

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PORELLA CORDEANA VE PORELLA PLATYPHYLLA'NIN
(PORELLACEAE) KİMYASAL BİLEŞİKLERİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ YÖNÜNDEN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Merve KARADENİZ LAMBRECHTS

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Alev ÖNDER

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Porella cordeana* ve *Porella platyphylla*’nın (Porellaceae) kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri yönünden karşılaştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve KARADENİZ LAMBRECHTS

Tarih: 21.07.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Anabilim Dalında
Merve Karadeniz Lambrechts tarafından hazırlanan
“*Porella cordeana* ve *Porella platyphylla*’nın (Porellaceae) kimyasal bileşikleri ve
biyolojik aktiviteleri yönünden karşılaştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri
tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21.07.2017

Prof. Dr. Alev Tosun

Ankara Üniversitesi

(Danışman)

Prof. Dr. Mehmet Levent Altun

Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Hatice Özenoğlu Kiremit

Adnan Menderes Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	18
1.1. Botanik Bilgiler	21
1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri	21
1.1.2. Bryophyte ve Özellikleri	21
1.1.3. Jungermanniales Takımının Özellikleri	27
1.1.4. Porellaceae Familyasının Genel Özellikleri	27
1.1.5. <i>Porella</i> L. Cinsinin Botanik Özellikleri	28
1.1.6. Türkiye'de Yetişen <i>Porella</i> L. Türleri	30
1.2. Fitokimyasal Çalışmalar	33
1.2.1. Monoterpenler	36
1.2.2. Seskiterpenler	37
1.2.3. Diterpenler	42
1.2.4. Flavonoidler	44
1.2.5. Steroidler	44
1.2.6. Sülfür İçeren Bileşikler	45
1.3. Biyolojik Aktivite ve Bazı Toksisite Çalışmaları	45
1.3.1. Alerjik Kontakt Dermatit	45

1.3.2. Sitotoksik Etki	46
1.3.3. Antimikrobyal, Antifungal ve Antiviral Etki	49
1.3.4. Böcek Beslenmesini Engelleyici, Mortalite ve Bağırsak Kurtlarını Öldürücü Etki	51
1.3.5. Süperoksit Salınımını İnhibe Edici Etki	52
1.3.6. 5-Lipoksijenaz, Kalmodulin, Hiyaluronidaz, Siklooksijenaz, DNA Polimeraz <i>b</i> ve α -Glukozidaz İnhibitör Etki	52
1.3.7. Antioksidan Etki	54
1.3.8. Balık Öldürücü ve Bitki Gelişimini İnhibe Edici Etki	55
1.3.9. Nörotrofik Etki	55
1.3.10. Kas Gevşetici ve Kalsiyum İnhibitör Etki	55
1.3.11. Kardiyotonik ve Vazopressin Antagonist Etki	56
1.3.12. Karaciğer X-reseptör (LXR) α Antagonisti, (LXR) β Antagonisti Etki	56
1.3.13. Katepsin B ve L İnhibitörü Etki	56
1.3.14. Antiplatelet Etki	56
1.3.15. Antitrombin Etki	57
1.3.16. Brine shrimp (<i>Artemia salina</i>) Üzerine Öldürücü Etkisi	57
1.3.17. Farnesoit X-reseptör (FXR) Reseptör Etkinleştirici Etki	57
1.3.18. NO Üretimi İnhibitörü Etki	57
1.3.19. Tübülün Polimerizasyonunu İnhibe Edici Etki	58
1.3.20. Vazorelaksasyon Etki	59
1.3.21. Yara İyileştirici Etki	59
1.4. <i>Porella</i> Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite ve Bazı Toksisite Çalışmaları	59
1.4.1. Alerjik Kontakt Dermatit	60
1.4.2. Sitotoksik Etki	60
1.4.3. Antimikrobiyal ve Antifungal Etki	61

1.4.4. Böcek Beslenmesini Engelleyici, Mortalite ve Bağırsak Kurtlarını Öldürücü Etkisi	63
1.4.5. Süperoksit Salınımını İnhibe Edici Etki	63
1.4.6. Balık Öldürücü ve Bitki Gelişimini İnhibe Edici Etki	64
1.4.7. 5-Lipoksijenaz, Kalmodulin, Hiyaluronidaz Siklooksijenaz İnhibe Edici Etki ve NO Üretimin İnhibe Edici Etki	64
1.4.8. Katepsin L ve Katepsin B İnhibe Edici Etki	64
2. GEREÇ ve YÖNTEM	65
2.1. Gereç	65
2.1.1. Toplanan Örneklerin Tür Özellikleri	65
2.1.1.1. <i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff Tür Özellikleri	65
2.1.1.2. <i>Porella cordaeana</i> (Huebener) Moore Tür Özellikleri	67
2.2. Materyal	68
2.3. Yöntem	70
2.3.1. Ekstraksiyon	70
2.3.2. Genel Deneysel Yöntemler	70
2.3.3. Kromatografik Yöntemlerin Detaylandırılması	71
2.3.4. İzolasyon yöntemi (Kolon kromatografisi, Prep-HPLC)	72
2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	72
2.4.1. Sitotoksik Aktivite Tayini	72
3. BULGULAR	77
3.1. Ekstraksiyona Ait Bulgular	77
3.2. Kromatografik Yöntemlere Ait Bulgular	77
3.2.1. İnce Tabaka Kromatografisine (İTK) Ait Bulgular	77
3.2.2. İzolasyona Ait Bulgular	80
3.3. Yapı Aydınlatılmasına Ait Bulgular	83

3.3.1. Spektroskopik Yöntemlere Ait Bulgular	84
3.4. Biyolojik Aktivite Bulguları	146
3.4.1. MTT Deneyine Ait Bulgular	146
3.4.2. SRB Deneyine Ait Bulgular	147
4. TARTIŞMA	148
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	150
ÖZET	152
SUMMARY	153
KAYNAKLAR	154
ÖZGEÇMİŞ	165

ÖNSÖZ

Porellaceae familyasına ait *Porella* L. cinsi, 100 tür ile dünyada dağılım gösteren, genellikle denizler hariç Antartika'da da yetişebilen bir türdür. Bununla birlikte, yapılmış olan çalışmalardan anlaşılmaktadır ki, Türkiye’de yetişen *Porella* türleri üzerinde yapılan araştırmalar hala çok fazla sayıda değildir. *Porella* türleri içerik bakımından oldukça zengindir. Özellikle, seskiterpen, diterpen, monoterpen yapısında bileşiklerin bol miktarda olduğu ve bu bileşiklerin önemli biyolojik etkilere sahip oldukları vurgulanmaktadır. Bu nedenle, ülkemizde doğal olarak yetişen iki tür olarak *Porella cordaeana* ve *Porella platyphylla* üzerinde çalışılması, söz konusu türlerin öncelikle kimyasal içeriklerinin incelenerek analizlerinin yapılması, bileşimlerinin karşılaştırılması, daha sonra da ekstrelerinin ve izole edilen kimyasal bileşiklerinin biyolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

İlk olarak tez konumun belirlenmesinden başlayarak tez yazım aşamalarının sonuna kadar her türlü ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, her fırsatta bilgisine, deneyimlerine başvurmama olanak sağlayan sayın hocam **Prof. Dr. Alev ÖNDER**’e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca ortak çalışmamızı kabul ederek bize her türlü olanağı sağlayan **Asist Prof. Liva HARINANTENAINA ROKOTONDRAIBE**’ye sonsuz teşekkürlerimizi sunarız. Güney Kore’de çalışmalarımızı yaptığımız, **Prof. Dr. Yeong Shik KIM**, **Dr. Chemoo CHUN**, **Dr. Salman KHAN**’a (Seoul National University), **Doç. Dr. Hatice ÖZENOĞLU KİREMİT**’e (Adnan Menderes Üniversitesi), **Prof. Dr. İsa GÖKLER**’e (Dokuz Eylül Üniversitesi), deneylerimizde sağladıkları imkân ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimizi iletiriz. Ayrıca, Farmakognozi Anabilim Dalının tüm saygıdeğer hocalarına ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Tez süresi boyunca yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen annem **Zeynep KARADENİZ**’e, Eşim **Michael LAMBRECHTS**’e, arkadaşlarım **Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN**’a ve **Hacer SELAMOĞLU ÇAĞLAYAN**’a da teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELELER ve KISALTMALAR

°C	Centigrade
µg	Microgram
µL	Microliter
5-(LOX)	5-lipoxygenase
¹³ C-NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
ACS	Sigma Aldrich
CH ₂ Cl ₂	Dichloromethane
C ₄ H ₁₀ O	Butanol
COSY	Correlation Spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
CO ₂	Carbondioxide
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	Ethyl Acetate
Et ₂ O	Diethyl Ether
FMLP	Formil Metionil Lösil Fenilalanin
FXR	Farnesoid X Receptor
Foto.	Fotoğraf
g	Gram
GC	Gas Chromatography
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
GI ₅₀	Concentration for 50% of Maximal Inhibition of Cell Proliferation
HDL	High-density lipoprotein
h/a	Hacim/Ağırlık

h/h	Hacim/Hacim
H ₂ O	Su
H ₂ SO ₄	Sulfuric Acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC ₅₀	Inhibitory Concentration %50
ID ₅₀	Infectious Dose %50
IKI	İyot Kalium İyot
IR	Infrared
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
kg	Kilogram
LD ₅₀	% 50 Lethal Dose
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
m/z	Mass to Charge Ratio
MeOH	Methanol
M	Molar
MIC	Minimum Inhibitor Consantration
mL	Mililiter
mm	Milimeter
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitric Oxide
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

NP-40	Nonionic Polyoxyethylene Surfactant
OD	Optical Density
O ₂ ⁻	Süperoksit Anyon Radikali
PC	<i>Porella cordaeana</i> (Huebener) Moore
PP	<i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff
Rf	Resolution Factor
SEC	Size-Exclusion Chromatography
SRB	Sulforhodamine B
TCA	Trichloroacetic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
α	Alfa
β	Beta

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Bryophyte ve taksonomik sınıfları	22
Şekil 1.2. Bryophyte'ler ve örnekleri	22
Şekil 1.3. Ciğerotlarının yaşam siklusu	23
Şekil 1.4. Ciğerotlarının üremesinin şematik gösterimi	24
Şekil 1.5. Bryofitlerin kullanım alanları	25
Şekil.1.6. Ciğerotları anatomisinde yer alan yağ hücreleri	26
Şekil 1.7. <i>Porella platyphylla</i>	28
Şekil 1.8. <i>Porella cordaeana</i>	28
Şekil 1.9. Handerson Kareleme yöntemine göre <i>Porella</i> türlerinin Türkiye'deki dağılımı	30
Şekil 1.10. <i>Porella arboris-vitae</i> (With.) Grolle	31
Şekil 1.11. <i>Porella baueri</i> (Schiffn.) C. E O. Jensen, Dünya üzerinde dağılımı	31
Şekil 1.12. <i>Porella cordaeana</i> (Hüb.) Moore, Dünya üzerinde dağılımı	32
Şekil 1.13. <i>Porella platyphylla</i> 'nın Dünya üzerinde yayılışı ve yetiştiği yerler	33
Şekil 1.14. Terpenik bileşiklere ait basit biyosentetik şema	34
Şekil 1.15. Başlıca seskiterpenik yapılara örnekler	37
Şekil 1.16. <i>Porella cordaeana</i> ekstrelerinde kimyasal grupların dağılımı (Bukvicki ve ark., 2012)	41
Şekil 1.17. Başlıca diterpen yapıları: A: Labdan, B: Abietan, C: Ent-Kauren, D: 18-hidroksisakkulatal, E: 19-hidroksisakkulatal	42
Şekil 1.18. Steroit yapısında bileşikler (1) Stigmatreol, (2) β -Sitosterol	44
Şekil 1.19. <i>Frullania tamarisci</i> subsp. <i>tamarisci</i> 'nin neden olduğu alerjik kontakt dermatit	46

Şekil 2.1. <i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff	65
Şekil 2.2. <i>Porella cordaeana</i> (Huebener) Moore	67
Şekil 2.3. <i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff	68
Şekil 2.4. Doğadan <i>Porella</i> türlerini toplarken bazı fotoğraflar (Foto: Merve Karadeniz)	69
Şekil 2.5. <i>Porella cordeana</i> ve <i>P. platyphylla</i> 'nın eterli ekstreleri	71
Şekil 2.6. MTT yönteminin şematik gösterimi	73
Şekil 2.7. MTT ilavesi ile mitokondride gerçekleşen reaksiyon	73
Şekil 2.8. SRB yönteminin şematik gösterimi	76
Şekil 3.1. PC (<i>Porella cordeana</i>) ve PP (<i>P. platyphlla</i>) eterli ekstreleri n-hekzan:etilasetat (4:1)-Godin reaktifi ile 100 °C'de yakılması ile, gün ışığında	78
Şekil 3.2. PC (<i>Porella cordeana</i>) ve PP (<i>P. platyphlla</i>) eterli ekstreleri n-hekzan:etilasetat (4:1)-Godin reaktifi ile 100 °C'de yakılması ile ve 254 nm UV ışığında	78
Şekil 3.3. PC (<i>Porella cordeana</i>) ve PP (<i>P. platyphlla</i>) eterli ekstreleri n-hekzan:etilasetat (4:1)-Godin reaktifi ile 100 °C'de yakılması ile ve 366 nm UV ışığında	79
Şekil 3.4. A: PC (<i>Porella cordeana</i>) ve PP (<i>P. platyphlla</i>) eterli ekstrelerinin gün ışığında görünümü, B: PC (<i>Porella cordeana</i>) ve PP (<i>P. platyphlla</i>) eterli ekstrelerinin reaktif püskürtülüp (MeOH: H ₂ SO ₄ , 1:1), 366 nm'de incelenmesi ile elde edilen ITK kromatogramları	79
Şekil 3.5. <i>Porella cordeaena</i> 'dan izole edilen yeni bileşikler: Porellasetal A(1), B(2), C(3), D(4) ve diğerleri fitol (5) ve stigmasterol (6)	80
Şekil 3.6. Biyoaktivite eşliğinde yapılan izolasyon şeması	81
Şekil 3.7. İzole edilen porellasetallerin, 254 nm'de HPLC kromatogramı (Bileşikler preparative HPLC ile de bu alandan toplanmıştır)	82
Şekil 3.8. Porellasetal A'nın (a) 1-D COSY spektrumunda korelasyon (b) Tüm yapıyı aydınlatmak için yararlanılan, HMBC korelasyonu	83
Şekil 3.9. Porellasetal A (1) 3 boyutlu görünümü	83

Şekil 3.10. Porellasetal B (2) ve Porellasetal C (3)'nin 3 boyutlu görünümü	83
Şekil 3.11. Porellasetal B (2) ve Porellasetal C (3)'nin C-11 deki relatif konfigürasyonunun NOESY korelasyonu ile incelenmesi	83
Şekil 3.12. UV spectrum (0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)	85
Şekil 3.13. KBr film içinde IR spektrumu (1)	86
Şekil 3.14. ^1H NMR spektrumu (1) (400 MHz, CD_3OD)	87
Şekil 3.15. ^{13}C NMR spektrumu (1) (100 MHz, CD_3OD)	88
Şekil 3.16. HSQC spektrumu (1) (400 MHz, CD_3OD)	89
Şekil 3.17. HMBC spektrumu (1) (400 MHz, CD_3OD)	90
Şekil 3.18. 1-D COSY spektrum (1) (δ 3.80 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)	91
Şekil 3.19. 1-D COSY spektrumu (1) (δ 5.62 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)	92
Şekil 3.20. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 0.72 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)	93
Şekil 3.21. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 0.84 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)	94
Şekil 3.22. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 3.80 de ışınlama ile alınan sinyal ile) (400 MHz, CD_3OD)	95
Şekil 3.23. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 5.94 de ışınlama ile alınan sinyal ile) (400 MHz, CD_3OD)	96
Şekil 3.24. HRESIMS (1), $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3$, at m/z: 287.1619 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ($\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$ için hesaplanan, t 287.1617)	97
Şekil 3.25. UV spektrum (0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)	98
Şekil 3.26. KBr film içinde IR spektrumu (2)	99
Şekil 3.27. ^1H NMR spektrumu (2) (400 MHz, CD_3OD)	100
Şekil 3.28. ^{13}C NMR spektrumu (2) (100 MHz, CD_3OD)	101
Şekil 3.29. HSQC spektrumu (2) (400 MHz, CD_3OD)	102

Şekil 3.30. HMBC spektrumu (2) (400 MHz, CD ₃ OD)	103
Şekil 3.31. HMBC spektrumu (2) (400 MHz, CD ₃ OD)	104
Şekil 3.32. 1-D COSY spektrumu (2) (δ 3.80 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	105
Şekil 3.33. 1-D COSY spektrumu (2) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	106
Şekil 3.34. 1-D COSY spektrumu (2) (δ 5.68 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	107
Şekil 3.35. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 0.67 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	108
Şekil 3.36. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 0.84 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	109
Şekil 3.37. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	110
Şekil 3.38. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 5.94 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	111
Şekil 3.39. HRESIMS (2), C ₁₇ H ₂₆ O ₃ , at m/z: 301.1775 [M+Na] ⁺ (C ₁₇ H ₂₆ O ₃ Na için hesaplanan 301.1774	112
Şekil 3.40. UV spektrum (0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)	113
Şekil 3.41. KBr film içinde IR spektrumu (3)	114
Şekil 3.42. ¹ H NMR spektrumu(3) (400 MHz, CD ₃ OD)	115
Şekil 3.43. ¹³ C NMR spektrumu (3) (100 MHz, CD ₃ OD)	116
Şekil 3.44. HSQC spektrumu (3) (400 MHz, CD ₃ OD)	117
Şekil 3.45. HMBC spektrumu (3) (400 MHz, CD ₃ OD)	118
Şekil 3.46. HMBC spektrumu (3) (400 MHz, CD ₃ OD)	119
Şekil 3.47. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 3.59 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	120
Şekil 3.48. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	121

Şekil 3.49. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 6.04 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	122
Şekil 3.50. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 5.48 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	123
Şekil 3.51. 1-D NOESY spektrumu (3) (δ 0.86 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	124
Şekil 3.52. 1-D NOESY spektrumu (3) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	125
Şekil 3.53. 1-D NOESY spektrumu (3) (δ 6.04 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	126
Şekil 3.54. HRESIMS (3), C ₁₇ H ₂₆ O ₃ , at m/z: 301.1775 [M+Na] ⁺ (C ₁₇ H ₂₆ O ₃ Na için hesaplanan 301.1774)	127
Şekil 3.55. UV spektrum(0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)	128
Şekil 3.56. KBr film içinde IR spektrumu (4)	129
Şekil 3.57. ¹ H NMR spektrumu (4) (400 MHz, CD ₃ OD)	130
Şekil 3.58. ¹³ C NMR spektrumu (4) (100 MHz, CD ₃ OD)	131
Şekil 3.59. HSQC spektrumu (4) (400 MHz, CD ₃ OD)	132
Şekil 3.60. HMBC spektrumu (4) (400 MHz, CD ₃ OD)	133
Şekil 3.61. HMBC spektrumu (4), (400 MHz, CD ₃ OD)	134
Şekil 3.62. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 2.10 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	135
Şekil 3.63. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 3.22 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	136
Şekil 3.64. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 5.48 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	137
Şekil 3.65. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 5.56 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	138
Şekil 3.66. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 0.67 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	139

Şekil 3.67. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 0.99 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	140
Şekil 3.68. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 3.22 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	141
Şekil 3.69. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 5.48 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD ₃ OD)	142
Şekil 3.70. HRESIMS (4), C ₁₉ H ₃₂ O ₄ , at m/z: 347.2181 [M+Na] ⁺ (C ₁₉ H ₃₂ O ₄ Na için hesaplanan 347.2192)	143
Şekil 3.71. <i>Porella cordaeana</i> 'nın eterli ekstresinin ¹ H NMR spektrumu	144
Şekil 3.72. <i>Porella cordaeana</i> ekstresi ve 1-4 bileşiklerinin ¹ H NMR spektrumlarının 3.5pp den 4 ppm'e kadar karşılaştırılması (etoksil bölgesi sinyallarına göre)	145
Şekil 3.73. <i>Porella cordaeana</i> 'nın Caco-2 (Kolon Kanseri Hücreleri) Üzerindeki Sitotoksitesi	146
Şekil 3.74. <i>Porella cordaeana</i> 'nın RAW 264.7 Makrofaj Hücreleri Üzerine Sitotoksitesi	146

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Üzerinde çalışılan <i>Porella</i> türlerinin fitokimyasal bileşimi (1975'ten günümüze) (Ludwiczuk ve ark., 2011)	35
Çizelge 1.2. <i>Porella</i> türlerinden izole edilen seskiterpen ve diterpenler (Ludwiczuk ve ark., 2011)	36
Çizelge 3.1. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyları ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayıları	85
Çizelge 3. 2. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyları ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayıları	98
Çizelge 3.3. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyları ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayıları	113
Çizelge 3.4. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyu ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayısı	128
Çizelge 3.5. Porellasetal A, B, C, D bileşiklerinin HT29 (Kolon kanser hücreleri) ve MCF-7 (İnsan meme kanseri hücreleri) üzerine sitotoksik etkisi	147

1. GİRİŞ

Bryophyte; İngiliz Botanikçi Samuel Frederick Gray (1766-1828) tarafından 1821 yılında doğal bir grup olarak teşhis edilmesine rağmen, resmi bölüm ismi olarak “Bryophyte” isminin verilmesi 50 sene sonra gerçekleşebilmiştir. Samuel Frederick Gray'ın teşhis ettiği Bryophyte'in iki grubu olan, yosunlar (Musci/Mosses) ve ciğerotları (Hepaticae/Liverworts) aslında daha öncesinde bilinmekteydi. Aslında, Gray'ın buluşu bu iki grup arasındaki yakınlığı ortaya çıkarmıştır. Hepaticae ise ilk olarak Fransız botanikçi Antoine Laurent tarafından 1789 yılında bulunmuştur (Cronquist, 1981).

