica* (Foto: G. Abay)



Şekil 1.7 Canlı ağaç üzerinde epifit karayosunu, *Neckera complanata* (Foto: G. Abay)



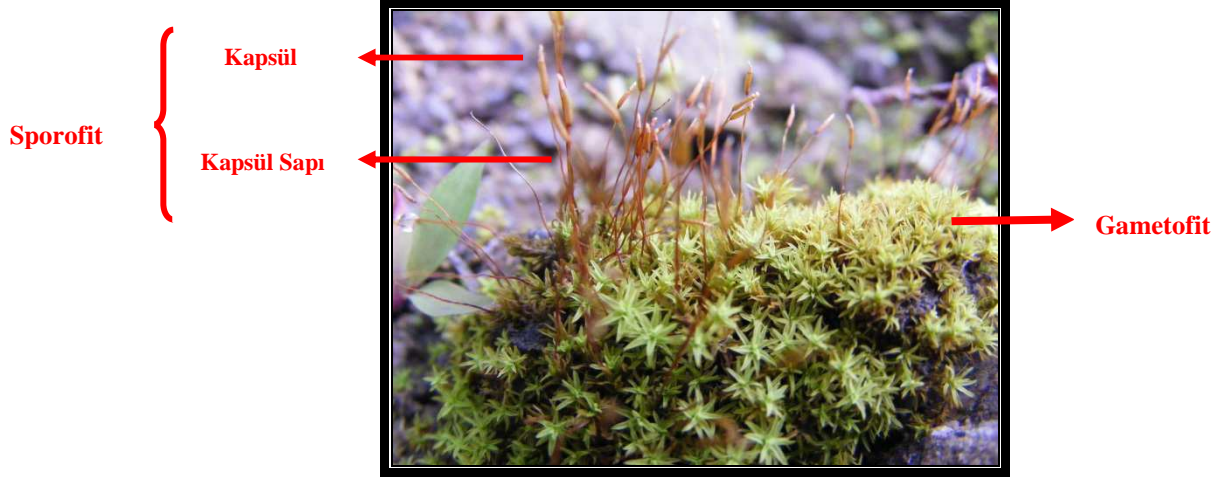
Şekil 1.8 Ölü ağaç üzerinde epifit karayosunu, *Leucobryum juniperoideum* (Foto: G.Abay)



Şekil 1.9 Beton üzerinde gelişen karayosunu (Foto: G. Abay)

Bazı bryofitler, *Ephemeropsis* ve *Viridivellus pulchellum* karayosunlarında olduğu gibi sadece birkaç mm uzunlukta ve az sayıda yaprak benzeri yapılara sahiptirler. *Buxbaumia* karayosunu kalın bir sap üzerinde büyük bir kapsüle sahiptir ve sadece birkaç özelleşmiş yaprak arkegoniyumu koruma görevini üstlenmiştir. *Monocarpus* ciğerotunun tallusu sadece 0.5-2 mm çapındadır. Diğer taraftan, *Polytrichum commune* karayosunu 50 cm den daha fazla bir yüksekliğe erişebilmektedir. Aynı şekilde *Dawsonia superba*, 70 cm yüksekliğe ve 35 mm yaprak uzunluğuna sahip olabilmekte ve bu ebatlarda kendini taşıyabilme yeteneğine sahip özelliktedir (Crum 2001). *Fontinalis* türleri sucul habitatlar ile desteklenen karayosunları olup 2 m uzunluğa kadar erişebilirler (Glime 2006).

Bryofitler gametofit ve sporofit adı verilen yapılardan meydana gelirler (Şekil 10). Gametofit baskın bir generasyon (1n kromozomlu), sporofit (2n) ise gelişimi için gametofite bağımlı bir yaşam döngüsü içerisinde yer alan bir yapıdır. Yaşam döngüsü, çimlenen spordan gelişen çoğu ciğerotlarında ve *Sphagnopsida*'da talloid yapıda, çoğu diğer karayosunlarında ise dallanmış iplikli yapıda olan bir protonemayı içerir. Protonema yapraklı gametoforları verecek olan tomurcukları üretir. Gametoforlar arkegoniyum ve anteridyumları üretirler ve zigot arkegoniyum içerisinde gelişen embrioyu oluşturur. Sporofitler gametofit üzerinde gelişir ve mayoz bölünmelerle sporları meydana getirirler. Bilinen yaşam döngülerine ek olarak vejetatif olarak bitkiden kopan parçalar sayesinde ve gemma adı verilen özel üreyimli yapılar sayesinde aseksüel olarak da çoğalabilmeleri mümkündür. Bryofitler damarlı bitkilerden, gelişimi için gametofite bağımlı olan sporofit yapıları ve baskın bir gametofit safhaya sahip olması ile farklılık gösterir. Ayrıca bryofitler; meristematik doku, lignin, traheid (karayosunlarında benzer fonksiyonlara sahip hydroidler mevcut) ve kalburlu hücrelere sahip olmamaları ile de farklılık gösterirler (Glime 2006).



Şekil 1.10 Karayosunlarında gametofit ve sporofit yapılar, *Barbula unguiculata* (Foto: G. Abay)

Bryofitlerin kimyası ile ilgili araştırmalar çok uzun zamandan beri ihmal edilmiştir. Bunun nedenleri olarak, bryofitlerin morfolojik olarak çok küçük yapılarda olmaları, saf örnek olarak çok büyük miktarlarda toplamının oldukça güç olması ve mikroskop altında bile teşhislerinin oldukça zor olması sayılabilir (Asakawa *et al.* 2013). Bryofit kimyası ile ilgili detaylı bilgilerin 1960'dan sonra ortaya çıkmaya başladığı (Schofield 2001) ve bryofitlerden izole edilen kimyasal bileşiklerin tarihinin ise son 50 yıla dayandığı literatür bilgilerinden anlaşılmaktadır (Sabovljević *et al.* 2001). Sözü edilen dönemlerde TLC (Thin Layer Chromatography) ve GC (Gas Chromatography), analizler için kullanılan ayırma teknikleri olmuştur. Bryofitler içerisinde, en fazla ciğerotları üzerine yoğunlaşmalar olmuş ve elde edilen bilgilerin taksonomik çıkarımları değerlendirilmiştir (Schofield 2001).

Son yıllarda, bazı bryofitlerdeki çok sayıdaki biyolojik aktiviteyi gösteren bileşiklerin varlığı yapılan kimyasal analizler sonucunda bilim dünyasına tanıtılmıştır (Asakawa *et al.* 2013). Değişik steroidler, yağ asitleri, yağlar, ve bazı organik bileşikler (terpenoidler, flavonoidler, lignanlar, antibiyotikler, lipidler, steroller vb.) bryofitlerden elde edilen önemli potansiyel kimyasal bileşiklerdir (Sabovljević *et al.* 2001). Geçmişten günümüze kadar bryofitlerin sahip oldukları değişik biyolojik etken maddelerin antimikrobiyal, antifungal, antitümör, antikanser ve insektisit açısından değerlendirilmesi bilinen aktivitelerden sadece bazılarını oluşturmaktadır (Asakawa

2007, Üçüncü *et al.* 2010). Frahm (2004) yapılan çalışmaların bryofit türlerine ve elde edilen ekstraların konsantrasyonuna bağlı olarak genelde bütün bryofitlerin etki gösterdiğini, özellikle ciğerotlarından elde edilen ekstraların en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olduğunu ve bunu turba yosunları (*Sphagnopsida*) ve gerçek karayosunlarının (*Bryopsida*) takip ettiğini ifade etmiştir (Tadesse 2002).

Bryofitlerden elde edilen çoğu kimyasal bileşikler tıp alanında kullanılmıştır (Pant 1998, Saxena and Harinder 2004). Bryofit türlerinin; Çin, Avrupa ve Kuzey Amerika'da tıbbi bitkiler olarak kullanımı 400 yıldan daha fazla bir süreyi kapsamaktadır (Asakawa, 1990a). Asakawa *et al.* (2013) tarafından bildirildiğine göre bazı tıbbi bryofitler ve bunların biyolojik aktiviteleri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Garnier *et al.* 1969, Suire 1972, Ding 1982, Wu 1982, Ando and Matsuo 1984, Asakawa 1999, Asakawa 1990a-b, Asakawa 1993, Asakawa 1995, Mizutani 1975).

Farklı coğrafyalardaki birçok ülkelerde bryofitlerden yararlanmada ilk üç sırayı; *Sphagnum*, *Marchantia* ve *Polytrichum* cinsleri paylaşmaktadır. Sözü edilen bryofitlerden ilk sırada yer alan *Sphagnum*'ların diğer bryofitlere göre daha fazla emici özelliği olması, bu cinsin uzun yıllar sargı bezi ve bebek bezi yapımında kullanımını gündeme getirmiştir. Bryofitlerden faydalanmada Çin, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada ilk üç sırayı oluşturmaktadır. Bryofit kullanımlarının hemen hemen yarısı ise Asya kıtasından rapor edilmiştir. Faydalı bryofitlerin farklı kullanım alanları incelendiğinde tıbbi olarak yararlanmaların fazla olduğu anlaşılmaktadır. Bunu dekoratif ve dolgu materyali olarak değerlendirmeler takip etmiştir (Harris 2008).

Çizelge 1. 1 Bazı Tıbbi Briyofitlerin Kullanım Alanları

Biyolojik Aktiviteleri ve Etkileri	
Musci (Karayosunları)	
<i>Bryum argenteum</i>	Panzehir, ateş düşürücü
<i>Cratoneuron filicinum</i>	Kalp hastalığı
<i>Ditrichum pallidum</i>	Kasılmalarda (Özellikle bebeklerde)
<i>Fissidens japonicum</i>	İdrar söktürücü, saç uzatıcı, yanıklarda, Sarılık
<i>Funaria hygrometrica</i>	Hemostaz (Kanamayı dindirme), akciğer tüberkülozu, sarılık, morluklar, ayak mantarı tedavisinde
<i>Haplocladium catillatum</i>	Panzehir, ateş düşürücü, gırtlak ve bademcik iltihabı, farenjit, üropatii(idrar yolları hastalığı), mastit (meme iltihabı), yılançık, zatürree, mesane iltihabı, orta kulak iltihabı
<i>Leptodictyum riparium</i>	Ateş düşürücü, üropatii(idrar yolları hastalığı)
<i>Mnium cuspidatum</i>	Hemostaz (Kanamayı dindirme), burun kanaması tedavisinde
<i>Oreas martiana</i>	Ağrı kesici, hemostaz (Kanamayı dindirme), harici yaraların tedavisinde, epilepsi, menoraji de (adet kanamasını düzenleme), nevreatani (sinir zayıflığı tedavisinde),
<i>Philonotis fontana</i>	Ateş düşürücü, panzehir, gırtlak ve bademcik iltihabı
<i>Plagiopus oederi</i>	Sakinleştirici, epilepsi, felç, kalp rahatsızlığı
<i>Polytrichum species</i>	İdrar söktürücü, saç çıkarıcı
<i>Polytrichum commune</i>	Ateş düşürücü, panzehir, Hemostaz (Kanamayı dindirme), kesiklerde, diş etlerinden gelen kanamayı durdurucu, hematemez (kan kusma), akciğer tüberülozu
<i>Rhodobryum giganteum</i>	Ateş düşürücü, İdrar söktürücü, tansiyon düşürücü, sakınleştirici, nevreatani (sinir zayıflığı tedavisinde), psikoz (ruhsal denge bozukluğu), kesiklerde, kalp rahatsızlığı, kalp kan damarlarını genişletici
<i>Rhodobryum roseum</i>	sakinleştirici, nevreatani (sinir zayıflığı tedavisinde), kalp rahatsızlığı
<i>Taxiphyllum taxirameum</i>	İltihap azaltıcı, Hemostaz (Kanamayı dindirme), harici yaraların tedavisinde
<i>Weissia viridula</i>	Ateş düşürücü, panzehir, burun iltihabı
Hepaticae (Ciğerotları)	
<i>Conocephalum conicum</i>	Antimikrobiyal, antifungal, ateş düşürücü, panzehir olarak, kesiklerin tedavisinde, yanıklarda, kaynar sudan ileri gelen yanık veya yara, kırıklarda, şişmiş dokularda, yılan sokması zehirlenmelerinde, safrakesesi taşı tedavisinde
<i>Frullania tamarisci</i>	Antiseptik
<i>Marchantia polymorpha</i>	Ateş düşürücü, panzehir, idrar söktürücü, kesiklerin tedavisinde, kırıklarda, sokması zehirlenmelerinde, yanıklarda, , kaynar sudan ileri gelen yanık veya yara, harici yaraların tedavisinde
<i>Reboulia hemisphaerica</i>	Kızarıklıklarda, Hemostaz (Kanamayı dindirme), harici yaraların tedavisinde, ezik (çürük) tedavisinde

Bryofit türlerinin ekolojik tarım ve bahçecilikte de alternatif bir ürün olarak değerlendirilebileceği literatür kayıtlarında geçmektedir (Pant 1998, Frahm 2004, Saxena and Harinder 2004). Günümüze kadar ekolojik tarım endüstrisi, bakır sülfat gibi ağır metal tuzlarını mantar enfeksiyonlarına karşı kullanmış ve kullanmaya da devam etmektedir. Ağır metaller toprakta biriktiğinden bu durum tartışmaya açıktır. Buna karşın, bryofit ekstresi kolayca ve hızlı bir şekilde bozulabilen çevre dostu alternatif doğal bir üründür. Bryofitlerce zengin tropikal dağlık bölgelerdeki çiftçilerin az miktarda finansal kaynak ile kendileri için bryofit ekstraktları hazırlaması, onları endüstriyel ülkelerde üretilen pahalı ürünlere karşı bağımsız kılmıştır (Frahm 2004). Bryofitlerin diğer bir kullanım alanı da bahçeciliktir. Japonya'da karayosunu bahçeleri huzur verici, dinlendirici olduğu düşüncesiyle birçok alanda tesis edilmiştir. Kyoto'da bunun çarpıcı örnekleri bilinmektedir. Ayrıca bonzai sanatında kullanılan bitkilerin zeminlerinde birçok karayosunu yer örtücü olarak kullanılmaktadır (Schenk 2002, Glime 2007).

Bryofitlerin kimyasal içerikleri konusunda Türkiye'de son yıllarda yapılan bazı çalışmalar; Üçüncü *et al.* (2010), Oztopcu-Vatan *et al.* (2011), Savaroğlu *et al.* (2011a), Cansu *et al.* (2013) ve Abay *et al.* (2012, 2013) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ise, *Rhytidiadelphus triquetrus* ve *Tortella tortuosa* karayosunundan farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların fitokimyasal incelenmesi ve HeLa ve C6 hücrelerine karşı antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, hekzan ekstresinin sabit yağları ve kloroform, etil asetat, metanol, su, su/etil asetat ve su/n-bütanol ekstraktlarının fenolik bileşikleri belirlenmiş ve tüm ekstraktların antiproliferatif aktiviteleri incelenmiştir. Sabit yağlar GC, GC-MS ile fenolik bileşenler ise HPLC-TOF/MS ile belirlenmiştir. Bu çalışma ile sözü edilen karayosunlarından elde edilen ekstraktların kanserli hücreler üzerinde deneyerek hücre çoğalmasını engelleyici özelliklerinin olup olmadığı ve ekstraksiyon ve fraksiyon aşamalarında etken maddenin olup olmadığının ortaya çıkarılması, çalışmanın sağlık alanında kullanılabilirliği açısından önemlidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bazı briyofit ekstreleri antioksidan (Pejin ve Bogdanović-Pristov 2012, Choobot *et al.* 2006, Choobot *et al.* 2008), antimikrobiyal ve antifungal (Singh *et al.* 2007, Altuner 2008, Deora *et al.* 2011, Savaroglu ve ark. 2011a), antifeedant (Fram and Kirchhof 2002), allelopatik etki (Tsubota *et al.* 2006) ve insektisit aktivite (Abay ve ark. 2012) gibi birçok aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, bryofit ekstrelerinin bazı antiproliferatif (anti-tümör, anti-kanser) etkileri konusunda yapılmış çalışmalar kronolojik sırada aşağıda verilmiştir.

Spjut *et al.* (1986), *Polytrichum ohioense*'nin hücre kültürü yoluyla elde edilen kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Topladıkları 218 bryofit taksonundan 75'inin toksik, 43'ünün ise aktif bileşiklere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Yazarlar; aktivite gösteren taksonların özellikle *Thuidiaceae*, *Mniaceae*, *Neckeraceae*, *Hypnaceae*, *Brachytheciaceae*, *Polytrichaceae*, *Dicranaceae* ve *Grimmiaceae* familyalarına ait olduğunu ve bryofitlerin yeni biyolojik aktif bileşiklerin keşfi için ümit verici bir kaynak olduğunu önermişlerdir.

Spjut (1992) bryofitlerin antitümör ajan olabilme potansiyellerini, onları sistematik açıdan ele alarak araştırmıştır. *Claopodium crispifolium* (Hook.) Ren. & Card., *Anomodon attenuatus* Hueb., *Polytrichum* türlerinden izolasyonla elde edilen bileşiklerin sitotoksik ve antitümör özellik gösterdiklerini belirtmiştir. 1990-1991 yıllarında Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinden toplanan yüzlerce bryofit türünün taranması sonucu, *Porella* cinsine ait türlerden etken sesquiterpen laktonların izole edildiği bildirilmiştir. 250-2000 gr arasında miktarlarda toplanan bryofit örneklerinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlar; P-388 lenfatik lösemi (*in vivo*), insan nazofarenks karsinomu (9KB) ve astrositom hücrelerine (9ASK) karşı test edilmiştir. Test sonuçları sistematik bryofit grupları, özellikle *Thuidiaceae*, *Mniaceae* ve *Neckeraceae* familyaları, ile korelasyon göstermiştir.

Gunatilaka *et al.* (1994), bazı bryofit ekstralarının potansiyel antikanser aktivite özelliği göstermesi nedeniyle, doğal ürünlerden izolasyonla elde edilen maddeler açısından değerlendirildiğinde bryofitlerin önemli bir yere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Lorimer *et al.* (1996) yaptıkları bir çalışma da; Yeni Zelanda'dan briyofit, liken ve vasküler bitki olmak üzere 86 tür toplamışlardır. Bu türlerin P388 (Kan kanseri) hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini incelemişlerdir. En yüksek aktivite ciğerotlarında (25 adet/29 adet) ve en düşük aktivite ise karayosunları ve boynuzsu ciğerotlarında (4/22) gözlenmiştir.

Bertl *et al.* (2004), karayosunlarında bulunan bir bibenzil olan lunularik asidin 4 türevinin; kolon kanseri hücrelerinde hücre büyümesi üzerinde, kadınlık hormonu ve meme tümör hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ivanova *et al.* (2007), *Sanionia georgico-uncinata* karayosunundan kloroform-metanol (1:1) çözücülerini kullanılarak elde edilen Sanionin A ve B'nin; insan lösemi (K562) ve rahim ağzı kanseri hücrelerinde (HeLa), farelerde bağ dokusu ana hücreleri (L929-fibroblast)'nde 72 saat sonra antiproliferatif aktivite ve sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yamada *et al.* (2007), Kanada'da yetişen *Sphagnum* turba yosununun sıçan bazofilik lösemisi üzerinde sitotoksik etkisini MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizi yaparak çalışmışlardır. Analiz sonucunda, düşük dozlar (0.001-10 µg/mL) 48 saat sonra hiçbir azaltıcı etki göstermemiştir. Sözü edilen *Sphagnum* turba yosununun elde edilen fulvik asidin alerjik hastalıkları önleme veya tedavisinde yararlı olabileceği ifade edilmiştir.

Guo *et al.* (2008), *Scapania verrucosa* Heeg. ciğerotu ve bu ciğerotu üzerinde yaşayan endofitik mantar *Chaetomium fusiforme*'den elde edilen ether ekstralarının kimyasal bileşimi, antifungal ve anti-tümör özellikleri araştırılmıştır. *C. fusiforme*'nin konukçu bitkiye göre daha fazla anti-tümör etki gösterdiği tespit edilmiştir. *S. verrucosa*

çiğerothu'nun, test edilen bütün tümör hücreleri üzerinde kısmen etkili olduğu belirtilmiştir.

Krzaczkowski *et al.* (2009), insan rahim kanseri hücrelerinde (HeLa) anormal fenotipik gelişmelere neden olan ve büyümei engelleyici bryofit ekstralarının farmakolojik taramasını çalışmışlardır. Test edilen 219 karayosunu ekstresi arasından, interfazik ve mitotik hücreler üzerine önemli etkilerinin çeşitli kombinasyonları ile hücre bölünmesi üzerine etkili 41 ekstrakt tespit edilmiştir. Hücre canlılığı, hücre döngüsü ve fenotipik analizler kullanılarak 7 ekstrakt daha fazla incelenmiştir. 2 sıra dışı fenotip içeren 3 tane farklı farmakolojik yapı aydınlatılmıştır.

Komala *et al.* (2010), Tahiti *Mastigophora diclados* ve *Frullania* türleri ve Endonezya *Frullania* türleri, *Dumortiera hirsuta*, *Marchantia* türleri ve Japonya *Porella perrottetiana* türlerinin ham ekstralarının GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi) ile kimyasal bileşenlerini belirlemişlerdir. Tahiti *M. diclados* ve *Frullania* türleri ve Endonezya *Frullania* türleri HL-60 (İnsan miyelosit kan kanseri) ve KB (Rahim kanseri) hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermişlerdir.

Oztopçu-Vatan *et al.* (2011) tarafından, *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp.'un antimikrobiyal ve antiproliferatif özellikleri araştırılmıştır. Sözü edilen karayosunundan elde edilen ekstre C nin C6 hücreleri üzerinde en etkili olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik bir süre sonunda; 85 µg/mL lik konsantrasyon kanserli hücrelerin yaşam gücünü %39, 170 µg/mL lik konsantrasyon ise %86 oranında azaltmıştır.

Savaroğlu *et al.* (2011b), sucul bir karayosunu olan *Fontinalis antypretica* Hedw.'nın antikanser özelliklerini incelemişlerdir. İki farklı ekstraksiyon yöntemiyle 8 özüt (metanol, kloroform, aseton, etil asetat, A, B, C ve D) elde edilmiştir. Ekstre C'nin aktif bileşeninin 0,16, 1,6, 16,80 ve 160 µg/mL konsantrasyonlarının in vitro toksisitesi test edilmiştir. Sadece 80 ve 160 µg/mL'lik konsantrasyonların 24 ve 48 saatte doza ve zamana bağlı olarak sıçan glioma (C6) hücre canlılığında azalmaya neden olduğu rapor

edilmiştir. Yazarlar, sonuç olarak bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında *F. antypretica*'nın antikanser ajan olabilme olasılığını ileri sürmüşlerdir.

