

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**TÜRKİYEDE YETİŞEN *Eryngium billardieri* Delar. BİTKİSİNİN
KİMYASAL İÇERİĞİ ile SİTOTOKSİSİTESİNİN MCF7 ve HepG2
HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI**

Proje No: THD-2017-7598

Hızlı Destek

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN
Eczacılık Fakültesi/Meslek Bilimleri Bölümü

Leyla PAŞAYEVA
Hanifa FATULLAYEV
Osman TUGAY
Eczacılık Fakültesi/Meslek Bilimleri Bölümü

Mayıs 2018

KAYSERİ

TEŐEKKÖR:

Bu alıŐma Erciyes Öniversitesi BAP Birimi tarafından THD-2017-7598 kodlu proje ile desteklenmiŐtir.

Bu projede LC-MS/MS cihazının kullanımında desteklerinden dolayı Erciyes Öniversitesi Ziya Eren İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (ERFARMA) teŐekkÖrlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
4. BULGULAR	13
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	25
6. EKLER	26
7. KAYNAKLAR	27

ÖZET

TÜRKİYEDE YETİŞEN *Eryngium billardieri* Delar. BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ ile SİTOTOKSİSİTESİNİN MCF7 ve HepG2 HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI

Eryngium cinsi Apiaceae familyasına ait olup Dünya’da 250, Türkiye’de ise 10’u endemik 23 tür ile temsil edilmektedir (1,2). *Eryngium* türleri Türkiye’de halk arasında boğadikeni, eşek dikeni, deve dikeni, göz dikeni ve tengel dikeni isimleri ile bilinirler (3). Ülkemizde yetişen *Eryngium* türlerinden biri de reçinemsî tadı olan *Eryngium billardieri* Delar.’dır. Bitki Doğu Anadolu Bölgesi’nde yetişmekte olup gövdesi ile kabuğu soyulduktan sonra gıda olarak tüketilmektedir (4,5). Türkiye’de halk arasında *Eryngium* türlerinin toprak üstü kısımları yangı giderici, ödem söktürücü, yara iyileştirici, sinüzit ve üriner sistem hastalıklarının (6), kök kısımları ise hemoroid, mukoz membranların lokal enflamasyonu ve soğuk algınlığının tedavisinde kullanılmaktadır (7,8). Literatürde ülkemizde doğal olarak yetişen *E. billardieri* ile yapılmış herhangi bir sitotoksitesite ve kimyasal içerik analizi çalışması bulunmamaktadır. Daha önce tarafımızca yapılan bir çalışmada bitkinin kimyasal kompozisyon incelemesi yapılmış ve daha çok triterpenik ve steroidal saponin yapısında maddeler içerdiği belirlenmiştir (9).

Projenin amacı; *E. billardieri* Delar. bitkisinin içerdiği bileşikler tespit etmek ve bu kapsamda, bitkinin toprak üstü kısımlarının ana metanol ekstresinin ve bu ekstreten partiyonla elde edilen etil asetat, n-butanol ve su ekstralarının sitotoksik aktivitesinin insan karaciğer (HepG2) ve insan meme kanseri (MCF7) hücre hatlarında *in vitro* araştırmaktır.

Projenin sonuçlarına göre, *E. billardieri* etil asetat ekstresinin iki farklı hücre hattında sitotoksik etkiye sahip olduğu Sülförhodamin B deneyi ile gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinde 24. ve 48. saat sonunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 67,00 ile 66,62 µg/ml; MCF7 hücrelerinde ise 35,99 ile 91,99 µg/ml’dir. Yapılan LC-MS/MS analizi ile etkili olduğu belirlenen etil asetat ekstresinin daha çok fenolik asitler ve flavonoidlerce zengin olduğu sonucuna varılmıştır. Rozmarinik ve klorojenik asit bileşiklerinin tüm ekstrallerdeki miktar tayini yapılmış ve bu maddelerin en fazla etil asetat ekstresinde bulunduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak; *E. billardieri* bitkisinin etil asetat ekstresinin potansiyel doğal kanser karşıtı maddelerin kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Anti-proliferatif özellikler için bitkinin toprak üstü kısımlarının kullanılması ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Eryngium billardieri* Delar., LC-MS/MS, HepG2, MCF7, SRB.

ABSTRACT

INVESTIGATION of CHEMICAL CONTENT and CYTOTOXICITY ON MCF7 and HepG2 CELL LINES of *Eryngium billiardieri* Delar. GROWING IN TURKEY

Eryngium genus from Apiaceae are represented by 250 species in the world, and 23 in Turkey and 10 of them are endemic. *Eryngium* species are known “boğadikeni, eşek dikeni, deve dikeni, göz dikeni and tengel dikeni” in Turkey. *Eryngium billiardieri* Delar .is one of the *Eryngium* species that grows in Turkey which has a resinous taste. The plant grows in the Eastern Anatolia Region and is consumed as food after being peeled. In traditionally, aerial parts of *Eryngium* species are used as anti-inflammatory, anti-eudema, expectorant and wound healing. The aerial parts of the plant also used for treatment of sinusitis and urinary tract diseases. In additionally, the root of the plant used fort he treatment hemorrhoids, local inflammation of mucous membranes and colds. In the literature, there is no study of cytotoxicity and chemical content analysis with *E. billiardieri* naturally grown in our country. In our previous study the chemical composition of the plant was investigated and it was determined that the plant mainly contained triterpenic and steroidal saponin compound.

The purpose of the project is to identify the main compounds contained in *E. billiardieri* Delar. For his purpose, the cytotoxic activity of the ethyl acetate, n-butanol and water extracts obtained from the main methanol extract of aerial part of the plant is examined in HepG2 and MCF7 cell lines *in vitro*.

According to the results, the sulforhodamine B assay showed that the *E. billiardieri* ethyl acetate extract had cytotoxic effect in two different cell lines. IC₅₀ values were 67.00 and 66.62 µg/mL in HepG2 cells and 35.99 and 91.99 µg/mL in MCF7 cells at 24th and 48th hours, respectively. The ethyl acetate extract was found the most active and it was determined that it was rich in phenolic acids and flavonoids by LC-MS/MS. In addition, rosmarinic and chlorogenic acid were quantitated in all extracts and they were mostly found in ethyl acetate extract.

As a result; It is thought that the ethyl acetate extract of the *E. billiardieri* may be a potential source of natural anti-cancer agents. Further research on the use of aerial part of the plant for anti-proliferative properties is needed.

Keywords: *Eryngium billiardieri* Delar., LC-MS/MS, HepG2, MCF7, SRB.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Doğal bileşiklerin 1950’li yıllarda ABD Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından geniş kapsamlı taranması sonucunda potansiyel antikanser ajanlar olarak tespit edilmiştir. 1940-2006 yılları arasında onaylanan antikanser ilaçların üçte ikisinden fazlasının doğal ürünler veya doğal kaynaklı ürün olduğu bildirilmiştir (10). *Catharanthus roseus* (L.) G.Don (Apocynaceae), *Angelica gigas Nakai* (Apiaceae), *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae), *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), *Ochrosia elliptica* Labill. (Apocynaceae) ve *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae) bitkilerinin aktif bileşikleri çeşitli kanser türlerinin ileri aşamalarının tedavisinde kullanılmaktadır (11). Ancak buna rağmen hala anti-kanser aktiviteye sahip çok sayıda doğal bileşik keşfedilmeyi beklemektedir.

Apiaceae familyası dünyada yaklaşık 450 cins ve 3700 türle temsil edilmektedir (12). Bu familya üyelerinin çoğu umbellat çiçek durumu, bir karpofor ile asılı duran tek tohumlu iki merikarptan oluşan özelleşmiş meyveler ve çok sayıda küçük epigin çiçekler ile kolaylıkla tanınabilir (13). Apiaceae familyası dünya genelinde çöller, bataklıklar, orman altı ve açıklıkları, subalpin tundralar, stepler ve açık yerler gibi çeşitli habitatlarda yayılış gösteren kozmopolit bir familyadır. Apiaceae familyasının Saniculoidea subfamilyasına dahil *Eryngium* cinsi Dünya genelinde 317 taxa ile (14), Türkiyede ise 10’u endemik 24 taxa ve 23 türle temsil edilmektedir (15, 16).

Günümüzde birçok sentetik ilacın yan etki ve etkileşimlerinden dolayı kanser tedavisinde kullanımında bazı zorlukların olduğu bilinmektedir. Öte yandan uygulama alanının genişliği, terapötik etkinliği ve düşük toksisitesi ile bitkisel ilaçlar dikkat çekmekte ve üzerinde yapılan antikanser çalışmalar hızlanmaktadır. Birçok bitkiden bugün farklı tümör türlerinin tedavisinde antikanser ilaç olarak kullanılan yeni bileşikler izole edilmiştir. Bu projenin özgün değeri değerlendirilecek olursa:

1. Bu proje ile Türkiye’ de yetişen ve hakkında hiçbir sitotoksik aktivite ve kimyasal içerik analizi bulunmayan *E. billiardieri* ilk kez sitotoksikite ve kimyasal içerik açısından değerlendirilmiştir.
2. Planlanan çalışma gerçekleştirildiği takdirde bu bitkiden hazırlanan farklı ekstraların de hem sitotoksikite hem de fitokimyasal içerik açısından birbiriyle kıyaslaması yapılmış, ekstraların sahip oldukları sitotoksikite ile fitokimyasal kompozisyonları arasında ilişki kurulmuş olacaktır.
3. Bunun yanında, bitkinin fenolik bileşik içeriği de ilk kez incelenecektir.

Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen verilerin, bitkiyle ilgili literatüre katkıda bulunması ve bu sayede yapılabilecek ileri çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Bu proje kapsamında sitotoksik etkinin değerlendirilmesinin yanı sıra bitkiden hazırlanan farklı ekstraların de hem aktivite hem de fitokimyasal içerik açısından birbiriyle kıyaslaması yapılmıştır. Ekstrelerin sahip oldukları etki ile fitokimyasal kompozisyonları arasında ilişki kurulmuştur. Böylece bu çalışma ile ülkemizde yetişen bu bitki türünün LC-MS/MS analizleri ile kimyasal içerikleri de ilk kez aydınlatılmıştır.

Yukarıda belirtilen araştırmaların sonucu ve geleneksel kullanımına bakıldığı zaman, *E. billiardieri* toprak üstü kısmının umut verici bir kanser karşıtı madde kaynağı olabileceği öne sürülmüştür.