Su ve kara gibi tamamen farklı olan iki ortam, bitkilerin yetişmesi için de oldukça farklı özelliklere sahiptir. Sucul ve karasal bölgeler arasında, nemli alanlar ve bataklıklar gibi su ve karanın temasta olduğu geçiş bölgeleri (amfibiyan bölge) bulunmaktadır. Amfibiyan bölgeler bitkilerin gelişebilmesi için oldukça sınırlı ekolojik imkanlara sahip olduğundan, geçiş bölgelerinde yer alan bitki grupları da oldukça az sayıdadır. Bu az sayıda bitki grubu içinde bu tür alanlara en iyi uyumu Bryophyte'e ait üyelerin sağladığı gözlenmektedir. Bu bölümün birkaç üyesinin suda yaşıyor özellikte olması da, onların geçiş bitkileri olduğunu göstermektedir (Özenoğlu Kiremit ve ark., 2007).

Broyofitler epifit bitki topluluğunun önemli bir üyesi oldukları için tropikal ve ılıman yağmur ormanlarındaki ağaçlarda da yetişirler. Aynı zamanda Broyofitler talluslu bitkilerin en gelişmiş (evrimleşmiş) taksonu olarak bilinmektedir. Yapısal özellik olarak, köklere sahip değildir, rizoitleri ile toprağa tutunmaktadırlar. İlkel gövde olsa da; karayosunlarında iletim demetleri bulunmaktadır fakat ciğerotlarının çoğunda bu özellik gelişmemiştir. Her zaman yeşil kalan bitkiler olup (Klorofil a ve b), fotosentez ürünü olarak nişasta üretmektedir ve gametofit üzerinde gametangiyumlar (eşeyssel hücreleri taşıyan organlar) bulunduran bitkiler olarak da bilinmektedir (Nabors, 2004).

Ciğerotları ve boynuzsu otlar, bitkiler aleminin Bryophyte bölümüne bağlı Marchantiopsida (Hepaticae) ve Anthocerotopsida sınıfında yer alan bitkilerdir. Yurdumuzda ise 170 civarında tür

ile temsil edilmektedir (Özenoğlu Kiremit ve Keçeli, 2009). Ancak bu sayının gerçek potansiyeli yansıtmadığı düşünülmektedir. Çünkü ülkemiz, hem farklı iklim koşullarına hem de farklı topografik yapılara sahip olmasından dolayı, bu çeşitliliğin daha fazla olduğunu söylememiz mümkündür. Bugüne kadar ülkemizde genellikle tohumlu bitkilere yönelik çalışmalara önem verilmiş olup tohumusuz bitkilerin bu konuda daha geri planda kalmış olduğunu söylememiz gerekir. Ülkemiz Ciğerotu Florası'na ait çalışmaların temeli yabancı araştırmacılarca atılmıştır (Gökler, 1993). Bu yabancı araştırmacıların yaptıkları araştırmaların çoğu, genellikle çok amaçlı botanik gezi sırasında gerçekleştirilmiştir. Tohumusuz bitkilerin toplanması, teşhisi gibi konuların zor olması, literatür eksikliği gibi nedenlerden dolayı günümüze kadar bu bitki grubu ihmal edilmiş olmakla beraber, son zamanlarda çalışmalara hız verildiğini de görmekteyiz. 1980'li yıllara kadar Türk araştırmacılar bu konuyu hiç ele almamıştır. Ancak bu yıllardan sonra, ciğerotları ve boynuzsu otlar, çeşitli üniversitelerde yer alan Türk araştırmacılar tarafından çalışılmaya başlandığını yinelemek isteriz (Gökler, 2004). Günümüzde; bu konu üzerinde ülkemizde çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalar genellikle; tür tayini ve yayılışı üzerine olup, kimyasal ve biyolojik aktivite üzerinde yapılmış olan çalışmalar çok kısıtlıdır.

Kısaca, Bryofitlerin de tüm bu nedenlerden dolayı, fitokimyasal yapılarına ait çalışmalar, çok uzun zamanlar boyunca ihmal edilmiştir. Bunun sebebi; morfolojik olarak çok küçük olmaları, büyük miktarlarda saf (tek tür halinde) numunelerinin toplanmasının zor olması ve mikroskop altında bile tanınmalarının güç olmasından kaynaklanmaktadır (Asakawa, 2001; Asakawa ve ark., 2013a).

Bununla birlikte, Bryofitler içinde yer alan Ciğerotları (Hepaticae) üzerine, dünyada belli gruplar tarafından oldukça detaylı çalışmalar yapıldığı da bilinmektedir. Yapılan fitokimyasal çalışmalar sonunda ciğerotlarının yapısal olarak çok geniş ve çeşitli bir kimyasal içeriğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Ciğerotları çok sayıda mono, seski ve di terpenik bileşikler ve aromatik bileşikler içermektedirler. Hatta taşıdıkları bazı özel yapıdaki terpenler yüksek bitkilerde bulunmamaktadır (Bukvicki ve ark., 2012). Bu da onlara ayırıcı ve hatta aranan bir özellik vermektedir. Çünkü bu bileşiklerin aynı zamanda kuvvetli farmakolojik etkilere sahip oldukları bulunmuştur. Daha önce yapılan biyolojik aktivite çalışmaları arasında; antikanser, alerjik kontakt dermatit, anti HIV-1 ve DNA Polimeraz β inhibitörü, antimikrobiyal ve antifungal aktivite, böcek beslenmesini engelleyici, mortalite ve bağırsak kurtlarını öldüren aktivite, süperokit salıverme inhibitör aktivite,

5-lipoksigenaz, kalmodulin, hiyaluronidaz, siklooksijenaz inhibitör aktivite ve NO üretimi inhibitörü aktivite, balık öldürücü ve bitki gelişimini inhibe edici aktivite, nörotrofik aktivite, kas gevşetici aktivite, kathepsin B ve L inhibitörü aktivite, kardiyotonik ve vazopressin antagonist aktivite, antiobezite aktivite gibi çalışmalara çokça rastlanmaktadır (Asakawa, 2007; Asakawa, 2008; Asakawa ve ark., 2009).

Ülkemiz bulunduğu coğrafi konumu sebebiyle çok geniş ve çeşitli bir bitki örtüsüne sahiptir (10.000'in üzerinde bitki çeşitliliği ile). Bunların arasında, birçok endemik bitki türünün varlığı da bilinmektedir. Yurdumuzda bulunan bitkiler üzerindeki çalışmalar hem ortak, hem bireysel çalışmalar ile, yurt dışı ve yurt içinde gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalar genellikle çiçekli bitkiler üzerinde yoğunlaşmış olup, çiçeksiz bitkilerin ikinci planda kaldığı görülmektedir. Ancak ülkemiz çiçeksiz bitkiler bakımından da oldukça geniş bir floraya sahiptir ve bu konuda çalışmalara hız verilebileceği düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda, bu grubu giren, Türkiye Ciğerotları'na ait türler; *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff. ve *Porella cordaeana* (Huebener) Moore seçilmiş ve ele alınmış olup; bu iki tür üzerinde fizyokimyasal ve biyolojik aktivitelere ait çalışmalar planlanmıştır. Ciğerotları ile yapılmış sınırlı sayıda çalışmayı da göz önünde bulunduracak olursak; yaptığımız çalışmanın Türkiye'de yetişen *Porella* türleri üzerinde olması ve bu türlerin kimyasal içeriklerinin incelenmesine yönelik bir çalışmanın daha önce yapılmamış olması bakımından orijinallğe sahip olacağı kaçınılmazdır. **Gerçekleştirilen tüm bu çalışmalar ileride yapılacak olan çalışmalara temel bir bilgi oluşturmaları bakımından önemli olacaktır. Ayrıca; ciğerotu türlerinden bazılarının incelenmesi ve yeni bileşiklerin elde edilmesi, bilim dünyasına kazandırılması, tezimizin orijinallği ve ilginç içeriği ile bilime katkı sağlayacağı görüşündeyiz.**

1.1. Botanik Bilgiler

1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri

Alem	: Plantae
Bölüm	: Bryophyte
Altbölüm	: Hepaticae
Sınıf	: Hepaticopsida
Altsınıf	: Jungermanniae
Takım	: Jungermanniales
Familya	: Porellaceae
Cins	: <i>Porella</i> L.
Tür	: <i>Porella platyphylla</i> (L.) Pfeiff (Katlıca) * <i>Porella cordaeana</i> (Huebener) Moore (Sarı Katlıca) *

(<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=POCO41>)
(United States Department of Agriculture Naturel Resources Conservation Service)

*Türkçeleştirilmiş isimlerdir (Güner ve ark., 2017).

1.1.2. Bryophyte ve Özellikleri

Bryophyte'ler dünya üzerinde yaklaşık 24.000 çeşit ile temsil edilmektedir (Asakawa ve ark., 2009). Taksonomik olarak 3 sınıfa (Şekil 1.1) ayırmak mümkündür. Bunlar ciğerotları, boynuzsu otlar ve yosunlardır. 2016 yılında yayınlanan boynuzsu otlar ve ciğerotlarına ait olan dünya listesinde 92 aileyi temsil eden 398 cinsten 7486 tür içeren ciğerotları (Marchantiophyta) ve boynuzsuotlar (Anthocerotophyta) için ilk kez dünya çapında yapılan kontrol listesi hazırlanmıştır (Lars Söderström ve ark., 2016).



Şekil 1.1. Bryophyte ve taksonomik sınıfları

(<http://www.plantscience4u.com/2014/04/classification-of-bryophytes.html#.WYhxd4jyjIU>)

Şekil 1.2.'de bu sınıflara ait birer tür örnek verilmiş olup, tür dağılımları belirtilmiştir.

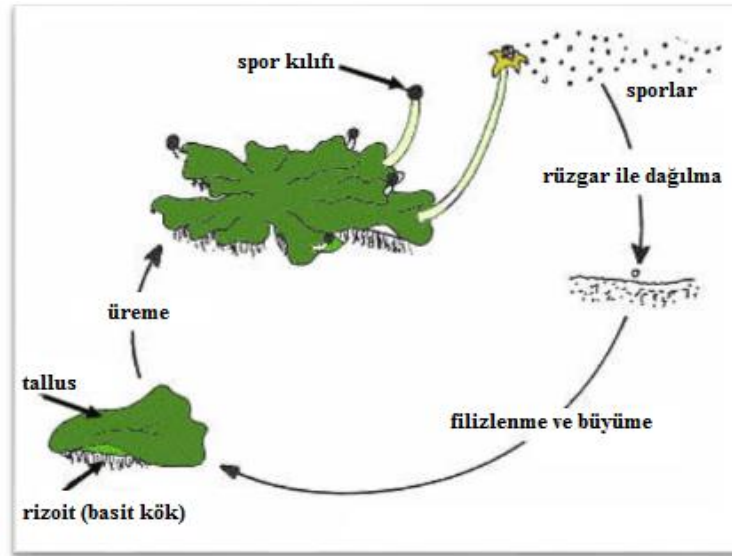


Şekil 1.2. Bryophyte'ler ve örnekleri

(Asakawa ve Ludwiczuk, 2013a)

Bryofitler için elimizde çok fazla bir bilimsel literatür olmamasına rağmen, karasal bitkilerin en yaşlısı olarak nitelendirilmektedir (Asakawa 2008). Bu hipotezin dayandığı şey ise; 500 milyon yıl öncesine ait olan bir fosilde bulunan sporların ciğerotları sporlarına çok benzemesinden kaynaklandığı düşünülebilir (Asakawa ve ark., 2013a, Buczkowska ve ark., 2016).

Bryofitler dünyada denizler dışında her yerde yayılış göstermekte (Asakawa ve ark., 2013a) ve Angiospermlerden sonra kara bitkilerinin ikinci büyük grubu olarak yer almaktadır (Chandra ve ark., 2016). Ağaçlarda, toprakta, göllerde, nehirlerde bulunduğu gibi, Antartika'da bile yetişmektedir (Asakawa ve ark., 2013b). Bryofitlerin çoğu geniş bir coğrafi dağılıma sahiptir, çeşitli ekolojik koşullar altında büyürler ve genellikle zorlu yaşam alanlarında bile öncüdürler (Şekil 1.3'te yaşam döngüleri basitçe anlatılmaktadır). Ayrıca, Bryofitlerin, gelişmiş bitkileri toprağa bağlamak için biyoteknolojik rol oynadığı düşünülmektedir (Troitsky ve ark., 2007). Bryofitler, diğer bitkiler için önemli bir tampon sistemi sağladığı için ekosistemlerin korunmasında dikkate değer bir rol oynamaktadırlar (Chandra ve ark., 2016). Bu bitkiler, küçük boyut nedeniyle çoğu insan tarafından daha az bilinmesinden dolayı, kullanımları yayılışlarına göre çok daha azdır (Harris, 2008).

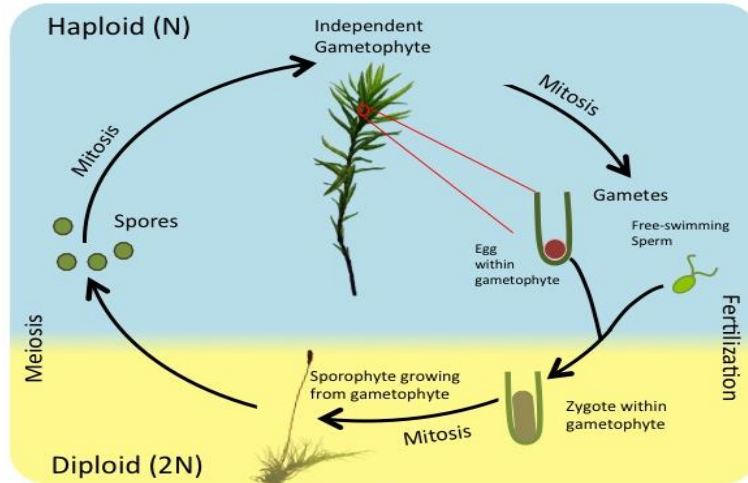


Şekil 1.3. Ciğerotlarının yaşam siklusu

(<http://www.saburchill.com/ans02/chapters/chap040.html>)

Bryofitler ilk primitif kara bitkileri olmaları bakımından da önemlidirler. Bu bitki türlerinin bir önemi de süksesyona yaptıkları olumlu katkıdan kaynaklanmaktadır (süksesyon; çıplak bir sahanın kademeli olarak bitkilerce kaplanması olayı). Süksesyonda, likenlerden başlayıp en kararlı bitki örtüsünü oluşturan ağaçsı formlara kadar uzanan zincirde, bryofitlerin önemli bir yeri vardır. Belli bir döneme kadar sadece çiçeksiz bitkilerin yaşayabildiği alan, yeterli topraklaşmanın sağlanması ve artan mineral madde (ciğerotlarının vb. bitkilerin ölmesi ve çürümesiyle) ile tohumlu bitkilere uygun hale getirilir (Özeoğlu Kiremit, 2005)

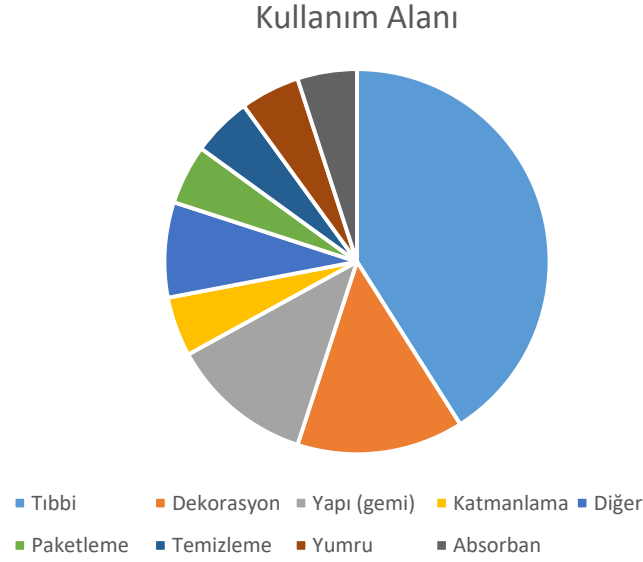
Bryofitler, en basit şekilde düzenlenmiş embriyofitlerin bir grubunu içerir. Bu grup, yaşam döngüsünde bir gametofitin hakimiyetine sahip olup, gelişmiş bir vasküler sisteme ise sahip değildirler. (Troitsky ve ark., 2007). Ciğerotunun yaşam çemberi eşeyli (gametofit) ve eşeysiz (sporofit) nesiller ile karakterizedir. Gametofit nesil, sporun filizlenmesi ile gelişir. Erkek üreme organı (anteridyum) spermli sulu bir ortam yardımı ile dişi üreme organında (arkegonyum) korunmakta olan yumurtayı döller. Sporofit bu embriyoda gelişir ve üst kısmında bir sporangyum oluşturur. Sporangyum patladığı zaman ise yeni gametofitik neslin başlangıcını sağlayacak olan sporlar serbest kalır (Şekil 1.4). Eşeysiz üreme de ise, gametofitik nesil veya bitki bedeninin dallarının ayrılmasıyla üretilen, yeni bitkilerle sonuçlanan “gemma” (tomurcuklanma) ile oluşur (vejetatif üreme). Çok hücreli olan gemmalar gelişerek yeni gametofit bitkiyi oluştururlar (Porley, 2013).



Şekil 1.4. Ciğerotlarının üremesinin şematik gösterimi

(<http://archive.cnx.org/contents/797a3978-2747-4897-aa1a-2241644b179d@6/bryophytes>)

Bryofitler hala yaşıyan en eski bitkiler olarak bilinmektedirler. Günümüze kadar çok farklı kullanım alanları olmuştur (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Bryofitlerin kullanım alanları

Şekil 1.5'te diğer olarak belirttiğim kategorinin içine; boyacılık, mum ve kandillerde kullanılan fitiller, parfüm sanayisi vb. girmektedir (Harris ve ark., 2008). Bunun yanında, Bryofitler insan besini olarak kullanımları açısından, önemsiz kabul edilmektedir. Aslında besin olarak kullanılmasını anlatan bir literatüre de rastlanmamıştır. Bununla birlikte birkaç bryofit, bilhassa yosunlar (mosses) Çin'de tıbbi bitkiler olarak yanıkları tedavi etmede, berelerde, dış yaralarda, yılan ısırmasında, pulmoner tüberkülozda, nevrastenide, çatlak ve kırıklarda, konvülsiyonlarda, haşlanarak oluşan yanıklarda, üropatide, pnömoni ve benzer hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Asakawa, 2001; Asakawa, 2011; Asakawa ve ark., 2013a, Asakawa ve ark., 2013b).

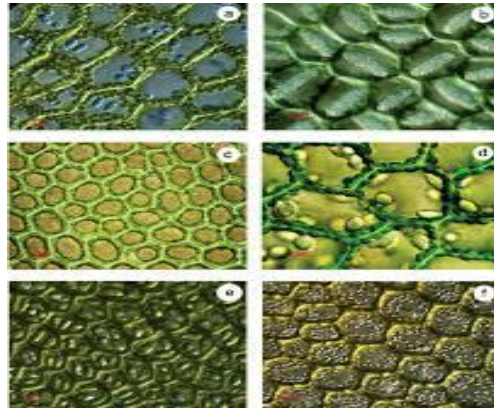
Tahmini olarak bryofitlerin çoğu acı bir öz/sıvı içermekte olup bundan dolayı bazıları şaşırtıcı şekilde acı lezzete sahiptir. Bazıları belki de bu özden dolayı alerjik kontakt dermatite sebep olmaktadır (Asakawa, 2001). Bryofitler çok çeşitlilikte ve nadir bulunan bileşiklere sahiptir.