Cheng *et al.* (2012) tarafından, *Polytrichum commune* Hedw. karayosununun etanolik ekstraktlarının ve *P. commune*'den elde edilen farklı fraksiyonların L1210 (lösemi) hücrelerinde anti-tümör ve apoptotik aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, konsantrasyona bağımlı olarak *P. commune*'den elde edilen ve 24 saatlik bir zaman dilimi sonrası IC₅₀ değeri 77.22 µg/mL olan etanolik ekstraktların kanserli hücrelerin yaşama gücünü azalttığını göstermiştir. Etilasetat fraksiyonu, 48 saat sonra elde edilen IC₅₀ değeri 32.29 µg/mL olan kloroform ve bütanol fraksiyonlarından daha yüksek anti-tümör etki göstermiştir. Bu çalışma *P. commune*'den elde edilen ham etanol ekstraksiyonunun, kültürü yapılmış L1210 (lösemi) hücrelerinde anti-tümör etkisini ele alan ilk araştırmadır.

Oztopcu-Vatan *et al.* (2012), *Homalothecium sericeum* ekstrelerinin sıçan glioma (C6) hücreleri üzerinde zamana bağlı sitotoksik etkilerini incelemiştir. *H. sericeum*'dan elde edilen aseton ekstreleri 0.17, 1.7 ve 17 µg/mL'lik konsantrasyonlarda C6 hücrelerinin yaşamsal seyirlerinde herhangi bir etki göstermemiştir. Fakat 48 saat sonra 85 µg/mL'lik konsantrasyonda % 16 ve 170 µg/mL'lik konsantrasyonda % 36 oranında C6 hücrelerinin gelişimini engellediği gözlenmiştir. 0.17 µg/mL'lik konsantrasyonda Ekstre A, C6 hücrelerinin yaşama yeteneğine herhangi bir etki gösterememişken, 48 saatlik bir gözlem sonucunda; 1.7 µg/mL'lik konsantrasyonda % 6, 17 µg/mL'lik konsantrasyonda % 8, 85 µg/mL'lik konsantrasyonda % 24 ve 170 µg/mL'lik konsantrasyonda % 33 oranında C6 hücrelerinin yaşama gücünde bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Munzi *et al.* (2014) *Peltigera* cinsi likene ait *P. canina*, *P. elisabethae* ve *P. praetextata* türlerinin su, etanol ve metanol ham ekstrelerinin miyelom (kemik iliği plazma kanser hücreleri) hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak; su ekstreleri hücre proliferasyonunu azaltan en etkili ekstre olarak rapor edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Karayosunu Materyali

Araştırmanın materyalini *Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst. (Şekil 3.1) ve *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. (Şekil 3.2) karayosunu türleri oluşturmaktadır. Her iki tür 2013 yılında toplandı. *R. triquetrus*, 1689 m yükseltide ve 40° 49' 734" kuzey enlemi-33° 46' 634" doğu boylamı arasında kalan Çankırı ili Yapraklı ilçesi Mesire yerindeki *Pinus sylvestris* L. ve *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. bitki örtüsünün yayılış gösterdiği alanda toprak üzerinden toplandı. *T. tortuosa*, yine aynı lokalitede, 1679 m yükseltide 40° 49' 695" kuzey enlemi-33° 46' 779" doğu boylamına sahip coğrafi koordinatlarda, toprak üzerinden toplandı.



Şekil 3.1 *Rhytidiadelphus triquetrus* (Hedw.) Warnst. (Foto: G. Abay)



Şekil 3.2 *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. (Foto: G. Abay)

3.2. Arazi Çalışması ve Herbaryum Örneklerinin Hazırlanması

Rhytidiadelphus triquetrus (Hedw.) Warnst. ve *Tortella tortuosa* (Hedw.) Limpr. karayosunu türlerinin mümkün olduğunca çevre kirliliğinden uzak, yerleşim alanlarının olmadığı veya müdahale görmemiş ekosistemlerden alınmasına özen gösterildi. Araziden toplanan karayosunu örnekleri önceden hazırlanmış plastik poşetler içerisine konuldu. Her bir tür için; bitki örneklerinin toplandığı tarih, yükselti, bitki örtüsü, coğrafi koordinatlar ve habitat bilgilerini içeren etiketler hazırlanıp ilgili karayosunu türlerinin bulunduğu plastik poşetlere konuldu. Toplanan örnekler laboratuvarında gazete kağıtları üzerine serilerek kurutuldu. Sonra kuruyan örnekler standart ebatlardaki zarflar içerisine konularak muhafaza altına alındı ve herbaryum örneği haline getirildi.

3.3. Karayosunu Türlerinin Teşhisi

Araziden toplanan karayosunu türlerinin teşhisi için Smith (2004) flora eserinden yararlanıldı. Buna göre, söz konusu taksonlar için önce hangi cinse ait oldukları tespit edildi ve daha sonra ise tür düzeyinde teşhisleri yapıldı. İlgili bitki örneklerinin Türkiye florasında olup olmadığını kontrol etmek için, Uyar ve Çetin (2004) karayosunu kontrol listesinden yararlanıldı. Taksonların güncel Latince adlarının kullanımında Hill *et al.* (2006) tarafından hazırlanan bryolojik monograf esas alındı.

3.4. Karayosunlarının Kurutulması ve Öğütülmesi

Karayosunları *Rhytidiadelphus triquetrus* (RT) ve *Tortella tortuosa* (TT) öncelikle istenmeyen otlardan arındırıldı (Şekil 3.3) ve oda sıcaklığında (25 °C) kurutuldu (Şekil 3.4).



Şekil 3.3 Karayosunlarının safsızlıklardan arındırma işlemi



Şekil 3.4 Karayosunlarının kurutulması işlemi

Ekstraksiyon işleminde verimi artırmak için temizlenen karayosunu -189°C de sıvı azotla parçalandı (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5 Karayosunlarının sıvı azotla parçalanma işlemi

Sıvı azotla parçalanma işlemi sonucunda karayosunları tartıldı.

3. 5. Ekstraksiyon İşlemi

3.5.1. Hekzan Ektresinin Eldesi

3.5.1.1. RT'nin hekzan ektresinin eldesi

Bir balon içerisine RT (74.54 g) alındı ve üzerine hekzan (1600 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.6).

3.5.1.2. TT'nin hekzan ektresinin eldesi

Bir balon içerisine TT (297.34 g) alındı ve üzerine hekzan (3000 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 RT ve TT hekzan ekstreleri

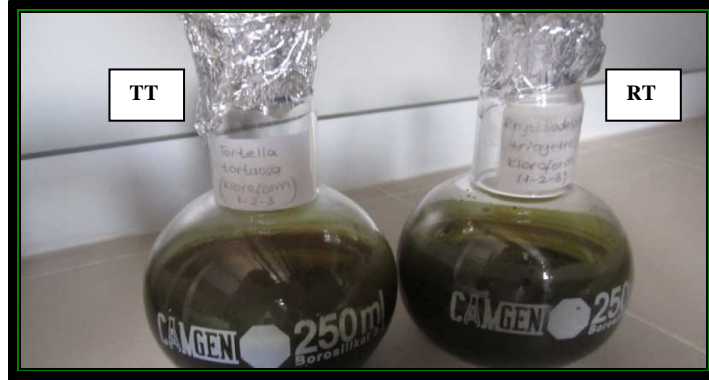
3.5.2. Kloroform (CHCl₃) Ektresinin Eldesi

3.5.2.1. RT' nin kloroform ektresinin eldesi

Hekzan ekstraksiyon işlemi sonucu kalan RT posası üzerine kloroform (750 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.7).

3.5.2.2. TT'nin kloroform ektresinin eldesi

Hekzan ekstraksiyon işlemi sonucu kalan TT posası üzerine kloroform (1750 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 RT ve TT kloroform ekstreleri

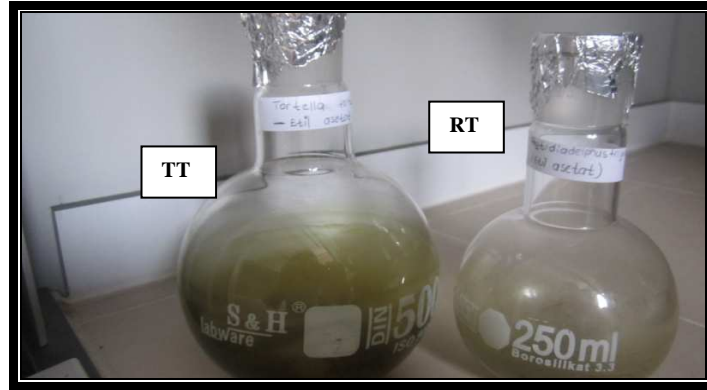
3.5.3. Etilasetat (EtOAc) Ektresinin Eldesi

3.5.3.1. RT'nin etilasetat ektresinin eldesi

Kloroform ekstraksiyon işlemi sonucu kalan RT posası üzerine etilasetat (500 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.8).

3.5.3.2. TT'nin etilasetat ektresinin eldesi

Kloroform ekstraksiyon işlemi sonucu kalan TT posası üzerine etilasetat (1000 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 RT ve TT etil asetat ekstraktları

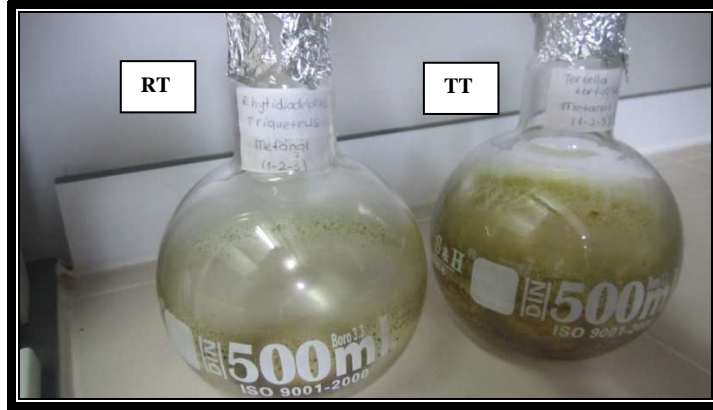
3.5.4. Metanol (MeOH) Ektresinin Eldesi

3.5.4.1. RT'nin metanol ektresinin eldesi

Etil asetat ekstraksiyon işlemi sonucu kalan RT posası üzerine metanol (500 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.9).

3.5.4.2. TT'nin metanol ektresinin eldesi

Etil asetat ekstraksiyon işlemi sonucu kalan TT posası üzerine metanol (1000 mL) ilave edildi. 3 gün oda sıcaklığında maserasyon yöntemiyle ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Her işlem sonunda bitki posası süzgeç kağıdı yardımıyla süzüldü. Süzüntüler birleştirildi. Elde edilen süzüntünün çözücüsü evaporatörde uzaklaştırıldı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 RT ve TT metanol ekstreleri

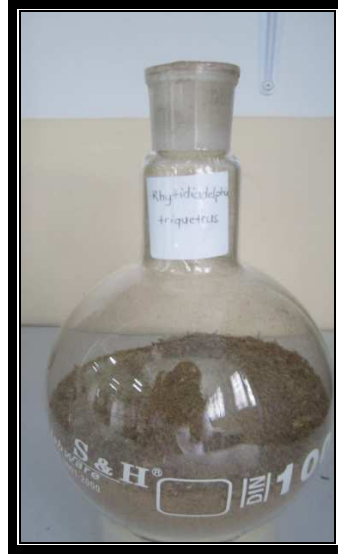
3.5.5. Su Ektresinin Eldesi

3.5.5.1. RT'nin su ektresinin eldesi

Metanol ekstraksiyon işlemi sonucu kalan RT posası (Şekil 3.10) bir süzgeç kağıdı üzerinde kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.10 RT bitki posası



Şekil 3.11 RT bitki posasının kaynatılmaya hazırlanması

Elde edilen kuru bitki posası (Şekil 3.11) saf suda (800 mL) geri soğutucu altında 5-6 saat kaynatıldı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 RT sulu fazın geri soğutucu altında kaynatılması işlemi

RT sulu fazın geri soğutucu altında kaynatılması işleminden sonra bir bez yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.13). Sulu ekstredeki su evaporatörde uzaklaştırıldı.



Şekil 3.13 RT sulu fazın süzme işlemi

3.5.5.2. TT'nin su ektresinin eldesi

Metanol ekstraksiyon işlemi sonucu kalan TT'nin posası (Şekil 3.14) bir süzgeç kâğıdı üzerinde kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.14 TT bitki posası



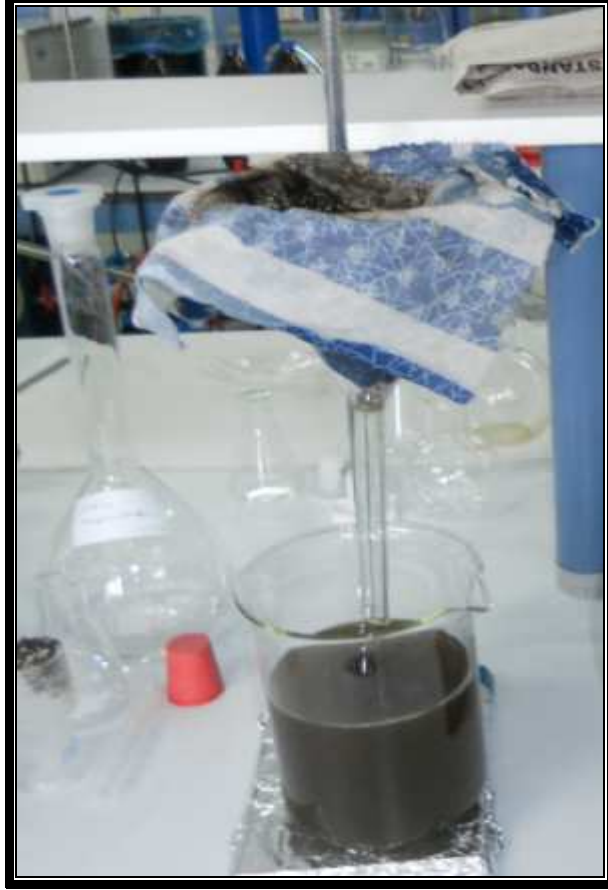
Şekil 3.15 TT bitki posasının kaynatılmaya hazırlanması

Elde edilen kuru bitki posası (Şekil 3.15) saf suda (1500 mL) geri soğutucu altında 5-6 saat kaynatıldı (Şekil 3.16).



Şekil 3.16 TT sulu fazın geri soğutucu altında kaynatılması işlemi

TT sulu fazın geri soğutucu altında kaynatılması işleminden sonra bir bez yardımıyla süzme işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.17). Sulu ekstredeki su evaporatörde uzaklaştırıldı.



Şekil 3.17 TT sulu fazın süzme işlemi

3.5.6. RT ve TT Ekstrelerinin Etil Asetat ve n-Bütanol ile Ekstraksiyon İşlemi

RT su ekstresi (300 mL) sırası ile etil asetat (5x 300 mL) ve n-bütanol (5x 300 mL) ile ekstrakte edildi. Aynı şekilde TT su ekstresi (1L) sırası ile etil asetat (5x 500 mL) ve n-bütanol (5x 500 mL) ile ekstrakte edildi (Şekil 3.18). Elde edilen ekstrelerin çözücüleri evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı.



Şekil 3.18 TT sulu fazın ekstraksiyon işlemi

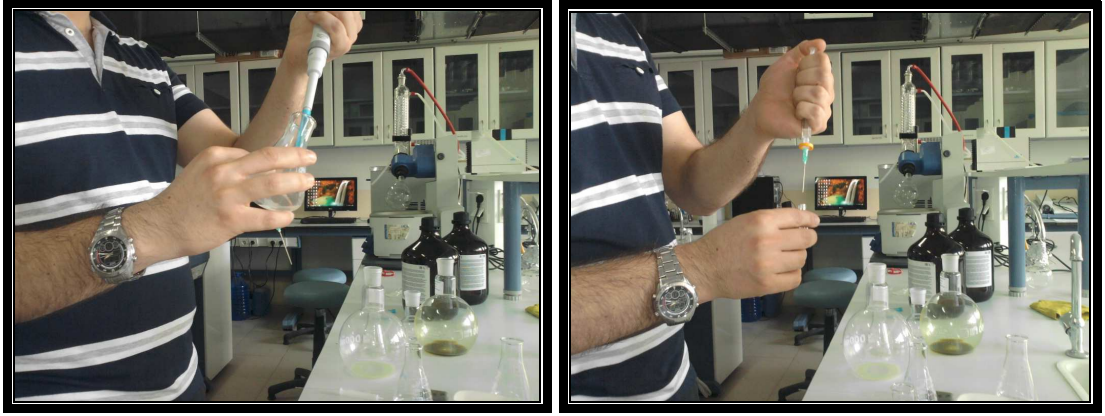
3.6. Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analizi

3.6.1. Hekzan ekstrelerinin esterleştirilmesi işlemi

RT ve TT karayosunlarının hekzan ekstrelerinin her birinden 11 mg alındı ve üzerine 1 Molar KOH/metanol çözeltisinden 5 mL eklendi. Oluşan karışım vorteksle iyice karıştırıldı (Şekil 3.19). Bu karışım üzeri 3 mL hekzan ilave edildi ve vorteksle iyice karıştırıldı. Hekzan fazından 1mL alınarak 7 mL hekzanla seyreltildi (3.66 mg/7 mL hekzan) ve bu çözeltiden 1.5 mL alınarak (Şekil 3.20) GC-MS analizi (Şekil 3.21) gerçekleştirildi (Demirtas and Sahin, 2013).



Şekil 3.19 Hekzan ekstralarının esterleştirilmesi işlemi



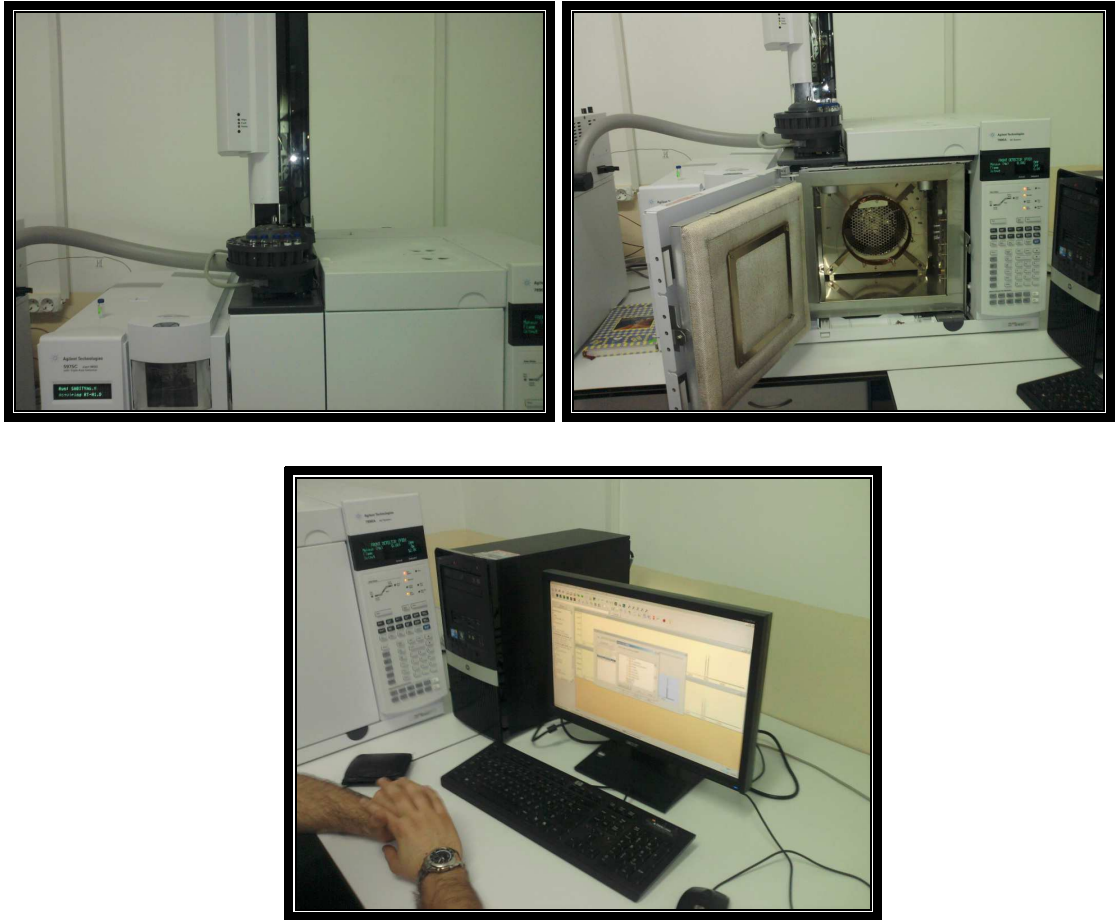
Şekil 3.20 Esterleştirilmiş hekzan ekstralarının viallere alınışı

3.6.2. Gaz kromatografisi (GC) programı

Sabit yağ analizleri için, Perkin Elmer Clarus 500 model gaz kromatografisi kullanıldı. Cihazda BPX-20 kapiler kolon (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlık; 5% phenyl polysilphenylene-siloxane), 70 eV iyonlaştırma voltajı ve FID detektörü kullanıldı. Fırın sıcaklığı şu şekilde: 50- 120 °C arası 5 °C/dak. ve 120 °C- 240 °C arası 10 °C/dak ve son kısımda 5 dakika tutuldu. 1.0 µL seyreltilmiş ekstralar, 300:1 split modunda cihaza enjekte edildi. Enjektör ve dedektör sıcaklığı, sırasıyla 220 °C ve 290 °C ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanıldı ve akış oranı 1 mL/dak olarak belirlendi ve örnekler 1/1000 oranında seyreltildi.

3.6.3. Gaz kromatografisi/ kütle spektrometrisi (GC/MS) programı

GC/MS analizi Perkin Elmer kütle spektrometresi ile gerçekleştirildi. Cihazda otosampler ve kolon olarak BPX-20 column (30m x 0.25mm x 0.25µm film) kullanıldı. GC/MS tespitleri için bir elektron iyonlaştırma sistemi kullanıldı (70 eV iyonlaştırma enerjisi). Taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanıldı ve akış oranı 1.3 mL/dak ve örnekler 1/1000 oranında seyreltildi.