GENEL BİLGİLER

Apiaceae familyası

Apiaceae familyası taksonlarının meyvesi; basit meyvelerden, olgunlukta açılmayan, yarılan meyveler (şizokarp) içerisinde yer alır. Olgun şizokarp meyve komissur yüzeyleri ile ayrılır ve karpofor ismi verilen çatallı bir yapı ile birbirine bağlanan iki adet tek tohumlu karpelden (merikarp) oluşur. Meyve lateral (komissural yüzeye dik) ya da dorsal (komissural yüzeye paralel) olarak basıklaşmış olabilir. Her bir merikarpın yüzeyinde kosta adı verilen ve iletim demetlerini ihtiva eden beş adet uzunlamasına birincil sırt bulunur. Birincil sırtlar arasında kalan alanlara vallekula denir ve bazen birincil sırtlar arasındaki bu vallekulalarda ikincil sırtlar yerleşmiştir. Birincil ve ikincil sırtlar gelişim dereceleri bakımından önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Salgı kanalları (vittalar) ise birincil sırtlar arasındaki vallekulalarda bulunur (17). Birincil ve ikincil sırtların veya kanatların varlığı, boyutu ve 7 ornamentasyonu familya için oldukça kullanışlı diagnostik karakterlerdir (18).

E. billiardieri Delar.

Çok yıllık, dik, lifli bir boyuna sahip. Birkaç gövde orta kısımdan (20)-40-75 cm, gevşek olarak dallanmış. Taban yaprakları devamlı kalıcı, oyukluya benzer, mavimsi yeşil, petioller dikensiz lamina dışı üçkensiden suborbiculara kadar, 7-15 cm uzunluk ve genişlikte, bipinnatifit basit segmentler üçe yarılmış, loblar ve reşis kenarları dentat, dikenli. Brakteler 5-7-(8), linear lanseolat, batıcı, 3(-5)-damarlı, ± geri kıvrık, içten ve ya dıştan dikenli, 1.5-3x kapitulumu sahip. Brakteler sepala göre uzun, tümü içte ve ya dışa doğru iç kupisli (15).

Eryngium Türlerinin Kimyasal Bileşikleri

Eryngium türleri ile yapılan fitokimyasal çalışmalarda tanen türevi maddeler, saponinler, alkaloidler, asetilen, flavonoidler, kumarin türevi bileşikler, triterpenik saponinler, monoterpene glikozitler, kemferol, klorojenik asit, kafeik asit, lutein ve β -karoten bulunduğu tespit edilmiştir (2,19). Yapılan literatür araştırmasında *Eryngium* cinsine dahil 250 türden sadece 23'ü fitokimyasal olarak araştırılmış ve toplamda 127 bileşik izole edilmiştir. Bunlardan büyük çoğunluğun fenolik ve terpenik yapıda olduğu bildirilmiştir (20).

İncelenen bazı literatürlerde *Eryngium* türlerinden 25 kadar saponin bileşiği izole edildiği ve bunların da büyük çoğunluğunun polihidroksi oleanen tip triterpen saponin olduğu bildirilmiştir. Örn., 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl- 22-O- β , β -dimethylacryloyl-A1- barrigenol, 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-22-O-angeloyl-R1-barrigenol, 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-21-O-acetyl- 22-O-angeloyl-R1-barrigenol, 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl-21-O-acetyl-22-O- β , β -dimethylacryloyl-R1-barrigenol (21,22,23). Bunun dışında yapılan bazı fitokimyasal çalışmalarda *Eryngium* türlerinden olan *E. bromeliifolium*'den betulnik asit (24), *E. macrocalyx* (*E. incognitum*) köklerinden oleanolik asit (25,26), from *E. maritimum*'un çiçekli yerüstü kısımlarından R1-barrigenol ve A1-barrigenol adlı triterpenoit yapısında bileşikler, *E. creticum* bitkisinin yerüstü kısımlarından ve *E. giganteum* bitkisinin tohumlarından hazırlanan eter ekstresinden seskiterpen yapısında dört perhidronaftalin türevi bileşik izole edilmiştir (27). Cinsin farklı türleri üzerinde yapılan çalışmalarla ise flavanoit yapısında bileşiklerin de bu türlerde bulunduğu görülmüştür: *E. campestre* türünün yerüstü kısımlarından kersetin, izokersetin, rutin, astragalın bileşiklerinin (28), *E. maritimum*'dan ise kemferol 3- β -D-glükopiranozil-7-O- α -L-rhamnopyranozit, astragalın ve izokersetin bileşiklerinin izole edildiği görülmüştür (29,30).

Eryngium Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları

E. billiardieri ile yapılan bir çalışmada köklerden ve toprak üstü kısımlardan hazırlanan %80 metanol ekstraktları ve bu ekstraktlardan elde edilen fraksiyonlar, sıçanlarda asetik asitle *i.p* olarak oluşturulan arttırılmış vasküler permeabiliteye ve serotonin, bradikinin ve karragenan ile oluşturulan ödeme karşı test edilmiştir. Asetik asitle arttırılmış vasküler permeabiliteyi en yüksek oranda köklerden elde edilen *n*-butanol ekstresinin inhibe ettiği, serotonin, bradikinin ve karragenan ile oluşturulan ödeme karşı da yine köklerden elde edilen *n* -butanol ekstresinin istatistiksel olarak anlamlı sonuç gösterdiği belirtilmiştir (8). Zarei ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada *E. billiardieri*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanolik ekstrenin hiperkolesterolemide oluşturulan sıçanlarda karaciğer fonksiyonlarına ve lipit düzeylerine olan etkisi incelenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre *E. billiardieri* ekstresi serum ALT ve ALP, kolesterol, trigliserit ve LDL'yi kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde düşürdüğü belirtilmiştir (9). Yapılan bazı çalışmalarda cinsin farklı türlerinden elde edilen saponin bileşiklerinin insan karaciğer, prostat, akciğer, kolon kanseri gibi birçok hücre hatlarından sitotoksik etkisi araştırılmış ve anlamlı derecede etki görüldüğü bildirilmiştir (23,31). Bunun dışında yapılan bir çalışmada *E. planum* bitkisinden hazırlanmış etanol ekstresinin insan lösemi hücre hattında apoptozu indüklediği bildirilmiştir (32).

Tüm bu literatür verileri göz önünde bulundurularak; planlanan proje kapsamında tarafımızdan yürütülen önceki çalışmamızın sonuçları ışığında bitkinin saponin bileşikleri taşıması muhtemel bulunarak, bu tip bileşiklerin daha çok sitotoksikite göstermesi muhtemel, östrojen reseptör pozitif MCF-7 ve östrojen reseptör negatif HepG2 hücre hatlarında incelenmiş; bunun yanında içeriği LC/MS/MS yöntemiyle araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmada, bitkilerin temini Selçuk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Osman TUGAY tarafından yapıldı. Bitki ekstre ve alt ekstralarının hazırlanması Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Laboratuvarı IX'da, Farmakognozi öğretim görevlisi Öğr. Gör. Dr. Leyla PAŞAYEVA tarafından; hücre kültürü çalışmaları ve hücre canlılık deneyleri Hadiye Kılıçer İnsan Hücre Kültürü ve Moleküler Çalışma Laboratuvarı'nda Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Kübra KARABOĞA ARSLAN tarafından; LC-MS/MS ile bitkinin içerik analiz çalışmaları Arş. Gör. Hanifa FATULLAYEV tarafından yapıldı. LC-MS/MS analiz çalışmalarına Erciyes Üniversitesi Ziya Eren İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (ERFARMA) destek verdi. İçerik analiz çalışmaları İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı ile gerçeleştirildi.

1. Bitki materyali: Çalışmalarda kullanılan *E. billardieri* bitkisinin toprak üstü kısmı 2015 yılında temmuz ayında Hadim-Bozkır arası, 1780 m yükseklikten toplanmıştır. Bitkiye ait örnekler, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi Herbaryumu'nda (KNYA 26907) muhafaza edilmektedir.

2. Ekstrelerin hazırlanışı: *E. billardieri*'nin toprak üstü kısımları kurutulduktan sonra kaba haline getirilerek %70 metanol (EKM) ile oda sıcaklığında ekstre edildi. Daha sonra metanol ekstresi fraksiyonlanarak etilasetat (EKE), n-butanol (EKB) ve su (EKW) ekstraları elde edildi. Çözücülerini alçak basınçta vakum altında uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen ekstralar liyofilize edilerek analiz anına kadar -18 °C'de saklandı.

3. Sıvı Kromatografisi Kütle-Spektrometresi/ Kütle-Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Bileşiklerin Analizi

LC-MS/MS Çalışma Şartları

Cihaz: Shimadzu 8040

Kolon: Restek C18 analitik kolon (150 x 4.6 mm, 3 µm partikül çapı)

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Akım hızı: 0.4 mL/dak

Kütle aralığı: m/z 100-1000

Kurutma sıcaklığı: 200 C

Nebulizer basıncı: 40 psi

Kurutma gazı: 15 mL/dak

Kapiler voltaj: 4 kV

İyonlaştırma turu: ESI -/+

Hareketli faz: A: metanol

B: %0,1formik asit

Gradient akış:

Zaman (dk)	Haraketli Faz A (%)	Haraketli Faz B (%)
0,01	75	25
15	60	40
18	55	45
21	45	55
25	25	75
38	15	85
43	15	85
53	5	95
58	5	95
68	0	100

Bununla birlikte proje kapsamında olmayan ekstrenin içerisinde tespit edilen bileşiklerden rozmarinik asit ve klorojenik asitin ekstre ve alt ekstrelerdeki miktarı belirlendi. Bu amaçla metanol ekstresi ve alt ekstreler 10 µg/ml konsantrasyonda, tespit edilen bileşikler ise (rozmarinik asit ve klorojenik asit) 8 µg/ml konsantrasyonda hazırlanarak LC-MS/MS’de üçer kez enjekte edildi. Üç analizin ortalaması alındı. Standart bileşikler, ekstrelerde ve alt ekstrelerde tutunma zamanları ve MS/MS fragmanları karşılaştırılarak tanımlandı ve bu bileşiklerin bitkideki miktarları her iki maddeye ait kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplandı.

4. Hücre kültürü çalışmaları: İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı olarak östrojen reseptör pozitif MCF-7 ile insan karaciğer karsinoma hücre hattı olarak HepG2 kullanıldı. Hücreler sırasıyla DMEM besiyerine; glutamin, %10 (a/h) fetal bovin serum ile %1 penisilin-streptomisin (h/h) (100 IU/ml penisilin; 100 µg/ml streptomisin) antibiyotik karışımı eklenerek uygun koşullarda çoğaltıldı. Hücreler, %5 CO₂ ve 37 °C inkübatörde kültüre edilerek, çoğalan hücreler yeni 75 cm²’lik flasklara pasajlanıp deneylerde kullanılmak üzere hücre stokları hazırlandı.