Bryofitlerden elde edilen ekstraların birçoğunun *in vitro* ortamda, değişik düzeylerde antibakteriyel, antikanser ve antifungal etkileri olduğu da belirlenmiştir (Scher ve ark., 2004).

Bryofitlerin ilginç özelliklerinden birisi de; böcek lavraları, mantarlar, bakteriler, salyangozlar ve memeliler tarafından tahrip olmamaları olarak rapor edilmektedir (Asakawa, 2001; Asakawa ve ark., 2013a).

Bryofitlerin bir grubu olan ciğerotları (Liverworts/Hepaticae), diğerlerinden bazı özellikleri ile ayrılmaktadır. Örneğin, ciğerotlarının morfolojik olarak sınıflandırılması oldukça zordur. Bundan dolayı ciğerotlarının fitokimyasının aydınlatılması türlerin ayrımı için çok önemlidir (Asakawa 2004, Asakawa, 2011; Asakawa ve ark., 2013a; Harinantenaina ve ark., 2006).

Ayrıca, anatomik olarak, ciğerotlarında bulunan yağ hücrelerinin (Şekil 1.6) “oil bodies” varlığı, çok önemli ve ayıricıdır. Yağ hücreleri, sadece bir kısım lipofilik terpenik bileşikler üretmekle kalmaz, aynı zamanda aromatik bileşikler ve özellikle fenolik bileşikleri de üretir (Asakawa 2004, Asakawa, 2011; Asakawa ve ark., 2013a; Harinantenaina ve ark., 2006).



Şekil 1.6. Ciğerotları anatomisinde yer alan yağ hücreleri

(https://www.researchgate.net/publication/263416286_The_Oil_Bodies_of_Liverworts_Unique_and_Important_Organelles_in_Land_Plants)

Ciğerotlarında bulunan yağ hücreleri organik solvanlarla çok kolay ekstre edilebilmektedir. Ciğerotlarında bulunan bu özellik, yosunlar ve boynuzsu otlarda bulunmamaktadır (Asakawa, 2007; Harinantenaina ve Asakawa, 2007) Ciğerotlarında bulunan yağ hücreleri Marchantiophyta'nın sınıflandırılması için de önemlidir ve biyolojik işaretleyici olarak kullanılmaktadır (Asakawa ve ark., 2013b). Çevresel durumlar ve coğrafik konumda ciğerotlarının içeriğinin değişiklik göstermesine neden olmaktadır (Harinantenaina ve ark., 2006).

1.1.3. Jungermanniales Takımının Özellikleri

Genellikle tropik bölgelerde yetişmesine rağmen, aynı zamanda Avrupa ciğerotu florasındaki en zengin gruptur. Bitkiler rizoitleriyle dik durumda veya ve yere uzanmış vaziyette bulunurlar. Çoğunlukla iki sıra büyük yan yaprakları ve bir sıra daha küçük ventral (postyal) yaprağı ile birlikte, üç sıralı bir yerleşime sahiptirler fakat bu özellik bazı gruplarda bulunmaz (Frey ve ark., 2006).

1.1.4. Porellaceae Familyasının Genel Özellikleri

Porellaceae familyası dünya çapında 100 tür ile temsil edilmektedir. Taksonun çoğu Güney Batı Asya'da bulunmakta ve *Porella* cinsinin orjininin de burası olduğu düşünülmektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011). Porellaceae familyası morfolojik olarak Frullaniaceae familyasına yakın olmakla beraber; kimyasal olarak aromadendran tipi seskiterpen keton, ent-siklokolerenonun *Frullania* ve *Porella vernicosa*' da bulunmasından başka çok fazla bir benzerlikleri bulunmamaktadır (Asakawa, 2004). Porellaceae familyası 2 gruba bölünmüş olup; bunlar acı lezzete sahip olan türleri içerenler ve acı olmayan lezzete sahip olan türleri içerenler olarak belirlenmiştir. Asakawa'nın 1995 yılında yaptığı çalışmaya göre, 15 *Porella* türü kimyasal olarak analiz edilmiş olup, bunlar 9 tipe ayrılmıştır (Asakawa, 1995);

- 1) Driman-aromadendran-pinguisan-tip
- 2) Sakkulatan-tip
- 3) Pinguisan-tip

- 4) Pinguisan-sakkulatan-tip
- 5) Afrikan-tip
- 6) Santalan-afrikan-siklofarnesan-tip
- 7) Guaian-tip
- 8) Germakran-pinguisan-sakkulatan-tip
- 9) Germakran-afrikan-guaian-tip

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise *Porella* türlerinin 6 kemotipinin olduğundan bahsedilmektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011). Bunlar ise;

- 1) Driman (Tip I)
- 2) Sakkulatan (Tip II)
- 3) Pinguisan-sakkulatan (Tip III)
- 4) Guaian-germakran (Tip IV)
- 5) Pinguisan (Tip V)
- 6) Afrikan (Tip VI)

1.1.5. *Porella* L. Cinsinin Özellikleri

Porella L.'ye şimdiye kadar yaklaşık 200 değişik isim verilmiştir. Dünyada bu cinse ait, ~ 100 türün olduğu bilinmektedir. İki loblu olması belirgin özelliğidir ve birbirinin içine gömülü yapraklar birbiri üzerinde iz bırakmıştır. Genellikle geriye doğru eğilmiş bir omurgaya sahiptir ve omurga sürekli yenilenir, geniş alt yapraklar lobçuklara benzerdir (Hentschel ve ark., 2007).

Porella cordaeana ve *P. platyphylla* türleri Jungermanniales takımının en belirgin örneklerindendir. Bu cins üyelerinde yapraklar dorsal, ventral ve alt yapraklar olmak üzere üç sırada düzenlenmiştir. Türler birbirlerinden, sürgün renkleri ve genelde farklı sıralarda düzenlenmiş bu yaprakların boyut ve şekillerindeki farklılıklardan ayrılırlar (Paton, 1999).



Şekil 1.7. *Porella platyphylla*

(<http://bryophyteportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=160474>)



Şekil 1.8. *Porella cordaeana*

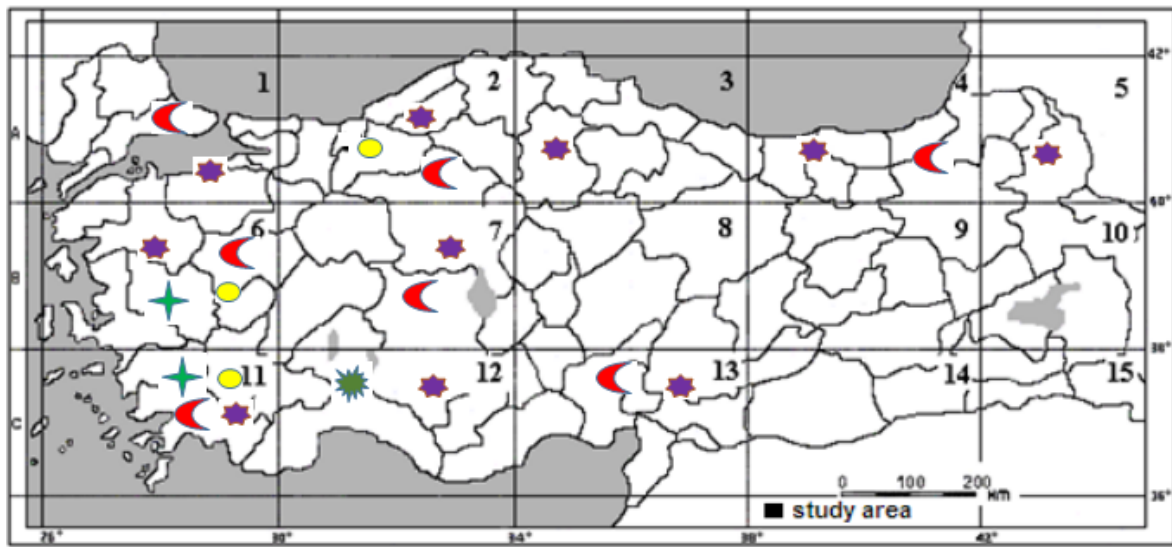
(<http://www.biolib.cz/en/image/id190470/>)

Porella L. türlerinin ayrımı morfolojik olarak küçük boyutta olmaları ve çok benzer olmaları sebebi ile oldukça zor bir şekilde, mikroskop altında, sadece uzman kişiler tarafından yapılabilmektedir. Müller ve bazı kişiler (1954-1957, bunun yanında Hattori 1967, 1976) ayrım için İKI (iyot kalium iyot) reaksiyonunu kullanmışlardır. Bu reaksiyon ile nişasta molekülleri viyole rengine dönmektedir. Bu metot vasküler bitkilerin anatomisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu İKİ reaksiyonundan özellikle, *Porella platyphylla* 'nın (Şekil 1.7) *Porella cordaeana* 'dan (Şekil 1.8) ayırımının zor olduğu zamanlarda faydalanılmaktadır (Piippo ve Norris, 1996).

1.1.6. Türkiye'de Yetişen *Porella* L. Türleri

Handerson kareleme (Şekil 1.9) yöntemine göre;



Şekil 1.9. Handerson Kareleme yöntemine göre *Porella* türlerinin Türkiye'deki dağılımı

★ *Porella platyphylla*, ● *Porella arboris-vitae*, ★ *Porella baueri*, ☾ *Porella cordaeana*
Porella pinnata L. ★

Porella arboris-vitae (With.) Grolle

Türkiye'de (A2, B6, C11) bölgelerinde; dünyada ise Fransa, İngiltere, İtalya, İspanya, Kuzey Afrika, Çin ve Kafkasya'da bulunmaktadır. Yetişme yeri genellikle gölgelenmiş nemli kireç taşları

ve silisli kayalar olarak belirlenmiştir. Bu türün nadiren ağaç kök ve gövdeleri üzerinde gelişebildiği rapor edilmiştir (Şekil 1.10) (Gökler, 2015).



Şekil 1.10. *Porella arboris-vitae* (With.) Grolle

(http://www.biopix.com/bitter-scalewort-porella-arboris-vitae_photo-86182.aspx)

***Porella baueri* (Schiffn.) C. E O. Jensen**

Türkiye (B6, C11) bölgelerinde, dünyada ise Orta ve Kuzey Avrupa'da bulunmaktadır (Şekil 1.11). Çoğunlukla yaprak döken ağaçların kök ve gövdeleri üzerinde, seyrek olarak da uçurum kenarlarında yayılış gösterdiği belirlenmiştir (Gökler, 2015).



Şekil 1.11. *Porella baueri* (Schiffn.) C. E O. Jensen, Dünya üzerinde dağılımı

***Porella cordaeana* (Huebener) Moore**

Türkiye'de (A1, A2, A4, B6, B7, C11, C13) bölgelerinde; dünya üzerinde ise Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve adaları, İskandinav ülkeleri, Kuzey Afrika, Orta ve Batı Asya ve Kuzey Amerika'nın batı kesiminde yayılış göstermektedir (Şekil 1.12) (Özenoğlu Kiremit, Genellikle nemli silisli kayalar üzerinde, dere kenarlarında, seyrek olarak da ağaç gövdesi ve kökleri üzerinde bulunmaktadır. Diğer türlere oranla daha yükseklerde yer alabilirler fakat asla orman üst sınırını geçmezler (Özenoğlu Kiremit ve ark., 2007; Gökler, 2015).



Şekil 1.12. *Porella cordaeana* (Hubener) Moore, Dünya üzerinde dağılımı

***Porella platyphylla* (L.) Pfeiff.**

Türkiye'de (A1, A2, A3, A4, A5, B6, B7, C11, C12, C13) bölgelerinde; dünya üzerinde ise Avrupa, Akdeniz ülkeleri, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika, Faroe, Azor ve Kanarya Adalarında bulunmaktadır (Şekil 1.13). Uzun boylu ağaçların kök ve gövdeleri üzerinde, dere kenarlarında bulunan kalkerli ve silisli kayaların çevresinde yaygın olarak yetişmektedir. Diğer *Porella* türlerine oranla, çevreye olan toleransının fazla olması nedeniyle ülkemiz genelinde dağılım alanı oldukça geniştir (Özenoğlu Kiremit ve ark., 2007).



Şekil 1.13. *Porella platyphylla*'nın Dünya üzerinde yayılışı ve yetiştiği yerler

***Porella pinnata* L.**

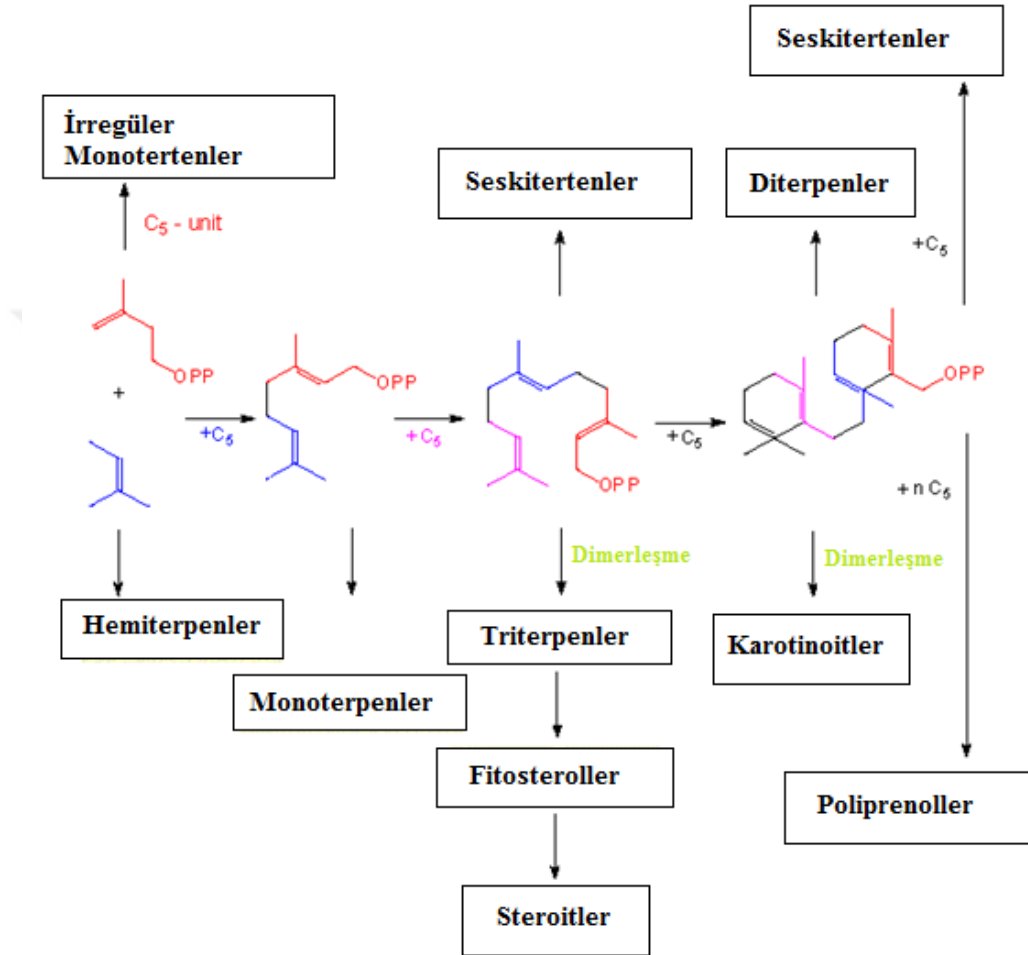
Türkiye'de (C12) bölgesinde rastlanmış olup; Dere yatağı içi ve kenarları gibi oldukça nemli alanlarda bulunan kayaların yüzeyinde, ağaçların kök ve gövdeleri üzerinde görülebilen bir türdür. Bazı ortamları tercih eden bitkilerdir (Özenoğlu Kiremit, 2005; Özenoğlu Kiremit ve ark., 2007). Dünya'da ise; Avrupa, Akdeniz Ülkeleri, Kuzey ve Orta Asya, Kuzey Afrika, Küba ve Kuzey Amerika'da yayılış gösteren bir türdür (Özenoğlu Kiremit, 2005).

Porella obtusata (Taylor) Trevis (Gökler, 2004) hakkında yeterli bilgi kaynaklarda bulunamamıştır.

1.2. Fitokimyasal Çalışmalar

Ciğerotları üzerinde, günümüze kadar yapılan fitokimyasal çalışmalar sonucunda sekonder metabolitleri ile çok geniş bir çeşitliliğe sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu metabolitlerden; mono-, seski- ve diterpenlerin varlığı ve bununla birlikte triterpenik bileşiklerin bulunduğu ve nadir de olsa azot içeren bileşiklere de rastlandığı bilinmektedir (Asakawa, 2008).

Genel olarak terpenik bileşiklerin bitkilerdeki oluşumlarını daha iyi anlayabilmek için, biyosentezine ait şema Şekil 1.14' te verilmiştir:



Şekil 1.14. Terpenik bileşiklere ait basit biyosentetik şema

1975-2011 yılları arasında, 29 *Porella* türü kimyasal olarak araştırılmıştır. Çizelge 1.1.'de yer alan bu bileşikler *Porella* türlerinde ya saptanmış (teşhis edilmiş) ya da izole edilmiştir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

Çizelge 1.1. Üzerinde çalışılan *Porella* türlerinin fitokimyasal bileşimi (1975'ten günümüze)
(Ludwiczuk ve ark., 2011)

No	<i>Porella</i> türleri	Bileşikler
1	<i>Porella acutifolia</i> ssp. <i>tosana</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler
2	<i>Porella arboris-vitae</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler
3	<i>Porella baueri</i>	Flavonoidler
4	<i>Porella bolanderii</i>	Flavonoidler
5	<i>Porella caespitans</i> ssp. <i>setigera</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler
6	<i>Porella camphylophylla</i>	Monoterpenler, Diterpenler
7	<i>Porella canariensis</i>	Seskiterpenler
8	<i>Porella capensis</i>	Flavonoidler
9	<i>Porella cordaeana</i>	Seskiterpenler, Flavonoidler
10	<i>Porella densifolia</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler
11	<i>Porella densifolia</i> ssp. <i>appendiculata</i>	Seskiterpenler, Diterpenler, Steroitler
12	<i>Porella densifolia</i> var. <i>fallax</i>	Seskiterpenler, Diterpenler
13	<i>Porella elegantula</i>	Seskiterpenler, Diterpenler, Steroitler
14	<i>Porella fauriei</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler
15	<i>Porella gracillima</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler
16	<i>Porella grandiloba</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler
17	<i>Porella japonica</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler
18	<i>Porella navicularis</i>	Seskiterpenler, Diterpenler
19	<i>Porella obtusata</i> ssp. <i>macroloba</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler
20	<i>Porella perrottetiana</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler
21	<i>Porella platyphylla</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler, Flavonoidler, Steroitler
22	<i>Porella platyphylloidea</i>	Flavonoidler
23	<i>Porella recurva</i>	Seskiterpenler
24	<i>Porella roellii</i>	Seskiterpenler
25	<i>Porella squamurifera</i>	Seskiterpenler, Steroitler
26	<i>Porella stephaniana</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler, Diterpenler
27	<i>Porella subobtusata</i>	Seskiterpenler
28	<i>Porella swartziana</i>	Seskiterpenler, Steroitler
29	<i>Porella vernicosa</i>	Monoterpenler, Seskiterpenler

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise *Porella* türlerinin 6 kemotipinin olduğundan söz edilmektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011). Bu sınıflandırma ise; driman, sakkulatan, pinguisan-sakkulatan, guaian-germakran, pinguisan, afrikan tipi terpenik yapılara dayanarak yapılan bir sınıflandırmadır.