Şekil 3.21 Örneklerin GC-MS analizi

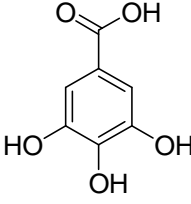
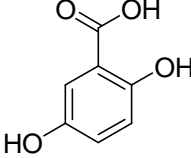
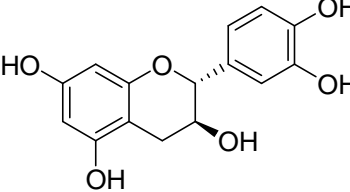
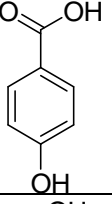
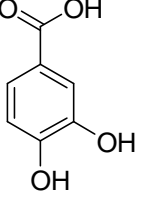
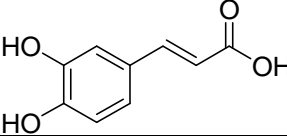
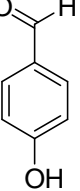
3.7. Kloroform, Etil Asetat (EtOAc), Metanol (MeOH), Su, Su/EtOAc ve Su/n-Bütanol Ekstrelerinin HPLC-TOF/MS Analizi

Kloroform, etil asetat, metanol, su, su/etil asetat ve su/ n-bütanol ekstrilerinin fenolik madde içeriği HPLC-TOF/MS analizi ile gerçekleştirildi. Analiz işlemleri sırasında gallik asit, gentisik asit, kateşin, 4-hidroksibenzoik asit, protokateşoik asit, kafeik asit, 4-hidroksi benzaldehit, rutin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, apigenin-7-glikozit, naringenin, kamferol, rosmarinik asit, salisilik asit, kersetin, ellajik asit, resveratrol ve klorojenik asit olmak üzere toplam 19 bileşenin (Çizelge 3.1) kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirildi. Bu analiz için aşağıda belirtilen program kullanıldı.

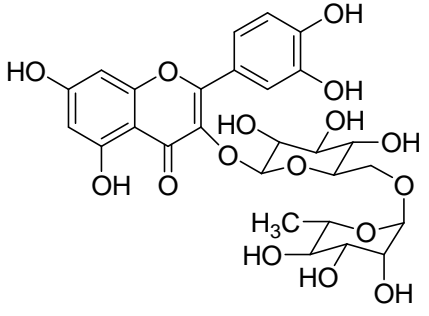
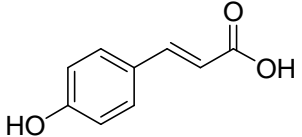
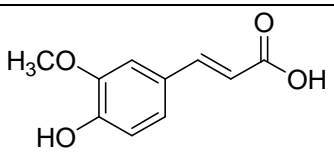
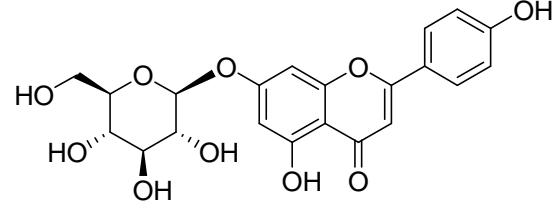
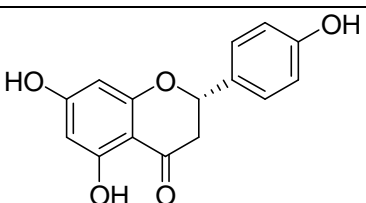
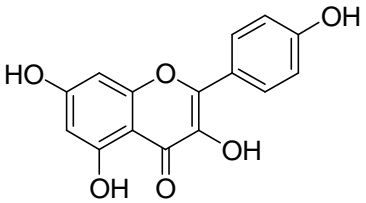
3.7.1. HPLC-TOF/MS programı

Ekstrelerin fenolik içeriği, Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System ile birleştirilmiş 6210 Time of Flight (TOF) LC/MS dedektör ve Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2.7 mm, 4.0 x 50 mm) kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Mobil faz A ve B sırasıyla, ultra saf su ile 0.1% formik asit ve asetonitril karışımı kullanıldı. Akış oranı 0.4 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 35 °C dir. Enjeksiyon hacmi 5 µL olarak kullanıldı. Çözücü programı şu şekilde: 0. dak %10 B; 0-1 dak %10 B; 1-10 dak %80 B; 10-19 dak %80 B; 19-19.10 dak %10 B; 19.10-29.1 dak %10 B. Standart bileşiklerin alıkonma zamanları (Retention times, RT) ve *m/z* değerleri ekstrilerin bileşenlerinin belirlenmesinde kullanıldı. MS-TOF cihazının iyonlaşma modu negatif olup, gaz sıcaklığı 325 °C, gaz akışı 11.0 L/dak, nebulizör (45 psi).

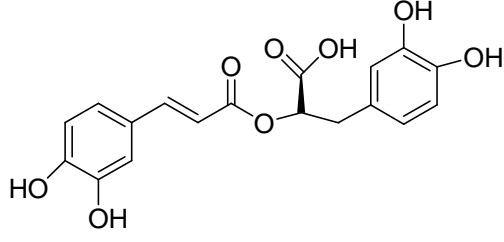
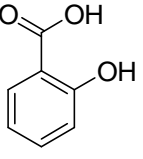
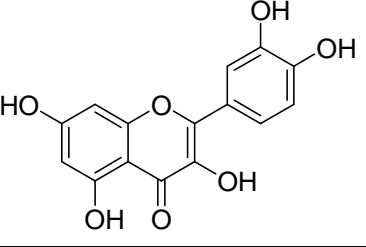
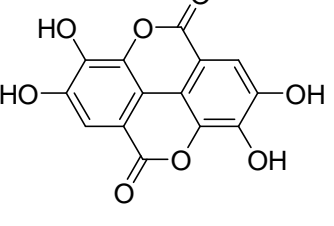
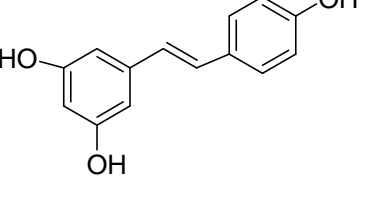
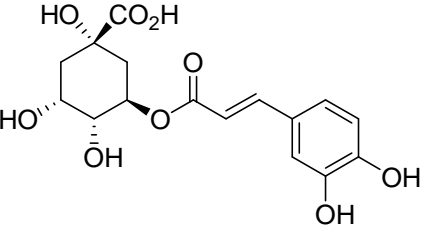
Çizelge 3.1 Analizi gerçekleştirilen fenolik bileşenler

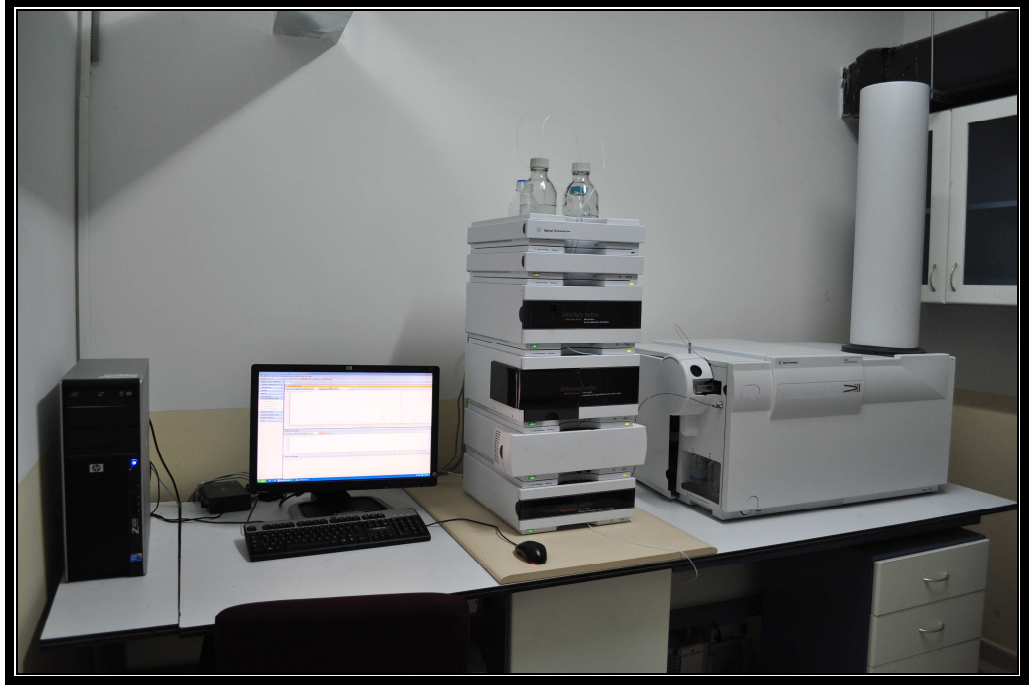
No	Molekül Adı	Molekül formülü	Kapalı formülü	Gerçek Molekül ağırlığı (g/mol)	Hesaplanan Molekül ağırlığı (g/mol)
1	Gallik asit		$C_7H_6O_5$	169,0142	169,0112
2	Gentisik Asit		$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0163
3	Kateşin		$C_{15}H_{14}O_6$	289,0718	289,0675
4	4- hidroksibenzoik Asit		$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0217
5	Protokateşoik Asit		$C_7H_6O_4$	153,0193	153,0159
6	Kafeik Asit		$C_9H_8O_4$	179,0350	179,0316
7	4-hidroksi benzaldehit		$C_7H_6O_2$	121,0295	121,0271

Çizelge 3.1' in devamı

8	Rutin		$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1461	609,1395
9	p-Kumarik Asit		$C_9H_8O_3$	163,0401	163,0367
10	Ferulik Asit		$C_{10}H_{10}O_4$	193,0506	193,0469
11	Apigenin-7-glikozit		$C_{21}H_{20}O_{10}$	431,0984	431,0939
12	Naringenin		$C_{15}H_{12}O_5$	271,0612	271,0698
13	Kamferol		$C_{15}H_{10}O_6$	285,0405	285,0369

Çizelge 3.1' in devam

14	Rosmarinik Asit		$C_{18}H_{16}O_8$	359,0772	359,0732
15	Salisilik Asit		$C_7H_6O_3$	137,0244	137,0220
16	Kersetin		$C_{15}H_{10}O_7$	301,0354	301,0317
17	Ellajik Asit		$C_{14}H_6O_8$	300,9990	300,9946
18	Resveratrol		$C_{14}H_{12}O_3$	227,0714	227,0678
19	Klorojenik asit		$C_{16}H_{18}O_9$	353,0878	353,0826

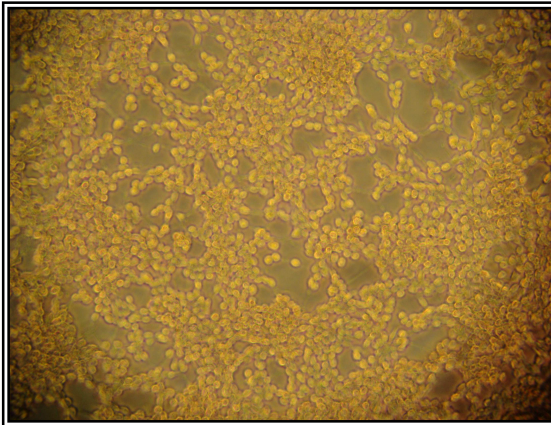


Şekil 3. 22 HPLC-TOF/MS cihazı

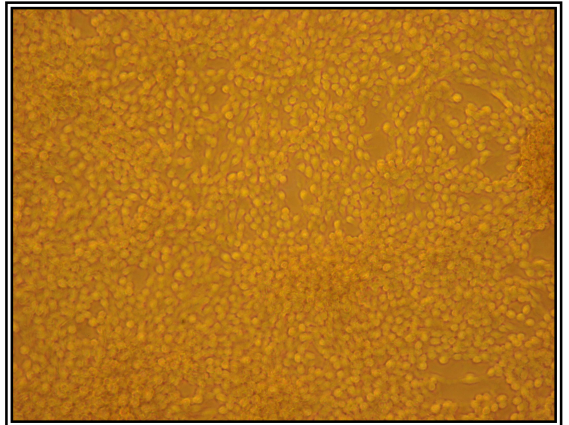
3.8. Antiproliferatif Aktivite

3.8.1. HeLa ve C6 hücrelerinin hücre kültürü işlemi

Antiproliferatif aktivite testlerinde HeLa (İnsan Rahim Kanseri Hücresi) ve C6 (Sıçan Beyin Tümör Hücresi) hücreleri kullanıldı (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24).

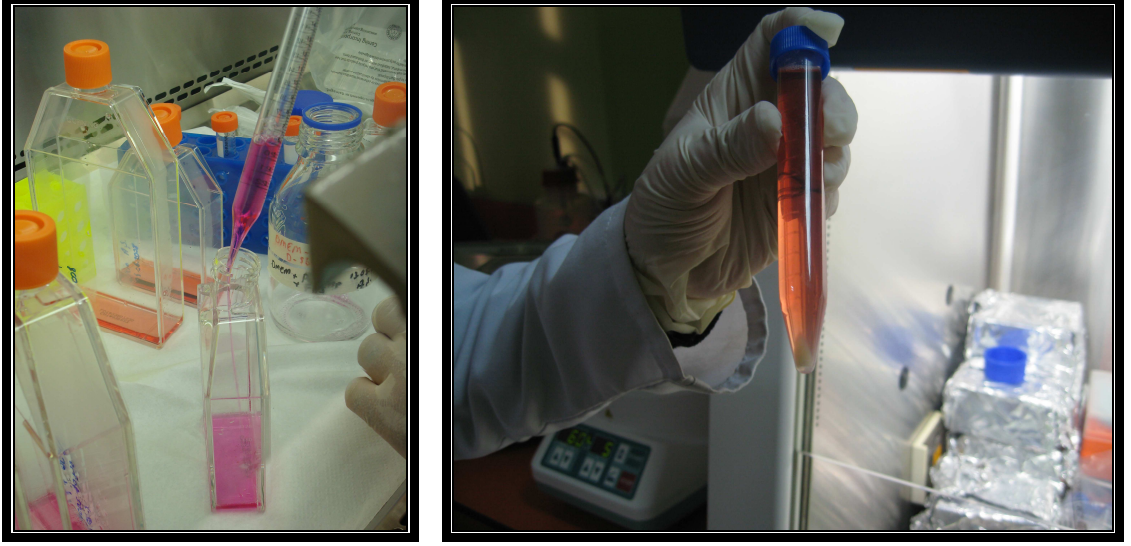


Şekil 3.23 C6 Tümör Hücresi



Şekil 3.24 HeLa Kanser Hücresi

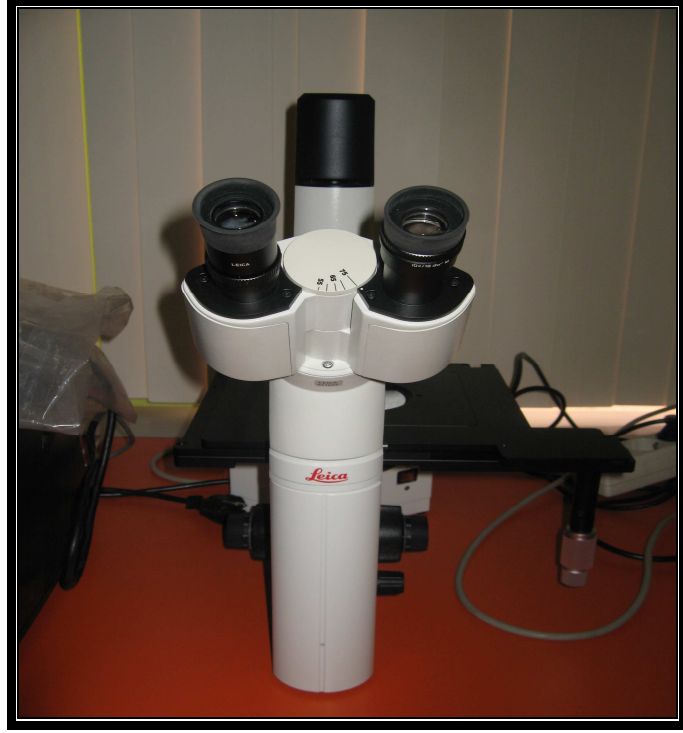
Steril kaplarda bulunan HeLa ve C6 hücrelerinin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler trypsin-EDTA (10 mL) ile 1-2 dakika inkübe edildi (veya CO₂ inkübatöründe, 37 °C). Böylece yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlandı.



Şekil 3.25 Pasajlama işlemi

İnkübatörden çıkarılan kap içerisine besi yeri DMEM (10 mL) eklenerek ortam nötralize edildi ve kap çalkalanarak hücre süspansiyonu falkon tüpüne aktarıldı, (600 rpm, 5 dak) santrifüj edilerek hücrelerin çökeltilmesi sağlandı. Besiyeri steril olarak boşaltıldıktan sonra, hücre çökeltisi DMEM besi yeri (1-3 mL) ile bir pipet kullanılarak çözüldü.

Diğer taraftan steril 250 mL'lik kaplara 20 mL DMEM besi yerinden ve süspansiyon edilen hücrelerden 1 mL konuldu. Bu kaplar kapakları yarı açık halde inkübatöre yerleştirildi ve bu işlem (split) her 4 günde bir tekrarlandı. Bu işlem tekrarlanırken hücrelerin büyümesi ve kontamine olup olmadığı, inverted mikroskop altında kontrol edildi.



Şekil 3.26 Inverted (ters) mikroskop

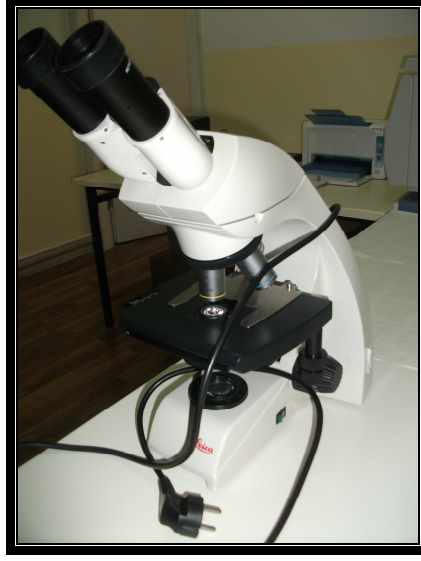
3.8.2. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Hücre pelletinden % 10 DMSO-DMEM karışımı ile hazırlanan hücre süspansiyonu 1 mL (yaklaşık 1×10^6 hücre/ml) steril 2 mL cryoviallere (biyolojik materyalleri saklamak için hazırlanmış özel kaplar) aktarıldı ve tüpler doğrudan sıvı azot içinde veya 1 gün -80 °C de bırakıldıktan sonra sıvı azot içinde saklandı.

3.8.3. Hücrelerin Sayılması İşlemi

Besi yeri ile süspansiyon edilen karışımdan 10 μ L alınarak Thoma Lamına damlatıldı ve 5 kuyucukta bulunan hücreler mikroskop altında sayıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak hücre sayısı belirlendi.

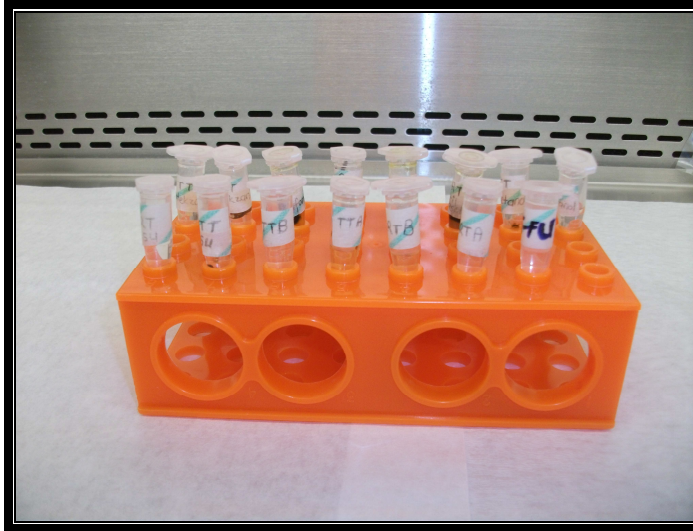
Hücre sayısı= 5 kuyucuktan sayılan hücre sayısı x 50.000 x seyreltme faktörü



Şekil 3.27 Mikroskop

3.8.4. Testler için ekstrelerden stok çözeltilerin hazırlanması

Örneklerin DMSO daki çözeltileri (20 mg/mL) hazırlandı ve 1:3 oranında besiyeri ile seyreltildi (5mg/mL). Oluşan yeni çözeltiler 0,22 mikronluk steril filtreler kullanılarak steril falcon (15 ml) tüplerine süzüldü ve -20 °C'de saklandı.



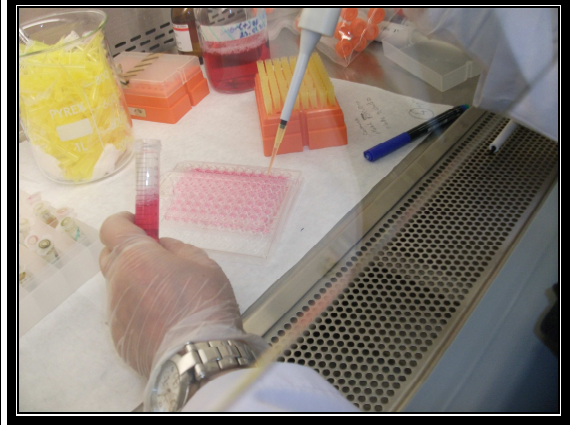
Şekil 3.28 Örnekler ve DMSO

3.8.5. BrdU cell ELISA testininin yapılışı

- 1) 96-well'lik mikroplatelerde Çizelge 3.2. belirtilen deney dizaynı gerçekleştirildi ve 24 saat 37 °C, % 5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Tüm ekstreler, 8 değişik konsantrasyonda (100, 75, 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 µg/mL) çalışıldı ve tüm işlemler steril kabinde gerçekleştirildi. Hücre proliferasyon deneyi üretici firmanın protokolüne göre BrdU cell ELISA yöntemiyle tespit edilecektir. Tüm testler üç tekerrürlü ve üç kez tekrarlandı. (Demirtas ve ark., 2009, Demirtas ve Sahin, 2013, Sahin Yaglioglu ve ark., 2013, Karakus ve ark., 2013).