5. Tripan Mavisiyle Canlı ve Ölü Hücre Sayılarının Belirlenmesi: Tripan mavisi ile canlı-ölü hücre analizi, ölü hücrelerin içerisine giren daha yoğun boya nedeniyle canlı hücrelere oranla daha koyu boyanması dikkate alınarak yapılan sayımla hesaplanmaktadır. Flasktaki besiyeri alınarak ve 3 mL tripsin/EDTA ilave edildi. Flask 2-3 dakika 37°C’lik inkübatörde bekletildi. Besiyeri içerisindeki hücrelerin tamamı flasktan alınıp steril bir santrifüj tüpüne konuldu. Bu sürenin sonunda kültür şişesinde bulunan tripsinli hücre süspansiyonu flasktan alınıp santrifüj tüpüne eklendi. İçerisinde hücre süspansiyonu bulunan santrifüj tüpü, 1.500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilecektir. Süpernatant atılıp dibe çökmüş hücrelerden oluşan çökeltinin üzerine 1 ml besiyeri eklenip pipetle birkaç kez pipetaj işlemi yapıldı. Bu şekilde hücreler flask tabanından tripsinleme yoluyla kaldırılıp (tek hücre süspansiyonu haline getirilip) sayılacak duruma getirildi. Hücreler tripan mavisi solüsyonu ile boyanarak hücre sayıcı cihaz (Cedex) ile sayılıp deneylere uygun sayılarda hücre kullanılarak çalışmalar gerçekleştirildi. Bunun için 0,2 ml’lik bir ependorf tüpüne 20 µl hücre, 20 µl besiyeri ve 40 µl tripan mavisi solüsyonu konulup karıştırıldı ve 10 µl cihaza yüklendi. Gerekli dilüsyon oranı girildikten sonra cihaz 1 ml’deki canlı hücre sayısını verdi.

6. Sülforodamin B (SRB) deneyi: SRB deneyi, anti-kanser ilaç taraması için yaygın ve yaygın olarak kullanılan bir *in vitro* yöntemdir. SRB, hafif asidik koşullar altında iki sülfonik grubu aracılığıyla proteinlerdeki bazik amino asit kalıntılarına bağlanan ve bazik koşullar altında ayrışan bir aminoksanten boyadır.

SRB, hücre canlılığının ölçülmesi için kullanılan ve trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilmiş aminoasitlere zayıf asidik ortam koşullarında bağlanıp daha sonra zayıf bazik şartlarda ayrışması ile oluşan pembe rengin absorbansının ölçülmesi ile kolorimetrik hücre tayini esasına dayanan bir yöntemdir. IC₅₀ istenilen saatte hesaplanabilir.

Bu projede, hücreler 96 kuyulu plakalara dağıtıldıktan 24 saat sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 4 farklı ekstre ile muamele edildi. EKB, EKE, EKM ve EKW ekstrilerinin on farklı konsantrasyonda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) HepG2 karaciğer kanser ve MCF-7 meme kanser hücre hatlarına muamele edilerek 24 ve 48 saatlik etkileri sitotoksik aktivite açısından değerlendirildi. EK ekstrilerinin sitotoksik etkileri, hücre çoğalmasında yüzde canlılık olarak hesaplandı ve 24. ile 48. Saat IC₅₀ hesaplamaları yapıldı.

7. İstatistiksel analiz: SRB deneyleri için: Tüm ölçümler farklı zamanlarda 3 farklı ve 4 tekrarlı deney sonuçları alınarak ve sonuçlar ortalama ± standart sapma cinsinden ifade edildi. Farklılıklar $p < 0,05$ 'te istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. IC₅₀ değerleri, GraphPad Prism 7 (Graph pad yazılımı, ABD) istatistiksel yazılımı kullanılarak hesaplandı.

BULGULAR

Sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesi:

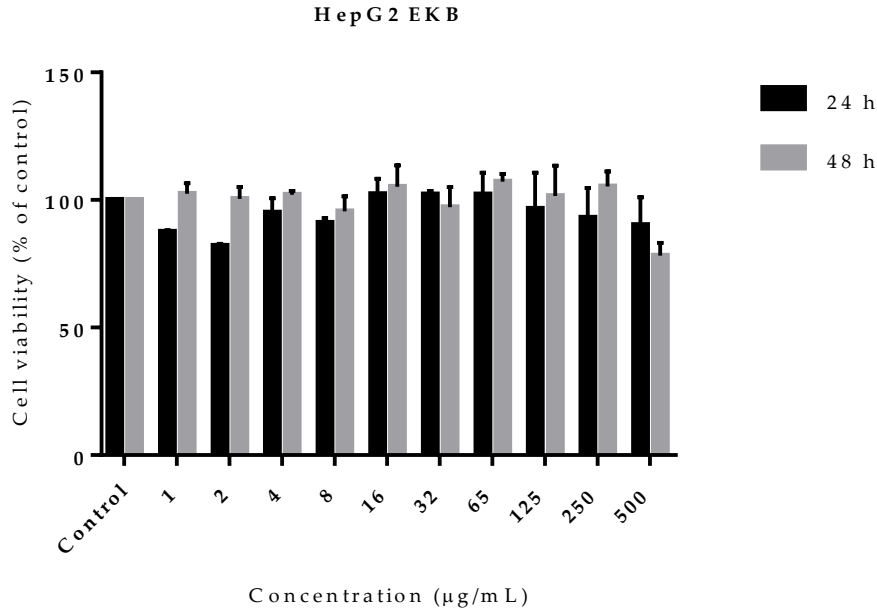
EKB, EKE, EKM ve EKW ekstreslerinin hücre canlılığına etkisi, östrojen negatif HepG2 karaciğer kanser ve östrojen pozitif MCF-7 meme kanser hücre hatlarında *in vitro* sülforhodamin B (SRB) deneyi ile tarandı.

EKB ekstresinin 24 saatlik sonuçlarına bakıldığında, karaciğer kanser hücresine karşı sitotoksik aktivite göstermezken meme kanser hücresinde proliferasyonu artırdığı görüldü (Şekil 1 ve 2). Genel olarak, EKE ekstresi, farklı IC₅₀ değerleri ile HepG2 ve MCF7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiği görüldü (Şekil 3 ve 4). EKB ekstresinin 48 saatlik hücre canlılığında yaptığı değişikliklere bakıldığında HepG2 hücresinde anlamlı bir değişikliğe neden olmazken MCF-7 hücresinin canlılığını azalttığı görüldü (Şekil 1 ve 2).

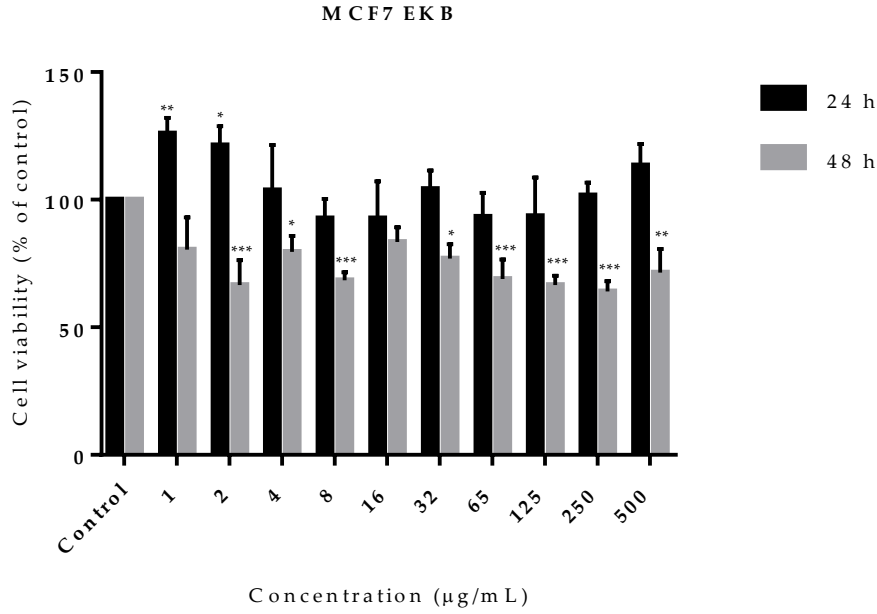
EKE ekstresi 250 µg/ml konsantrasyonda, HepG2 hücre hattında canlılığı 24 ile 48 saat için sırasıyla %54,17 ve %11,50'e kadar azalttı (Tablo 1). EKE ekstresinin MCF7 hücre hattında 65 µg/ml konsantrasyonda 24 saatte canlılığı %49,18'e 8 µg/ml konsantrasyonda 48 saatte canlılığı %51,53'e kadar düşürdüğü görüldü (Tablo 1). HepG2 hücrelerinde 24 ve 48 saat için IC₅₀ değerleri sırasıyla 67,00 ile 66,62 µg/ml; MCF7 hücrelerinde 35,99 ile 91,99 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 2). MCF-7'nin HepG2'ye karşı daha düşük bir 24. saat IC₅₀ değeri olduğu Tablo 2'de gösterilmektedir.

EKM ekstresi HepG2 hücresinde 24. saat sonuçlarına göre 500 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip değildir (Şekil 5). EKM ekstresi MCF7 hücresi üzerine 24. saat sonuçlarına göre, 8, 16 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda canlılığı %70'in altına düşürerek bu konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü. Bununla birlikte 48. saat sonuçlarına bakıldığında 8, 16, 65, 125 ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda proliferatif etki gözlemlendi (Şekil 6).