Ciğerotları, dünya genelinde yaklaşık 5000-6000 tür ile temsil edilen, nispeten küçük bir bitki grubu olarak göze çarpmaktadır. Bununla birlikte, ciğerotları içindeki sekonder metabolitlerin içeriği ve çeşidi son derece fazladır, dolayısıyla bu bitkiler kimyasal olarak kompleks bir yapı ile karakterize edilmektedir. Bu yapı çeşitliliği, ciğerotlarının kemosistematik sınıflandırılması için kullanılabilir. Porellaceae familyası, özellikle seskiterpen ve diterpen kompozisyonu açısından kimyasal olarak çok çeşitli bir grubun örneğidir. *Porella* cinsinin, basitçe acı ve acı olmayan türler

olarak 2 gruba ayrıldığından daha önce söz edilmişti. Bunların birincisi, drimane tipi seskiterpen dialdehit, poligodial varlığı ile karakterize edilen *P. vernicosa* kompleks'e ait olan (kemotip I) olup, bunların dışında kalan diğer beş grup ise kemotip II-VI olarak belirlenmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. *Porella* türlerinden izole edilen seskiterpen ve diterpenler (Ludwiczuk ve ark., 2011)

Tip	Porella Türleri	Seskiterpenler									Diterpenler		
		DRI	PIN	ARO	GE R	GUA	AFR	MO N	S A N	E L E	SAK	LA B	KAU
I	<i>Porella arboris-vitae</i>	+++++	+	+									
	<i>Porella canariensis</i>	+	+	+									
	<i>Porella fauriei</i>	++											
	<i>Porella gracillima</i>	+++	++++	++									
	<i>Porella obtusata</i> subsp. <i>macroloba</i>	+++	++++	++									
	<i>Porella roellii</i>	+++											
	<i>Porella vernicosa</i>	+++	+	+									
II	<i>Porella camphylophylla</i>									+			
	<i>Porella perrottetiana</i>									++	++		
	<i>Porella stephaniana</i>								+	+			
III	<i>Porella elegantula</i>		++							+			
	<i>Porella grandiloba</i>		++++				+	+		+			
	<i>Porella navicularis</i>		++++						+	+		+	
	<i>Porella platyphylla</i>		++++								++++		
IV	<i>Porella acutifolia</i> subsp. <i>tosana</i>		++++	+	++	++				+	+		
	<i>Porella japonica</i>		++	++	++	++++				+	+		
V	<i>Porella cordaeana</i>	++	++++					+++		+			
	<i>Porella densifolia</i>		+++	+									++++
	<i>Porella recurva</i>		++										
IV	<i>Porella caespitans</i> subsp. <i>setigera</i>			+			++		+	+			
	<i>Porella subobtusata</i>						+++	++	+				
	<i>Porella swartziana</i>			+	++	++	++++		+				

DRI – Drimane; PIN – Pinguisan; ARO – Aromadendran; GER – Germacran; GUA – Guaian; AFR – Afrikan; MON – Monosiklofarnesan; SAN – Santalan; ELE – Eleman; LAB – Labdan; SAC – Sakkulatan; KAU – Kauran

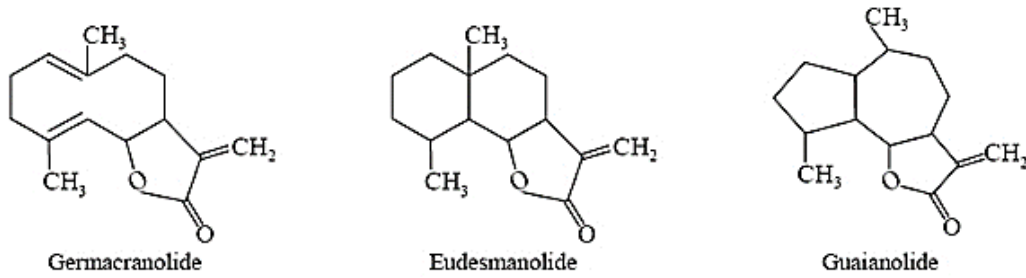
1.2.1. Monoterpenler

Porella türleri genellikle ezildiklerinde bir koku hissedilmekte ve bu genellikle monoterpen hidrokarbonlarından kaynaklandığı bilinmektedir (Asakawa, 2001). En sık bulunan monoterpenler; α -pinen, β -pinen, kamfen ve limonen olarak belirlenmiştir (Asakawa, 1982). Bir çok *Porella* türünde aynı tür monoterpen bulunduğu için, bu monoterpenlerin kemosistematiğe, bu türleri belirleyici olarak kullanılmasının oldukça zor olduğundan bahsedilmektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

P. densifolia subsp. *appendiculata*'nın metanollü ekstresinden α -pinen, β -pinen, kamfen, α -terpinen ve *p*-simen adlı monoterpenoitler izole edilmiştir (Asakawa ve ark., 1986). *P. platyphylla* monoterpenlerin varlığı ile bilinir; α -terpinen en çok bulunan bileşenidir (Ludwiczuk ve ark., 2011). *P. caespitans* subsp. *setigera*'nın eter (Et₂O) ile elde edilen ekstresinden kamfen, β -pinen, kalamenen monoterpenleri teşhis edilmiştir (Asakawa ve ark., 1980).

1.2.2. Seskiterpenler

Monoterpenlerle beraber *Porella* cinsine ait türlerde seskiterpenler (Şekil 1.15) de bulunmakta ve bunların çok sayıda farklı yapıya sahip oldukları bilimektedir. Genellikle yapıları; afrikanlar, aromadendranlar, drimanlar, germakranlar, guinanlar, monosiklofamesanlar, pinguisanlar, santalanlar ve diğer minör seskiterpenler olarak bilinmektedir (Toyota ve ark., 1989, Ludwiczuk ve ark., 2011).



Şekil 1.15. Başlıca seskiterpenik yapılara örnekler

En büyük grup olan ve Tip-I olarak da bilinen, acı lezzetli ciğerotlarının [*P. arboris-vitae*, *P. canariensis*, *P. fauriei*, *P. gracillima*, *P. obtusata* var. *macroloba*, *P. roellii* and *P. vernicosa* (*P. vernicosa* kompleksi)] driman tipi seskiterpenleri (Poligodial vb.) ürettikleri anlaşılmıştır. Bu türler poligodial dışında, sinnamolit, drimeninol ve drimenini çok yaygın olarak içermektedir (Asakawa, 1982). *P. vernicosa* kompleksi de güçlü acı maddeleri taşımakta ve kompleksteki bu acılık (–)-polygodial bileşiğine bağlı olarak meydana geldiği bilinmektedir (Asakawa, 2007).

Aromadendran-tipi ile birlikte seskiterpenik siklokolorenonun yanı sıra drimanlarla birlikte pinguisane tipi seskiterpenler, Tip-I'e ait yedi türden beşinde saptanmıştır. Günümüze kadar sadece driman tipi seskiterpenler, *P. fauriei* ve *P. roellii*'de bulunmaktadır (Ludwiczuk ve ark., 2011). *P. roellii*'de yine aristolan tip seskiterpenlerin de mevcut olduğu belirtilmektedir (Asakawa, 1995).

Kültüre alınarak üretilen *P. vernicosa* Lindb.'in bu kültürden hazırlanan eterli ekstresinde, acı lezzete sahip olan seskiterpen dialdehit, poligodial (% 20.3), başlıca metabolit olarak tespit edilmiştir. İkinci ana metabolit norpinguisonmetilester (% 18.7) olup, ek olarak β -bisabolen (%12.7), drimenol (% 8.4), siklokolorenon (% 7.5) ve diğer driman ve pinguisan seskiterpenler, GC/MS analizi ile tespit edilmiştir. Bu tespit edilen bileşiklere, norpinguison (% 24.5), poligodial (% 21.7) ve siklikolorenon (% 13.4) da eşlik etmiştir. Dolayısıyla, *in vitro* ortamda kültürlen *P. vernicosa* tarafından üretilen metabolitlerin karışımındaki poligodial içeriği, doğal ortamda yetişen bitkiye benzer olarak elde edilmiştir (Ono ve ark., 1996).

P. fauriei'nin eter ile elde edilen ekstresinden aristolan isimli seskiterpen de izole edilmiş fakat minör olarak bulunmuştur (Asakawa ve ark., 1980).

P. canariensis'in diklorometan (CH_2Cl_2) ile elde edilen ekstresinden 6 tane pinguisan tipi diterpen; α -pinguisen, pinguisenol, 7-keto-pinguisenol-12-oikasit metilester, deoksopinguison, deoksopinguison-12-oik asit metil ester ve deoksopinguison-15-oik asit metil ester, 2 tane norpinguisan: norpinguison ve norpinguison metilester ve spiropinguisan pitikanolit izole edilmiştir. Drimanlardan; isodrimeninol, drimenin, sinnamolit ve acı olan poligodial içeriği bulunmuştur. Norpinguison ve ent-siklokolorenon ise bu ciğerotunun majör bileşikler olarak tespit edilmiştir (Cullmann ve Becker, 1999). *P. canariensis*'in metanollü ekstresinden pinguisan tip artefakt ve bu tip için bilinen 4 tip seskiterpen olan; ent-siklokolorenon, sinnamolit, cis-dihidrosinnamolit ve isodrimeninol elde edilmiştir (Nagashima ve ark., 1996a)

Sakkulatan tip diterpenlerin yanı sıra çok miktarda pinguisan tipi seskiterpenleri üreten birkaç *Porella* türü vardır. Bunlar *P. platyphylla*, *P. navicularis*, *P. grandiloba*, *P. elegantula*'dır. Bu 4 tür, sakkulatan-pinguisan Tip (III)'e dahil edilmektedir. *P. grandiloba*'nın ana bileşenleri

perrottetianal A ve norpinguisan metil esterdir. Perrottetianal A ayrıca pinguisane tipi norseskiterpenler ile birlikte *P. elegulus*'da bulunmuştur. *P. platyphylla* seskiterpenleri pinguisanları içerirken, diterpenleri ise sakkulatanları içermektedir. *P. navicularis*, pinguisan ve norpinguisan türevlerini üretmektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011). *P. grandiloba*'nın eterli ekstresinden pinguisan-tipi seskiterpenlerden; grandilobalit A, B, ve 6 α -hidroksi-4,8-dimeotoksikarbonil-pinguis-11,6-olit ve grandilobalit C elde edilmiştir (Tazaki ve ark., 1998).

P. navicularis'in eterli ekstresinden pinguisan tip seskiterpenler izole edilmiştir. Bunlar; 5-pinguisen-11-ol, 6 α -metoksi-pinguis-5(10)-en-11,6-olit, 6 α -metoksi-pinguis-5(10)-en-11,6-olid-15-karboksilik asit ve 5 α ,10 α -epoksi-pinguisan-11,6-olit-15-karboksilik asit metilesterdir (Bungert ve ark., 1998).

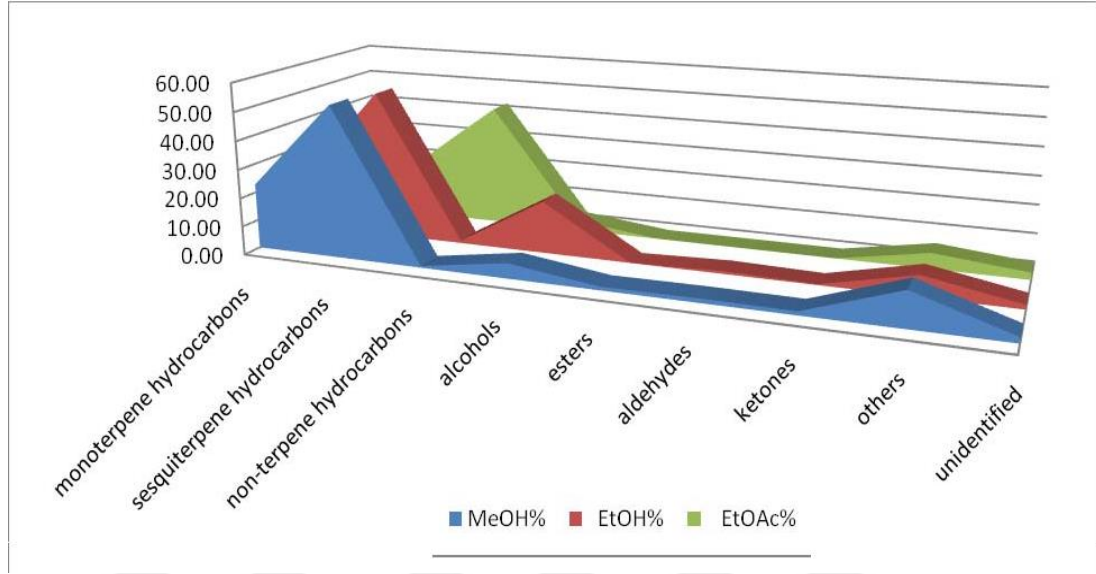
Sakkulatan tip diterpenlerin yanı sıra çok miktarda pinguisan tip seskiterpenler üreten *P. japonica* ve *P. acutifolia* subsp. *tosana* Tip-III'e benzer bileşikler içermekle beraber çok karakteristik guaian-germakran tipi seskiterpen laktonları biyosentezledikleri için, bu iki bitki Tip-III'ten ayrılmıştır (Ludwiczuk ve ark., 2011). Germakranolitler ve guaianolitler kemotip (IV)'e ait en karakteristik bileşiklerdir (Ludwiczuk ve ark., 2011). *P. acutifolia* subsp. *tosana*'nın eterli ekstresi ile yapılan deneylerde *P. japonica* türü ile çok benzer bir içeriğe sahip oldukları bulunmuştur. Her iki tür de aynı pinguisanları, sakkulatanları ve guaia-12,6-olitleri ürettikleri için kimyasal olarak birbirlerine çok benzer, ancak germakranolit bileşenlerinde *P. acutifolia* subsp. *tosana* 12,8-olitler sentezlerken, *P. japonica* 12,6-olitler üretir. Yine aynı deneyde *P. acutifolia* subsp. *tosana*'nın içeriğindeki 4 α ,5 β -epoksi-8-epi-inunolit maddesinin daha öncesinde Compositae familyasına ait bir bitkiden de elde edildiği anlaşılmıştır (Toyota ve ark., 1991). *P. acutifolia* subsp. *tosana*'nın eterli ekstresinden 2 tip pinguisan seskiterpen izole edilmiş olup; bunlar bisakutifolon A ve B'dir (Hashimoto ve ark., 1998b). Kochi, Japonya'da toplanan *P. acutifolia* subsp. *tosana*'nın eterli ekstresinden Diels-Alder reaksiyonu ile, pinguisane dimerleri (Bisakutifolonlar A-C) başka hiç bir *Porella* türünden izole edilmemiştir. Pinguisanlar, sakkulatanlar, germakranolitler de tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu içerikte guaianlar ve hidroperoksi germakranolidlerin varlığı doğrulanmamıştır. Japonya/Tokushima'da yetişen ve burdan toplanan yukarda bahsedilen ciğerotlarının hidroperoksigermakranolit grubu bileşikleri keskin tadından sorumlu olarak bulunmuştur (Hashimoto ve ark., 2000).

Tip (IV)'e giren *P. japonica*'nın eter ile elde edilen eksterinde kaespitenon ve aristolon minör madde olarak bulunmuştur (Asakawa ve ark., 1980).

P. recurva ve *P. cordaeana*'nın yanı sıra *P. densifolia* subsp. *appendiculata* ve *P. densifolia* var. *fallax* Tip-V, pinguisanları ana bileşenler olarak üretir. Pinguisan tipi seskiterpenler *Porella* cinsinde yaygındır, ancak bu gruba ait türlerin pinguisanların yanı sıra daha fazla seskiterpen üretmediği de görülmektedir (Asakawa ve ark., 1986; Ludviczuk ve ark., 2011).

P. recurva'nın diklorometan ile elde edilmiş ekstresinden sadece norpinguisanlardan; norpinguison metil ester, norpinguison, 6,11-epoksi-15-nor-3,4-diokso-5,10-pinguisadien-12-asetat, 6,11-epoksi-15-nor-4-okso-5,10-pinguisadien-12-asetat izole edilmiştir (Klink ve ark., 2002).

P. cordaeana'nın bütanollü ($C_4H_{10}O$) ekstresinden monosiklofarnesan tipi seskiterpenoid striatenon ve drimanlar da tespit edilmiştir (Harrigan ve ark., 1993). *Porella cordaeana*'nın diklorometan ile elde edilen ekstresinden porellapinguisanolide, porellapinguisenon, spiropinguisanin isimli seskiterpenoidler elde edilmiştir (Toyota ve ark., 1989). *P. cordeana*'nın bütanonlu ekstresinde de aristolan tip seskiterpenlere rastlanmıştır (Harrigan ve ark. 1993). *P. cordeana*'nın bütanon ile elde edilen ekstresinden drimenin, 7 ketoisodrimenin ve 7-ketoisodrimenin-5-en elde edilmiş olup (Harrigan ve ark., 1993); Avrupa'dan toplanan aynı türün diklorometan ile elde edilen ekstresinde de yine bu maddelerin bulunduğu bahsedilmektedir (Şekil 1.16'da *P. cordaeana*'nın ekstrelerinden izole edilen bileşikler gösterilmiştir.) (Toyota ve ark., 1989).



Şekil 1.16. *Porella cordaeana* ekstrelerinde kimyasal grupların dağılımı (Bukvicki ve ark., 2012)

Afrikan tipi seskiterpenler, *Porella* türlerinde son grup olarak yer alırlar. Bu sınıf bileşiklerin yapısı çok nadirdir ve bu kemotipin ilk türü *P. swartziana*'dır. Kolombiya ve Arjantin'den toplanan *P. swartziana*'nın eterle ve sonrasında metanolla elde edilen ekstresinde geniş bir biseskiterpen aralığı tespit edilmiştir. Bunlardan afrikan grubuna dahil olanlar; kaespitenon, svartzianin A, svartzianin B'dir. Sekoafrikan olarak; sekovartzianin A ve sekosvartzianin B; norafrikanlar olarak da; norsekosvartzianin ve dehidroksi norsekosvartzianin içermektedirler (Tori ve ark., 1996; Mitre ve ark., 2004). Farklı olarak, bir lepidozane-tip seskiterpen alkol de *P. swartziana*'dan izole edilmiştir (Asakawa, 1995).

P. subobtusa kimyasal olarak *P. caespitan*'a benzemektedir. Çünkü her iki tür de afrikan ve santalan türevi bileşikleri üretmektedir (Asakawa ve ark., 1980). Kaespitenon, 14-asetoksikaespitenon, svartzianin A, sekosvartzianin A ve sekosvartzianin B'nin varlığı Japonya'dan toplanan *P. subobtusa*'nın eterli ekstresinde tespit edilmiştir (Nagashima ve ark., 1996a). *P. subobtusa*'nın yine eterli ekstresinden lepidozan-tipi seskiterpenler de izole edilmiştir (Nagashima ve Asakawa, 2001). *P. swartziana*'nın aksine, *P. subobtusa* germakranları ve guaianları üretmez, santalanlardan; α -santalen ve α -santalen-(12S),13-diol ve monosiklofarnesan

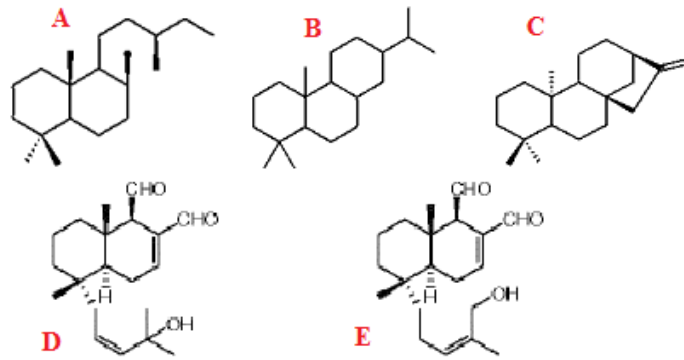
dehidro- β -monosiklonerolidol ve 8-hidroksi-9-metoksi- β -monosiklonerolidol'ü içermektedir (Nagashima ve ark., 1996a).

Aristolan-tip seskiterpenler ciğerotlarında nadir bulunmaktadır. *P. caespitans* var. *setigera* 'da ent-aristolon varlığı saptanmıştır (Asakawa, 1995). *P. caespitans* subsp. *setigera* 'nın eter ile elde edilen ekstresinde kaespitenon majör madde olarak bulunmuştur (Asakawa ve ark. 1980). Afrikanlar dışında, guaianler (guaisvartzianin A, guaisvartzianin B) ve germakran tip (germakrasvartzianin) seskiterpenlerde ayrıca izole edilmiştir (Nagashima ve Asakawa, 2001).

Arjantin'de endemik olarak bulunan *P. chilensis* 'in önce eter, sonrasında ise metanol ile ekstraksiyonu yapılmış ve pinguisan-tipi seskiterpenler ile aromadendran-tip seskiterpenler izole edilmiştir (Gilabert ve ark., 2011).