Şekil 3.29 Inkübatör

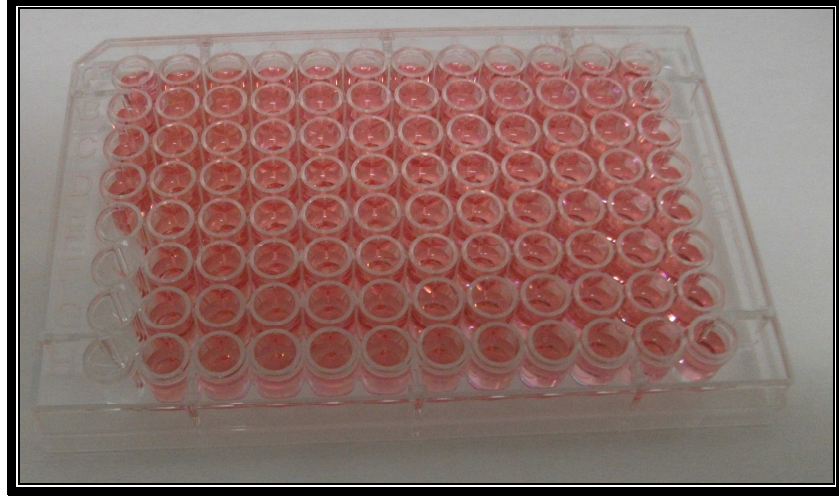


Şekil 3.30 Örneklerin pipetlenmesi

Çizelge 3.2 Proliferasyon Denemeleri Deney Dizaynı (100 µg/mL)

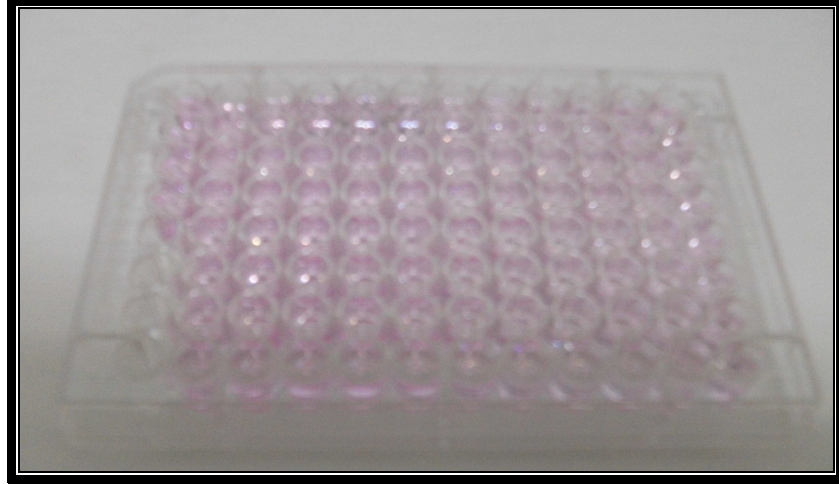
	KONTROL	Standart madde	EKSTRE 1
HÜCRE	100 µL	100 µL	100 µL
E1	100 µL	20 µL	20 µL
DMEM	10 µL	80 µL	80 µL
TOPLAM	200 µL	200 µL	200 µL

- 2) 24 saatin sonunda kuyucuklara 20 µl BrdU etiketleme solüsyonundan eklendi ve 4 saat 37 °C, % 5 CO₂ inkübatörde inkübasyona bırakıldı.



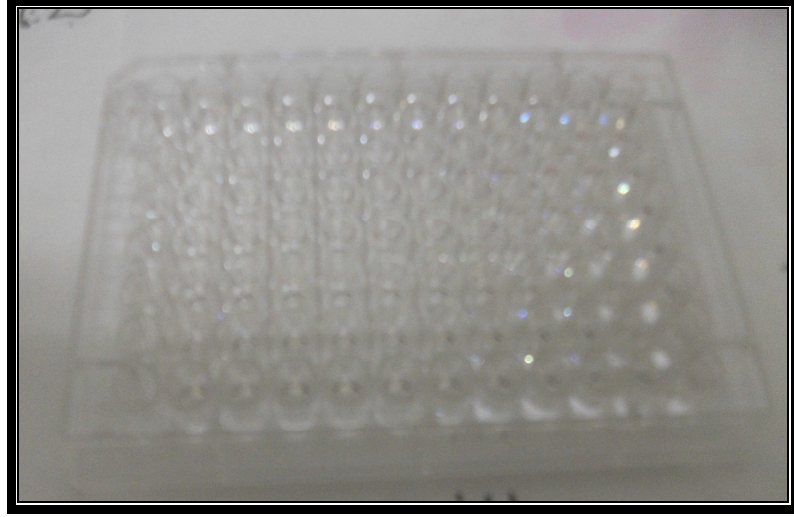
Şekil 3.31 BrdU etiketleme solüsyonunun eklenmesi

- 3) Etiketlenen kuyucuklardaki çözelti ters çevrilerek boşaltıldı ve 200 μ l FixDenat eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.



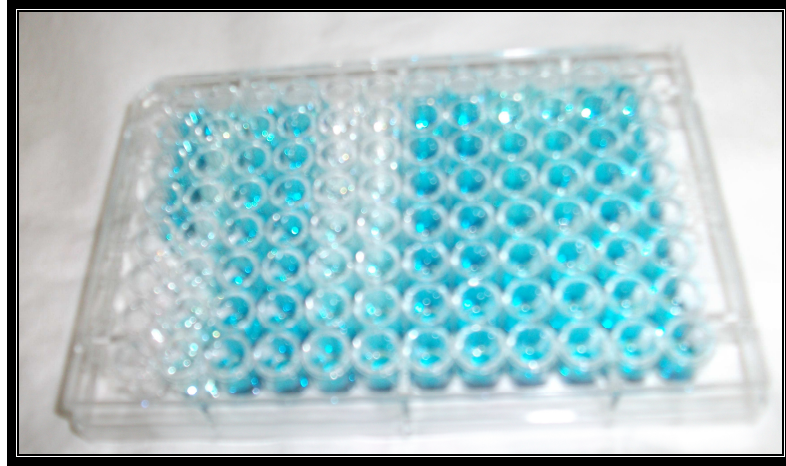
Şekil 3.32 FixDenat solüsyonunun eklenmesi

- 4) FixDenat solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 200 μ l anti-BrdU-POD solüsyonu eklendi ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.



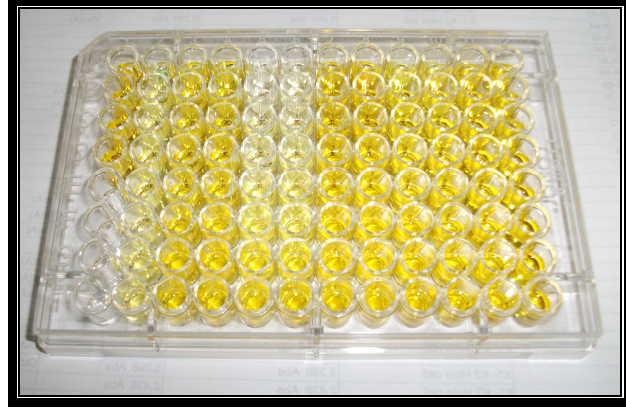
Şekil 3.33 Anti-BrdU-POD solüsyonunun eklenmesi

- 5) Anti-BrdU-POD solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra tüm kuyucuklar 3 x 200 μ l yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra tüm kuyucuklara 100 μ l substrat solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

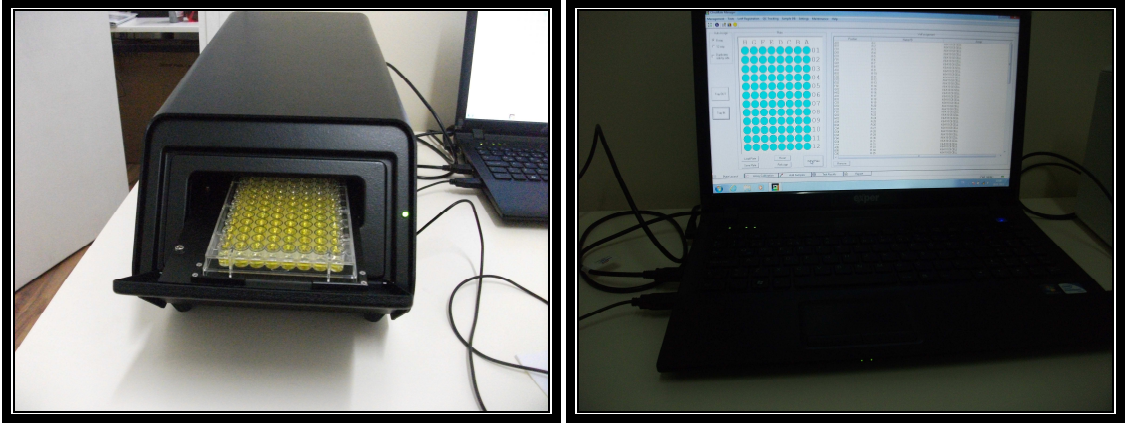


Şekil 3.34 Substrat solüsyonunun eklenmesi

- 6) Tüm kuyucuklara 25 μ l 1M H_2SO_4 çözeltisi ilave edilmeden önce ve sonra ELISA okuyucuda (ChroMate, Microplate Reader P4300 Series, USA) 450 ve 650 nm deki absorbansları ölçüldü.



Şekil 3.35 H₂SO₄ çözeltisi eklenmesi

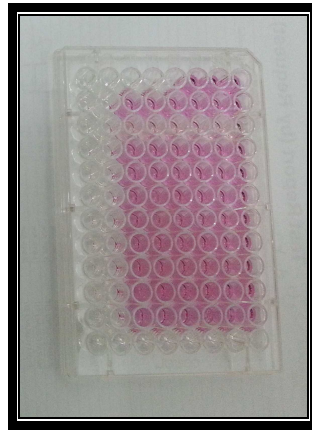


Şekil 3.36 ELISA mikroplate okuyucu

3.9. Sitotoksik Aktivite Testlerinin Yapılışı

Test maddelerinin sitotoksik aktivitesi LDH Cell Cytotoxicity Assay (Roche 04 744 926 001, Germany) kullanılarak üretici firmanın prosedürüne göre test edildi. Öncelikle hücre kültür flaskları içinde yer alan C6 hücrelerinden besi yeri uzaklaştırıldı. Daha sonra flasklara 10 mL Tripsin EDTA çözeltisi eklendi, böylece yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden sökülmesi sağlandı ve 5 dakika CO₂ inkübatörde (37 °C) bekletildi. Üzerine DMEM (10 mL) eklendi. Oluşan karışım falcon tüpüne alındı, santrifüj edildi (600 rpm, 5 dak). Süpernatant kısım döküldü ve C6 hücreleri DMEM (2-3 mL) ile çözüldü. Bu karışımdan 20 µL alınarak 40 µL Trypan blue boyası ile karıştırıldı ve 20 µL Thoma Lamına damlatıldı. Üzeri bir lamelle kapatıldı ve sayım alanındaki toplam 5 kuyucukta bulunan hücreler (mavi boyanmayan canlı hücreler) mikroskop altında sayıldı. Hücreler sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu mikroplate alınarak her bir kuyucuğa 5000 hücre eklendi. High kontrol kuyucuğuna 100 µL triton X 100, low kontrol kuyucuğuna 100 µL DMEM ve örnek kuyucuklarına ise 100 µL (son derişim 100 µM) örneklerden eklendi ve 24 saat CO₂ inkübatörde (37 °C) inkübe edildi. Tüm işlemler steril kabinde gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak 5-fluorouracil (5-FU) kullanıldı.

24 saat inkübasyon sonunda örneklerin sitotoksik aktiviteleri LDH Cell Cytotoxicity Assay üretici firmanın protokolüne göre tespit edildi. Tüm testler üç tekerrürlü ve iki kez yapılmıştır. Kısaca, inkübasyon sonrasında tüm kuyucuklardan başka bir 96 kuyucuklu mikroplate süpernatant kısmından 100 µL alındı.



Şekil 3.37 Deney öncesi plate görünümü

Bu süpernatantların üzerlerine reaksiyon karışımından 100 µl eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında ve ışık almayan bir ortamda inkübasyona bırakıldı (Şekil 38).



Şekil 3.38 Deney sonrası plate görünümü

Bu süre sonunda plakalar uygun bir mikroparka okuyucuda (ChroMate, Microplate Reader P4300 Series, USA) kullanılarak 492 nm dalga boyunda okutuldu ve absorbans değerleri elde edildi. Aşağıdaki formül kullanılarak % sitotoksiteler hesaplandı.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = (\text{Deneysel değer} - \text{Düşük Kontrol}) / (\text{Yüksek Kontrol} - \text{Düşük Kontrol}) \times 100$$

3.10. İstatistiksel Analiz

In vitro deney sonuçları dokuz değerlerin ortalamasıdır (\pm SD). Gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi ($p < 0.01$). Uygulama grupları arasındaki farklılıklar ise çoklu karşılaştırma testi (Duncan) ile analiz edildi.

3.11. IC₅₀ ve IC₇₅ Değerlerinin Hesaplanması

Ekstre ve standartların IC₅₀ ve IC₇₅ değerleri ED50 plus v1.0 programı ile hesaplandı (Vargas, 2000).

4. BULGULAR

4.1. Karayosunlarının Tartılması

Sıvı azotla parçalanma işlemi sonucunda karayosunları tartıldı. *Rhytidiadelphus triquetrus* 74.54 g ve *Tortella tortuosa* ise 297.34 g olarak belirlendi.

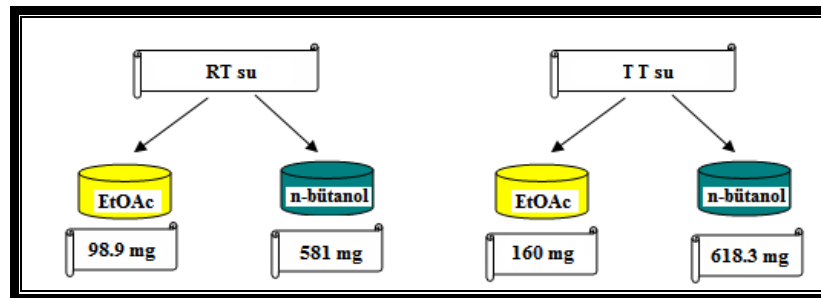
4.2. Ekstraksiyon İşlemi Sonuçları

Çizelge 4.1 de *Rhytidiadelphus triquetrus* ve *Tortella tortuosa* karayosunlarından elde edilen ekstraktlerin miktarları ve verimleri (%) verilmiştir.

Çizelge 4.1 *R. triquetrus* ve *T. tortuosa* ekstre miktarları ve verimleri (%)

Örnek adı	<i>R. triquetrus</i>		<i>T. tortuosa</i>	
	Miktarı (g)	Verim (%)	Miktarı	Verim
Hekzan Ekstresi	0,698	0.92	0,447	0.15
Kloroform Ekstresi	2.26	3.03	5.884	1.97
Etil asetat Ekstresi	0.239	0.32	0.533	0.18
Metanol ekstresi	3.021	4.05	3.66	1.23
Su ekstresi	2.3766	3.56	10.991	3.84

R. triquetrus ve *T. tortuosa* karayosunlarının su ekstraktlerinin etil asetat ve n-bütanol ile ekstraksiyonları sonucunda elde edilen ekstre miktarları belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 RT ve TT Etil asetat ve n-Bütanol ekstre miktarları

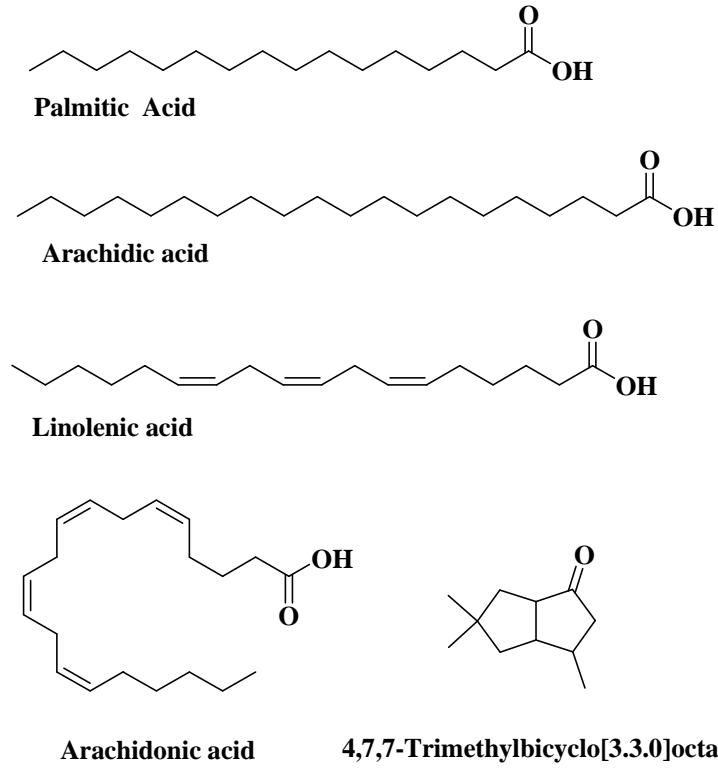
4.3. Hekzan Ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

RT ve TT hekzan ekstrlerinin GC-MS analizi sonucunda toplam 16 bileşen belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 RT ve TT karayosunlarının GC-MS analiz sonuçları

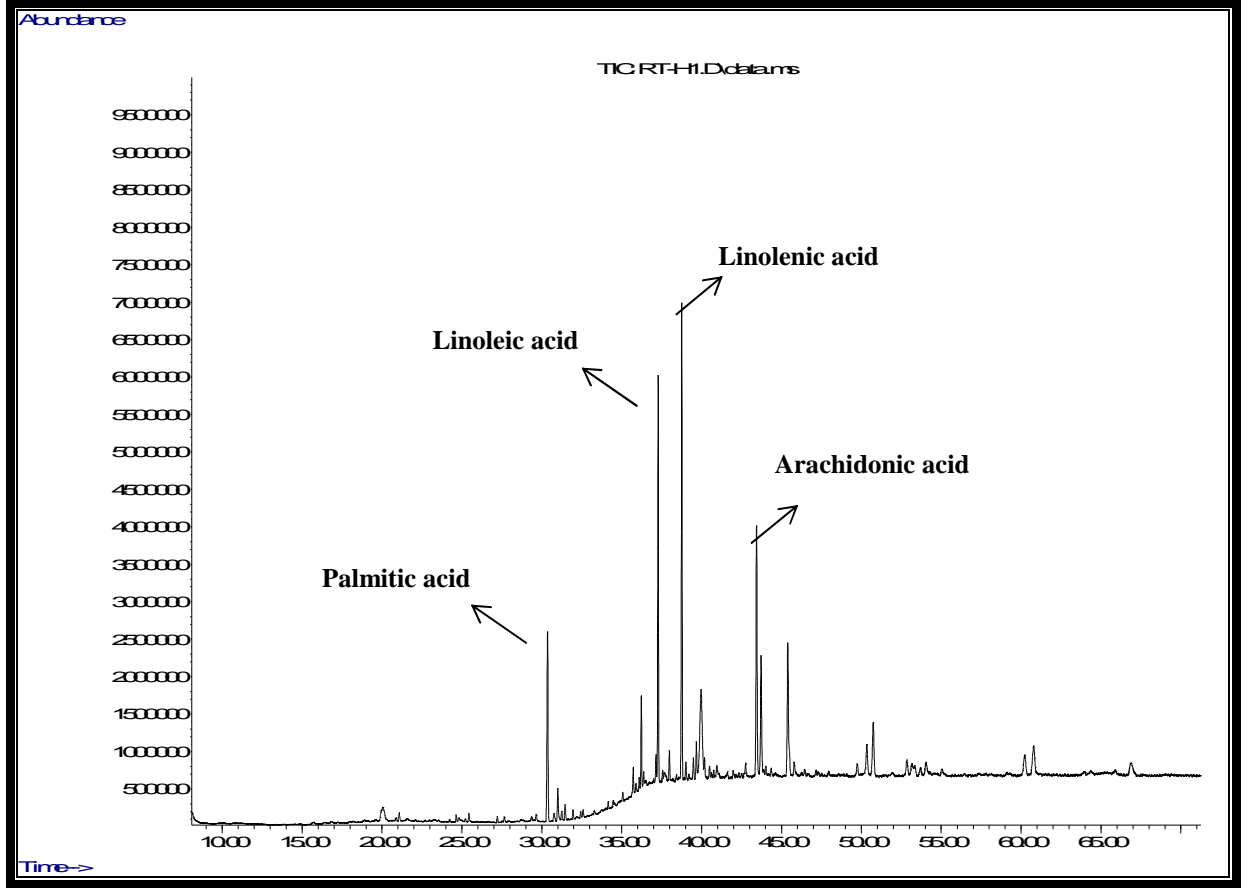
No	RT	İzomer	Bileşik adı	% miktar	
				RT	TT
Doymuş Yağ asitleri					
1	30.357	C 16:0	Palmitic acid, methyl ester	13,15	5,52
2	31.026	C 16:0	Palmitic acid, isopropyl ester	2,34	1,02
3	35.724	C 18:0	Stearic acid, methyl ester	1,74	0,71
4	40.199	C 20: 0	Arachidic acid, methyl ester	25,39	0,40
Ara Toplam				42,62	7,65
Mono Doymamış Yağ Asitleri					
5	36.228	C 18:1	Oleic acid, methyl ester		2,77
6	36.250	C 18:1	7-Octadecenoic acid, methyl ester (omega 9)		2,70
7	36,388	C18:1	11- Octadecenoic acid, methyl ester	4,41	0,56
Ara Toplam				4,41	6,03
Çoklu Doymamış Yağ Asitleri					
8	37.286	C18:2	Linoleic acid, methyl ester (omega 6)		8,53
9	38.883	C18:2	Linolenic acid, methyl ester (omega 6)	20,70	52,97
10	41.995	C 20:2	11,13-Eicosadienoic acid, methyl ester (omega 6)		0,94
11	43.443	C 20:4	Arachidonic acid, ethyl ester		4,48
12	43.466	C 20:4	Arachidonic acid, methyl ester (omega 6)	17,60	3,97
13	45.423	C 20:5	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester) (EPA)		4,19
Ara Toplam				38,3	75,08
Diğer Bileşikler					
14	25.459		1-Octadecene		0,77
15	31.278		1-Heptadecene		1,18
16	39.970		4,7,7-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-2-one	14,67	
Ara Toplam				14,67	1,95
Genel Toplam				100	98,87

RT hekzan ekstresinde Arachidic acid, methyl ester (% 25.39), Linolenic acid, methyl ester (% 20.70), Arachidonic acid, methyl ester (% 17.60), 4,7,7-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-2-one (% 14,67) ve Palmitic acid, methyl ester (% 13,15) beş ana bileşen (Şekil 4.2) olmak üzere toplam 8 bileşen belirlendi (Çizelge 4.2).