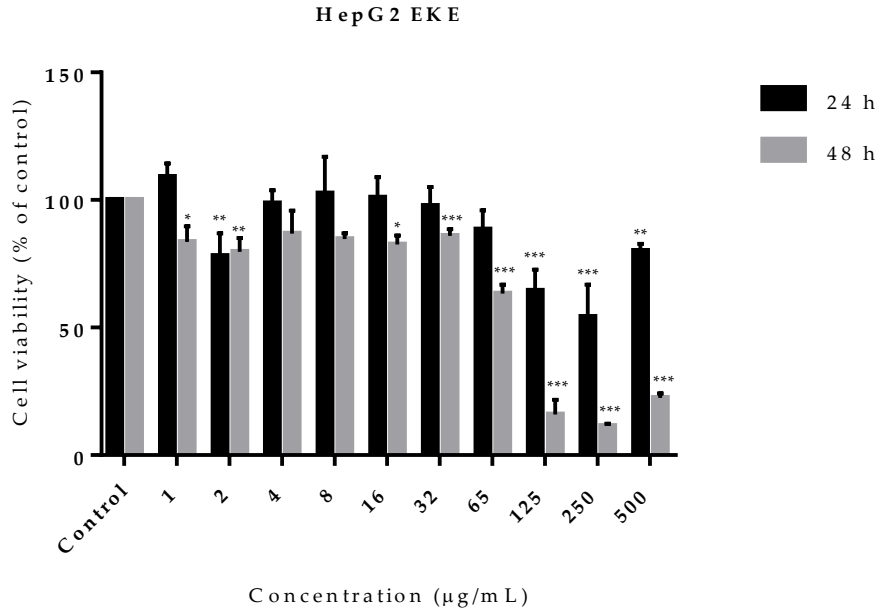
EKW ekstresi HepG2 hücreleri üzerinde 24. ve 48. saat etkilerine bakıldığında 500 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Şekil 7). Ancak EKW ekstresinin MCF7 hücreleri üzerinde 48. saat etkilerine bakıldığında 2, 8 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda anlamlı bir şekilde proliferasyonu artırdığı görüldü (Şekil 8).



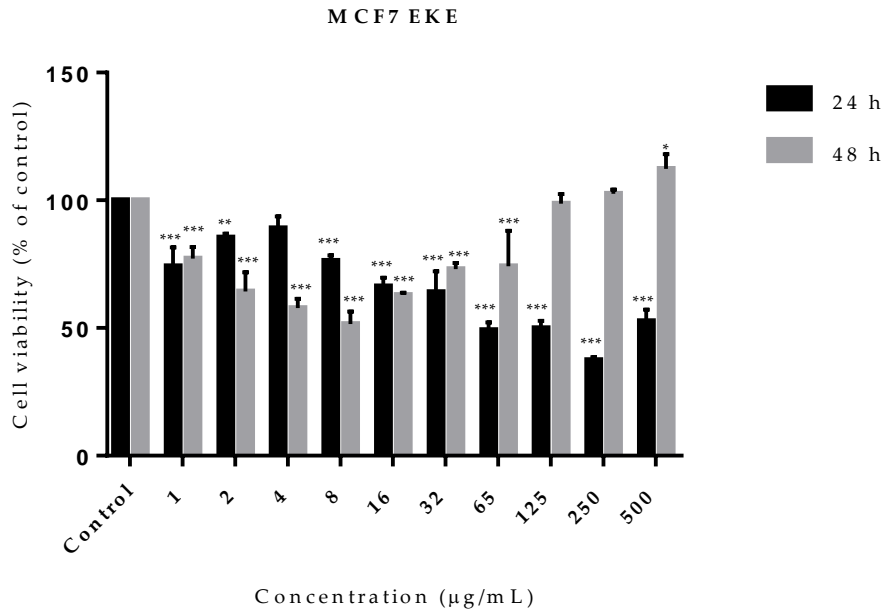
Şekil 1. EKB ekstresinin HepG2 hücrelerinde canlılığa etkileri. EKB ekstresi ile hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



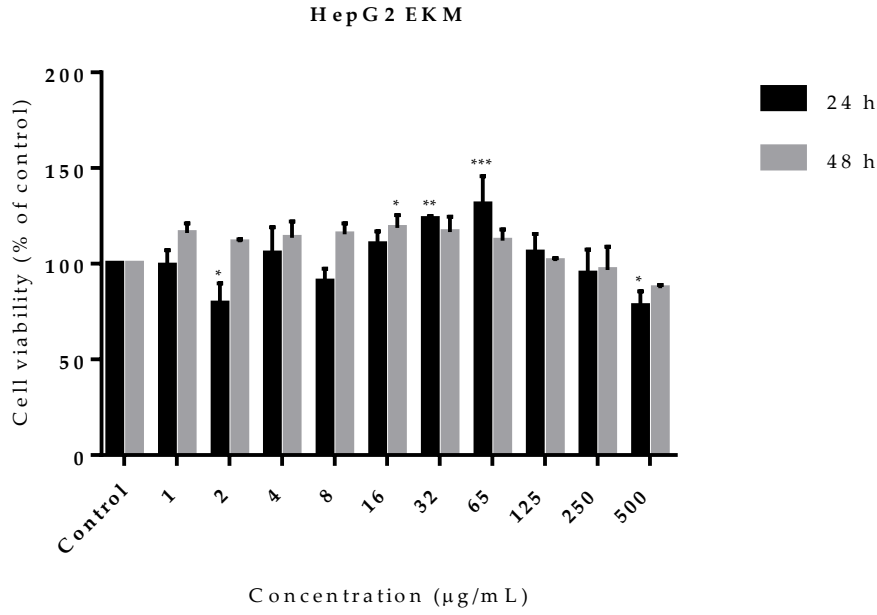
Şekil 2. EKB ekstresinin MCF7 hücrelerinde canlılığa etkileri. EKB ekstresi ile hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



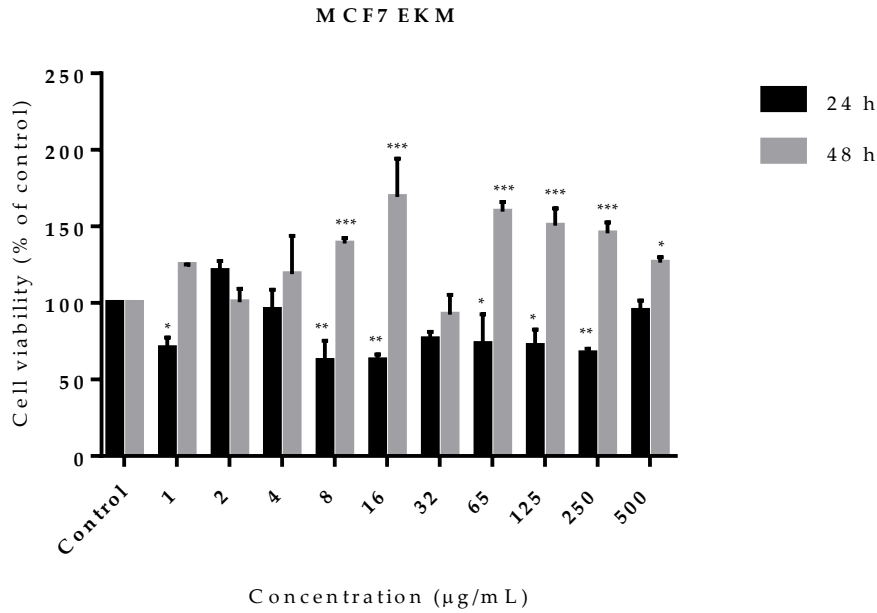
Şekil 3. EKE ekstresinin HepG2 hücrelerinde canlılığa etkileri. EKE ekstresi ile hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



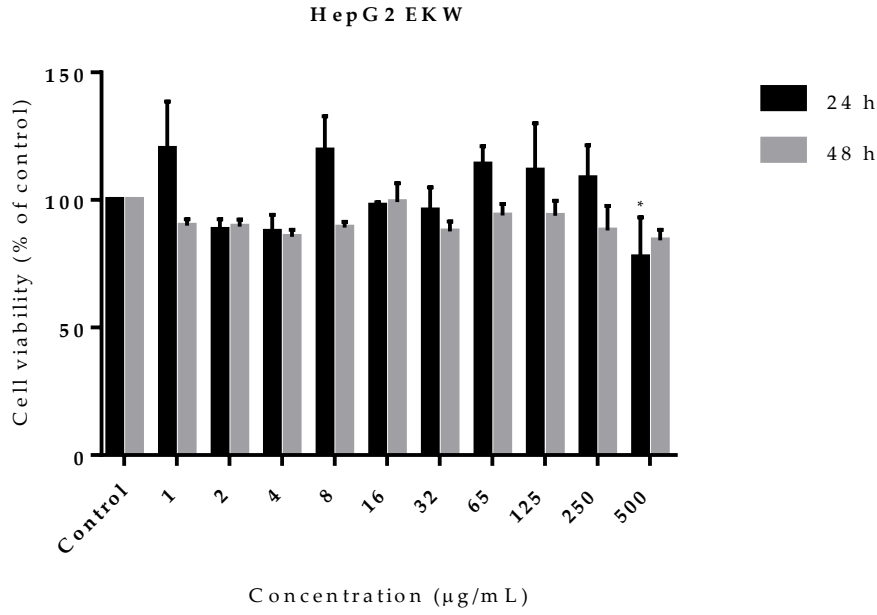
Şekil 4. EKE ekstresinin MCF7 hücrelerinde canlılığa etkileri. EKE ekstresi ile hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



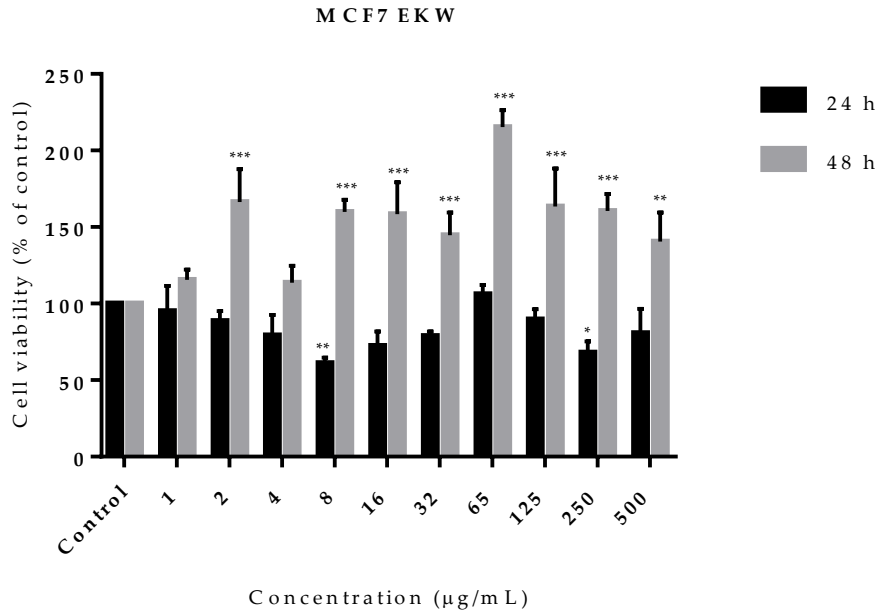
Şekil 5. EKM ekstresinin HepG2 hüresinde canlılığa etkileri. EKM ekstresi ile hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Şekil 6. EKM ekstresinin MCF7 hüresinde canlılığa etkileri. EKM ekstresi ile hücelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Şekil 7. EKW ekstresinin HepG2 hücrelerinde canlılığa etkileri. EKW ekstresi ile hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$