1.2.3. Diterpenler

Diterpenlerin (Şekil 1.17) arasında sakkulatan tipi diterpenik bileşiklerin çok yaygın olması ile birlikte, labdanlar ve kauranlar da birkaç türde bulunmaktadır. *Porella* türlerinde nadiren de olsa diğer bileşiklere (steroitler ve flavanoitler) de rastlanmaktadır (Ludwiczuk ve ark., 2011).



Şekil 1.17. Başlıca diterpen yapıları: A: Labdan, B: Abietan, C: *Ent*-Kauren, D: 18-hidroksisakkulatal, E: 19-hidroksisakkulatal

Tip (II)'ye ait ciğerotları karakterteristik sakkulatan tipi diterpenleri barındırırlarlar. *Porella kamfifilya*, *P. perrottetiana* ve *P. stephaniana*, ana bileşen olarak perrotantianal A üretmektedirler (Asakawa, 1982). *P. perrottetiana*'dan Perrottetianal B ve sakkulaporellin tespit edilmiştir (Asakawa, 1982). *P. perrottetiana*'nın eterli ekstresinde ayrıca labdan tipi diterpenlere ve (-)- α -ödesmole de rastlanmıştır (Toyota ve ark., 1999). Ayrıca, eterli ekstersinden sakkulatan-tipi bir diterpen olan hemiasetal izole edilerek yapısı aydınlatılmıştır (Asakawa ve ark., 1990). *P. perrottetiana*'nın yanı sıra *P. stephaniana*'da da bol miktarda alkol yapısında bileşikler bulunmaktadır. *P. stephaniana*'nın dietileterli ekstresinde majör bileşik olarak (-)- α -ödesmol bulunmuştur (Asakawa ve ark., 1980).

P. acutifolia subsp. *tosana*'nın eterli ekstresinden çeşitli diterpenler elde edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Hashimoto ve ark., 2000). *P. acutifolia* subsp. *tosana* (Toyota ve ark., 1991), *P. caespitans* var. *setigera* (Asakawa, 1995), *P. cordaeana* 'nın diklorometanlı ekstresinden (Toyota ve ark., 1989), *P. elegantula* 'nın eterli ve petroleterli ekstrelerinden (Asakawa ve Campbell, 1982; Fukuyama ve ark., 1988), *P. navicularis* 'in metanollü ekstresinden (Fukuyama ve ark., 1988) dialdehit yapısında diterpenler izole edilmiştir.

P. densifolia var. *fallax* 'ın metanollü ekstresinden ent-kauren, ent-11 α -hidroksikauren-15-on ve (16R)-ent-11 α -hidroksikauran-15-on bulunmuş, fakat birbirine çok benzeyen *P. densifolia* subsp. *appendiculata* 'da bu diterpenlerin varlığına rastlanamamıştır (Asakawa ve ark., 1986). Metanollü ekstresinden izole edilen striaten ve striatol; *P. densifolia* subsp. *appendiculata* ve *P. densifolia* var. *fallax*'da kauran tipi diterpenlerle birlikte bulunmaktadır. Araştırılan tüm *Porella* türleri arasında kauran yapısında olanlar sadece *P. densifolia*'dan izole edilmiştir. Hindistan'dan toplanan *P. densifolia* subsp. *appendiculata* 'dan ent-kauren-15-on-18-oik asit, ent-18-hidroksikauren-15-on ile birlikte izole edilmiştir. *P. densifolia* subsp. *appendiculata* 'nın metanollü ekstresinden de kauren, 15-hidroksikauren ve kauren-15-on elde edilmiş ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır (Asakawa ve ark., 1986).

P. platyphylla diterpenleri genellikle sakkulatanları içermektedir (Ludwiczuk ve ark., 2011).

Arjantin koleksiyonunda endemik olan *Porella chilensis*'in önce eter, daha sonra metanol ile ekstre edilmiş olan ekstresinden fusikokan tipi diterpenler izole edilmiştir (Gilabert ve ark., 2011).

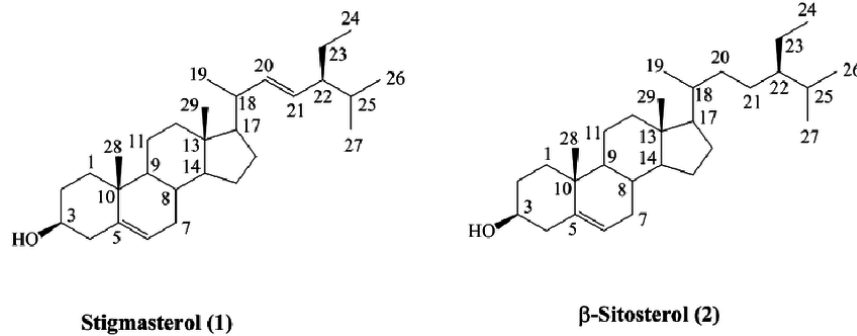
P. roellii'nin eterli ekstresinden dehidroabietik asit izole edilmiştir ve bu o zamana kadar bryofitlerden elde edilen ilk abietan-tipi diterpen olarak kaydedilmiştir (Asakawa, 1995).

1.2.4. Flavonoidler

Flavonoidlerin dağılımı, *Porella* türlerinde oldukça çeşitlilik göstermektedir. *Porella* türleri grup olarak flavonları daha fazla içermektedir. Türlerle bağlı olarak nitel ve nicelik bakımından farklılık gösterir. Örneğin, Avrupa'nın çeşitli bölgelerinden 16 farklı lokaliteden toplanan *P. platyphylla*'nın flavonoid içerikleri şaşırtıcı derecede farklıdır (Asakawa, 1995). *P. platyphylla*'nın metanol ile elde edilen ekstresinden saponarin, isoviteksin ve yine flavon yapısında olmak üzere bazı bileşikler izole edilmiştir (Nilsson, 1973). Bununla birlikte bu gruba ait olan çok fazla bileşikten söz edilmemektedir.

1.2.5. Steroitler

Neredeyse bütün ciğerotları, kamfesterol (=24 α -metilkolesterol), stigmasterol (=24 α -etilcolesta-5,22-dien-3 β -ol) ve sitosterolü (=24 α -etilcolest-5en-3 β -ol) (Şekil 1.18) içermektedir. *Porella*'da kolesterol, brassikasterol ve kampesterilbehenat daha önceleri tespit edilmiştir (Asakawa, 1995).



Şekil 1.18. Steroit yapısında bileşikler (1) Stigmatreol, (2) β -Sitosterol

P. densifolia subsp. *appendiculata*'nın metanollü ekstresinden kampesterol, stigmasterol and sitosterol gibi steroidler izole edilmiştir (Asakawa ve ark., 1986).

P. platyphylla 'nın eterli ekstreseinden ketosteroidlerden, stigmast-4,22-dien-6-ol-3-on ve stigmast-4-en-6 β -ol-3-on elde edilmiştir. Mevcut çalışmada, ekstrelerin GC profilleri incelenmiş ve bazı olağandışı bileşikler tespit edilmiştir. Fitosterenler nadir bulunan bileşikler olup, *Porella platyphylla* gibi ilkel yapılı bir bitkiden ilk defa izole edilmiştir. *P. platyphylla*'dan elde edilen ketosteroidler daha önceleri yüksek bitkilerde ve deniz organizmalarında tespit edilmiş olan bileşiklerdendir (Tosun ve ark., 2015).

1.2.6. Sülfür İçeren Bileşikler

Ciğerotlarının kurutulması sırasında, su yosunlarının kokusuna benzer bir koku meydana gelmektedir. Deniz yosunlarının önemli belirteçlerinden biri olan dimetil sülfid *P. cordeana*'dan GC/MS ve FDP dedektörlü GC sistemi ile saptanmıştır (Toyota ve ark., 1989).

1.3. Biyolojik Aktivite ve Bazı Toksisite Çalışmaları

Ciğerotları üzerine yapılan araştırmalar sonucu bu bitkilerin çok çeşitli ve önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Çeşitli türler üzerinde yapılan biyolojik aktiviteye ait olan çalışmalara ve deney sonuçları, örnekler verilerek aşağıda gösterilmiştir:

1.3.1. Alerjik Kontakt Dermatit

Frullania asagrayana, *F. bolanderi*, *F. dilatata*, *F. eboracensis*, *F. franciscana*, *F. infata*, *F. kunzei*, *F. nisquallensis*, *F. liparia*, *F. tamarisci*, *Marchantia polymorpha*, *Metzgeria furcata*, *Radula complanata* ve *Schistochila appendiculata* gibi ciğerotlarının yoğun alerjik kontakt dermatite neden oldukları bilinmektedir (Asakawa ve ark., 1987). Özellikle, *Frullania* türlerinin dikkate değer alerjik özellikleri vardır. *Frullania* türlerinde alerjiyi oluşturan bileşikler,

seskiterpen lakton α -metilen- γ -lakton grubudur (Asakawa, 1982). *Frullania*'ya duyarlı olan hastaların, *Frullania*'dan izole edilen (+)-frullanolit ve (-)-frullanolit'e eşit derecede ve kuvvetli tepki gösterdikleri (Şekil 1.19) tespit edilmiştir (Asakawa, 1982).



Şekil 1.19. *Frullania tamarisci* subsp. *tamarisci*'nin neden olduğu alerjik kontakt dermatit

Yeni Zelanda'dan toplanan *Schistochila appendiculata*'nın da alerjik etkilerin olduğu saptanmıştır. *S. appendiculata*'nın metanollü ekstresinden elde edilen alkil fenol ve uzun zincirli akilli salisilik asitler ve bunların potasyum tuzları (kateşol)'nın alerjik kontakt dermatite neden olduğu bulunmuştur (Evans ve Schmidt, 1980; Asakawa ve ark., 1987; Lepoittevin ve ark., 1989).

1.3.2. Sitotoksik Etki

Çeşitli ciğerotlarından elde edilen bazı seskiterpen laktonlar, germakronolitler ve guaianolitler, KB nazofarenjiyal ve P-388 lenfositik lösemi hücrelerine karşı sitotoksik aktivite göstermişlerdir. *Bazzania pompeana*, *Kurzia makinoana*, *Lophocolea heterophylla*, *Makinoa crispata*, *Marsupella emarginata*, *Pellia endiviifolia*, *Plagiochila fruticosa*, *P. ovalifolia*, *Porella caespitans*, *P. japonica*, *P. perrottetiana*, *P. vernicosa* ve *Radula perrottetii*'nin kuru ekstrelerinin P-388 hücreline karşı sitotoksik etkileri ($IC_{50}=4-20 \mu\text{g/mL}$) kanıtlanmıştır (Asakawa, 1995). Bunun dışında *Frullania diversitexta*, *F. ericoides*, *F. muscicola*, *F. tamarisci* subsp. *obscura*, *Lepidozia vitrea*, *Pallavicinia subciliata*, *Plagiochila sciophila*, *Spruceanthus semirepandus* ve *Trocholejeunea sandvicensis*'dan elde edilen kuru ekstrelerin ise aynı hücre kültürlerine karşı sitotoksik etkisi inaktif çıkmıştır ($IC_{50}=20 \mu\text{g/mL}$ 'den yüksektir) (Asakawa ve ark., 2013b).

Conocephalum conicum ve *Dumortiera hirsuta*'nın eterli ve metanollü ekstraktları ile *C. conicum*'dan $2\alpha,5\beta$ -dihidrokarbonan-2-sinamat ve *D. hirsuta*'dan elde edilen lunuların maddelerinin insan HepG2 hücrelerine sitotoksik etkisi kanıtlanmıştır. IC₅₀ değerleri sırasıyla; 4.5 ve 7.4 µg/mL olarak bulunmuştur (Lu ve ark., 2006).

Plagiochila türlerinin çoğu plagioşilin A içermekte ve KB hücrelerine karşı sitotoksik etkileri bulunmaktadır (0.28 µg/mL) (Asakawa ve ark., 2013b). *P. ovalifolia*'nın eterli ekstresinden izole edilen plagioşilin A, plagioşilin A-15-il oktanoat ve 14-hidroksi plagioşilin A-15-il (2E,4E)-dodekadienoat maddelerinin P-388 lösemi hücrelerine karşı IC₅₀ değerleri sırasıyla; 3.0, 0.05 ve 0.05 µg/mL olarak saptanmıştır (Toyota ve ark., 1998). *Lepidozlea vitrea*'nın etil asetatlı ekstresinin P-388 lösemi hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (IC₅₀= 2.1 µg/mL) bulunmuştur (Shu ve ark., 1994).

Hepatostolonophora paucistipula'nın etanollü ekstresinden elde edilen (-)-ent-arbuskulin ve (-)-konstulonit maddeleri P388 lösemi hücreline karşı (IC₅₀ değerleri 1.1 ve 0.7 µg/mL) sitotoksik etki göstermişlerdir (Baek ve ark., 2003).

Bazzania novae-zelandiae'nin etanollü ekstresinden izole edilen navikulil kafeat maddesinin P-388 lösemi hücrelerine karşı GI₅₀ (Kontrolün %50'sinde büyümeyi inhibe eden konsantrasyon) değeri 0.8-1.1 µg/mL olarak bulunmuştur (Burgess ve ark., 2000).

Riccardia crassa'nın etanol ile ekstresinden elde edilen rikardifenol C, BSC-1 (Afrika yeşil maymun böbrek epiteli) hücrelerine karşı 60 µg/disk konsantrasyonda sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Perry ve Foster, 1995).

Tahitili *Mastigophora diclados* eter ve metanollü ekstraktlarının sırasıyla; HL-60 hücrelerine karşı, IC₅₀ değerleri 2.4 ve 13.1 µg/mL ve KB hücrelerine karşı, 14.6 ve 32.5 µg/mL olarak bulunmuştur. Her iki ekstreden de izole edilen (-)-herberten-1,2-diol; mastigoforen C; mastigoforen D etkin maddelerinin sitotoksik etkileri sırasıyla HL-60 hücrelerine karşı IC₅₀ değerleri 2.5, 1.4, 12.8, 1.4,

2.4 µg/mL olarak saptanmıştır. KB hücrelerine karşı ise, 14.2, 3.3, 12.5, 11.8 ve 14.8 µg/mL IC₅₀ değerleri ile sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Komala ve ark., 2010).

Schistochila glaucescens'in diklorometanlı ekstresinden elde edilen glokeskenolitin, P-388 fare lösemi hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (IC₅₀=2.3 µg/mL) bulunmuştur (Scher ve ark., 2002).

Lepidolaena taylorii'nin eterde çözülebilen sitotoksik etki gösteren fraksiyonundan (P-388 hücre dizisine karşı IC₅₀ değeri= 1.3 µg/mL); 8,9-sekokauran diterpenoit, rabdoubrosanın, 16,17-dihidrorabdoubrosanın, 8,14-epoksirabdoubrosanın ve bunlarla ilişkili olan entkaur-16-en-15-on bileşiği izole edilmiştir. Ent-8,9-seko ve ent-kauren bileşikleri P-388 lösemi hücrelerine ve birkaç insan tümör hücrelerine karşı test edilmiş ve test sonucu olarak rabdoubrosanın ve 8,14-epoksirabdoubrosanın sitotoksik aktivitesi en güçlü olan bileşikler olarak tespit edilmiştir (Sırasıyla; IC₅₀ değerleri; 0.006 ve 0.27 µg/mL ve GI₅₀ değerleri ise 0.10 ve 1.2 µM) (Perry ve ark., 1996a; Asakawa ve ark., 2013b).

Marchantia emarginata subsp. *tosana*'nın metanollü ekstresinden elde edilen Marchantin A maddesinin, MCF-7 insan meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik aktivitesi IC₅₀=4.0 µg/mL olarak bulunmuştur. Western blot analizi sonucunda, Marchantin A'nın aktif olarak bir kaspaz (Programlı hücre ölümüne yol açan bir enzim) bağımlı olarak aracılığı ile MCF-7 hücrelerinin apoptozisini başlattığını göstermiştir (Huang ve ark., 2010).

Trichocolea lanata ve *Trichocolea tomentella*'nın etanollü ekstresinden elde edilen tomentellinin Afrikalı yeşil maymunların böbrek epitel hücrelerine (BSC-1) karşı 15 µg/mL'de sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur (Perry ve ark., 1996b).

Jungermannia türlerinin eterli ekstresinden elde edilen *ent*-kauren ve diğer farklı kauren tipi bileşiklerin HL-60 hücrelerine karşı (IC₅₀ değerleri= 0.49, 7.0, 0.59 ve 0.28 µM) aktif oldukları tespit edilmiştir (Nagashima ve ark., 2003).

Jungermannia türlerinden elde edilen jungermanenonlar (A-D) olarak isimlendirilen bileşikler insan lösemi hücrelerine (HL-60) karşı sitotoksik aktivite göstermiş olup, IC₅₀ değerleri sırasıyla; 1.3, 5.5, 7.8, and 2.7 µM olarak kaydedilmiştir (Kondoh ve ark., 2005).

1.3.3. Antimikrobiyal Etki

Bazzania türleri, *Conocephalum conicum*, *Diplophyllum albicans*, *Dumortiera hirsuta*, *Marchantia polymorpha*, *Metzgeria furcata*, *Lunularia cruciata*, *Pellia endiviifolia*, *Porella vernicosa* kompleks, *P. platyphylla*, *Plagiochila* gibi bazı ciğerotlarının antimikrobiyal etkisi bulunmuştur (Asakawa, 1995).

Bir diğer çalışmada, *Marchesinia mackaii*'nin hem distilasyon (Clevenger tipi aperey) hem de ekstraksiyonun eşlik ettiği (Likens-Nickerson tipi aperey) bir yöntemle elde edilen uçucu yağlarının *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica*'ya karşı antimikrobiyal etkisi tespit edilmiştir (Figueiredo ve ark., 2002).

Ayrıca, *Pellia endiviifolia*'dan elde edilen sakkulatal tipi bir diterpen, *Streptococcus mutans* (diş çürüğüne neden olan organizma)'a karşı (LD₅₀=8 µg/mL) antibakteriyel etki göstermiştir (Asakawa ve ark., 2013b). *Dumortiera hirsuta*'dan elde edilen lunularin etkin maddesi de *Pseudomonas aeruginosa*'ya 64 µg/mL'de antimikrobiyal olarak etki etmiştir (Lu ve ark, 2006).

Yapılan başka bir çalışmada da, *Lepidozia fauriana*'dan elde edilen lepidozenolit metisiline dirençli *Staphyococcus aureus*'a 100 µg/mL'de pozitif cevap vermiştir. *Candida albicans* ve *Trichomonas feetus*'ü de 100 µg/mL inhibe edici etki göstermiştir (Shu ve ark., 1994).

Riccardia crassa'nın etanollü ekstresinden izole edilen rikkardifenol C maddesi *Bacillus subtilis*'e karşı 60 µg/disk konsantrasyonda antibakteriyel etki göstermiş olup, antifungal olarak *Candida albicans* veya *Trichophyton mentagrophytes* bir etkisi bulunamamıştır (Perry ve ark., 1995). *Schistochila glaucescens*'in diklorometanlı ekstresinden elde edilen glokeskenolit maddesi *Trichophyton mentagrophytes*'e karşı antifungal etkilidir (Scher ve ark., 2002). *Paraschistochila*

pinnatifolia'dan elde edilen ent-1- β -hidroksikauran-12-on ise *Candida albicans*'a karşı düşük bir antifungal aktivite göstermiştir (Lorimer ve ark., 1997).

Birçok *Marchantia* türünden elde edilen markantin A bu ciğerotu için önemli bileşiklerden bir tanesi olarak bilinmektedir. Bu türlerden; *Marchantia chenopoda*, *M. polymorpha*, *M. paleacea* var. *diptera*, *M. plicata*, ve *M. tosana* türleri; *Acinetobacter calcoaceticus*'a [minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) 6.25 μ g/mL] *Alcaligenes faecalis* (100), *Bacillus cereus* (12.5), *B. megaterium* (25), *B. subtilis* (25), *Cryptococcus neoformans* (12.5), *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (100) ve *Staphylococcus aureus* (3.13-25)'a karşı antibakteriyel etki göstermişlerdir (Asakawa, 1995). Bunlar aynı zamanda *Alternaria kikuchiana*, *Aspergillus fumigatus* (MIC 100 μ g/mL), *A. niger* (25–100), *Candida albicans*, *Microsporium gypseum*, *Penicillium chrysogenum* (100), *Piricularia oryzae* (12.5), *Rhizoctonia solani* (50), *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix schenckii* (100) organizmalarına karşı da antifungal özellik göstermişlerdir (Asakawa, 1995). Ayrıca, markantin A, B, D, perrottetin F, ve paleatin B gibi bileşiklerin, anti-HIV-1 (IC_{50} =5.3–23.7 μ g/mL) etkileri de kaydedilmiştir (Asakawa ve ark., 2008, 2009). *Schistochila glaucescens* isimli ciğerotundan izole edilen, markantin C, neomarkantin A ve B maddeleri, Gram (+) bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'e karşı (MIC= 2, 1.5 ve 2 μ g/mL) antimikrobiyal etki göstermiştir. Aynı zamanda dermatofitik olan *Trichophyton mentagrophytes*'e de bu üç madde antifungal etkili bulunmuş olup MIC değerleri sırasıyla; 0.5, 1 ve 0.5 μ g/mL olarak tespit edilmiştir (Scher ve ark., 2002) .