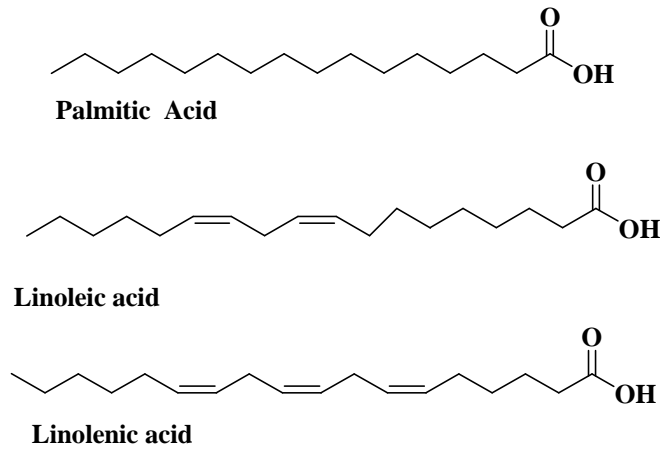
Şekil 4.2. RT hekzan ekstresinin ana bileşenleri

Şekil 4.3. de RT hekzan ekstresinin GC-MS Kromatogramı verilmektedir (Şekil 4.3).



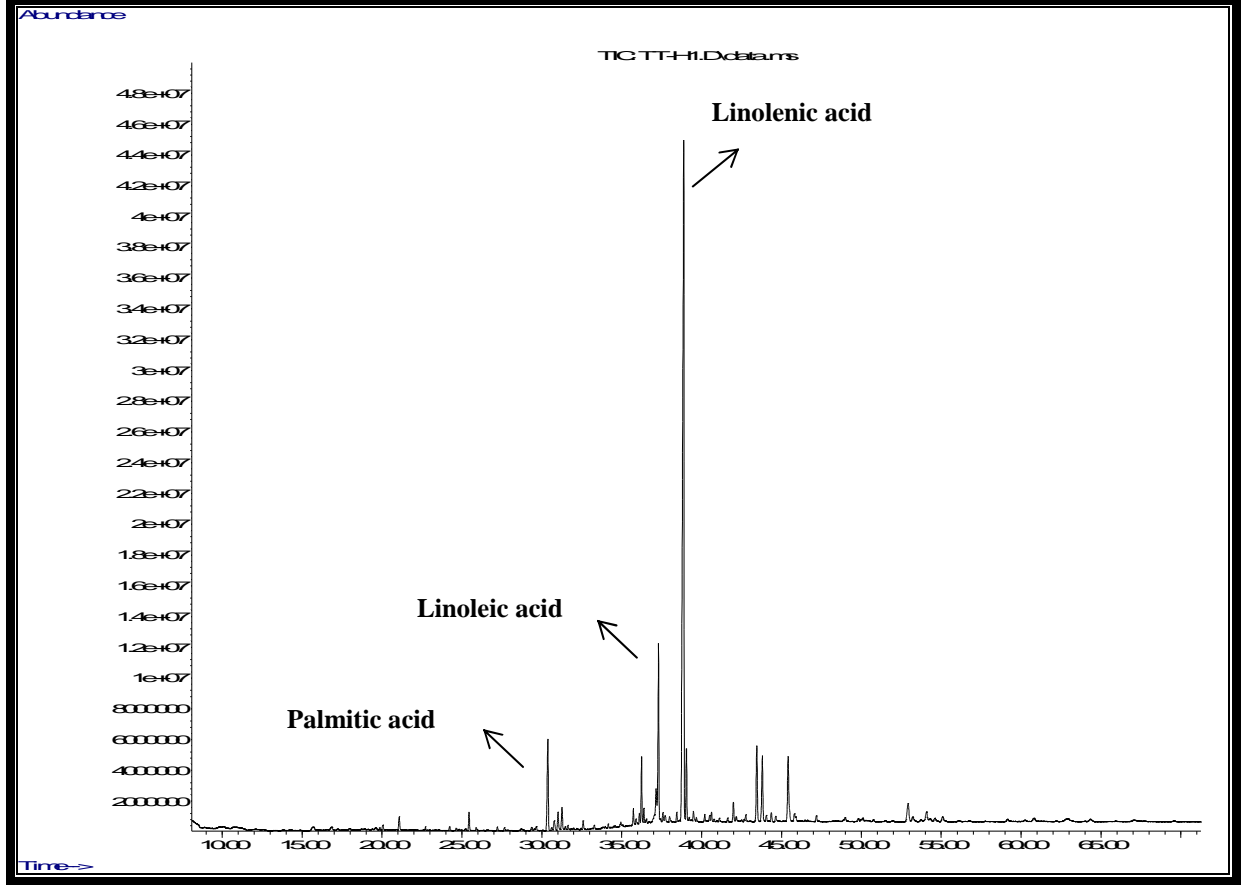
Şekil 4.3 RT nin GC-MS kromatogramı

TT hekzan ekstresinde C 18:2 Linolenic acid, methyl ester (% 52,97), Linoleic acid (% 8,53) ve Palmitic acid (% 5,52) üç ana bileşen (Şekil 4.4) olmak üzere, toplam da ise 15 bileşen tespit edildi (Çizelge 4.2).



Şekil 4.4 TT hekzan ekstresinin ana bileşenleri

Şekil 4.5. de *Tortella tortuosa* hekzan ekstresinin GC-MS kromatogramı verilmektedir (Şekil 4.5).

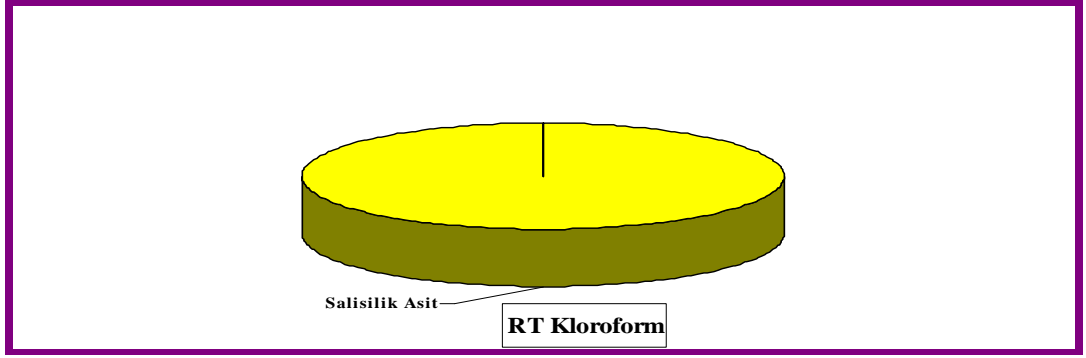


Şekil 4.5 TT nin GC-MS kromatogramı

4.4. Kloform, Etilasetat (EtOAc), Metanol (MeOH), Su, Su/EtOAc ve Su/n-Bütanol Ekstrelerinin HPLC-TOF/MS Analiz sonuçları

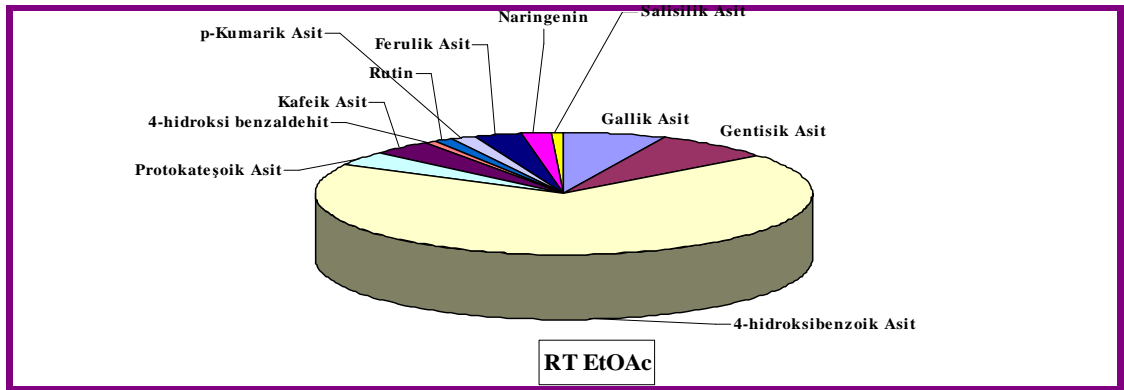
4.4.1. RT ekstrelerinin HPLC-TOF/MS analiz sonuçları

RT kloroform ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından salisilik asit (0.16 mg fenolik/100 g kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.6, Çizelge 4.3).



Şekil 4.6 RT kloroform ekstresinin fenolik içeriği

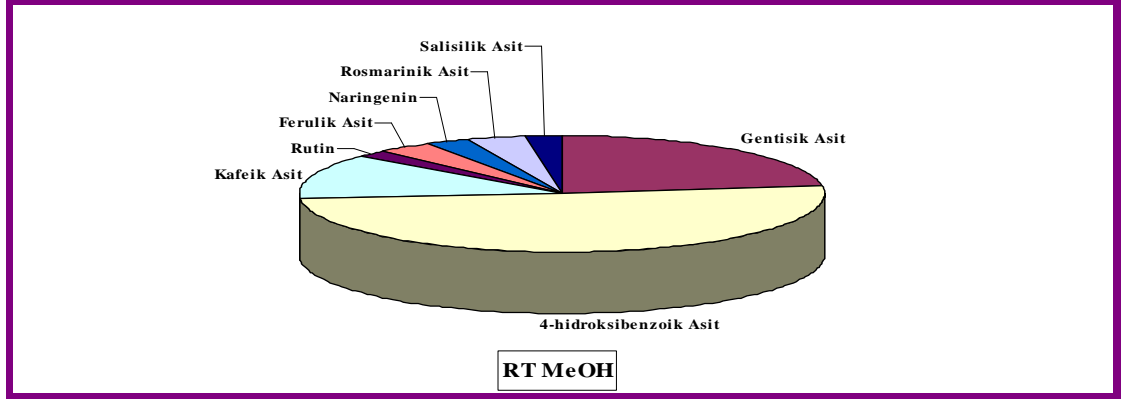
RT EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (0.07 mg fenolik/100 g kuru bitki), gentisik asit (0.08 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (0,72 mg fenolik/100 g kuru bitki), protokateşoik asit (0,04 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,04 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksi benzaldehit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), rutin (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), *p*-kumarik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), ferulik asit (0,03 mg fenolik/100 g kuru bitki), naringenin (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 11 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.3). 4-hidroksibenzoik asit ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 RT EtOAc ekstresinin fenolik içeriği

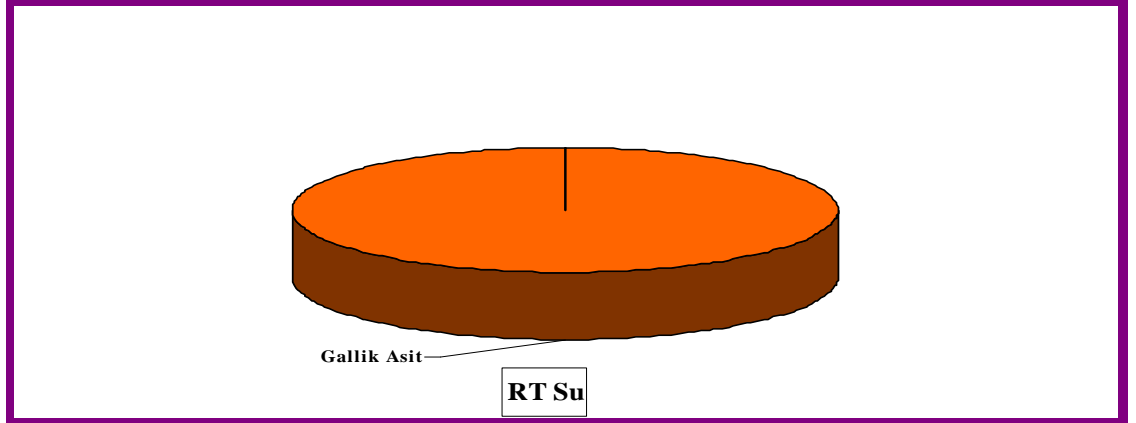
RT MeOH ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gentisik asit (1,06 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (2,36 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,59 mg fenolik/100 g kuru bitki), rutin (0,09

mg fenolik/100 g kuru bitki), ferulik asit (0,15 mg fenolik/100 g kuru bitki), naringenin (0,13 mg fenolik/100 g kuru bitki), rosmarinik asit (0,17 mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,10 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 8 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.3). 4-hidroksibenzoik asit ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 RT MeOH ekstresinin fenolik içeriği

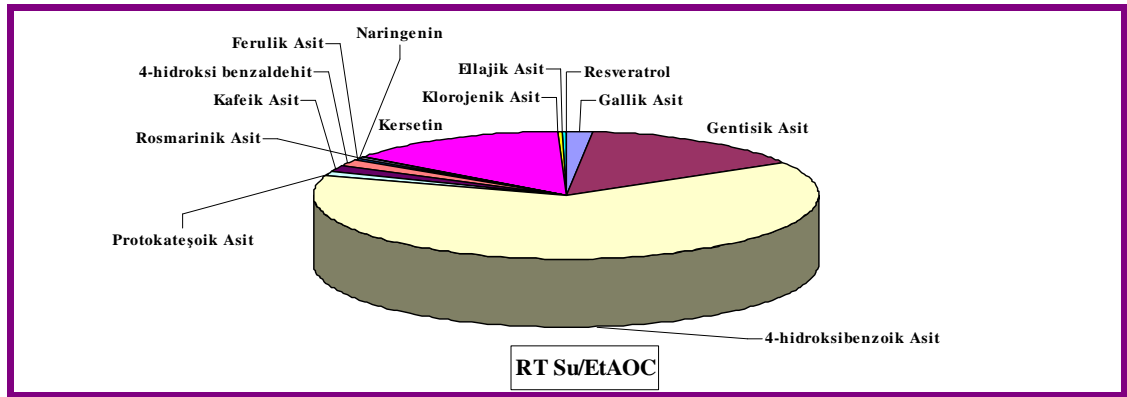
RT su ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (1.09 mg fenolik/100 g kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.9, Çizelge 4.3).



Şekil 4.9 RT su ekstresinin fenolik içeriği

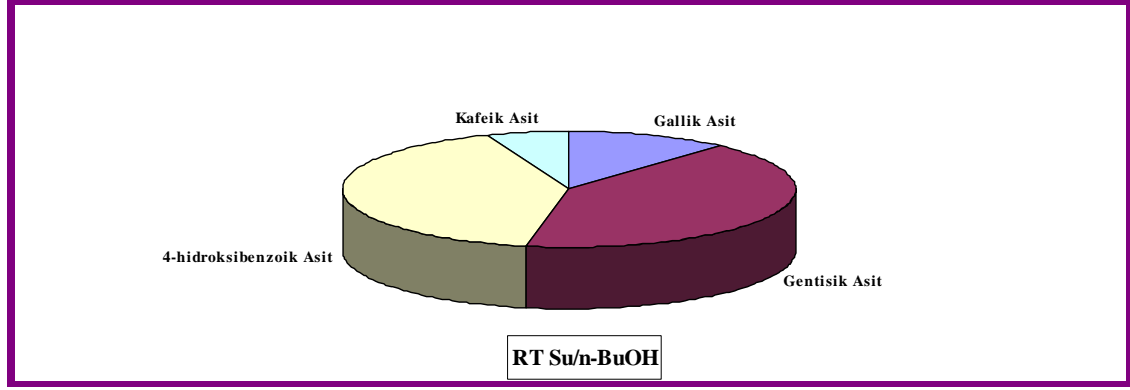
RT Su/EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (0,12 mg fenolik/100 g kuru bitki), gentisik asit (1,17 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (4,96 mg fenolik/100 g kuru bitki), protokateşoik asit (0,08 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,12 mg fenolik/100 g

kuru bitki), 4-hidroksi benzaldehit (0,13 mg fenolik/100 g kuru bitki), ferulik asit (0,04 mg fenolik/100 g kuru bitki), naringenin (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), rosmarinik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), kersetin (1,12 mg fenolik/100 g kuru bitki), klorojenik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), ellajik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), resveratrol (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 13 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.3). gentisik asit ve kersetin iki ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 RT Su/EtOAc ekstresinin fenolik içeriği

RT Su/n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), gentisik asit (0,07 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (0,07 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 4 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.3). gentisik asit ve 4-hidroksibenzoik asit iki ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.11).



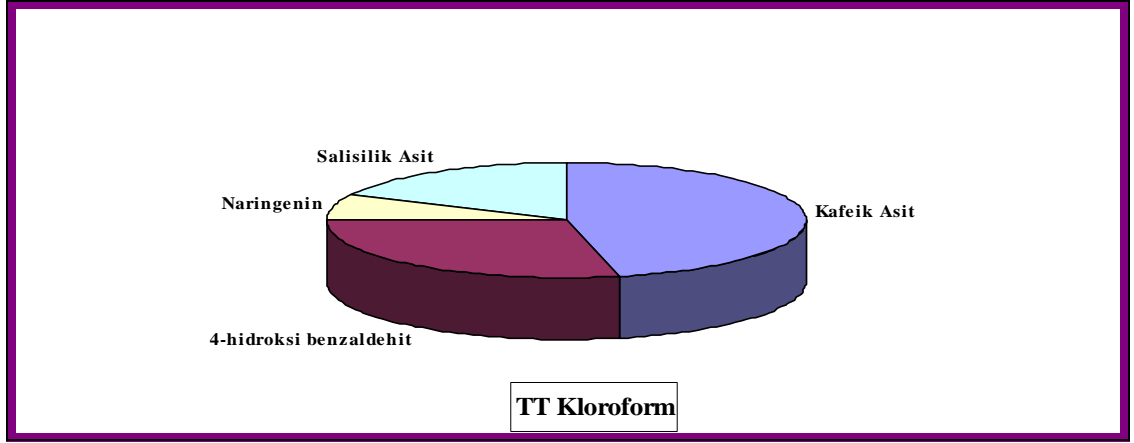
Şekil 4.11 RT Su/n-BuOH ekstresinin fenolik içeriği

Çizelge 4.3 RT ekstrelerin fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik/100 g kuru bitki)

	MeOH	EtOAc	Kloroform	Su	Su/EtOAc	Su/n-BuOH
Gallik Asit	-	0,07	-	1,09	0,12	0,02
Gentisik Asit	1,06	0,08	-	-	1,17	0,07
Kateşin	-	-	-	-	-	-
4-hidroksibenzoik Asit	2,36	0,72	-	-	4,96	0,07
Protokateşoik Asit	-	0,04	-	-	0,08	-
Kafeik Asit	0,59	0,04	-	-	0,12	0,01
4-hidroksi benzaldehit	-	0,01	-	-	0,13	-
Rutin	0,09	0,01	-	-	-	-
p-Kumarik Asit	-	0,02	-	-	-	-
Ferulik Asit	0,15	0,03	-	-	0,04	-
Apigenin-7-glikozit	-	-	-	-	-	-
Naringenin	0,13	0,02	-	-	0,01	-
Kamferol	-	-	-	-	-	-
Rosmarinik Asit	0,17	-	-	-	0,02	-
Salisilik Asit	0,10	0,01	0,16	-	-	-
Kersetin	-	-	-	-	1,12	-
Klorojenik Asit	-	-	-	-	0,02	-
Ellajik Asit	-	-	-	-	0,01	-
Resveratrol	-	-	-	-	0,01	-

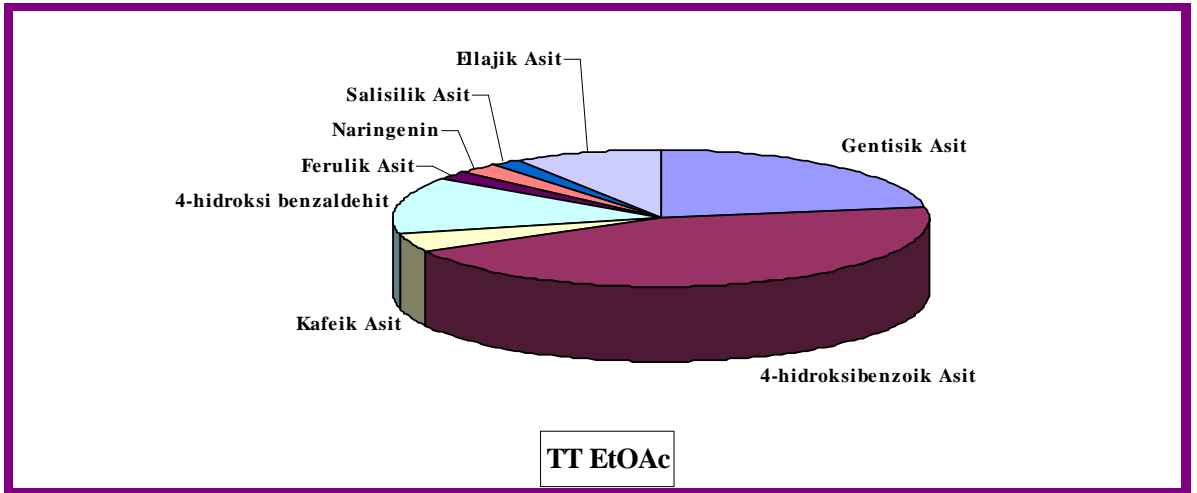
4.4.2. TT Ekstrelerinin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları

TT Kloroform ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından kafeik asit (0,13 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksi benzaldehit (0,08 mg fenolik/100 g kuru bitki), naringenin (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,05 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 4 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.4). kafeik asit ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.12).