Şekil 8. EKW ekstresinin MCF7 hücrelerinde canlılığa etkileri. EKW ekstresi ile hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda (1, 2, 4, 8, 16, 32, 65, 125, 250 ve 500 µl) 24 ve 48 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB deneyi ile değerlendirildi. Hücre canlılığı \pm S.D.'nin ortalama hatası olarak verildi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Tablo 1. EK ekstralarının meme kanseri (MCF7) ve karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerindeki inhibisyon değerleri (%)

Cell line	Extract code	Time (h)	Concentrations/well (µg/mL)										
			1	2	4	8	16	32	65	125	250	500	
Cell viability (%) via SRB method													
HepG2	EKB	24	87,50±0,54	82,07±0,77	95,11±5,52	91,03±1,92	102,40±5,97	102,20±1,44	102,20±8,54	96,56±14,18	93,12±11,62	90,22±10,85	
		48	102,40±4,09	100,40±4,66	102,10±1,47	95,62±5,83	105,20±8,44	97,20±7,89	107,20±3,02	101,50±11,89	105,40±5,79	78,13±5,02	
	EKE	24	109,10±5,28	78,08±8,86	98,73±5,05	102,50±14,34	100,90±8,01	97,64±7,38	88,41±7,54	64,49±8,14	54,17±12,63	80,07±2,68	
		48	83,54±6,17	79,73±5,27	86,78±9,05	84,69±2,28	82,57±3,50	85,91±2,61	63,34±3,45	15,92±5,79	11,50±0,80	22,41±1,74	
	EKM	24	99,16±7,89	79,25±10,55	105,40±13,71	90,70±6,64	110,20±6,60	123,40±1,49	131,10±14,66	105,90±9,61	94,84±12,57	77,93±7,65	
		48	116,10±4,91	111,30±1,43	113,50±8,53	115,40±5,72	118,70±6,71	116,60±7,97	112,00±5,84	101,40±1,52	96,73±12,20	87,23±1,70	
	EKW	24	120,00±18,58	88,26±4,15	87,51±6,72	119,40±13,32	97,84±1,17	95,96±8,99	114,00±7,09	111,50±18,54	108,50±12,90	77,56±15,66	
		48	89,89±2,52	89,52±2,82	85,61±2,75	89,18±2,31	99,14±7,47	87,73±3,86	93,98±4,40	93,76±5,91	88,04±9,62	84,18±4,16	
	MCF7	EKB	24	126,00±6,14	121,40±7,43	103,70±17,76	92,66±7,61	92,72±14,49	104,20±7,30	93,26±9,41	93,50±15,17	101,70±5,04	113,40±8,47
			48	80,44±12,58	66,53±9,83	79,62±6,25	68,44±3,10	83,44±5,73	76,89±5,67	68,98±7,56	66,53±3,69	64,08±4,04	71,44±9,30
		EKE	24	74,21±7,37	85,47±1,50	89,01±4,69	76,37±2,12	66,31±3,33	64,09±8,06	49,18±2,99	49,90±2,92	37,38±1,18	52,65±4,58
			48	77,16±4,51	64,35±7,42	57,81±3,69	51,53±4,91	62,99±0,82	73,07±2,36	74,16±13,94	98,70±3,78	102,50±1,70	112,30±5,75
EKM		24	70,54±6,82	120,90±6,49	95,45±13,28	62,12±13,16	62,63±3,81	76,26±4,87	73,23±19,27	72,05±10,65	67,17±3,03	94,95±6,60	
		48	125,00±0,20	100,40±8,75	118,80±25,13	138,80±3,56	169,30±25,03	92,43±12,88	159,70±6,29	150,60±11,08	145,40±7,24	126,40±3,43	
EKW		24	95,12±16,36	88,72±6,40	79,29±13,25	61,11±3,54	72,39±9,39	78,79±3,07	106,20±5,98	89,73±6,73	68,01±7,36	80,81±15,75	
		48	115,50±6,62	166,40±21,42	113,70±11,10	159,80±8,04	158,40±20,88	144,80±14,78	215,30±11,03	163,50±24,67	160,50±11,08	140,40±19,00	

Tablo 2. EK ekstralarının HepG2 ve MCF7 hücrelerindeki IC₅₀ değerleri

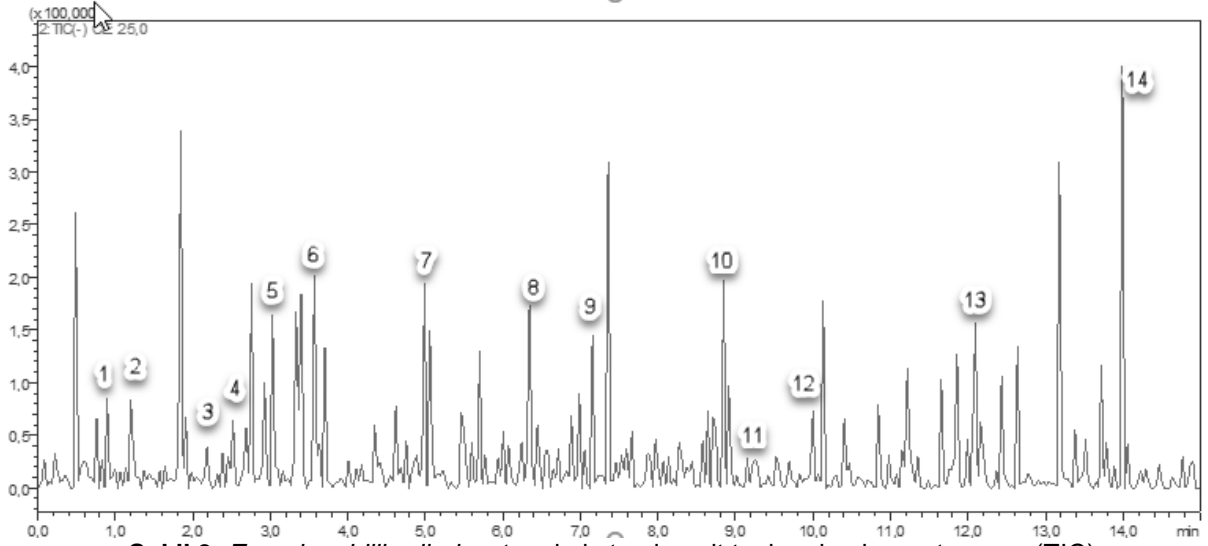
Cell line	Extract code	24 h IC ₅₀ (µg/mL)	48 h IC ₅₀ (µg/mL)
HepG2	EKB	ND	ND
	EKE	67,00	66,62
	EKM	ND	ND
	EKW	ND	ND
MCF7	EKB	ND	ND
	EKE	35,99	91,99
	EKM	ND	ND
	EKW	ND	ND

İstatistiksel analiz: Sonuçlar ortalama ± standart sapma cinsinden ifade edildi. IC₅₀ değerleri, GraphPad Prism 7 (Graph pad yazılımı, ABD) istatistiksel yazılımı kullanılarak hesaplandı.

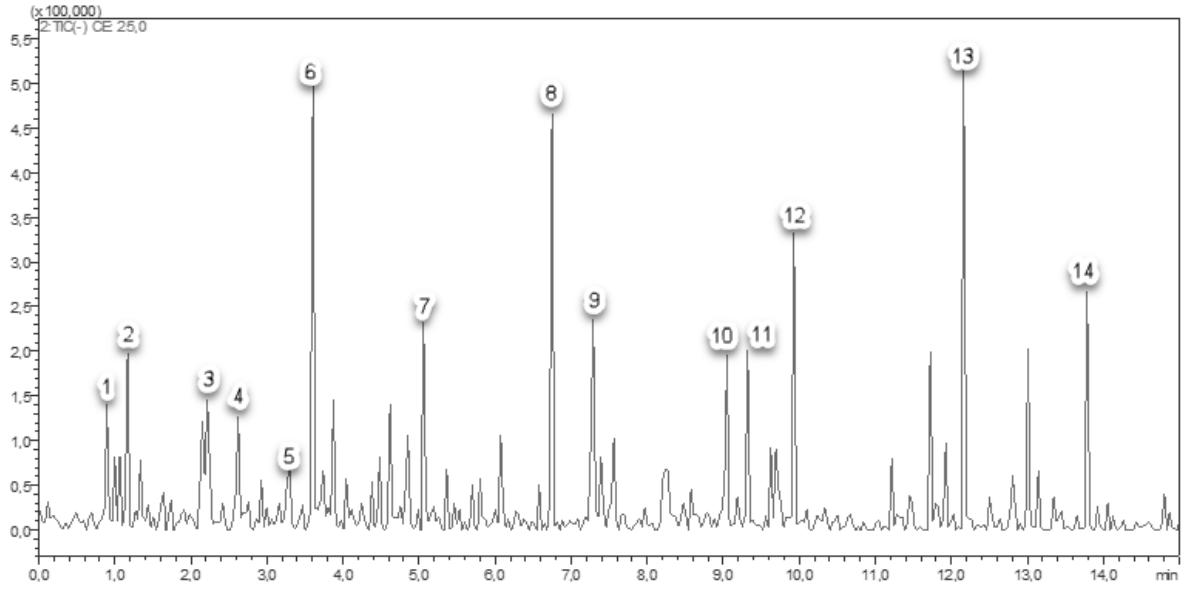
Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi/Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Çalışmada kullanılan *E. billiardieri* türünün kimyasal içeriğini belirlemek amacıyla metanol ekstresi kullanılarak Elektron Sprey İyonlaşma yöntemi (ESI) ile LC-MS/MS analizi gerçekleştirildi. Ekstreye ait toplam iyon kromatogramı Şekil 9-12’de, kütle spektrumu ise Şekil 13-16’da verilmiştir.