Marchantia polymorpha'dan izole edilmiş olan rikkardin D izole edilmiş ve flukonazol-dirençli *C. albicans* suşlarından; QL-14, QL-28, SDEY-24R ve SDEY-09R'ye karşı antifungal olarak etkili olmuş olup MIC değerleri sırasıyla 16, 32, 16 ve 16 μ g/mL olarak belirlenmiştir. Rikkardin D flukonazol ile karıştırıldığında, ise bu değerler çok daha potansiyel bir anlam taşımakta olup MIC değerleri 0.313–0.375 μ g/mL olarak ifade edilmiştir (Guo ve ark., 2008).

Candida albicans'a karşı rikkardin D bileşiğinin antifungal aktivitesinin, hücre duvarı kitin sentezi üzerindeki inhibe edici etkisine bağlı olabileceği düşünülmüştür (Cheng, 2008). Riccardin D *C. albicans*'ta mitokondriyal disfonksiyondan kaynaklı olan reaktif oksijen türlerinin birikimi

yoluyla antifungal etki gösterir. Rikkardin D bileşiği ayrıca *C. albicans*'ta metakaspazı aktive ederek apoptozu indüklemiştir (Wu ve ark., 2009, 2010).

Plagiochila fasciculata'dan elde edilen 2-hidroksi-3,4,6-trimethidroksiasetofenon, 2-hidroksi-4,6-dimethoksiasetofenonun disk difüzyon yöntemi 150 µg/disk konsantrasyonda *Trichophyton mentagrophytes* ve *Cladosporium resinae*'e karşı antifungal aktivite göstermiştir (Lorimer ve Perry, 1994).

1.3.4. Böcek Beslenmesini Engelleyici, Mortalite ve Bağırsak Kurtlarını Öldürücü Etki

Plagiochila türlerinden elde edilen plagioşilin A etkin maddesinin *Spodoptera exempta* (Afrika tırtıl ordosu)'na karşı güçlü bir beslenme engelleyici (1-10 ng/cm², 2 saat) etkisi bulunmuştur (Asakawa, 1982). Plagioşilin A etkin maddesi aynı zamanda *Caenorhabditis elegans*'a (111 µg/mL) solucanları öldürücü etki de göstermiştir. Acı lezzette olan sakkulatanın *Panonychus citri* kene türünü öldürücü etkisi de bulunmaktadır. *Chiloscyphus polyanthos*'tan izole edilmiş plagioşiline A, ödesmanolitler ve *Gymnocolea inflata*'dan elde edilmiş olan gymnokolin maddelerinin Japonya'da yetişen *Pieris* türünün larvalarına karşı beslenmeyi engelleyici etkisi de kayıtlardadır (Asakawa, 1995).

Hymenophyton flavellatum'dan elde edilen 1-(2,4,6-trimetoksifenil)-but-2(E)-en-1-on maddesinin (Toyota ve ark., 2009) *Eurema hecabe mandarina* sarı kelebeklerin larvalarına karşı beslenmeyi engelleyici etkisi tespit edilerek yayınlanmıştır (Numata ve ark., 1984).

Lepidolaena hodgsoniae'den elde edilen hodgsonoks maddesinin böcek öldürücü etkisi *Lucilia cuprina*'ya karşı değerlendirilmiş olup, etkisi çok yüksek bulunamamıştır. LC₅₀ değeri; 270 µg/mL olarak ölçülmüş ve standart böcek ilacı diazoninden (LC₅₀ değeri; 1.6 µg/mL) daha az aktif olduğu kaydedilmiştir (Ainge ve ark., 2001). *Lepidolaena clavigera*'dan elde edilen atisan-II maddesi, sinek larvalarına karşı orta düzeyde böcek öldürücü etki göstermiştir (Perry ve ark., 2001). *Metacarypogeia alternifolia*'dan izole edilen metakalipogin maddesi, *Oncopeltus fasciatus*'un

metamorfozunu inhibe etmiş ve 30 böcekten 4'ü yetişkinliğe hiç ulaşamamıştır (Shy ve ark., 2002).

1.3.5. Süperoksit Salınımını İnhibe Edici Etki

Organizmalarda aşırı süperoksit anyon radikali (O_2^-) bulunması kardiyak enfarktüs ve arteriyel skleroz gibi çeşitli anjiyopatilere neden olmaktadır. Poligodial ve sakkalutal bileşikleri, kobay peritoneal makrofajından $4.0 \mu\text{g/mL}$ 'de süperoksit anyon radikal salınımını inhibe etmektedir. Ayrıca, *Plagiochila fruticosa*, *P. ovalifolia* ve *P. yokogurensis*'den elde edilen plagioşilit ve *Jungermannia infusca*'dan elde edilen infuskaik asit (klerot-3,13(16)-14-trien-17-oik asit) bileşikleri sırasıyla tavşandan elde edilen PMN hücrelerinden süperoksit anyon salınımını $IC_{50}=0.07$ ve $25 \mu\text{g/mL}$ 'de ve formil metionil lösil fenilalanin (FMLP) ile indüklenmiş kobay peritoneal makrofaj hücrelerinde ise IC_{50} değerleri sırasıyla; 25 ve $40 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Asakawa ve ark., 2013b).

Aynı aktivite, *Bazzania japonica*'dan elde edilen siklomiltalil-10-kaffeat ile kobay peritoneal makrofajı ($IC_{50}=7.5 \mu\text{g/mL}$) hücrelerine karşı da bulunmuştur. Yine bazı seskiterpenlerden; bisiklogermakrenal *Conocephalum conicum*'da, herberten-1,2-diol ve herberten-2,3-diol *Mastigophora diclados*'ta ve bazı diterpenlerden; infuskasit A ve infuskasit B *Jungermannia infusca*'da, süperoksit salıverme inhibitörü olarak etkili bulunmuştur (Asakawa 1995). *Radula javanica*'dan elde edilmiş olan bibenzil türevi olan radulanin K maddesinin de kobay makrofaj hücreleri üzerine ($IC_{50}=6 \mu\text{g/mL}$) süperoksit anyon radikali etkisi bulunmuştur (Asakawa, 1994).

1.3.6. 5-Lipoksijenaz, Kalmodulin, Hiyaluronidaz, Siklooksijenaz, DNA Polimeraz b ve α -Glukozidaz İnhibitör Etki

Bir makrosiklik bisbibenzil türevi olan markantin A, birkaç *Marchantia* türünden izole edilmiş olup 5-lipoksijenaz [5-(LOX)] inhibitörü aktivite [$(10^{-5} \text{ M'de } \% 89, 10^{-6} \text{ M'de } \% 94, 10^{-7} \text{ M'de } \% 45, 10^{-8} \text{ M'de } \% 16)$]; LTB_3 'ye karşı (5S,12R-dihidroksi-6,8,10,14-ikosatetraenoik asit)], [$(10^{-5} \text{ M'da } \% 99, 10^{-6} \text{ M'da } \% 97, 10^{-7} \text{ M'da } \% 70, 10^{-8} \text{ M'da } \% 40)$]; 5-HETE'ye karşı (5-hidroksi-

6,8,11,14-eikosatetraenoik asit)], $ID_{50}=1.85 \mu\text{g/mL}$ deęerinde bulunarak, kalmodulin inhibit6r6 etkileri kaydedilmiştir (Asakawa ve ark., 2013b).

Bazı fenolik bileşikler 6nemli derecede siklooksijenaz (COX) inhibit6r aktivite g6stermiřlerdir. Bunlar; markantin A ($IC_{50} 46,4 \mu\text{M}$), markantin B (55,9), markantin E (58,0), paleatin B (45,2), rikkardin C (53,5), isorikkardin C (50,8), perrottetin D (26,2) ve radulanin H (39,7) olarak belirlenmiştir (Schwartner ve ark., 1995).

Marchantia polymorpha ve *M. paleacea* var. *diptera*'dan izole edilen markantin A, B, D, perrottetin F ve paleatin B maddeleri DNA polimeraz b inhibit6r aktivite g6stermiřlerdir ($IC_{50}=14.4-97.5 \text{ mM}$) (Asakawa, 2015).

Radula perrottetii'den elde edilen perrottetin A ve D, *Radula* t6rlerinden elde edilen prenil bibenzil, *Riccardia multifida*'dan riccardin A, *Marchantia* t6rlerinden markantin D ve E, kalmodulin inhibit6r6 etkiye sahiptirler ($ID_{50}=2,0-95,0 \mu\text{g/mL}$) (Asakawa, 2013b).

Diğer bir 6alışmada, *Blasia pusilla*'dan elde edilen bibenzil dimerlerinden; pusilatin A-D, pusilatin B ve C DNA polimeraz b inhibit6r aktivite g6stermiştir (IC_{50} değerleri sırasıyla; 13.0 ve 5.16 mM) (Yoshida ve ark., 1996).

Lunularik asit, hemen hemen her ciğerotunda min6r bileşen olarak bulunmakta olup, anti-hiyaluronidaz aktivite sergilemektedir ($IC_{50}=0.13 \text{ mM}$). Bu aktivite Japonya'da oral anti-alerjik olarak kullanılan transilat(N-3',4'-dimetoksisinnamoilantranilik asit) ilacından daha kuvvetli bulunmuştur (Hashimoto ve ark., 1988).

Bir diğer etki ise, α -glukozidazın inhibe edici aktivitesi, antiobezite ve antidiyabet ile ilişkilidir. Ciğerotlarında şimdiye kadar bulunan bibenzillerden sadece markantin C, α -glukozidaz inhibe edici bileşik olarak bulunmuştur (1 mM'de % 52,2). Bu aktivite, 1-deoksinojirimisininkinden (0,4 mM'de % 100) daha d6ř6k olamakla beraber, bu makrosiklik bisbibenzil bileşiğinin α -glukozidaz inhibit6r aktivitesi ile ilgili ilk defa rapor edilmiştir (Harinantenaina ve ark., 2007).

1.3.7. Antioksidan Etki

Mastigophora diclados'un eter ve metanol ekstralarının biyoaktivite eşliğinde yapılan izolasyon çalışmalarında, DPPH deneyi kullanılarak test edilmiş ve elde edilen fraksiyonlardan izole edilen (-)-diplofillolit, (-)- α -herbertenol, (-)-herberten-1,2-diol, (-)-mastigoforen C, (-)-mastigoforen D, (-)-diplofillin ve mastigoforen A maddelerinden (-)-herberten-1,2-diol, (-)-mastigoforen C ve (-)-mastigoforen D maddeleri güçlü antioksidan özellik göstermiş olup, IC₅₀ değerleri sırasıyla; 1,9, 2,7 ve 2,0 μ g/mL olarak bulunmuştur. Bu bileşiklerden, (-)-herberten-1,2-diol ve (-)-mastigoforen D maddelerinin antioksidan etkisi, C vitamininden daha yüksek ve kersetine benzer olarak not edilmiştir (Komala ve ark., 2010).

Markantin A madesi de serbest radikal süpürücü etki göstermiştir (IC₅₀ değeri 20 μ g/mL) (Huang ve ark., 2010). Markantin H ise, IC₅₀ 0,51 mM'de sıçan beyni homojenatlarında enzimatik olmayan demir kaynaklı lipid peroksidasyonu göstermiştir (Hsiao ve ark., 1996). Bu kaydedilen etkinin desferrioksamin veya diğer klasik antioksidanlardan daha etkili olduğu söylenebilir. Markhantin H, NADPH-sitokrom P450 redüktazın mikrozomal elektron taşımasını etkilemeksizin IC₅₀ 0,32 mM'de NADPH'ye bağlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu bastırmıştır. Bu madde ayrıca, insan düşük yoğunluklu lipoproteininin bakır katalizli oksidasyonunu da engellemiş olup, peroksidatif hasara karşı biyomakrosiklik molekülü koruyan bir koruyucu olarak kullanılabileceğini de göstermiştir (Hsiao ve ark., 1996).

Plagiochila ovalifolia'nın eter ekstresinin biyoaktivite eşliğindeki fraksiyonlamaları DPPH radikal süpürme deneyi kullanılarak test edilmiş ve izole edilen 3,5-dihidroksi-2-(3-metil-2-butenil)-bibenzil ve plagioşin D maddelerinin antioksidan etkili oldukları anlaşılmıştır (50-200 μ g/mL'de % 28-48 inhibisyon ve 50-200 μ g/mL'de % 62-78 inhibisyon) (Asakawa, 2015).

Jungermannia sublata'dan elde edilen subulatin ile eritrosit membran hayalet sistemi kullanılarak antioksidan potansiyeli ölçülmüştür. Subulatin, pozitif kontrol olarak kullanılan, α -tokoferol ile aynı aktiviteyi göstermiştir (Tazaki ve ark., 2002).

1.3.8. Balık Öldürücü ve Bitki Gelişimini İnhibe Edici Etki

Pellia endiviifolia, *Pallavicinia levieri*, *Riccardia robata* var. *yakushimensis*, ve *Trichocoleopsis sacculata*'nın kuru ekstrelerinin içerdikleri yoğun miktarda sakkulatan tipi diterpenlerin balıklara karşı toksik etkilerinin oldukları bilinmektedir (Asakawa, 1995). *Pellia endiviifolia*'dan elde edilen 4 sakkulatan tipi diterpenterden sakkulatal ve 1*b*-hidroksisakkulatal 1 ppm konsantrasyonda 20 dakikada *Oryzia latipes*'e karşı balık öldürücü etki göstermiştir (Hashimoto ve ark., 1995).

1.3.9. Nörotrofik Etki

Mastigophora diclados'tan elde edilen mastigoforen D, A ve B maddeleri 10^{-5} - 10^{-7} M'da nörotrofik özellikler sergilemişlerdir (Fukuyama ve Asakawa, 1991).

Başka bir çalışmada da, *Plagiochila fruticosa*'dan elde edilen, plagioşilal B ve plagioşilit, sadece nörit filizlenmesinin hızlanmasını değil, aynı zamanda, fetal sıçan serebral hemisferinin nöronal bir hücre kültüründe asetil kolin transferaz aktivitesinin de 10^{-5} M'da arttırıldığını göstermektedir. Plagioşin A aynı zamanda 10^{-6} M'da aynı aktiviteyi göstermektedir (Fukuyama ve Kodama, 1996).

1.3.10. Kas Gevşetici ve Kalsiyum İnhibitör Etki

Siklik bisbibenzil yapısında olan, Markantin A ve benzerleri, farmakolojik olarak önemli olan ve kas gevşetici aktif ilaç olarak kullanılan bisbibenzil-izokinolin alkaloidlerinden olan d-tüboküarine yapısal olarak benzemektedirler. Şaşırtıcı şekilde Markantin A ve Markantin A'nın trimetileteri de, d-tüboküarin gibi kas gevşetici etki göstermiş, ancak etki mekanizmasının nasıl işlediği tam olarak aydınlatılamamıştır (Taira ve ark., 1994).

1.3.11. Kardiyotonik ve Vazopressin Antagonist Etki

Markantin A kardiyotonik aktiviteye sahip bir bileşik olarak, koroner kan akış hızını hızlandırmaktadır (0.1 mg konsantrasyonda 2.5 mL/dk). *Radula perrottetii* 'den elde edilen prenil bibenzil maddesi de vazopressin (antidiüretik hormon/ADH) aktivite ($ID_{50}=27\mu\text{g/mL}$) sergilemiştir (Asakawa, 2015).

1.3.12. Karaciğer X-reseptör (LXR) α Antagonisti, (LXR) β Antagonisti Etki

Plazmada bulunan HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) değerinin yüksekliğinin aterosklerotik kalp hastalığı ile ters orantılı olduğu düşünülmektedir. *Reboulia hemisphaerica* ve *Blasia pusilla* 'dan rikkardin C ve F elde edilmiş ve bu maddeler karaciğer X-reseptör (LXR) α antagonisti ve (LXR) β antagonisti etki göstererek HDL değerini yükseltmişlerdir. Fareler üzerinde yapılan deney sonucunda rikkardin C'nin trigliserit düzeyini etkilemeden HDL'yi arttırdığı bulunmuştur. Yapılan bu çalışma ile rikkardin C'nin antiobezite için kullanılabilecek bir ilaca ışık tutabileceği de bu çalışma ile ortaya çıkmıştır (Tamehiro ve ark., 2005).

1.3.13. Katepsin B ve L İnhibitörü Etki

Katepsin L, osteoporoz ve allerji ile ilişkili olan bir proteaz türevi enzimlerdendir. Markantin türevlerinin, katepsin B ve L inhibitörü etkisi bulunmuştur. Isomarkantin C maddesi her iki enzime karşı güçlü inhibitör etki göstermiştir (10^{-5}M 'de Katepsin L için % 95 ve B için % 93). İnfüskaik asit de aynı aktiviteyi sergilemiştir. (10^{-5}M 'de Katepsin L için % 63 ve B için % 32) (Asakawa, 2015).

1.3.14. Antiplatelet Etki

Reboulia hemisphaerica 'dan elde edilen markantiyakuinon $100\mu\text{g/mL}$ 'de antiplatelet aktivite göstermiştir (Wei ve ark., 1995). Plagioşilin C, yıkanmış tavşan platelet hücrelerinde, arakidonat (100mM) (100 ve $50\mu\text{g/mL}$ 'de sırasıyla; % 95 ve % 45) ve kollajen ($10\mu\text{g/mL}$) ($100\mu\text{g/mL}$ 'de

% 100 inhibisyon) ile uyarılan agregasyonlarda antiplatalet etkisi ile yararlı olmuştur (Lin ve ark., 1996).

1.3.15. Antitrombin Etki

Jungermannia comata’dan elde edilen perrottetin E, trombine karşı inhibitör aktivite göstermiş ($IC_{50}=18$ mM) ve kan pıhtılaşması ile ilişkisi de bulunmuştur (Nagashima ve ark., 1996b).

1.3.16. Brine shrimp (*Artemia salina*) Üzerine Öldürücü Etkisi

Balantiopsis cancellata’nın diklorometanlı ekstresi tuzlu karides larvalarına (*Artemia salina*) karşı güçlü öldürücü etki göstermiştir (LD_{50} değeri 2,5 ppm den daha düşük bulunmuştur). Ayrıca, bütün fenil etanol esterleri; β -feniletil benzoat, (*R*)-2-hidroksi-2- feniletil benzoat, β -feniletil (*Z*)-c-sinamat ve β -feniletil (*E*)-sinamat ve benzil (*E*)- sinamat tuzlu karides larvalarına karşı 2.5-7.4 ppm değerleri arasında öldürücü etki göstermişlerdir (Labbé ve ark., 2005).

1.3.17. Farnesoit X-reseptör (FXR) Reseptör Etkinleştirici Etki

Farnesoid X-Reseptör (FXR), nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Safra asidi ve kolesterol homeostazındaki kritik genlerin salımını kontrol etmekle sorumlu bir reseptördür. Markantin A ve E bileşikleri ile yapılan deneyler sonucunda potansiyeli yüksek olan endojen safra asidine (kenodeoksikolik asit) kıyasla yüksek seviyede FXR'yi aktive ettiği bulunmuştur (Suzuki ve ark., 2008).

1.3.18. NO Üretimi İnhibitörü Etki

Nitrik oksit (NO) fazla üretimi, enflamasyonun yol açtığı doku hasarında ve kanserojenik N-nitrozaminlerin oluşumunda rol oynamaktadır. Patolojik tepkilerde bulunan endotoksinler veya sitokinlerin uyarılmasında, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) tarafından yüksek miktarda

NO üretilmektedir. Böylece, enflamasyonun neden olduğu hastalıklar iNOS tarafından aşırı üretilmiş olan NO ile daha da artacaktır. Bu nedenle doğal kaynaklardan, NO üretimini inhibe eden bileşiklere ulaşmak ve elde etmek oldukça önemlidir (Asakawa, 2015). Bunlardan bazılarının ciğerotlarından izole edildiğini söyleyebiliriz.