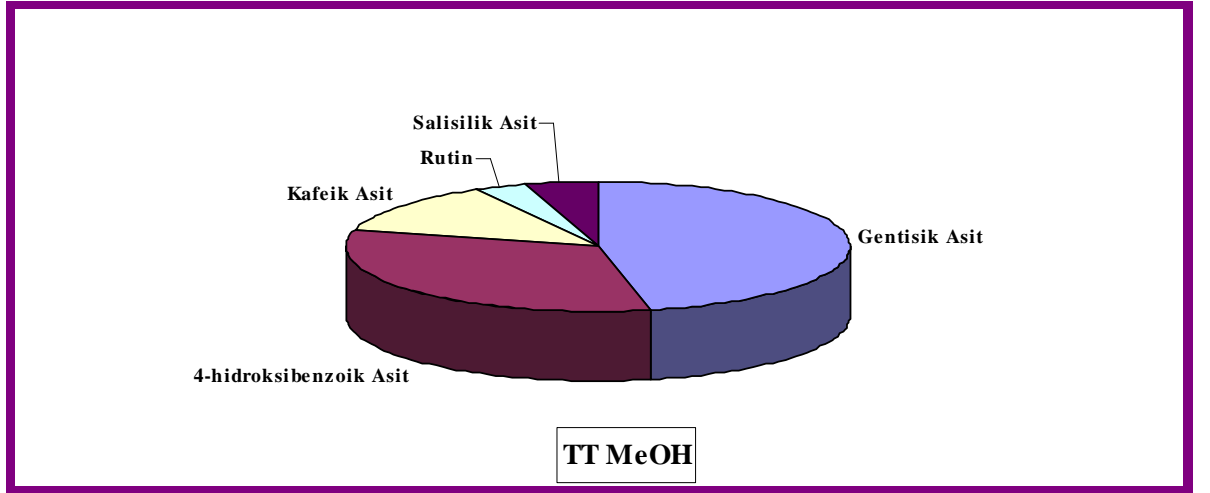
Şekil 4.12 TT Kloroform ekstresinin fenolik içeriği

TT EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gentisik asit (0,05 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (0,1 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksi benzaldehit (0,03 mg fenolik/100 g kuru bitki), ferulik asit (0,004 mg fenolik/100 g kuru bitki), naringenin (0,006mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,004 mg fenolik/100 g kuru bitki), ellajik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 8 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.4). 4-hidroksibenzoik asit ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.13).



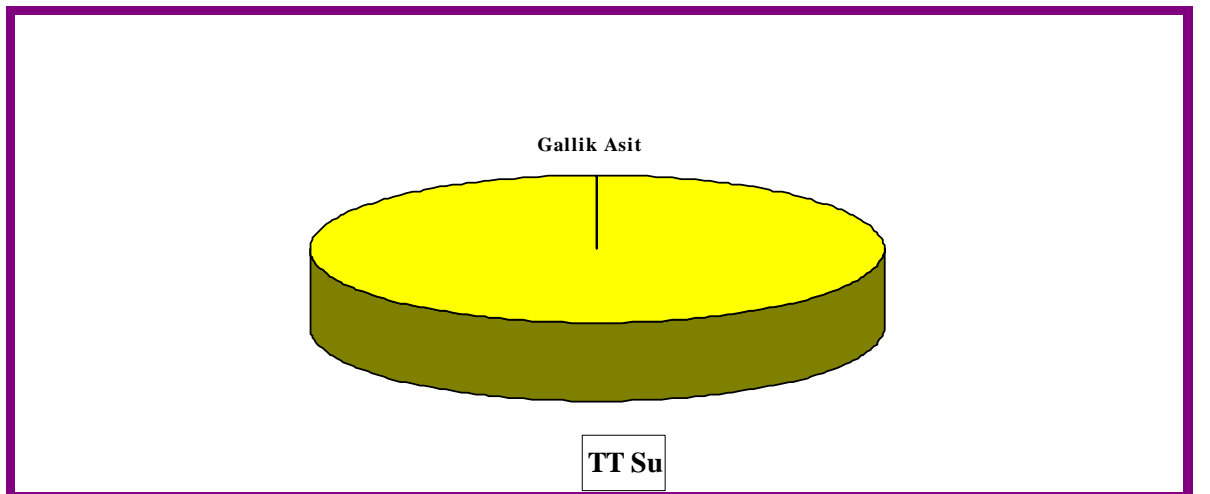
Şekil 4.13 TT EtOAc ekstresinin fenolik içeriği

TT MeOH ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gentisik asit (0,29 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (0,2 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,08 mg fenolik/100 g kuru bitki), rutin (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,03 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 5 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.4). Gentisik asit ve 4-hidroksibenzoik asit iki ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.14).



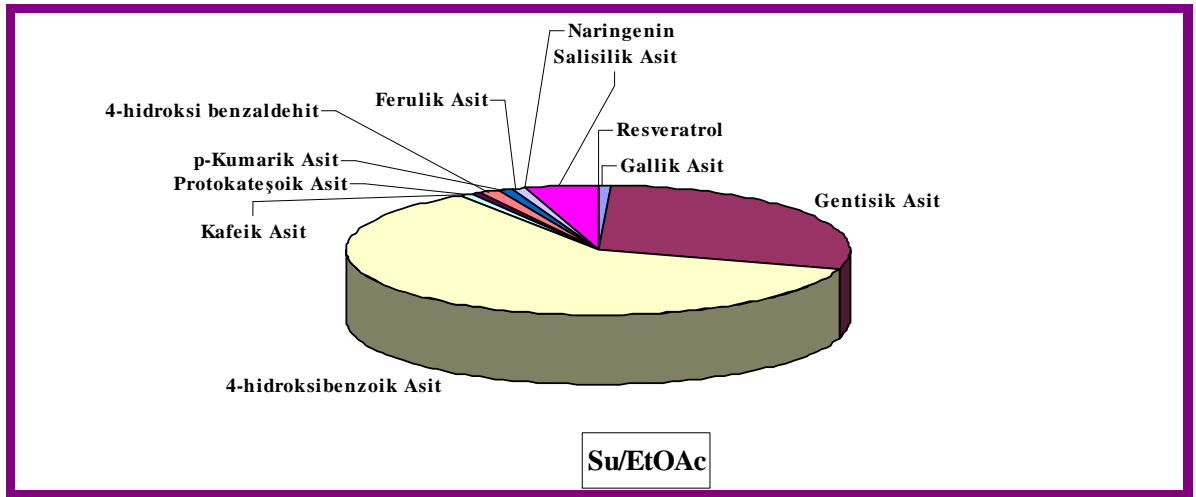
Şekil 4.14 TT MeOH ekstresinin fenolik içeriği

TT Su ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (0,8 mg fenolik/100 g kuru bitki) belirlendi (Şekil 4.15, Çizelge 4.4).



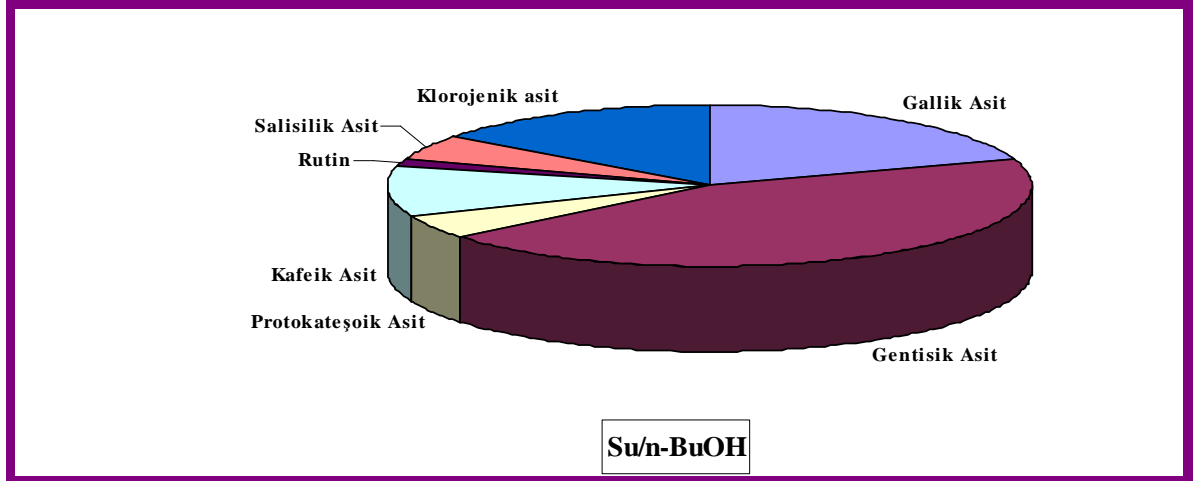
Şekil 4.15 TT Su ekstresinin fenolik içeriği

TT Su/EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), gentisik asit (0,64 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksibenzoik asit (1,35 mg fenolik/100 g kuru bitki), protokateşoik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), 4-hidroksi benzaldehit (0,03 mg fenolik/100 g kuru bitki), *p*-kumarik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), ferulik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), naringenin (0,001 mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,1 mg fenolik/100 g kuru bitki), resveratrol (0,003 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 11 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.4). 4-Hidroksibenzoik asit ve gentisik asit iki ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 TT Su/EtOAc ekstresinin fenolik içeriği

TT Su/n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS analizi sonucunda mevcut 19 fenolik bileşen arasından gallik asit (0,04 mg fenolik/100 g kuru bitki), gentisik asit (0,09 mg fenolik/100 g kuru bitki), protokateşoik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), kafeik asit (0,02 mg fenolik/100 g kuru bitki), rutin (0,003 mg fenolik/100 g kuru bitki), salisilik asit (0,01 mg fenolik/100 g kuru bitki), klorojenik asit (0,03 mg fenolik/100 g kuru bitki) olmak üzere 7 bileşenin varlığı tespit edildi (Çizelge 4.4). gentisik asit ana bileşen olarak belirlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 TT Su/n-BuOH ekstresinin fenolik içeriği

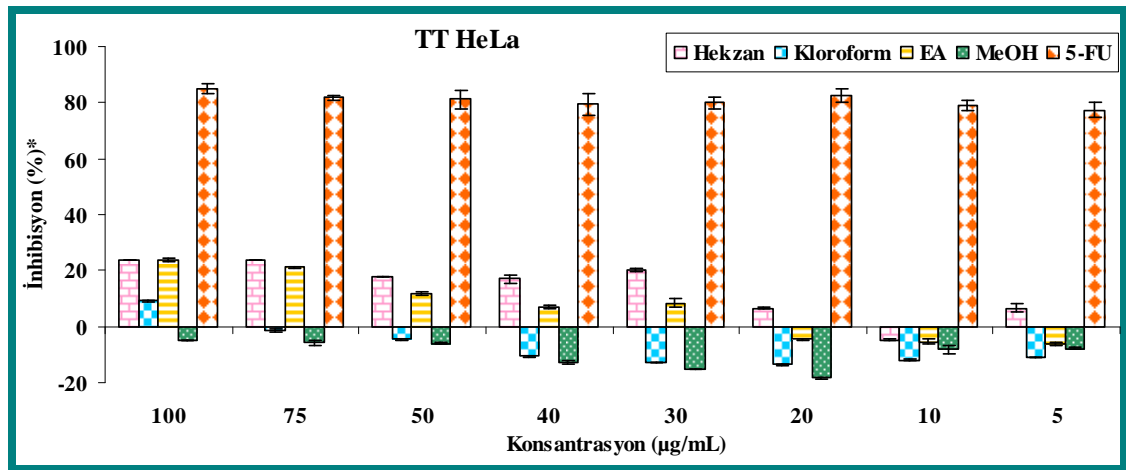
Çizelge 4.4 TT ekstrelerin fenolik bileşenleri ve miktarları (mg fenolik/100 g kuru bitki)

	MeOH	EtOAc	Kloroform	Su	Su/EtOAc	Su/n-BuOH
Gallik Asit	-	-	-	0,8	0,02	0,04
Gentsik Asit	0,29	0,05	-	-	0,64	0,09
Kateşin	-	-	-	-	-	-
4-hidroksibenzoik Asit	0,2	0,1	-	-	1,35	-
Protokateşoik Asit	-	-	-	-	0,02	0,01
Kafeik Asit	0,08	0,01	0,13	-	0,01	0,02
4-hidroksi benzaldehit	-	0,03	0,08	-	0,03	-
Rutin	0,02	-	-	-	-	0,003
p-Kumarik Asit	-	-	-	-	0,02	-
Ferulik Asit	-	0,004	-	-	0,02	-
Apigenin-7-glikozit	-	-	-	-	-	-
Naringenin	-	0,006	0,02	-	0,001	-
Kamferol	-	-	-	-	-	-
Rosmarinik Asit	-	-	-	-	-	-
Salisilik Asit	0,03	0,004	0,05	-	0,1	0,01
Kersetin	-	-	-	-	-	-
Ellajik Asit	-	0,02	-	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-	0,003	-
Klorojenik asit	-	-	-	-	-	0,03

4.5. Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

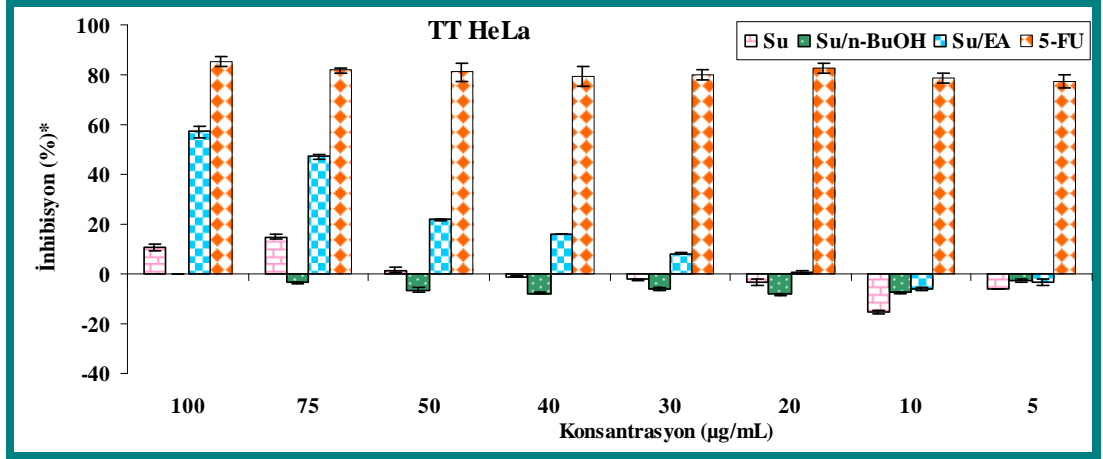
4.5.1. TT Ekstrelerinin HeLa Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

TT hekzan, kloroform, etil asetat (EA) ve metanol (MeOH) ekstralarının HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.18). Tüm bu ekstraların antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-fluorourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstraların, çalışılan tüm dozlarda oldukça düşük aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Bununla beraber tüm ekstraların aktivitelerinde doza bağlı olarak bir artış gözlemlendiği tespit edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 TT ekstralarının HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrarlolu ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

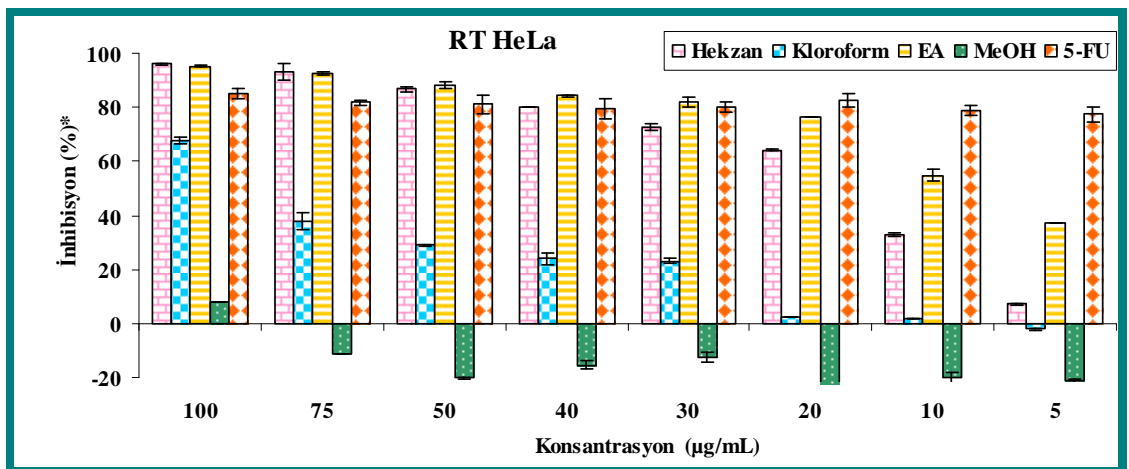
TT su, su/n-BuOH (Su/n-bütanol) ve su/EA (su/ etil asetat) ekstralarının HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.16). Su, su/n-BuOH ekstralarının antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-fluorourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstralarının, çalışılan tüm dozlarda aktiviteye sahip olmadıkları gözlemlendi. Bununla beraber su/EA ekstrasının hem ılımlı bir aktiviteye sahip olduğu hem de aktivite de doza bağlı olarak bir artış gözlemlendiği tespit edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 TT Su ekstrlerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrürlü ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

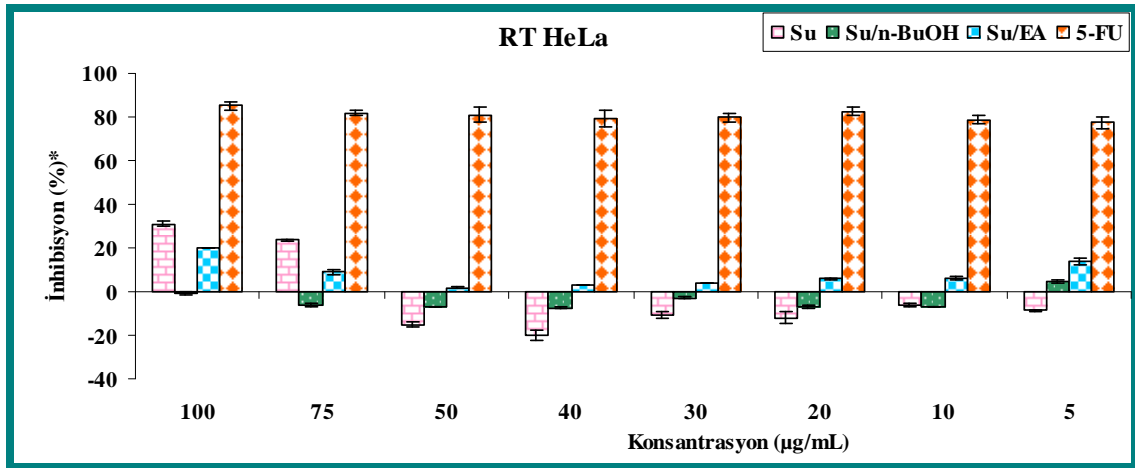
4.5.2. RT ekstrlerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları

RT hekzan, kloroform, etil asetat (EA) ve metanol (MeOH) ekstrlerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.20). Hekzan ve etil asetat ekstrlerinin (5-10 µg/mL dozlar hariç) standart olarak kullanılan 5-florourasil den dahi daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlandı. Kloroform ekstresi ise hekzan, etil asetat ekstrleri ve 5-florourasil ile mukayese edildiğinde daha ılımlı bir aktiviteye sahip olduğu gözlandı. Metanol ekstresinin ise tüm dozlarda oldukça düşük aktivite gösterdiği tespit edildi. Bununla birlikte tüm ekstrlerde aktivitelere doza bağlı olarak bir artış gözlandığı tespit edildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 RT ekstrlerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrürlü ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

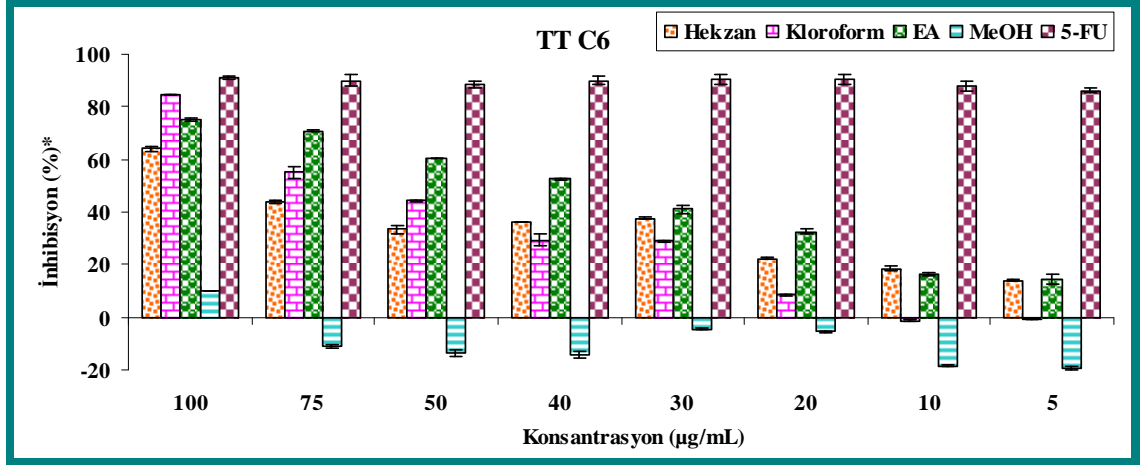
RT su, su/n-BuOH (Su/n-bütanol) ve su/EA (su/ etil asetat) ekstrlerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.21). Su, su/n-BuOH su/EA (su/ etil asetat) ekstrlerinin antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstrlerinin, çalışılan tüm dozlarda aktiviteye sahip olmadıkları gözlemlendi. Bununla beraber ekstrlerinin aktivitelelerinde doza bağlı olarak bir artış gözlemlendiği tespit edildi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 RT Su ekstrlerinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrarlolu ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

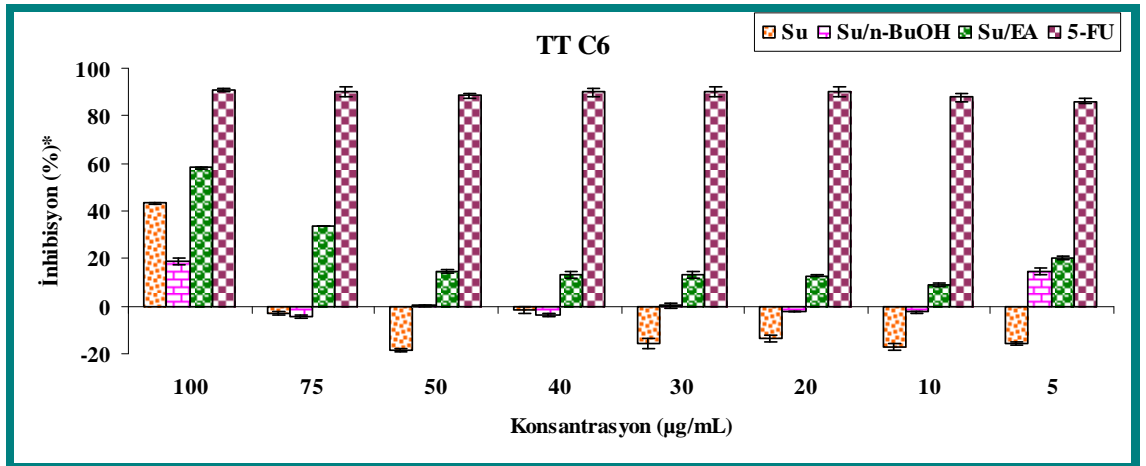
4.5.3. TT ekstrlerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite sonuçları

TT hekzan, kloroform, etil asetat (EA) ve metanol (MeOH) ekstrlerinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.22). Kloroform ve etil asetat ekstrlerinin antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstrlerinin, çalışılan yüksek dozlarda (özellikle 100 µg/mL) önemli ölçüde aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Hekzan ekstrlerinde ılımlı bir etki gözlenirken, metanol ekstrlerinde oldukça düşük bir aktivite tespit edildi. Bununla beraber tüm ekstrlerinin aktivitelelerinde doza bağlı olarak bir artış görüldü (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 TT ekstrelerinin C6 hüresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrürlü ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

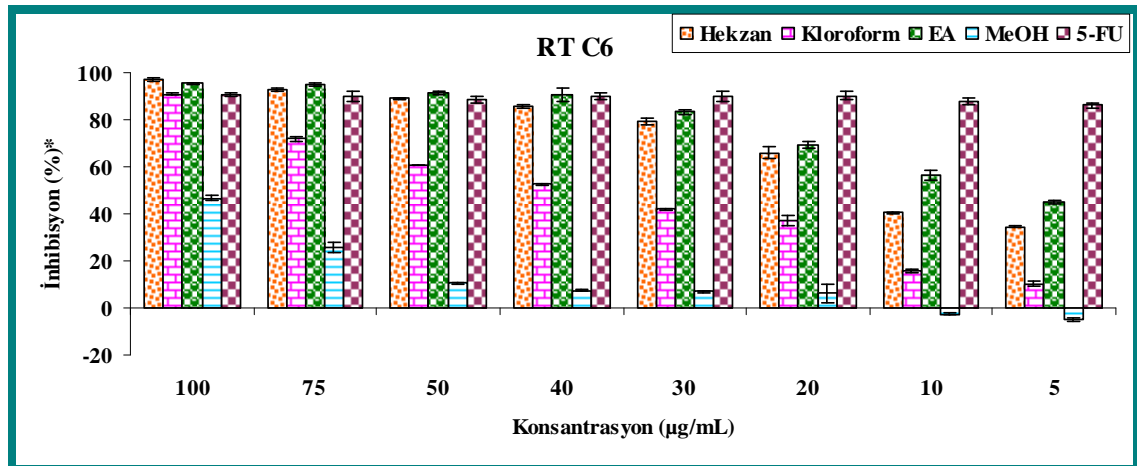
TT su, su/n-BuOH (Su/n-bütanol) ve su/EA (su/etil asetat) ekstrelerinin C6 hüresine karşı antiproliferatif aktivitelemi belirlendi (Şekil 4.23). Su ve su/EA (su/etil asetat) ekstrelerinin antiproliferatif aktivitelemi standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstrelerin, 100 µg/mL de ılımlı bir aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Su/n-BuOH ekstresinde ise çalışılan en yüksek dozda bile oldukça zayıf bir aktivite tespit edildi. Bununla beraber ekstrelerin aktivitelemlerinde doza bağılı olarak bir artış gözlemlendiği tespit edildi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 TT Su ekstrelerinin C6 hüresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrürlü ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$.)