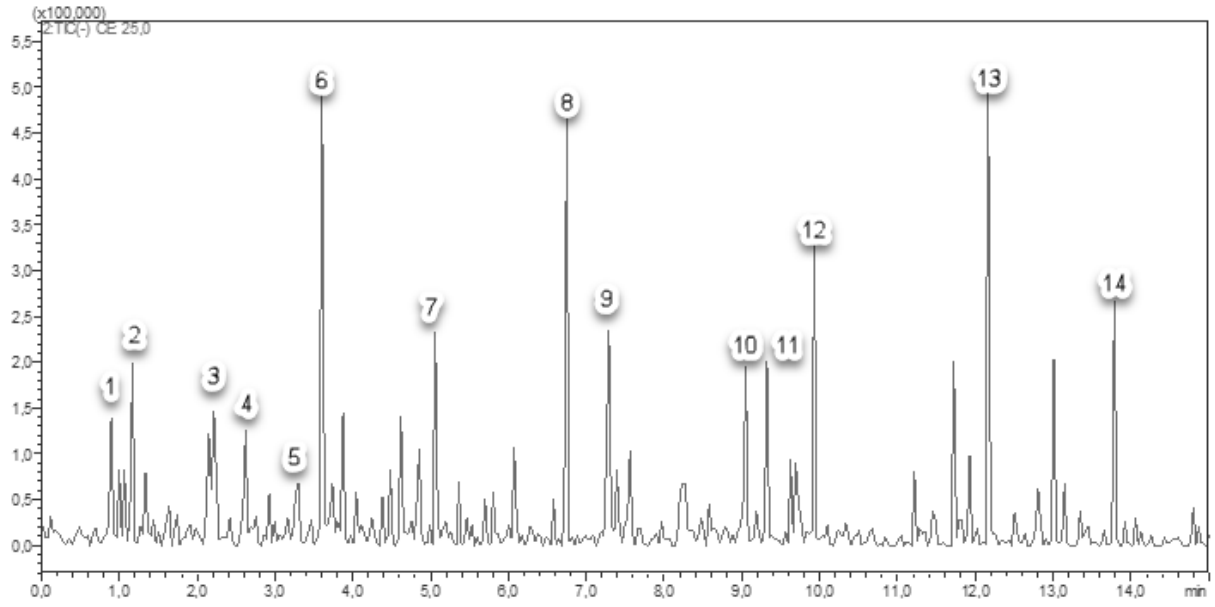
Spektrumlarda bulunan piklere ait ana fragman iyonları ise Tablo 3’de verilmiştir. LC-MS/MS analizleri sonucunda *E. billiardieri* metanol ekstresinin daha çok kafeik ve kinik asit türevleri içerdiği tespit edildi.



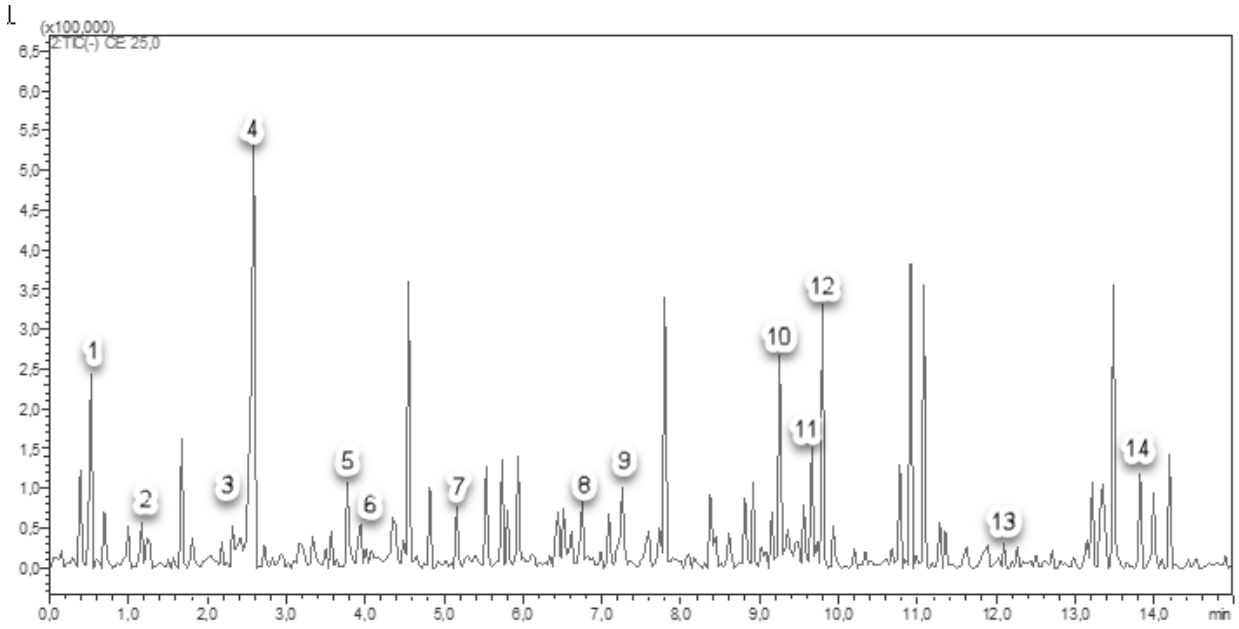
Şekil 9. *Eryngium billiardieri* metanol ekstresine ait toplam ion kromatogramı (TIC)



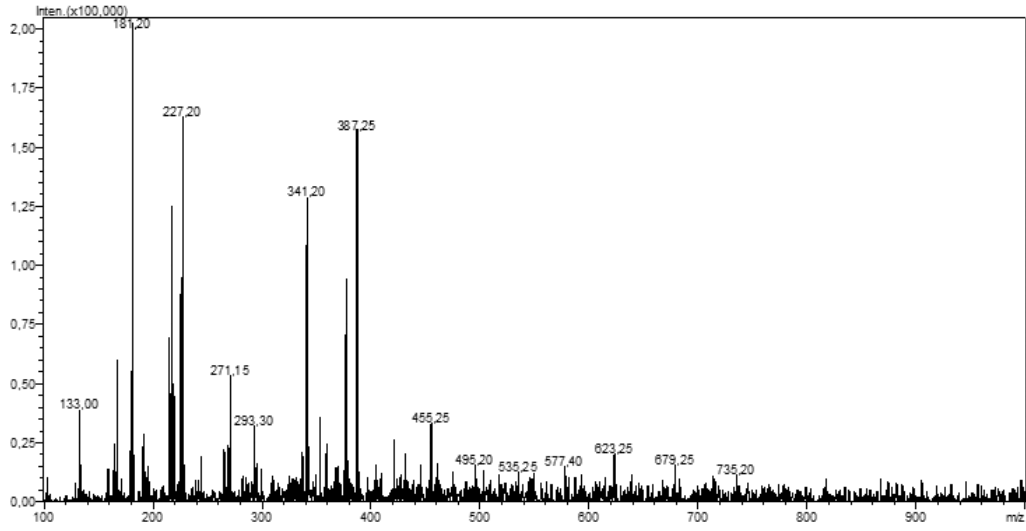
Şekil 10. *Eryngium billiardieri* etil asetat ekstresine ait toplam ion kromatogramı (TIC)



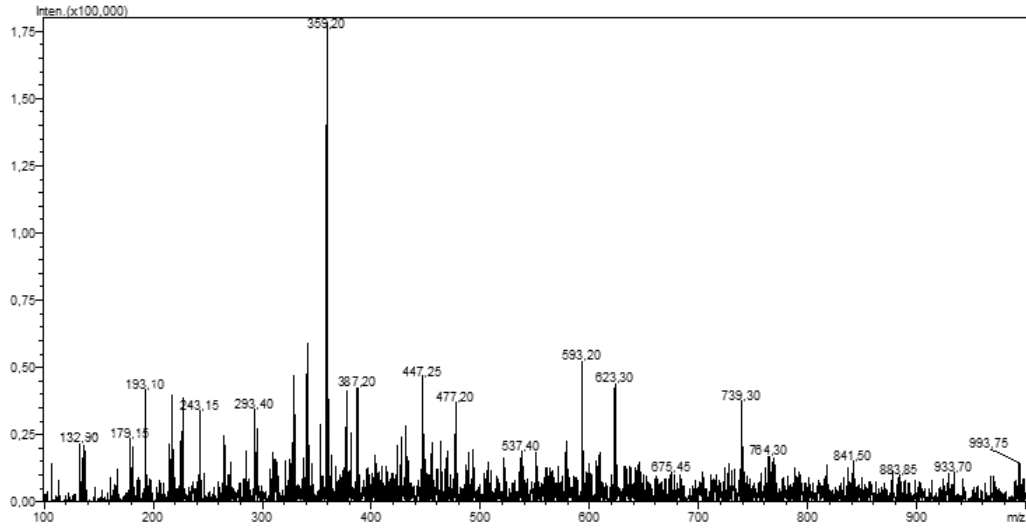
Şekil 11. *Eryngium billiardieri* n-butanol ekstresine ait toplam ion kromatogramı (TIC)



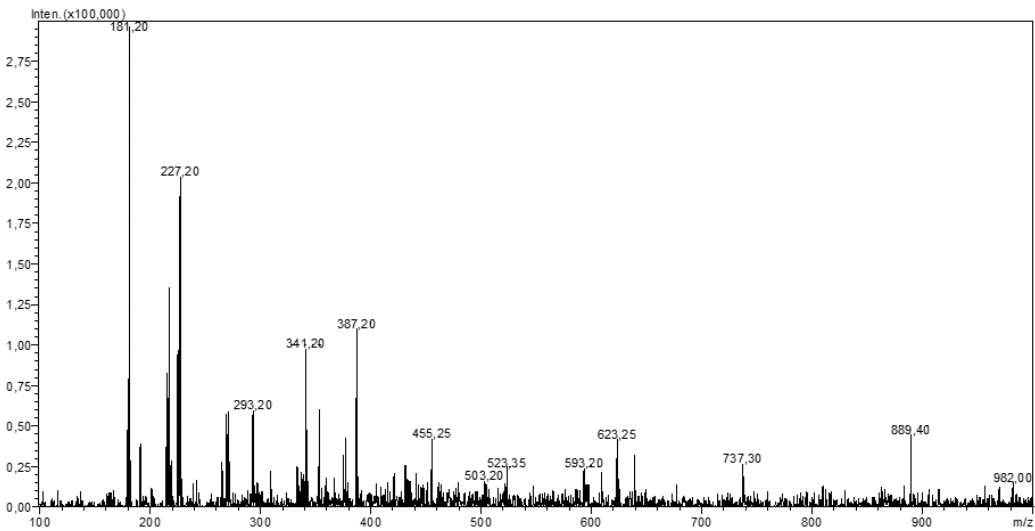
Şekil 12. *Eryngium billiardieri* su ekstresine ait toplam ion kromatogramı (TIC)