Thysananthus spathulistipus'tan klerodan, *Radula appressa*'dan 2-geranil 3,5-dihidroksibibenzil maddeleri RAW-264.7 kültür hücrelerinde lipopolisakkarite (LPS) yanıt olarak NO üretimi inhibisyonu açısından değerlendirilmiştir. Tüm bibenziller, LPS ile uyarılan RAW 264.7 hücrelerinde, 4.5-20 mM aralığında %50 oranında NO üretimini inhibe etmiş ve 2-geranil 3,5-dihidroksibibenzil isimli bileşik ise, daha etkili olarak bulunmuştur (Harinantenaina ve ark., 2006).

Kültürlenmiş RAW 264.7 hücrelerinde lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NO üretiminin inhibisyonu; markantin A, rikkardin A, markantin B, markantin D, markantin E, perrottetin F, rikkardin C, rikkardin F bibenzilleri ve seztenmiş olan markantin A trimetil eter ve markantin B trimetil eter ile test edilmiş olup; NO inhibisyonunun IC₅₀ (µM) değerleri sırasıya; 1.44, 2.50, 4.10, 10.18, 62.16, 7.42, >100, 5.0 ve sentez ile elde edilen bileşikler için ise; 42.50 ve 42.45 olarak bulunmuştur (Harinantenaina ve ark., 2005).

1.3.19. Tübülün Polimerizasyonunu İnhibe Edici Etki

Markantin C, insan beyin tümör hücrelerinde ve HeLa (insan servikal adenokarsinoma hücre dizisinde)'daki G2/M fazında, çıplak fareden insan servikal tümör ksenograftlarının (farklı cinsten olan bireyden alınan dokuyu aşılama) büyümesini güçlü bir şekilde inhibe etmiş, zaman ve doz bağımlı olarak mikrotübül miktarını azaltmıştır (Shi ve ark., 2008; 2009). Markantin C, 8-24 mM'de mikrotübül depolimerleştirici vinkristine benzer şekilde, tübülünün polimerizasyon hızını azaltmıştır. Bu sonuçlar, hem hücredeki apoptotik etkiler hem de *in vivo* antitümör aktivitelerde mikro tüp depolimerizasyonunda markantin C'nin aynı şekilde davrandığını sergilemiştir. Markantin C, tümör hücrelerinin mitoz safhasında durdurulmasını indükleyen ve tümör hücresi büyümesini baskılayan yeni bir mikrotübül inhibitörüdür ve kolşisin, paklitaksel, vinkristin, vinblastin gibi mikrotübül inhibitörlerinden yapısal olarak farklıdır. Bu nedenle gelecekte

yapılacak antitümör ilaçlar için potansiyel bir önem taşımakta olduğu düşünülmüştür (Shi ve ark., 2008; 2009).

Plagiochila fruticosa 'dan izole edilen izoplagiokin A ve B'de tubulinin polimerizasyonunu IC₅₀ 50 and 25 mM değerlerinde inhibe etmiştir. İzoplagiokin A ve B'nin dihidro türevleri bu açıdan inaktif bulunmuştur (IC₅₀> 100mM) (Morita ve ark., 2009).

1.3.20. Vazorelaksiyon Etki

Lepidozenolit ve (-)-5 β -hidroperoksilepidozenolit isimli bileşikler, 100 μ g/mL konsantrasyonda değerlendirildiğinde, fazik ve tonik büzülmeler açısından norepinefrin (3mM) ile uyarılan farenin göğüs aortunda vazorelaksiyon etki yaratmıştır. Lepidozenolit maddesi aynı zamanda potasyum (80 mM) ve kalsiyum (1.9 mM) ile baskılanan vazokonstriksiyonu da önlemiştir (Shu ve ark., 1994).

1.3.21. Yara İyileştirici Etki

Reboulia hemisphaerica (L.) Raddi (Aytoniaceae), *Plagiochasma rupestre* (J.R. Forst et G. Forst) Steph. (Aytoniaceae) ve *Targionia hypophylla* L. (Targioniaceae) eterli ekstreleri hazırlanmış ve bu ekstreler % 1'lik merhem formülasyonları kullanılarak insizyon yara modeli üzerinde sırasıyla % 43,1, % 383 ve % 24,1 oranlarında yara gerilme kuvvetinde artış oluşturmuş olup; kontraksiyon değerleriyle dairesel eksizyon yara modelinde ise *Reboulia hemisphaerica*, *Plagiochasma rupestre* ve *Targionia hypophylla* ekstreleri sırasıyla % 62,1, %5 8,0 ve % 39,8'de referans örnek ile karşılaştırılabilir düzeyde ve anlamlı derecede etkili bulunmuştur (Tosun ve ark., 2016).

1.4. Porella Türleri Üzerinde Yapılan Biyolojik Aktivite ve Bazı Toksisite Çalışmaları

Driman tipi seskiterpenler doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bir sünger türü olan *Dysidea* türlerinden, deniz salyangozu türü olan *Dendrodoris carbunculosa*, mantar türü olan *Peniophora*

polygonia, ciğerotu türü olan *Porella*, eğrelti otlarından *Thelipteris hispidula* ve yüksek yapılı bitkiler olan; *Polygonum hydropiper* (Polygonaceae), *Taxus cuspidata* (Taxaceae), *Warburgia ugandensis*, *Cinnamosma macrocarpa* (Canellaceae) ve bir çok *Drimys* türleri gibi geniş bir bitki grubunun kimyasal içeriğinde bulunmakta ve çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Bunlar arasında; antibakteriyel, antifungal, beslenmeyi engelleyici, sitotoksik, yumaşakçalar sınıfını öldürücü, balık öldürücü, bitki gelişimini engelleyici ve fitotoksik etkilerini de sayabiliriz (Allouche ve ark., 2009).

1.4.1. Alerjik Kontakt Dermatit

Porella vernicosa kompleksindeki bitkiler, içeriğindeki poligodial'den kaynaklanan acı bir lezzet ve iritan bir özellik göstermektedir. Kobaylar, intradermal enjeksiyonlar kullanılarak polygodiale duyarlı hale getirilmiştir (Asakawa, 1995). Böylece, bu bileşiğin alerjik kontakt dermatite neden olduğu saptanmıştır.

1.4.2. Sitotoksik Etki

Hepaticae'ye ait bazı bitkilerin içerdikleri bibenzillerin bazılarının sitotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir (Basile ve ark., 1998).

Porella caespitans, *P. japonica*, *P. perrottetiana*, *P. vernicosa*'da elde edilen eterli ekstraktların P-388 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi bulunmuştur (IC₅₀ değerleri 4-20 µg/mL arasındadır) (Asakawa, 1990; Asakawa, 2007; Asakawa, 2013b).

P. vernicosa kompleksten elde edilen poligodialin melanoma hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi (2-4 µg/mL) de saptanmıştır (Asakawa, 2008).

Japonya'dan toplanan, *P. perrottetiana*'nın eterli ekstresi hem HL-60 (İnsan promiyelositik lösemi hücreleri) hem de KB (faringeal skuamöz kanseri hücreleri) hücrelerine karşı suda çözülebilen WST-8 kolorimetrik yöntemiyle sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. *P. perrottetiana*'dan 4a,

5 β -epoksi-8-epi-inunolit, 7-keto-8-karbometoksipinguisenol, perrottetianal A maddeleri izole edilmiştir. Bu maddelerden ilk ikisi HL-60 hücrelerine karşı (IC₅₀ değerleri; 8.5 ve 2.7 μ M) ve KB hücrelerine karşı (IC₅₀ değerleri; 52.4 ve 46.3 μ M) düşük sitotoksik aktivite göstermişlerdir. Yine yapılan başka bir çalışmada, 7 α -hidroksi-8-karbometoksipinguisenol ve akutifolon A indüklemeye ve dehidrazasyon işlemleri ile HL-60 hücrelerine karşı (IC₅₀ değerleri 83.10 ve >177 μ M) ve KB hücrelerine karşı (IC₅₀ değerleri 2.7 ve 46.6 μ M) sitotoksik etkileri bulunmuş olup, dienon grubunun HL-60 hücrelerine karşı sitotoksik etkiye aracılık etmede önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Komala ve ark., 2011).

P. cordaeana'nın eterli ekstresinden elde edilen iki bileşiğin α -furanopinguisanol ve furanopinguisanonun sitotoksik etkileri, MTT yöntemi ile incelenmiş ve özellikle furanopinguisanonun'un her konsantrasyonda sitotoksik etkisi bulunmuştur (Radulovic ve ark., 2016). *P. cordaeana*'nın eterli ekstresinden elde edilen yeni 4 bileşiğin porellasetal A, B, C, D'nin HT-29 (kolorektal kanseri hücreleri) ve MCF-7 (insan meme kanseri hücreleri) üzerine SRB (sülforodamin B) yöntemine göre sitotoksik etkileri incelenmiş ve sonuç olarak düşük bir sitotoksik etki saptanabilmiştir (Tan ve ark., 2017).

İçerdikleri sekiterpenler açısından *Porella swartziana*, *P. recurva*, *P. subobtusa*, *P. acutifolia* subsp. *tosana* bitkilerinin; diterpenler açısından ise *P. densifolia*, *P. chilensis* bitkilerinin potansiyel sitotoksik etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Dey ve Mukherjee, 2015).

1.4.3. Antimikrobiyal ve Antifungal Etki

Bryofitlerde bulunan terpenler, bibenziller, bisbibenziller, yağlı asit türevleri ve asetofenonlar antifungal etkiden sorumludurlar (Scher ve ark., 2004)

Porella cordaeana'dan elde edilmiş olan metanollü, etanollü ve etil asetatlı ekstraktların; *Salmonella enteritidis* 155, *Escherichia coli* 555–Gram (-) ve *Listeria monocytogenes* 56Ly–Gram (+) bakterilere ve *Saccharomyces cerevisiae* 635, *Zygosaccharomyces bailii* 45, *Aerobasidium pullulans* L6F, *Pichia membranaefaciens* OC 71, *Pichia membranaefaciens* OC 70, *Yarrowia*

lipolytica RO13 mayalarına karşı antimikrobiyal etkisi kanıtlanmıştır (Bukvicki ve ark., 2012). *P. cordeana*'nın bütanon kullanılarak elde edilen eksteresinde bulunan drimenin ve aristolanın, *Saccharomyces cerevisiae*'nin DNA'sı onarılmış mutantlarına karşı orta düzeyde toksik etkisi bulunmuştur (Harrigan ve ark., 1993).

Afrikan tipi seskiterpenlerce zengin olan, *P. swartziana*'nın önce eter, sonrasında metanol ile elde edilen ekstresinin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı önemli antibakteriyel bir etkisi bulunamamıştır (Mitre ve ark., 2004).

3, 9 ve 10 numaralı bileşiklere verilen numaralar *P. chilensis*'in dietil eter ve sonrasında metanol ile elde edilen ekstresinden izole edilen bileşiklerden bazıları, 50 ve 5 µg/mL'de insanda bulunan bir patojen olan *Pseudomonas aeruginosa*'yı sırasıyla 3 (53 ve % 47), 9 (45 ve % 41), 10 (48 ve % 37) inhibe etmişler ve bakteriyel büyümede bir azalma meydana getirmişlerdir (Gilabert ve ark., 2011).

P. swartziana'nın eterle ve sonrasında metanol ile elde edilen ekstresinden afrikan tipi seskiterpenler izole edilmiş olup, bulunan bileşikler agar difüzyon metoduna göre Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı çok düşük bir antibakteriyel etki göstermişlerdir (Mitre ve ark., 2004).

P. arboris-vitae'nin metanol ve etanollü ekstreleri bozulmuş yemeklerden elde edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri, mikrobiyal seyreltme yöntemi ile değerlendirilmiştir. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC/MİK), sırasıyla maya ve bakteri suşlarına karşı 0,5 ile 1,5 mg/mL ve 125 ila 2 mg/mL arasında değişen değerler göstermiştir. Metanolik ve etanolik *P. arboris-vitae* ekstrelerinin *Salmonella Enteritidis* 155 üzerinde bıraktığı morfolojik ve yapısal değişiklikler; taramalı elektron mikroskopu ve transmisyon elektron mikroskopu ile incelenmiştir. Sonuçlar ise, *P. arboris-vitae* ekstrelerinin antimikrobiyal potansiyelinin olduğunu kanıtlamakta ve gıda koruyucu doğal antimikrobiyal ajanlar olarak önermektedir (Kumar Tyagi ve ark., 2013).

1.4.4. Böcek Beslenmesini Engelleyici, Mortalite ve Bağırsak Kurtlarını Öldürücü Etkisi

Porella'da bulunan sekonder metabolitlerinden bazıları, böceklerin hormon ve sinir sistemleri üzerine etki ederek, mide ve kas dokularını etkilemektedirler. *P. chilensis*'den elde edilen monoterpen ve sekiterpenler üzerine yapılan bir araştırmada *Spodoptera frugiperda* (güz tırtılı) cinsine karşı; pinguisan, fusikokkan ve aromadendran yapılarına sahip olan bileşiklerin, 100 ve 200 µg/g konsantrasyonlarda önemli ölçüde larvaların gelişimini inhibe ettikleri gözlenmiştir (Corzo ve ark., 2012).

P. vernicosa kompleks'den elde edilen poligodial ve poligodialin sentetik enansiyomeri, sinek lavralarını 40 ppm konsantrasyonunda ($IC_{50}=0,07$ mg/mL) öldürmektedir (Asakawa, 1995). *P. vernicosa* kompleksten izole edilen (-)-poligodialin 40 ppm'lik bir konsantrasyonda sivrisinek lavralarına etkisi, piyasada bulunan DEET'den daha güçlü olan sivrisinek öldürücü etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur (Asakawa, 2008).

P. obtusata'nın alkollü ekstresi hazırlanarak yapılan deneyde, *Arion lusitanicus*'a (Portekiz sümüklüböceği) karşı böcek beslenmesini engelleyici etkisi araştırılmıştır. Yapılan araştırma sonucu *P. obtusa*'da bulunan değer % 0,05'de başlamış ve % 0,25'te maksimum değere ulaşmıştır (Frahm, ve Kirchhoff, 2002).

1.4.5. Süperoksit Salınımını İnhibe Edici Etki

Porella elegantula'dan elde edilen norpinguison metil eter, uyarılmış formil metionil lölil fenilalanin (FMLP) yöntemi ile 35 µg/mL konsantrasyonda kobay farelerinin peritoneal makrofajlarının % 50'sinde süperoksit salınımını inhibe edici etkisini göstermiştir (Fukuyama ve ark., 1988).

P. vernicosa'dan elde edilen bir başka seskiterpen olan norpinguison ve *P. perrottetiana*'dan elde edilen perrottetianal A da aynı şekilde kobay farelerinin makrofaj hücrelerinde süperoksit inhibe edici etki ($IC_{50}= 12,5-50$ µg/mL) göstermişlerdir (Asakawa, 1995).

1.4.6. Balık Öldürücü ve Bitki Gelişimini İnhibe Edici Etki

Porella vernicosa kompleks'den elde edilen (-)-polygodial en güçlü balık öldürücü etkili bileşik olarak tespit edilmiştir. Medaka balığı (*Oryzia latipes*), (-)-polygodialin 0,4 ppm solüsyonunda 2 saatte ölmektedir. Aynı zamanda, sentetik olan (+)-polygodialin de Medaka balığını (*Oryzia latipes*) 0.4 ppm konsantrasyonda yine 2 saatte öldürebildiği kanıtlanmıştır (Asakawa, 1982).

1.4.7. 5-Lipoksijenaz, Kalmodulin, Hiyaluronidaz Siklooksijenaz İnhibe Edici Etki ve NO Üretimin İnhibe Edici Etki

Porella perrottetiana'dan elde edilen labda-12,14-dien-7a,8a-diol ($ID_{50}=82 \mu\text{g/mL}$) düşük kalmodulin inhibe edici etki göstermiştir (Asakawa, 2015).

P. densifolia'dan izole edilmiş olan norpinguison metil ester, norpinguison ve *ent*-16-kauren-15-on bileşikleri, RAW 264.7 LPS ile uyarılmış hücrelerde NO üretimini inhibe edici etki göstermiş olup, değerleri sırasıyla; IC_{50} 45,5, 1,7 ve 69,4 μM 'dır (Quang ve Asakawa, 2010).

1.4.8. Katepsin L ve Katepsin B İnhibe Edici Etki

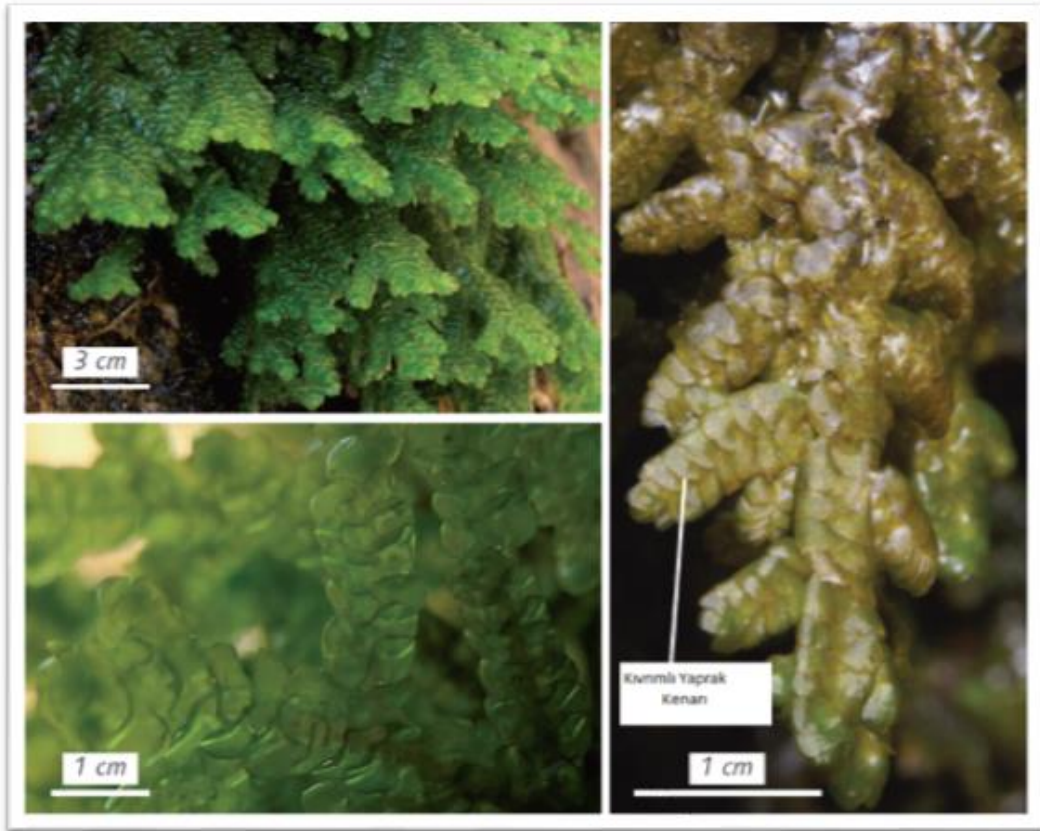
Porella japonica'dan elde edilen ekstrenin güçlü katepsin A ve B inhibe edici etkisi bulunmuştur. Bu bitkinin ham ekstresinden elde edilen biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlardan guainolit yapısında bileşikler elde edilmiştir. Bunlar; 11-epiporelladiolit, 11,13-dehidroporelladiolit ve porellaolittir. Bunlardan; 11,13-dehidroporelladioit, katepsin B (10^{-5} mol/mL'de % 13,4) ve katepsin L (10^{-5} mol/mL'de % 24,7)'ye düşük bir inhibitör aktivite sergilemişlerdir (Hashimoto ve ark., 1998a).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Toplanan Örneklerin Tür Özellikleri

2.1.1.1. *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff Tür Özellikleri



Şekil 2.1. *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff

<http://rbg-web2.rbge.org.uk/bbs/Activities/liverworts/Porella%20platyphylla.pdf>

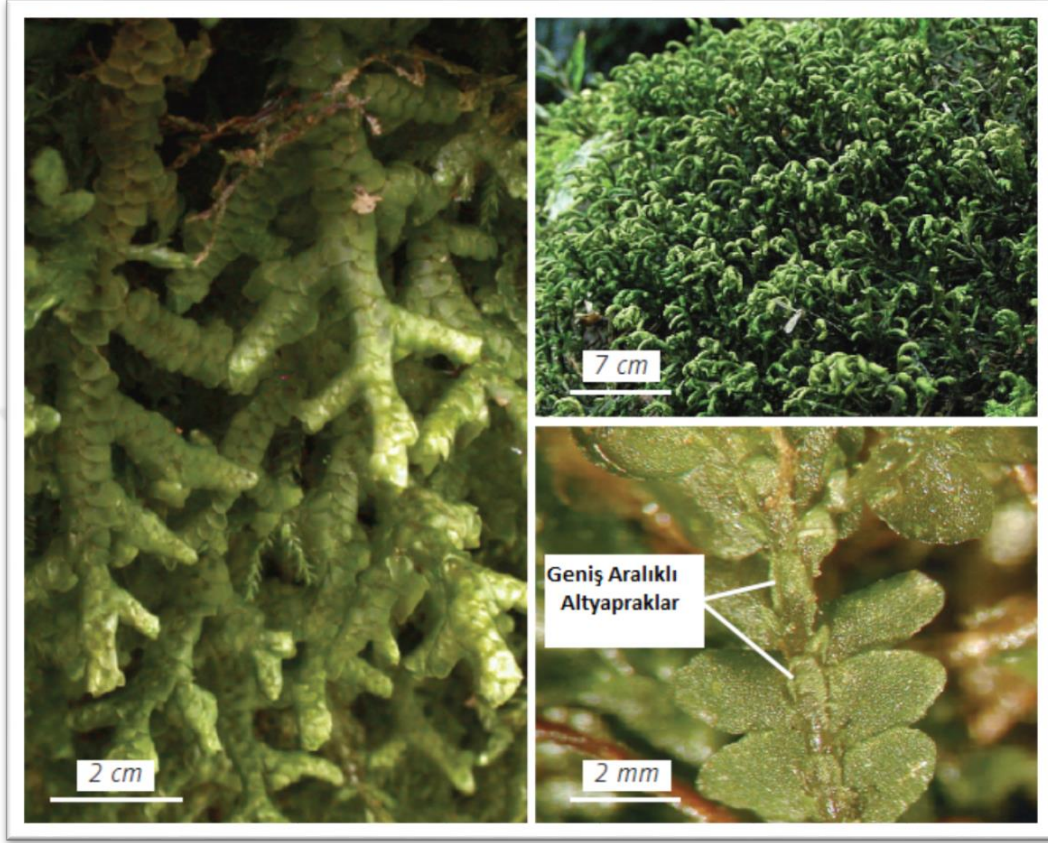
Bosanquet; “Atlas of British & Irish” isimli kitabında, *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff (Şekil 2.1) türünü şu şekilde açıklamıştır (Bosanquet, 2014):

Tanımlama: Filizleri 1,5-4 mm genişlikte ve birkaç santimetre uzunlukta bulunmakatdır. Yaprak kenarları yukarıya doğru kıvrık olduğu için sık sık düzensiz bir görünüme sahiptir. Genellikle koyu yeşil sürgünlerinin birbirinin üstüne gelmesi, karakteristik bir yaprak düzenlemesini ortaya çıkarır. Her yaprağın tabanında yukarı kalkık kenarları olan küt uçlu bir lobül bulunmaktadır. Lobüller, yaprakların en az beşte biri ile sekizde biri boyutundadır. Mat bir renge sahip olan yaprakların, 2 mm uzunlukta ve genişlikte olduğu rapor edilmektedir.