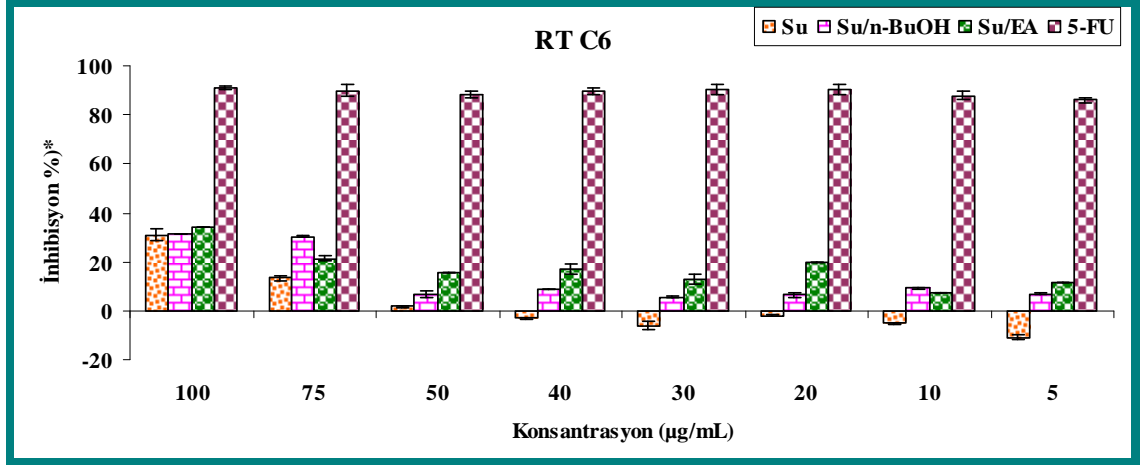
4.5.4. RT Ekstrelerinin C6 Hücrelerine Karşı Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

RT hekzan, kloroform, etil asetat (EA) ve metanol (MeOH) ekstralarının C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.24). Hekzan ve etil asetat ekstralarının antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstralarının aktivitelerinin 5-FU in aktivitesinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. Kloroform ekstresinin antiproliferatif aktivitesi ise 5-FU ile mukayese edildiğinde 5-FU'in aktivitesine oldukça yakın olduğu görüldü. MeOH ekstresinin antiproliferatif aktivitesi incelendiğinde ise standart bileşiğe oranla ılımlı bir etki gösterdiği belirlendi. Bununla beraber tüm ekstralarının aktivitelerinde doza bağlı olarak bir artış görüldü (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 RT ekstralarının C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrarırlı ve üç kez tekrarlandı, p<0.01.)

RT su, su/n-BuOH (Su/n-bütanol) ve su/EA (su/ etil asetat) ekstralarının C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri belirlendi (Şekil 4.25). Tüm ekstralarının antiproliferatif aktiviteleri standart olarak kullanılan 5-florourasil (5-FU) ile mukayese edildiğinde ekstralarının, düşük bir aktiviteye sahip oldukları gözlemlendi. Bununla beraber ekstralarının aktivitelerinde doza bağlı olarak bir artış gözlemlendiği tespit edildi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25 RT Su ekstrlerinin C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi (*Tüm testler üç tekrürlü ve üç kez tekrarlandı, $p < 0.01$)

TT ve RT ekstrlerinin HeLa ve C6 hücrelerine karşı IC_{50} ve IC_{75} değeri Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6 da verildi.

Çizelge 4.5 TT ve RT ekstrlerinin HeLa Hücresine karşı IC_{50} ve IC_{75} değeri

Ekstre Adı	<i>Tortella tortuosa</i>		<i>Rhytidiadelphus triquetrus</i>	
	IC_{50}	IC_{75}	IC_{50}	IC_{75}
Hekzan	33.26	57.26	17.94	48.16
Kloroform	94.62	104.31	57.08	81.61
EtOAc	55.60	72.82	*	31.49
MeOH	138.60	122.20	112.33	120.19
Su	70.76	85.17	80.75	97.94
Su/EtOAc	59.53	76.74	65.01	124.05
Su/n-Bütanol	139.22	139.93	*	*

*değer < 0

Çizelge 4.6 TT ve RT ekstrlerinin C6 Hücresine karşı IC_{50} ve IC_{75} değeri

Ekstre Adı	<i>Tortella tortuosa</i>		<i>Rhytidiadelphus triquetrus</i>	
	IC_{50}	IC_{75}	IC_{50}	IC_{75}
Hekzan	37.46	71.98	1.48	40.48
Kloroform	53.80	77.44	38.61	66.68
EtOAc	29.37	57.26	*	27.60
MeOH	111.63	123.68	64.23	87.70
Su	94.12	115.38	74.81	94.59
Su/EtOAc	58.02	91.82	39.49	79.01
Su/n-Bütanol	134.13	198.51	50.09	77.40

*değer < 0

4.6. Sitotoksik Aktivite Sonuçları

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi amacıyla C6 hücreleri ve pozitif kontrol olarak da 5-FU kullanıldı. Antiproliferatif aktivite testleri sonucunda standart olarak kullanılan 5-FU ile mukayese edildiğinde yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen TT Hekzan, RT Hekzan, TT Kloroform, RT Kloroform, TT EtOAc, RT EtOAc, TT Su/EtOAc ekstralarının ve 5-FU'in sitotoksisite belirlendi. Bu amaçla antiproliferatif aktivite testlerinde çalışılan en yüksek doz olan 100 µM konsantrasyon da bileşiklerinin sitotoksisite tespiti edildi. Test sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.7 de verildi.

Çizelge 4.7 Etkili ekstraların % sitotoksisite değerleri

Örnek Adı	% Toksikite*
TT Hekzan	7
RT Hekzan	7
TT Kloroform	20
RT Kloroform	16
TT EtOAc	23
RT EtOAc	16
TT Su/EtOAc	37
5-FU	26

*Tüm testler üç tekerrürlü ve iki kez tekrarlandı (p<0.01)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerden çok yönlü yararlanma kapsamında geçmişten günümüze dek birçok bilimsel çalışma yapılmış, özellikle sağlık alanında kullanılabilecek pek çok doğal maddenin bazı hastalıkların tedavisi konusundaki yerleri literatürlere konu olmuştur.

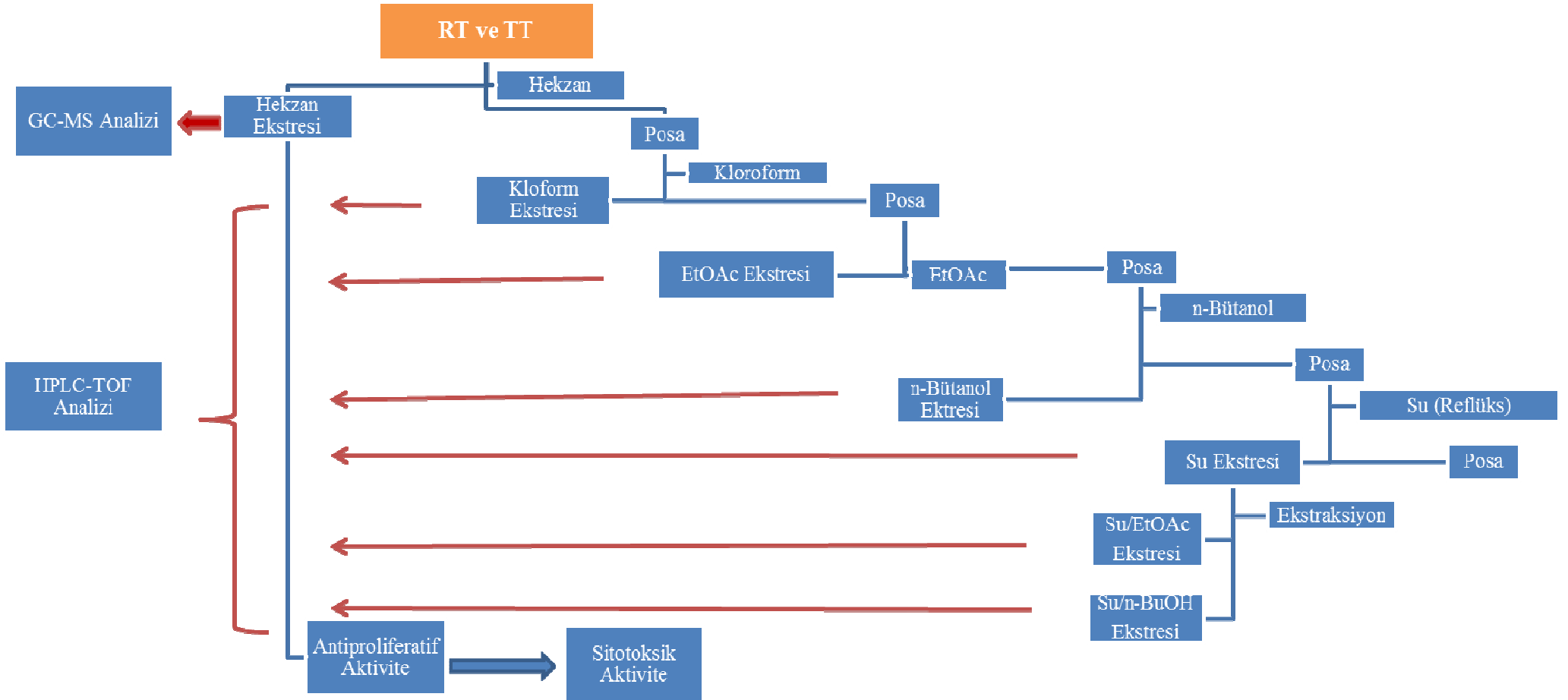
Bu çalışma C6 (Sıçan Beyin Tümörü) ve HeLa (İnsan Rahim Kanseri) kanser hücrelerinde RT ve TT'nin Hekzan, Kloroform, EtOAc, Metanol, Su, Su/EtOAc ve Su/n-Bütanol ekstralarının antiproliferatif ve sitotoksik etkileri değerlendirilerek, antikanser özelliklerinin olup olmadığını ve ekstralarının kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında TT ve RT karayosunları ile yapılan çalışmalar Şekil 5.1de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Antiproliferatif aktivite testleri sonucunda yüksek aktivite gösteren TT Hekzan, Kloroform, EtOAc, Su/EtOAc ve RT Hekzan, Kloroform, EtOAc ekstralarının (Çizelge 5.1.) C6 hücresine karşı % sitotoksiteleri belirlendi.

Çizelge 5.1. TT ve RT ekstralarının antiproliferatif aktiviteleri (100 µg/mL konsantrasyonda)

Örnek Adı	<i>Tortella tortuosa</i>		<i>Rhytidadelphus triquetrus</i>	
	HeLa**	C6**	HeLa**	C6**
Hekzan	23.90	64.06	96.01	96.88
Kloroform	9.14	84.56	67.58	90.99
EtOAc	23.86	74.93		95.58
MeOH	*	9.96	8.14	46.71
Su	10.44	43.43	30.99	30.96
Su/EtOAc	57.04	58.14	19.84	34.08
Su/n-Bütanol	0.15	18.89	*	31.28
5-FU	85.17	91.01	85.17	91.01

*değer <0, ** % inhibisyon



Şekil 5.1 Çalışmanın Özeti

TT ve RT karayosunları ile yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen sonuçlar aşağıda belirtildi.

1) Hekzan ekstralarının GC-MS analizi sonucunda 16 bileşen belirlendi. RT hekzan ekstresinde Palmitic acid, Arachidic acid, Linolenic acid ve Arachidonic acid ana bileşenler olarak belirlendi. TT hekzan ekstresinde ise Palmitic acid, Linoleic acid ve Linolenic acid ana bileşenler olarak tespit edildi.

2) Kloroform, EtOAc, MeOH, Su, Su/EtOAc ve Su/n-bütanol ekstralarının HPLC-TOF analizi sonucunda ile fenolik bileşenleri tespit edildi. Tüm ekstralarda ana bileşen olarak 4-hidroksi benzoik asit, Salisilik asit, Gallik asit, Gensitik asit ve Kafeik asitana bileşenler olarak tespit edildi.

3) Elde edilen ekstraların HeLa ve C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteleri incelendi. Analizler sonucunda RT ekstralarının HeLa ve C6 hücrelerine karşı yüksek antiproliferatif aktiviteye sahip olduğu belirlendi. TT ekstralarının ise **hücre seçici olarak C6 hücrelerine karşı güçlü antiproliferatif aktivite** gösterdiği tespit edildi.

4) Antiproliferatif aktivite testleri sonucunda yüksek aktivite gösteren TT Hekzan, Kloroform, EtOAc, Su/EtOAc ve RT Hekzan, Kloroform, EtOAc ekstralarının (Çizelge 5.1.) C6 hücresine karşı % sitotoksiteleri belirlendi. TT Su/EtOAc ekstresi hariç tüm ekstraların standart bileşikten daha az toksik olduğu tespit edildi.

Ekstrelerdeki ana bileşenlerin literatürdeki anti kanser aktiviteleriyle ilgili yağılan araştırmalarda aşağıdaki veriler elde edildi.

RT nin hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda ana bileşen olarak arachidic acid (% 25.39), linolenic acid (% 20.70), arachidonic acid (% 17.60) ve palmitic acid (% 13.15) olarak belirlendi. RT nin hekzan ekstresinde en fazla miktarda bulunan arachidic acid, balık ve bitkisel yağlarda (örneğin, yer fıstığı gibi) doğal olarak bulunan doymuş

yağ asididir. Ayrıca, arachidonic acid hidrojenasyonu sureti ile meydana getirilebilir. Arachidic acid, gibi doymuş yağ asitlerince zengin diyetlerin, yüksek kan kolesterol düzeyleri ile sonuçlanan serum düşük yoğunluklu lipoproteinleri geliştirdikleri bilinmektedir. Arachidic acid, yüzey aktif madde özelliğinden dolayı ilaç, sabun, kozmetik ve gıda ambalaj üretiminde kullanılır (Netsel *et al.* 1994).

TT nin hekzan ekstresinin GC-MS analizi sonucunda ana bileşen olarak Linolenic acid (% 52.97) belirlenmiştir. Bu ekstrenin C6 hücrelerine karşı yapılmış olan antiproliferatif aktivite testleri sonucunda önemli oranda (% 64.06 inhibisyon) aktivite belirlenmiştir. Perilla ve keten tohumu yağlarında % 50-60 oranında Linolenic acid bulunmaktadır. Narisawa *et al.* (1991) ve Hirose *et al.* (1987) yapmış oldukları çalışmalarda, % 12 Perilla yağı ile desteklenmiş besin ile beslenen sıçanların kolon kanseri gelişimini engellediğini göstermişlerdir (Narisawa *et al.* 1991, Hirose *et al.* 1987).

Tez çalışması kapsamında RT ve TT nin fenolik asitleri belirlenmiştir. Fenolik asitler, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan, fenolik bileşiklerin önemli bir sınıfıdır (Cai *et al.* 2004). Baskın fenolik asitler, hidroksi benzoik asitleri (örneğin gallik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, protokateşoik asit) ve hidroksisinnamik asitleri (örneğin, ferulik asit, kafeik asit, klorojenik asit) içermektedirler (Cai *et al.* 2006). Fenolik asitler ve analogları, geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olup, bazı fenolik asitler kanserin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Clifford 2000).

RT nin MeOH, EtOAc, Su/ EtOAc ve Su/n-BuOH ekstrelerinin ana bileşeni 4-hidroksibenzoik asittir. RT nin EtOAc ekstresinin C6 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesi standart olarak kullanılan 5-FU dan bile daha yüksek bulunmuştur (IC₇₅: 27.60 µg/mL). Literatürde EtOAc ekstresinin ana bileşeni olan 4-hidroksibenzoik asitin antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Aşağıda 4-hidroksibenzoik asitin antiproliferatif aktivitesi ile ilgili çalışmalara yer verilmiştir.

Histon asetiltransferazlar (HAT's) ve histon deasetilazlar (HDAC's) birçok proteinin asetilasyon durumunu değiştirerek hücresel süreçleri düzenlemektir. Patolojik olarak

değiştirilmiş HDAC etkinliği kanseri gelişimine katkıda bulunur ve bu nedenle yeni bir asetilasyon modülatörlerinin karakterizasyonu gelecek anti-kanser tedavileri için önemlidir. Seidel *et al.* 2014 yılında yapmış oldukları bir çalışma da, asetilasyon protein düzeylerini artıran pan-HDAC inhibitörleri olarak üç yeni 4-hidroksi-benzoik asit türevi belirlemişlerdir. Bu bileşiklerin, hücre döngüsü ilerlemesini durdurduğunu ve normal hücrelerin yaşayabilirliği etkilemeden, apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma verileri, 4-hidroksibenzoik asit türevlerinin anti-kanser potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Seidel *et al.* 2014). Bununla birlikte, çalışmamızda yer alan *Tortella tortuosa* nın EtOAc, Su/EtOAc ekstrelerinin ana bileşeni de 4-hidroksibenzoik asittir. Bu ekstrelerin C6 ve HeLa hücresine karşı yapmış olduğumuz antiproliferatif aktivite testleri sonucunda, her iki kanser hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi standart olarak kullanılan 5-FU ile mukayese edildiğinde ılımlı bir etki gözlenmiştir.

RT nin kloroform ekstresinin ana bileşeni salisilik asittir. Salisilik asit ve onun türevi asetilsalisilik asit gibi anti-inflamatuvar ilaçlar tümör baskılayıcı etkisi olan ve apoptozu tetikleyen ilaçlar olarak belirtilmişlerdir. Ayrıca, bazı kanser türlerinin riskini bilinmeyen bir mekanizma ile azaltmaktadırlar. Vejselova ve Kutlu yapmış oldukları bir çalışmada, salisilik asitin, insan akciğer adenokarsinoması alveoler epitel hücreleri (A549 hücreleri) üzerine apoptozu tetikleyerek sitotoksik ve potansiyel antiproliferatif etkisi olduğunu belirlemişlerdir (URL 1). Bununla birlikte C6 ve HeLa hücresine karşı yapmış olduğumuz antiproliferatif aktivite testleri sonucunda RT nin kloroform ekstresinde C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi standart olarak kullanılan 5-FU'dan bile daha yüksek bulunmuştur (IC₅₀: 38.61 µg/mL).

TT nin kloroform ekstresinde kafeik asit ana bileşen olarak belirlenmiştir. C6 ve HeLa hücresine karşı yapmış olduğumuz antiproliferatif aktivite testleri sonucunda TT nin kloroform ekstresinde C6 hücresine karşı antiproliferatif aktivitesinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (IC₅₀: 53.80 µg/mL). Kampa *et al.* 2004 yılında yapmış oldukları bir çalışma da ferulik asit, kafeik asit, protokateşik asit fenoliklerini de içeren bir grup fenolik bileşiğin insan meme kanser hücresine (T47D cell line) antiproliferatif aktivitelerini incelemişlerdir. Analizler sonucunda, doza ve zamana bağlı olarak

antiproliferatif aktivite Kafeik asit>Ferulik asit=Protokateşik asit şeklinde belirlenmiştir (Kampa *et al.* 2004). Han *et al.* klorojenik asit ve kafeik asitin, antioksidan maddeler olduğunu; mutajenik ve kanserojen N-nitroso bileşiklerinin oluşumunu inhibe ettikleri tespit edilmiştir (Han *et al.* 2007).