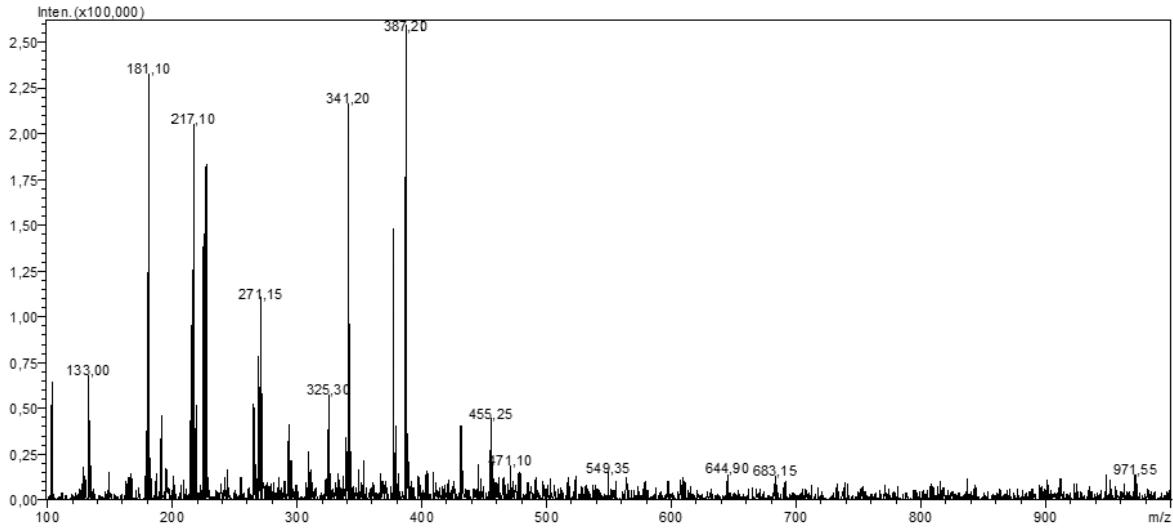
Şekil 13. *Eryngium billiardieri* metanol ekstresinin LC/MS/MS ile fingerprint analizi



Şekil 14. *Eryngium billiardieri* etil asetat ekstresinin LC/MS/MS ile fingerprint analizi



Şekil 15. *Eryngium billiardieri* n-butanol ekstresinin LC/MS/MS ile fingerprint analizi



Şekil 16. *Eryngium billiardieri* su ekstresinin LC/MS/MS ile fingerprint analizi

Yapılan LC/MS/MS analizleri sonucunda bitkiden hazırlanan metanol ekstresi ve alt ekstrelerin kimyasal kompozisyonları belirlenmiştir. Sonuç olarak ekstrelerin kimyasal kompozisyonunun aynı olduğu ancak madde miktarlarında farklılıklar olduğu görülmüştür. Ekstrelerde tanımlanan bileşiklerin LC/MS/MS analiz sonuçları Tablo 3.'de verilmiştir.

Tablo 3. *Eryngium billiardieri* ekstrelerinde LC-MS/MS ile tanımlanan bileşikler

Bileşik No	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragment iyonlar m/z (MS/MS)	Bileşiğin adı	Kaynak
1	133	115	Malik asit	González ve diğerleri, 2011
2	341	179,135	Kafeik asit-3-glukozit	Gardana, C. ve diğerleri, 2007
3	377	341, 215, 179, 161,119	Kafeik asit türevi-I	Riethmüller, E. ve diğerleri, 2013
4	447	273, 285, 257, 151	Kemferol-3-O-glukozit	Song, C. ve diğerleri, 2012
5	593	285, 255	Kemferol kumaroil hekzozit	Simirgiotis, M. J. ve diğerleri, 2010
6	359	133,161,179	Rozmarinik asid	Tang ve diğerleri, 2016
7	353	191	Klorojenik asid	Lin ve diğerleri, 2000
8	387	223,191,179	5-sinapoilkinik asit	Lin ve diğerleri, 2010
9	455	289,183	Epikateşin-3-O-(4-O-metil) gallat	Hasim Kelebek
10	609	301	Rutin	Karaçelik ve diğerleri, 2015
11	735	191,193,367	Ferulik asit dimeri	Bravo ve diğerleri, 2007
12	577	269	Apigenin-7-O-rutinozid	Lin ve diğerleri, 2010
13	623	315	İzorametin 3-O-rutinozid	Lin ve diğerleri 2000
14	191	191, 93, 85	Kinik asit	Clifford ve diğerleri, 2015

Tespit edilen rozmarinik asit ve klorojenik asit bileşiğinin *E. billiardieri* bitkisine ait ekstre ve alt ekstrelerde gerçek madde miktarlarını kantitatif olarak belirlemek amacıyla standart maddeler için negatif iyonlaşma modunda MRM (multiple reaction monitoring) çiftleri oluşturuldu (Şekil 17). m/z 353[M-H] moleküler iyon pikine sahip 5,1. dakikada

kolonu terk eden maddenin moleküler iyon pikinin yanında bağıl yoğunluğu en çok olarak görülen m/z 191 temel pikli spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu moleküler iyon pikinin klorojenik asit (3-kafeoilkinik asit) olarak tanımlanmıştır (Clifford ve ark., 2003). Bunun dışında 4,3. dakikada kolonu terk eden maddenin ise bağıl yoğunluğu en çok olarak görülen m/z 161 temel pikli spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu bileşiğin m/z 359[M-H] moleküler iyon pikine sahip rozmarinik asit olduğu belirlendi (Tang ve ark., 2016).

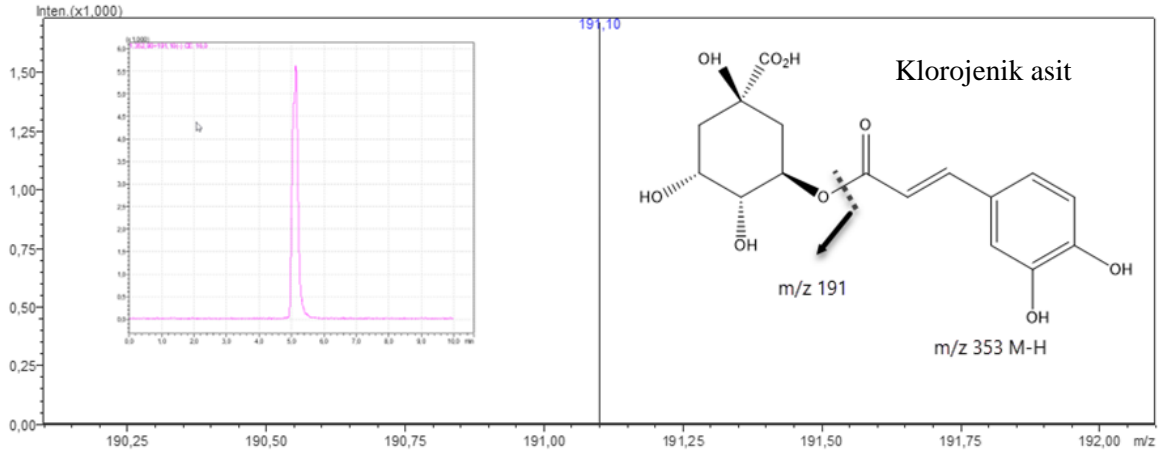
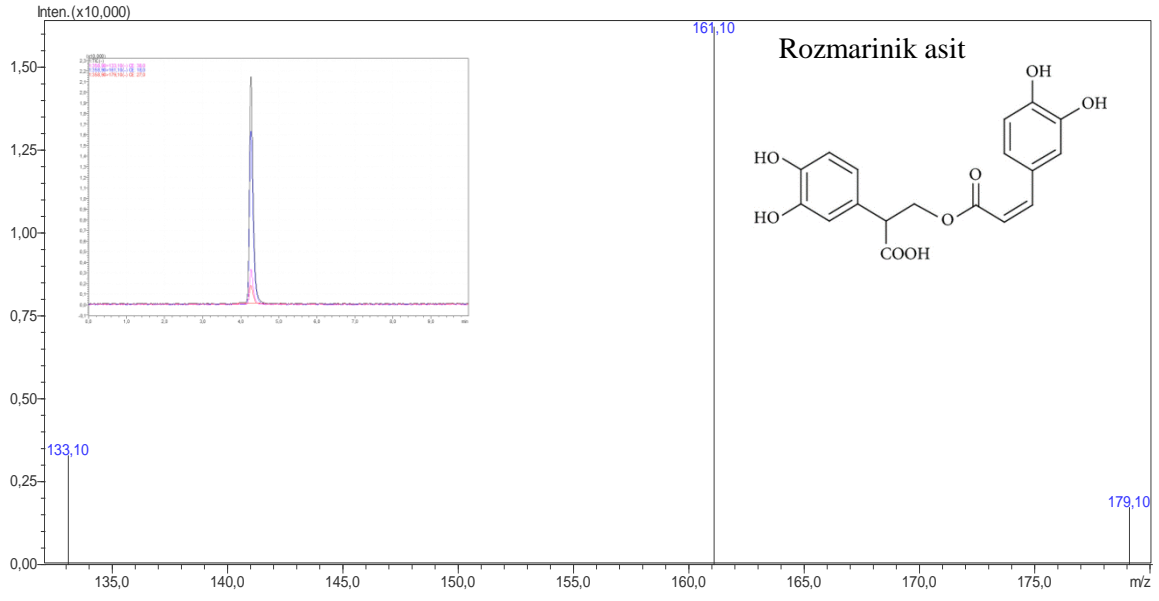
Ekstrelerin içerisindeki tanımlanan bu bileşiklerin miktarları standart maddelerden hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4). Bileşiklerin ekstrelerdeki miktarları Tablo 5’de verilmiştir. Maddelerin tanımlanmasında maddelerin tutunma zamanları ve MS/MS spektrumları kullanılmıştır.

Tablo 4. LC-MS/MS’ de kullanılan standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Madde	Kalibrasyon Denklemi ($y=ax + b$)	Korelasyon Katsayısı (r^2)
Rozmarinik asit	$y = 2842x + 54,151$	$R^2 = 0,9989$
Klorojenik asit	$y = 33716x - 2152,2$	$R^2 = 0.999$

Table 5. Rozmarinik asit ve klorojenik asitin ekstre ve alt ekstrelere ait LC-MS/MS sonuçları ($\mu\text{g/g}$ ekstre \pm SD)

Bileşikler	RT (dk)	Miktar ($\mu\text{g/mg}$ ekstre)				
		EK	EKE	EKB	EKW	EK
Rozmarinik asit	4,3	64.690\pm0.123	485.603\pm0.809*	14.092\pm0.630	n.d.	64.690\pm0.123
Klorojenik asit	5,1	36.850\pm0.340	62.355 \pm 0.270*	30.717 \pm 0.188	17.735 \pm 0.240	36.850\pm0.340



Şekil 17. Rozmarinik asit ve klorojenik asite ait MRM kromatogramı ve kütle spektrumu

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma Türkiye’de yetişen ve üzerinde şimdiye kadar sitotoksik inceleme ve içerik analizi bulunmayan *E. billiardieri* bitkisi ile yapılmış ilk çalışmadır. Proje kapsamındaki sonuçlar ile Ülkemiz açısından oldukça değerli olan bu bitkinin literatürde ulusal kimliğimiz ile ilk kez yer almasını hedeflemekteyiz.

Sonuçlarımız, EKB ekstresinin sitotoksik aktivitesini östrojen negatif HepG2’de göstermemesi ve östrojen pozitif MCF-7 hücrelerinde göstermesi, tarafımızca daha önce yapılan bir çalışmada verildiği üzere bu ekstrenin saponinlerce zengin olmasına bağlanabilir. EKE ekstresinin 2 farklı hücre hattında da sitotoksik etkisi ise içerdiği rozmarinik asit, klorojenik asit ve diğer sitotoksik etkisi literatürde belirtilen bileşiklerle sinerjistik etkisi ile izah edilebilir. EKW ekstresinin HepG2 hücre canlılığında bir değişikliğe sebep olmazken MCF7 hücrelerinde 48 saatlik etkisinin proliferasyon ile sonuçlanması ekstre içeriğinde bulunan glikozidik yapıdaki bileşiklerin MCF7 hücrelerinin çoğalmasını stimüle etmesine bağlanabilir. Ancak bu proliferasyonun östrojen reseptörü ile ilişkili olup olmadığının ileri çalışmalarıyla aydınlatılması gereklidir.

Proje kapsamında bitkinin etil asetat ekstresi ile yapılan içerik analizi sonucunda bu ekstrenin daha çok kafeik asit ve kinik asit türevleri yanında rozmarinik asit ve klorojenik asit gibi fenolik asitler içerdiği bulunmuştur. Belirlenen bileşiklerden rozmarinik asit ve klorojenik asitin ekstrelerdeki gerçek zamanlı miktar tayini sonucunda bu maddelerin daha çok etil asetat ekstresinde bulunduğu belirlendi. Bunun da gelecekte bitki ile tarafımızdan yapılması planlanan biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmalarında yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma EKE’nin HepG2 ve MCF7 hücrelerine etkiliyken EKB, EKB ve EKW’nin bu hücre hatlarına karşı etkili sitotoksik aktiviteye sahip olmadığını gösteren kanıtlar sağlamıştır.

Böylece *E. billiardieri* bitki ekstrelerinin östrojen reseptör pozitif ve negatif hücre hatlarındaki muhtemel sitotoksikite farklılığı gösterilmiş olup bu farklılığın ekstre içeriği ile ilişkisi ortaya kısmen konulmuştur. Bu çalışmanın özellikle ilerleyen çalışmalarla etkiden sorumlu bileşiklerin belirlenmesinin mümkün kılınabileceği düşünülmektedir.

Proje sonrasında yapılması planlanan devam niteliğindeki *in vitro* çalışmalarla, literatürde henüz tam olarak aydınlatılmamış mekanizmalar açıklığa kavuşturulması planlanmaktadır.

EKLER

Bitkinin sitotoksik etkilerinin insan meme MCF7 ve endometriyum RL95-2 kanser hücre hatlarında araştırılacağı proje önerisinde belirtilmiştir. Ancak hücre kültüründe RL95-2 hücresinin çoğalması aşamasında güçlük yaşanmıştır. Bundan dolayı Anabilim Dalımızda mevcut olan ve çalışmayla bütünlük arz eden insan karaciğer kanser hücresi HepG2 ile çalışmaya devam edilmiştir. BU sebeple proje başlığının da TÜRKİYEDE YETİŞEN *Eryngium billardieri* Delar. BİTKİSİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ ile SİTOTOKSİSİTESİNİN MCF7 ve HepG2 HÜCRE HATLARINDA ARAŞTIRILMASI olarak değiştirilmesine karar verilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Wörz A. On the distribution and relationships of the South-West Asian species of *Eryngium* L. (Apiaceae-Saniculoideae). Turk J Bot 2004; 28: 85-92.
2. Aslan Erdem S. Türkiye’de Yetişen Bazı *Eryngium* Türlerinde Farmakognozik Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2009: 7-128.
3. Baytop T. Türkiyede bitkiler ile tedavi (Geçmişte ve Bugün). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 1999; ss 169.
4. Akan H, Korkut MM, Balos, MM. Arat Dağı ve çevresinde etnobotanik bir araştırma. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi 2008; 20(1): 67-81.
5. Yurdakök B. Türkiye’de Yetişen *Eryngium kotschy* (Boğadikeni) ve *Eryngium maritimum* (Deniz Boğadikeni) Bitkilerinin Sitotoksik Etkilerinin hep2, hepg2, vero ve u138 mg Hücre Kültürlerinde Araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2010: 9.
6. Küpeli E, Kartal, M, Aslan, S, Yeşilada E. Comparative evaluation of the antiinflammatory and antinociceptive activity of Turkish *Eryngium* species. J Ethnopharmacol 2006; 107(1): 32-37.
7. Gürhan G, Ezer N. Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2004; 24(1): 37-55.
8. Yeşilada E, Tanaka S, Tabata M, Sezik E. The antiinflammatory activity of the fractions from *Eryngium billardieri* in mice. Phytother Res 1989; 3 (1): 38-40.
9. Paşayeva L., Köngül E, Karatoprak Ş.G., Tugay O. *Eryngium Billiarderi* Delar. Ekstrelerinin Toplam Fenolik ve Flavonoit Madde Kompozisyonlarının ve Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Dergisi; 26 (1):1-93.
10. Fouché, G., Cragg, G. M., Pillay, P., Kolesnikova, N., Maharaj, V. J., & Senabe, J. (2008). In vitro anticancer screening of South African plants. Journal of ethnopharmacology, 119(3), 455-461.
11. Carvalho, C. C. D., Machado, K. N., Ferreira, P. M. P., Pessoa, C., Fonseca, T. H. S., Gomes, M. A. and Nascimento, A. M. D. (2013). Biological screening of extracts of Brazilian Asteraceae plants. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 7(28), 2000-2005.
12. Pimenov, M. G., & Leonov, M. V. E. (1993). The genera of the Umbelliferae: A nomenclator. Royal Botanic Gardens, Kew.
13. Downie, S., Ramanath, S., Katz-Downie, D., & Llanas, E. (1998). Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid RPO C1 intron sequences. American Journal of Botany, 85(4), 563-563.
14. Erdelmeier, C. A., & Sticher, O. (1986). A cyclohexenone and a cyclohexadienone glycoside from *Eryngium campestre*. Phytochemistry, 25(3), 741-743.
15. Davis P. H (1978). Flora of Turkey and the East Aegean Islands 1-6 (1965-1978): 2. Complement to PH Davis. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 1(4), 305.
16. Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T., & Başer, K. H. C. (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Supplement 2). Edinburgh Üniv. Pres, 11.
17. Lee, B. Y., & Downie, S. R. (1999). A molecular phylogeny of Apiaceae tribe Caucalideae and related taxa: inferences based on ITS sequence data. Systematic Botany, 461-479.
18. Coulter, J. M., & Rose, J. N. (1887). Notes on Umbelliferae of E. United States. III. Botanical Gazette, 12(4), 73-76.

19. Zarei A, Ashtiyani SC, Hamidizadeh S, Rezaei A. The Study of the Effects Hydro-Alcoholic Extract of *Eryngium billardieri* on Lipid Profiles Levels and Liver and Renal Functions Tests in Hypercholesterolemic Rats. GJP 2015; 9(1): 21-27.
20. Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G., & Li, S. (2012). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae).
21. Zhang, Z. Z.; Li, S. Y.; Ownby, S.; Wang, P.; Yuan, W.; Zhang, W. L.; Beasley, R. S. Phenolic compounds and rare polyhydroxylated triterpenoid saponins from *Eryngium yuccifolium*. Phytochemistry, 2008, 69, 2070-2080.
22. Kartal, M.; Mitaine-Offer, A. C.; Abu-Asaker, M.; Miyamoto, T.; Calis, I.; Wagner, H.; Lacaille-dubois, M. A. Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*. Chem. Pharm. Bull., 2005, 53 (10), 1318-1320.
23. Kartal, M.; Mitaine-Offer, A. C.; Paululat, T.; Abu-Asaker, M.; Wagner, H.; Mirjolet, J. F.; Guilbaud, N.; Lacaille-Dubois, M. A. Triterpene saponins from *Eryngium campestre*. J. Nat. Prod., 2006, 69, 1105-1108.
24. Hiller, K.; Von, T.N.; Lehmann, G.; Grundemann, E. Betulinic acid-a sapogenin in *Eryngium bromeliifolium* Delar. 21.The contents of a saniculoidea. Pharmazie, 1974, 29 (2), 148-149.
25. Ikramov, M.T.; Kharlamov, I.A.; Khazanovich, R.L.; Khalmatov, K.K. Sapogenins of *Eryngium macrocalyx*. Him. Prir. Soedin., 1976, (3), 401.
26. Assenov, I.; Gevrenova, R. D-Mannitol from *Eryngium campestre* L. Farmatsiia (Sofia), 1991, 4 (5-6), 26-28.
27. Muckensturm, B.; Boulanger, A.; Farahi, M.; Reduron, J.P. Secondary metabolites from *Eryngium species*. Nat. Prod. Res., 2010, 24 (5), 391-397.
28. Hiller, K.; Pohl, B.; Franke, P. Flavonoid spectrum of *Eryngium maritimum* L. Part 35. Components of some Saniculoideae. Pharmazie, 1981, 36 (6), 451-452.
29. Hohmann, J.; Páll, Z.; Günther, G.; Máthé, I. Flavonolacyl glycosides of the aerial parts of *Eryngium campestre*. Planta Med., 1997, 63 (1), 96.
30. Kartnig, T.; Wolf, J. Flavonoids from the aerial parts of *Eryngium campestre*. Planta Med., 1993, 59 (3), 285.
31. Wang, P.; Ownby, S.; Zhang, Z.Z.; Yuan, W.; Li, S.Y. Cytotoxicity and inhibition of DNA topoisomerase I of polyhydroxylated triterpenoids and triterpenoid glycosides. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, 20, 2790-2796.
32. Zhang, Z.Z.; Li, S.Y.; Lian, X.Y. An overview of genus *Aesculus* L.: Ethnobotany, phytochemistry, and pharmacological activities. Pharm. Crops, 2010, 1, 24-51.