TT ve RT nin Su ekstresinde ana bileşen olarak gallik asit belirlenmiştir. C6 ve HeLa hücrelerine karşı yapmış olduğumuz antiproliferatif aktivite testleri sonucunda standart olarak kullanılan 5-FU ile mukayese edildiğinde ılımlı bir etki gözlenmiştir. Faried *et al.* 2007 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl bitkisinden gallik asit izole etmişlerdir. İzole ettikleri gallik asitin insan kanser hücreleri olan yemek borusu kanseri hücreleri (TE-2) önemli ölçüde inhibe ettiğini belirlemişlerdir (Faried *et al.* 2007). Bir başka araştırma grubu ise, şarap ve üzüm ekstresinde bulunan bazı fenolik asitlerin (kafeik asit, ferulik asit, gallik asit, protokateşik asit gibi) mide, akciğer ve meme kanserine karşı etkili olduğu belirtmiştir (Stagos *et al.* 2006).

Sonuç olarak, RT ve TT karayosunları ekstralarının C6 ve HeLa hücrelerinde doza bağlı olarak hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen aktivite sonuçları ekstre bazında fitokimyasal analizler ile desteklenmiştir. Ayrıca, C6 ve HeLa hücrelerinde sözü edilen karayosunlarının antikanser etkilerini açıklayacak ilave saf bileşenlerin izolasyon çalışmaları yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Abay, G., Altun, M., Karakoç, Ö.C., Gül, F. ve Demirtas, I. 2013. Insecticidal activity of fatty acid-rich Turkish bryophyte extracts against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 16(10), 806-816.
- Abay, G., Karakoç, Ö.C., Tüfekçi, A. R., Koldaş, S. ve Demirtaş, İ. 2012. Insecticidal activity of *Hypnum cupressiforme* (Bryophyta) against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 51, 6-10.
- Altuner, E.M. 2008. Bazı karayosunu türlerinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü – Biyoloji. Ankara.
- Ando, H. and Matsuo, A. 1984. In advances in bryology, W. Schultze-Motel (Ed.), J. Cramer, Vaduz, 2, 133–224.
- Asakawa, Y. 1990b. In Bryophytes: their chemistry and chemical taxonomy, D. H. Zinsmeister, R. Mues (Eds.), Oxford University Press, 369–410, Oxford.
- Asakawa, Y. 1995. In progress in the chemistry of organic natural products, Vol. 65, Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., and Tamm Ch. (Eds.), Springer, 1–562, Vienna.
- Asakawa, Y. 1990a. in eds.: Chopra, R.N. and Bhatla, S.C. Biologically active substance from Bryophytes, *Bryophyte development: physiology and biochemistry*, Boston: CRC Press.
- Asakawa, Y. 1993. In bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination, S. M. Colegate and R. J. Molyneux (Eds.), CRC Pres, 319–347, Boca Raton.
- Asakawa, Y. 1999. In phytochemicals in human health protection, nutrition, and plant defense, J. Romeo (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, 319–342, New York.
- Asakawa, Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, 79, 557-580.
- Asakawa, Y. Ludwiczuk, A. and Nagashima, F. 2013. Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, 91, 52-80.
- Bertl, E., Becker, H., Eicher, T., Herhaus, C., Kapadia, G., Bartsch, H. and Gerhäuser, C. 2004. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 287-295.
- Cai, Y.Z., Luo, Q., Sun, M. Ad nCorke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, 74, 2157–2184.
- Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q. and Corke, H. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*, 78, 2872–2888.
- Cansu, T.B., Yaylı, B., Özdemir, T., Batan, N., Karaoğlu, Şengül Alpay ve Yaylı, N. 2013. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of mosses (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. and *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr.) grown in Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 37, 213-219.

- Cheng, X., Xiao, Y., Wang, X., Wang, P., Li, H., Yan, H. and Liu, Q. 2012. Anti-tumor and pro-apoptotic activity of ethanolic extract and its various fractions from *Polytrichum commune* L. ex Hedw in L1210 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 49-56.
- Chobot, V., Kubicova, L., Nabbout, S., Jahodar, L. and Hadacek, F. 2008. Evaluation of antioxidant activity of some common mosses. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal of Biosciences*, 63(7-8), 476-482.
- Choobot, V., Kubicova, L., Nabbout, S., Jahodar, L. and Vytlacilova, J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of five moss species. *Fitoterapia*, 77, 598-600.
- Clifford, M.N. 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 80, 1033-1043.
- Crum, H. 2001. Structural diversity of bryophytes. University of Michigan Herbarium. Ann Arbor, 379 p.
- Demirtas, I. ve Sahin, A. 2013. Bioactive volatile content of the stem and root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. *carduiformis* var. *carduiformis*, *Journal of Chemistry* doi: 10.1155/2013/125286
- Demirtas, I., Sahin, A., Ayhan, B., Tekin, S. ve Telci, I., 2009. Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *linearis*. *Records of Natural Products*, 3:2, 104-109.
- Deora, G. S., Vishwakarma, G. and Suhalka, D. 2011. Screening of antifungal activity of *Asterella angusta* (Steph.) against *Aspergillus nidulans*. *Journal of Pure And Applied Microbiology*, 5(1), 253-256.
- Ding, H. 1982. *Zhong guo Yao Yun Bao zi Zhi Wu*. Kexue Jishu Chuban She. Shanghai, 409 p.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L.S., Usman, N., Miyazaki1, T., Kato, H. and Kuwano, H. 2007. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International Journal Of Oncology*, 30, 605-613.
- Frahm, J.P. 2004. Recent developments of commercial products from Bryophytes. *The Bryologist*, 107(3), 277-283.
- Frahm, J.P. and Kirchhoff, K. 2002. Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against the slug *Arion lusitanicus*. *Cryptogamie Bryologie*, 23(3), 271-275.
- Garnier, G., Bezaniger-Beauquesne, L. and Debraux, G. 1969. *Ressources Médicinales de la Flore Francaise*, Vigot Frères Éditeurs, 1, 78-81, Paris.
- Glime, J.M. 2006. *Bryophyte Ecology, Vol 1 Physiological Ecology*. Sponsored by Michigan Technological University (MTU), Botanical Society of America (BSA), International Association of Bryologists (IAB), published online at <http://www.bryoecol.mtu.edu/>
- Glime, J.M. 2007. Economic and ethnic uses of Bryophytes. (Eds: Crosby, M.R. *et al.*) In: *Flora of North America, Vol 27, Part 1*. Oxford University Press, pp.14-41.
- Gradstein, S. R., Churchill, S.P. and Salazar Allen, N. 2001. *Guide to the Bryophytes of tropical America*. Mem. N.Y. Bot. Gard., 86, 1-577.
- Gunatilaka, A.A.L., Kingston, D.G.I. and Johnson, R.K. 1994. Mechanism-based isolation and structure of some anticancer active natural-products. *Pure and Applied Chemistry* 66 (10-11), 2219-2222.

- Guo, L., Wu, J.Z., han, T., Cao, T., Rahman, K. And Qin, L.P. 2008. Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. *Molecules*, 13, 2114-2125.
- Han, X.Z., Shen, T. and Lou, H.X. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci*, 8, 950-988.
- Harris, E.S.J. 2008. Ethnobryology: traditional uses and folk classification of bryophytes. *The Bryologist* 111(2), 169-217.
- Hill, M.O., Bell, N., Bruggeman-Nannenga, M. A., Brugués, M., Cano, M. J., Enroth, J., Flatberg, K. I., Frahm, JP., Gallego, M. T., Garilleti, R., Guerra, J., Hedenäs, L., Holyoak, D. T., Hyvönen, J., Ignatov, M. S., Lara, F., Mazimpaka, V., Muñoz, J. and Söderström, L. 2006. An annotated checklist of the mosses of Europe and Macaronesia. *Journal of Bryology*, 28, 198-267.
- Hirose, M., Masuda, A., Ito, N., Kamano, K. and Okuyama, H. 1987. Effects of dietary perilla oil, soybean oil and safflower oil on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mammary gland and colon carcinogenesis in female SD rats. *Carcinogenesis*, 11, 731-735.
- Ivanova, V., Kolarova, M., Aleksieva, K., Dornberger, K. J., Haertl, A., Moellmann, U., Dahse, H.M. and Chipev, N. 2007. Sanionins: anti-inflammatory and antibacterial agents with weak cytotoxicity from the Antarctic moss *Sanionia georgico-uncinata*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 37(4), 343-352.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A. and Castanas, E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action, *Breast Cancer Res*, 6 (2),63-74.
- Karakus, G., Polat, Z.A., Sahin Yaglioglu, A., Karahan, M. ve Yenidunya, A.F. 2013. Synthesis, characterization, and assessment of cytotoxic, antiproliferative, and antiangiogenic effects of a novel procainamide hydrochloride-poly(maleic anhydride-co-styrene) conjugate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* doi: 10.1080/09205063.2012.750209 ,24, (10) 1260-1276.
- Komala, I., Ito, T., Yagi, Y., Nagashima, F. and Asakawa, Y. 2010. Volatile components of selected liverworts, and cytotoxic, radical scavenging and antimicrobial activities of their crude extracts. *Natural Product Communications* 5(9), 1375-1380.
- Krzaczkowski, L., Wright, M., Rebérioux, D., Massiot, G., Etiévant, C., and Gairin, J.E. 2009. Pharmacological screening of bryophyte extracts that inhibit growth and induce abnormal phenotypes in human HeLa cancer cells. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23, 473-482.
- Lorimer, S.D., Barns, G., Evans, A.C., Foster, L.M., May, B.C.H., Perry, N.B. and Tangney, R. S.1996. Cytotoxicity and antimicrobial activity of plants from New Zealand's subantarctic island. *Phytomedicine*, 2(4), 327-333.
- Mizutani, M. 1975. *Misc. Bryol. Lichenol.* 6, 64.
- Munzi, S., Doriana, T., Ceccarelli, D., Klimati, E., Tiezzi, A., Pisani, T., Paoli, L. and Loppi, S. 2014. Antiproliferative activity of three lichenspecies belonging to the genus *Peltigera*. *Plant Biosystems*, 148(1), 83-87.

- Narisawa, T., Takahashi, M., Kotanagi, H., Kusaka, H., Yamazaki, Y., Koyama, H., *et al.* 1991. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid alpha-linolenic acid on colon carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res*, 82, 1089-1096.
- Nestel, P., Clifton, P. and Noakes, M. 1994. Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men. *J Lipid Res* 35, 656-662.
- Oztopcu Vatan, P., Kabadere, S., Uyar, R., Savaroglu, F. ve Kus, G. 2012. Time dependent cytotoxic role of *Homalothecium sericeum* extracts on glioma. *Biological Diversity and Conservation*, 5(1), 1-4.
- Oztopcu Vatan, P., Savaroglu, F., Filik Iscen, C., Kabadere, S., Ilhan, S. ve Uyar, R. 2011. Antimicrobial and antiproliferative activities of *Homalothecium sericeum* (Hedw.) Schimp. Extracts. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2A), 461-466.
- Pant, G. 1998. Medicinal uses of bryophytes. In: Chopra, R.N. (Ed.), *topics in Bryology*. New Delhi, Mumbai, Calcuta, Lucknow, Chennai, Nagpur, Bangalore, Hyderabad, Ahmedabad, pp. 112-124.
- Pejin, B. And Bogdanović-Pristov, J, 2012. ABTS cation scavenging activity and total phenolic content of three moss species, *Hem. ind.* 66 (5), 723–726.
- Renzaglia, K.S., Duff, R. J., Nickrent, D.L. and Garbary, D. J. 2000. Vegetative and reproductive innovations of early land plants: Implications for a unified phylogeny. *Philosoph. Trans. Roy. Soc. London B*, 355, 769-793.
- Sabovljević, M., Bijelović, A. and Grubišić, D. 2001. Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Lek. Sirov*, 21, 17-29.
- Sahin Yaglioglu, A., Akdulum, B., Erenler, R., Demirtas, I., Telci, I. and Tekin, S. 2013. Antiproliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and (E)-1,8-pentadecadiene from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. *Roots, Medicinal Chemistry Research* doi: 10.1007/s00044-012-0297-2.
- Savaroglu, F., Ilhan, S. And Filik-Isce, C. 2011a. An evaluation of the antimicrobial activity of some Turkish mosses, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (14), 3286-3292.
- Savaroğlu, F., Filik İşçen, C., Öztopcu Vatan, A.P., Kabadere, S., İlhan, S. and Uyar, R. 2011b. Determination of antimicrobial and antiproliferative activities of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Turk J Biol.*, 35, 361-369.
- Harinder, D.K. Saxena. 2004. Uses of bryophytes. *Resonance* 9, 56-65.
- Schenk, G. 2002. *Moss gardening including lichens, liverworts, and other miniatures*. Timber Press, Portland, Oregon. 261 p.
- Schofield, W.B. 2001. *Introduction to Bryology*. The Blackburn Press. New Jersey. 431 pages.
- Seidel, C., Schnekenburger, M., Dicato, M. and Diederich, M. 2014. Antiproliferative and proapoptotic activities of 4-hydroxybenzoic acid-based inhibitors of histone deacetylases. *Cancer Letters*, 343(1), 134-146.
- Singh, M., Rawat, A.K.S. and Govindarajan, R. 2007. Antimicrobial activity of some Indian mosses. *Fitoterapia*, 78, 156-158.
- Smith, A.J.E. 2004. *The moss flora of Britain and Ireland*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 1012 p.
- Spjut, R.W. and Suffness, M., Cragg, G.M. and Norris, D.H. 1986. Mosses, Liverworts, and Hornworts screened for antitumor agents. *Economic Botany*, 40 (3), 310-338.

- Spjut, R.W. 1992. Systematic screening of bryophytes for antitumor agents. *Tropical Bryology*, 6, 193-202.
- Stagos, D., Kazantzoglou, G., Theofanidou, D., Kakalopoulou, G., Magiatis, P., Mitaku, S. and Kouretas, D. 2006. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res-Gen Tox En*, 609, 165–175.
- Suire, C. 1972. Chimie des Bryophytes. *Rev. Bryol. Lichenol.* 41, 105.
- Tadesse, M. 2002. Characterisation and mode of action of natural plant products against leaf fungal pathogens. Shaker, Aachen.
- Tsubota, H., Kuroda, A., Masuzaki, H., and Deguchi, H. 2006. Preliminary study on allelopathic activity of bryophytes under laboratory conditions using the sandwich method. *Journal of The Hattori Botanical Laboratory*, 100, 517-525.
- URL 1.
<http://online.journals.tubitak.gov.tr/openAcceptedDocument.htm?fileID=418607&no=90453> , 04.05.2014.
- Uyar, G. ve Çetin, B. 2004. A new check-list of the mosses of Turkey. *Journal of Bryology*, 26, 203–220.
- Üçüncü, O., Cansu, T.B., Özdemir, T., Alpay Karaoğlu, S. ve Yaylı, N. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (*Tortula muralis*) Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., and *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. from Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 825-834.
- Vargas, M. H. 2000. IC₅₀ ve IC₇₅ values ED50 plus v1.0 programs, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- Wu. P.C. 1982. Some uses of mosses in China, *Bryol. Times*, 13, 5.
- Yamada, P., Isoda, H., Han, J. K., Talorete, T. P. N., Yamaguchi, T. and Abe, Y. 2007. Inhibitory effect of Fulvic acid extracted from Canadian Sphagnum peat on chemical mediator release by RBL-2H3 and KU812 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(5), 1294-1305.

TERMİNOLOJİK TERİMLER

<u>Terim</u>	<u>Açıklama</u>
Esterleşme Reaksiyonu	: Esterler genel olarak karbon asitlerinden elde edilmektedirler. Esterleşme reaksiyonu, karbon asitlerinde bulunan –OH grubu (alkol) bir –OR grubuyla yer değiştirmesidir.
Pasajlama	: Hücre kültürü kaplarında tek tabaka halinde bulunan hücre dizilerini sıcaklık ve tripsin yardımıyla, zarar vermeden yüzeyden alıp sıvı içinde süspanse ederek başka ortamlara aktarma işlemidir.
Kromatogram	: Kromatografik sistemlerde analiz sonucunda elde edilen zamana karşı detektör sinyali grafiğidir.
Fenolik bileşik	: Aromatik halkaya bir ya da daha fazla hidroksil grubunun bağlandığı aromatik bileşiklerdir.
Antiproliferatif	: Hücrenin kontrolsüz çoğalmasını önlemektir.
Sitotoksik etki	: Hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran etkidir.
Briyofit	: Kelime anlamı su aldığında şişen olan bu grup bitkiler; karayosunları, ciğerotları ve boynuzotlarından oluşurlar.
Karayosunu	: Gerçek kök, gövde ve yaprak yapısına sahip olmayan, baskın gametofit ve buna bağımlı sporofit safhalarının görüldüğü briyofit gurubudurlar.
Ciğerotu	: Karaya uyum açısından karayosunlarına göre daha ilkel olan, gerçek kök, gövde ve yaprak yapısından yoksun, talluslu veya yapraksı yapıdaki briyofit gurubudurlar.
Boynuzsu ciğerotu	: Gerçek protonemaya sahip olmayan, talluslu, dallanmamış tek hücreli rizoidlere sahip briyofit gurubudurlar.
Proliferasyon	: Hücrelerin çoğalması, artması demektir.
Gametofit	: Karayosunu yaşam döngüsünde hâkim, yapraklı, haploid evre.

- Sporofit** : Haploid nesil üzerinde konuk olan (asalak olmayan konuk), ayak, seta ve kapsül içeren karayosununun diploid nesli.
- Epifit** : Epifit (Eski Yunanca: *Epi*=üzerinde, *Phyton*=bitki), bazı bitkiler diğer bazı bitkileri sadece konak olarak kullanırlar ve onlara zarar vermeden konum ve destek sağlamak için üzerlerinde büyür ve gelişirler.
- Arkegonyum** : Dişi gametleri içeren, taban kısmı şişkin, boyun kısmı tüp şeklinde olan yapı.
- Anteridyum** : Anterozoidleri içeren, küreselden iplik şekline doğru ya da kısa silindirik yapıda olan erkek organ.
- Hydroid** : Hydrom içerisindeki su iletim hücreleri.
- Leptoid** : Leptom içerisindeki besin iletim hücreleri, karayosunlarında şeker üretimi yapan özelleşmiş hücreler.
- Steroid** : Steroid, birbiriyle kaynaşmış dört halkadan oluşmuş karbon iskeletli bir lipittir.
- Yağ asidi** : Kimya ve biyokimyada, yağ asidi, genelde uzun, alifatik kuyruklu bir karboksilik asittir.
- Terpenoid** : Terpenlerin çoğu hidrokarbonlardır; ancak alkoller, ketonlar veya aldehitler gibi oksijen içeren bileşiklerde olabilirler. Bu türevler çoğunlukla terpenoid olarak adlandırılırlar.
- Flavonoid** : Genellikle 15 karbon atomu bulunana C6-C3-C6 karbon iskeletini içeren geniş bir doğal ürün sınıfını veya özellikle de fenilbenzopiran iskeletine sahip bileşikler ifade eder.
- Lignan** : Lignans bitkilerde bulunan bir kimyasal bileşikler grubudur. Lignanlar sübstitüe sinamik asit alkollerinin dimerizasyon aracılığıyla fenilalaninden türetilen polifenolik maddelerdir.
- Lipid** : Lipidler, yağlar, mumlar, steroller, yağda çözünen (örneğin, vitamin A, D, E olarak ve K), vitaminler, monogliseritler, digliseritler, trigliseritler, fosfolipidler vb. bileşikler içeren ve doğal olarak oluşan bir moleküller grubudur.

- Sterol** : Steroller, veya steroid alkoller steroidlerin bir alt grubu olup, A halkasının 3-pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahiptirler. Asetil koenzim A'dan sentezlenen amfipatik lipitlerdir.
- Antimikrobiyal** : Mikroorganizma tarafından üretilen veya sentetik olarak elde edilen ve mikroorganizmaları öldüren veya gelişmesini baskılayan, gıdalarda istenmeyen ancak herhangi bir nedenle bulunma olasılığı olan bakteri, küf, maya, patojen veya patojen olmayan her türlü mikroorganizmayı ortamdaki yok etmek, çoğalma veya faaliyetlerini önlemektir.
- Antitümör** : Tümör meydana gelmesini engelleyen, tümörün büyümesine engel olanıdır.
- Antifungal** : Mantarların üremesine engel olma veya onların öldürülmesidir.
- İnsektisit** : Zararlı böceklerin gelişimini ve üremesini engellemektir.
- Endofitik** : Bir bitkinin dokuları arasında veya hücrelerinde bulunan anlamına gelir.
- Absorbans** : Bir ışığın absorblayıcı ortamdan geçmeden önceki şiddetinin geçtikten sonraki şiddetine oranıdır.
- Apoptoz** : Programlanmış hücre yaşam süresini düzenlemektir (Hücre ölüm programı).
- İnhibisyon** : Kimyasal reaksiyonun yavaşlatılması veya durdurulması, kimyasal tepkimenin önlenmesidir.
- Tripsin** : Pankreas tarafından salınan, amin asitleri arasındaki bağları koparan proteolitik bir enzimdir.
- Cryovial** : Hücre dondurma tüpüdür.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Muhammet Şamil YAĞLIOĞLU
Doğum Yeri :Amasya
Doğum Tarihi :01.07.1976
Medeni Hali :Evli
Yabancı Dili :İngilizce
Adres : Çankırı Orman İşletme Müdürlüğü, ÇANKIRI.
Telefon :0 543 604 21 12
e-mail :samilyaglioglu@hotmail.com

Eğitim Durumu

Derece	Kurum ve Yıl
Lise	:Suluova Lisesi (1991-1994)
Ön Lisans	:Mersin Üniversitesi (1994-1996)
Lisans	:Karadeniz Teknik Üniversitesi (1998-2002)
Yüksek Lisans	:Çankırı Karatekin Üniversitesi (2012-2014)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Çalıştığı Kurum	Yıl
Amasya Orman İşletme Müdürlüğü Taşova Şefliği	2006-2008
Amasya Orman İşletme Müdürlüğü Aydınca Şefliği	2008-2012
Çankırı Orman İşletme Müdürlüğü Çankırı Şefliği	2012-.....

Katıldığı Seminerler

- 1) “Orman Yangınları Uzmanlık Eğitimi”, 6-14 Ocak 2011, Kozaklı, Nevşehir.
- 2) “Avcı Eğitimi” 02-12 Şubat 2009, Amasya.
- 3) “Orman Amenajman Planlarının Hazırlanması, Planlardaki Tablolar Arasındaki Bağlantılar, Silvikültürel Etanın Tespiti, İşletme Sınıfları, Fonksiyonlar, Harita Bilgisi, Arazi Uygulamaları, Genel Orman İdaresi ve Planlama”, 06-11 Mayıs 2012, Çorum.