Benzer Türler: *P. cordaeana*, *P. platyphylla*'ya çok benzemektedir. Fakat *P. cordaeana*'nın yapraklarının uçları *P. platyphylla*'nın yaprak uçları kadar kıvrılmamaktadır. *P. platyphylla* ayrıca lobül uçlarının yakınında herhangi bir bükülme içermez.

Yetiştirme Yeri: *P. platyphylla*, kalker kayalıklarla kayalar üzerinde bol miktarda bulunan bir bitkidir. Ayrıca, eski duvarların üstlerinde, hatta kasaba ve şehirlerin merkezine yakın yerlerde bile yetişebilirler. Bazen nehirlerle alüvyonlu ağaçlar üzerinde de bulunmaktadır.

2.1.1.2. *Porella cordaeana* (Huebener) Moore Tür Özellikleri



Şekil 2.2. *Porella cordaeana* (Huebener) Moore

<http://rbg-web2.rbge.org.uk/bbs/Activities/liverworts/Porella%20cordaeana.pdf>

Bosanquet; “Atlas of British & Irish” kitabında *Porella cordaeana* (Huebener) Moore (Şekil 2.2) türü için de şu tanımlamayı kullanmıştır (Bosanquet, 2014):

Tanımlama: *P. cordaeana* çok farklı görünse bile, yine de tanımlamak zor olabilir. Dalları, çoğunlukla sivri uçlu filizleri (2,3-4 mm genişliğinde), büyük yaprakları (2 mm genişliğinde) donuk, koyu yeşil rengi ile kendini göstermektedir. Bütün bu özellikler, *Porella* türleri için tipiktir. Genellikle yaprak kenarlarının biraz yukarı kalkmasıyla, gevşek ve düz görünür. Her bir yaprağın altındaki dar loblar gövdeye doğru uzanır. Alt yapraklar, gövde boyunca ayrılmış bir şekilde yer

alır ve birbiriyle çakışmaz. Ne yazık ki, bu özellikler her zaman iyi gelişmiş ve ayırt edici değildir ve *P. platyphylla* formları onları taklit edebilir.

Benzer Türler: *P. cordaeana*'ya en benzer tür, *P. platyphylla* olarak bilinir, hatta *P. cordaeana* ile melezleştiğine bile rastlanır. Lobülleri küt uçludur ve kenar boşlukları biraz yükselir, ancak büküm olmaz, alt kısımları genellikle birbirine yakın iken, birinin ucu bir diğerrinin tabanıyla örtüşür.

Yetiştirme Yeri: Ağaç diplerinde ve kayaların üzerinde, düşük yoğunluklu nehirlerlerin etrafında sıkça rastlanan bir bitkidir. *P. platyphylla* kadar oldukça geniş bir yaşam alanına sahip olduğu bilinmektedir. Daha nadir olarak, ormanlık kayalıklarda, yüksek zeminli korunaklı uçurumlarda veya göl kenarındaki kayalıklarda ve silisli kayalarda yetişmektedir. *P. platyphylla*'nın aksine kireç taşından kaçınmaya eğilimlidir.

2.2. Materyal



Porella cordaeana Türkiye-Aydın Koçarlı-Mersin Belen yolu yatağındaki kaya üstlerinden Nisan 2013'de toplanmıştır (Şekil 2.4). Toplanan örnekler, Adnan Menderes Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde depolanmış ve herbaryum numarası, Özenoğlu-C11/223 ve Özenoğlu C11/280 olarak belirlenmiştir.

Şekil 2.3. *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff

P. cordaeana, serin ve ışık olmayan bir yerde çok kısa bir süre kurutulmuş ve içindeki tüm yabancı madde ve bitkilerden temizlenmiştir. Aynı şekilde, *P. platyphylla* (Şekil 2.3.), (Herbaryum No: Özenoğlu C11/222). Tüm türler, Prof. Dr. İsa Gökler ve Doç. Dr. Hatice Özenoğlu Kiremit tarafından teşhis edilmiş ve doğrulanmıştır.



Şekil 2.4. Doğadan *Porella* türlerini toplarken bazı fotoğraflar (Foto: Merve Karadeniz)

2.3. Yöntem

2.3.1. Ekstraksiyon

Öğütücü yardımı ile *Porella cordaeana* hafifçe parçalanıp, darası alınmış bir kapta tartıldı (230.44 gr). Daha sonra bu miktar, yaklaşık olarak eşit miktarlarda iki adet, 2 L'lik erlen mayere paylaştırılıp, üzerine yaklaşık 1600 mL kadar eter ilave edildi. Ağzı sıkıca kapatılıp güneş görmeyen ve serin bir yerde üç hafta (aralıklı olarak çalkalanmak sureti ile) süre ile maserasyona bırakıldı. Bekletmiş olduğumuz ekstremizi, büyük bir pileli süzgeç kağıdından süzüp, hazırlanan kolon yardımı ile yeniden süzme işlemi yapıldı. Kolonun ağzına önce küçük bir miktar pamuk koyup üzerine yaklaşık 1cm boyunda silikajel (0.063-0.200 mm) düzgünce eklenip, ekstre yavaş yavaş yukarıdan pipet yardımı ile uygulanmıştır. Toplanan berrak ekstre, daha önceden darası alınan balon yardımı ile, rotavaporda 30°C'yi aşmayacak şekilde yoğunlaştırıldı.

2.3.2. Genel Deneysel Yöntemler

Bütün kimyasal çözeltiler, Fisher Scientific'ten satın alındı.

Analitik ince tabaka kromatografisi (İTK) alüminyum destekli TLC (250 µm) Dynamic Adsorbent Inc. Size'den satın alınmıştır.

Kolon kromatografisinde, normal sabit faz olarak Parc-Technologique BLVD (Quebec City, Canada)'den satın alınan SiliaFlash® P60 (230–400 gözenekli) ve yine ters sabit faz olarak ise Sigma-Aldrich'ten satın alınan oktadesil ile modifiye edilmiş (C18) silikajel (200–400 gözenekli) ile gerçekleştirilmiştir. Size exclusion kromatografisi (SEC) Sephadex™ LH-20 ile gerçekleştirilmiştir.

Preparatif HPLC, DAD (Diode Array Detector) ile bağlantılı Hitachi Primaide HPLC (Primaide 1430), Primaide 1210 oto-sampler, Primaide 1110 degaze edici pompa ve bir yarı preparatif C18 kolonu DYNAMAX®-60 Å C₁₈ kolonu, 10×250 mm) ile gerçekleştirildi.

UV spektrumları, Fisher Scientific-silika küvetleri (Katalog no: 14-385-910C) ile Hitachi U-2910 UV/Vis çift ışıklı spektrofotometreden elde edildi.

Optik rotasyon verileri, Perkin Elmer 343 polarimetre ile ölçüldü.

IR spektrumları, Sigma-Aldrich'den bir KBr (yuvarlak kristal disk) üzerinde Thermo-Nicolet 6700 Fourier dönüştürme IR spektrofotometresinde kaydedildi (Katalog no: Z267635-1EA).

NMR spektrumları, 300 K Bruker AVIII400HD NMR spektrometresi ile alındı.

Kütle spektroskopik (MS) verileri ise, Thermo LTQ Orbitrap tarafından gerçekleştirildi.

2.3.3. Kromatografik Yöntemlerin Detaylandırılması

2.3.3.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)



Çalışmamızda bir ön tarama olarak, bitki ekstraktları, ince tabaka kromatografisi (İTK) ile incelenerek, geliştirilen plakların fotoğrafları çekildi. Toplanan *Porella cordeana* ve *P. platyphylla*'nın eterli ekstraktları (Şekil 2.5) İTK plakalarına uygulandı. Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 1.05554, 20×20) hazır plaklar kullanılarak *n*-hekzan:etil asetat'ın farklı oranlarında hazırlanan solvan sistemleri ile hem gün ışığında, hem de UV 366 ve 254 nm'de incelendi. İnceleme sırasında reaktif olarak MeOH:H₂SO₄ (1:1) ve Godin reaktifi kullanıldı.

Şekil 2.5. *Porella cordeana* ve *P. platyphylla*'nın eterli ekstraktları

2.3.4. İzolasyon Yöntemi (Kolon kromatografisi, Prep-HPLC)

Bitkinin eterli ekstresi, CH₂Cl₂-MeOH karışımı (1:1) kullanılarak size exclusion kromatografisi (Sehadex LH-20) ile fraksiyonlanarak 6 fraksiyon elde edildi. Daha sonra bu fraksiyonlar aktivite tayini için kullanılan deneyle (SRB ve MTT) incelendi. Aktif bulunan fraksiyon, MeOH-H₂O karışımları ile elde edilen, (% 40, % 70 ve % 100 MeOH) 3 fraksiyona ayrıldı ve bu fraksiyonlar C₁₈ kolonu kullanılarak elde edildi. Bu fraksiyolamada, % 70'lik MeOH'den elde edilen aktif fraksiyon prep-HPLC'ye uygulandı (gradient sistem: % 50 MeOH'den % 100 MeOH'e kadar değiştirildi). Sonunda 3 bileşik (izolat) elde edildi. İzolatlardan bir tanesi, 2 bileşiğin karışımı halinde bulunuyordu, ve bu 2 bileşik *n*-hekzan:EtOAc karışımı (4: 1) ile silika jel kolonda ayrıldı.

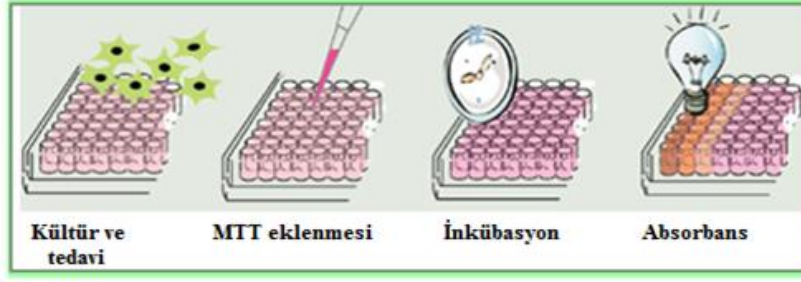
2.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.4.1. Sitotoksik Aktivite Tayini

MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit] deneyi

Yapılan biyoaktivite çalışmaları arasında yapılan ilk denemelerde, özellikle ekstreler üzerinde, sitotoksik aktivite taraması için en temel yöntem olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit] deneyi kullanıldı (Şekil 2.6).

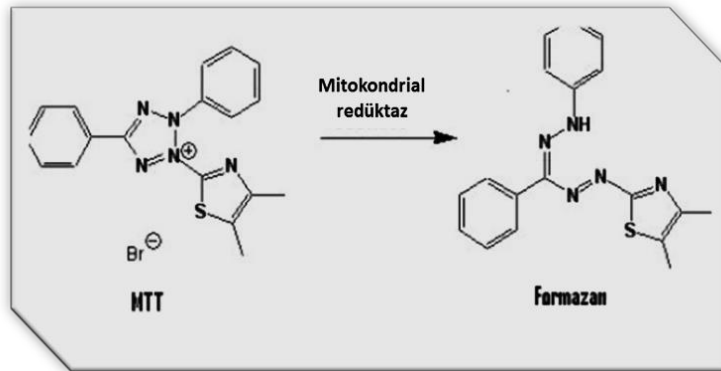
Tetrazolyum tuzları indirgenme işlemi sonrasında çözünen ve çözünmeyen formazanları oluşturan geniş bir heterosiklik bileşik grubu olup, ilk olarak 1894 yılında hazırlanmıştır. MTT; 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromit, bir monotetrazolyum tuzu olup; indirgeme, hücre proliferasyonunu ve sitotoksiteyi ölçmek için sık kullanılan yöntemlerden biridir (Liu ve ark., 1997).



Şekil 2.6. MTT yönteminin şematik gösterimi

http://www.ibric.org/myboard/zoom.php?Board=exp_qna&filename=protocol.gif&id=157507&fid=1

MTT deneyinin genel amacı, detaylı bir sayım yapmaksızın görece yüksek verimli (96 kuyucuklu plakalarda) bir şekilde canlı hücre sayısını ölçmeye dayanmaktadır. MTT yöntemi direkt mitokondri ile ilişkili olup, hücre sayısının artması veya azalması mitokondri ile orantılıdır. Hücrelerin mitokondriyal aktivitesinin tayini ise sarı renkli bir tetrazolyum tuzu olan MTT'nin mitokondride mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi ile alakalıdır (Şekil 2.7). İndirgenme reaksiyonu sonucunda açığa çıkan formazon kristalleri daha sonra optik yoğunluk ölçme yöntemi ile (OD) 540 ve 700 nm de, canlı hücre sayısındaki herhangi artış veya azalma formazon konsantrasyonunun ölçülmesi ile tespit edilir ve yoğunluk oranı canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Meerlo ve ark., 2011).



Şekil 2.7. MTT ilavesi ile mitokondride gerçekleşen reaksiyon

SRB (Sülfürodamin B) deneyi

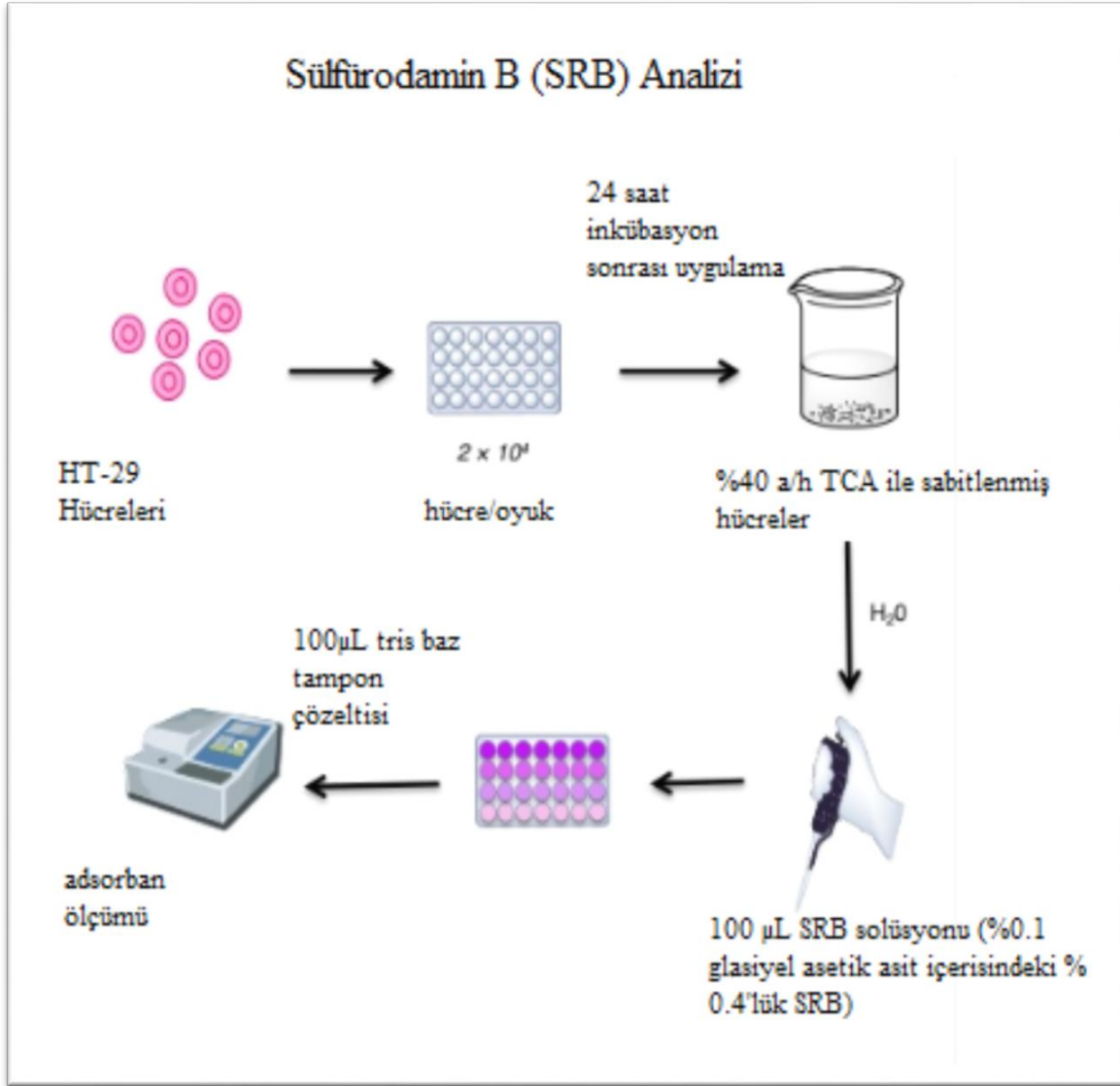
Sülfürodamin B yöntemi Skehan ve arkadaşları tarafından büyük çapta uyuşturucu taramaları için, uyuşturucudan kaynaklı olan sitotoksosite ve hücre proliferasyonunu tahlil etmek için geliştirilmiştir. SRB analizi, SRB boyasının elektrostatik olarak ve pH temelinde protein bazik amino asit kalıntılarına bağlanma kabiliyetine dayanmaktadır. SRB trikloro asit (TCA) ile sabitlenmiş proteininin amino asit kalıntılarına bağlanmaktadır. SRB nicel olarak hücrelerden çıkarılıp tris baz gibi hafif bazlarla çözülerek optik yoğunluğu (OD) ölçülebilir hale getirilir. SRB analizinin sonuçları 96 kuyucuklu bir plakta %1-200'e kadar olan hücresel yoğunluklardaki birleşme ve hücre sayısı ve ölçülen hücresel proteinle doğrusaldır. Duyarlılığı birçok flüoresan yöntemi ile karşılaştırılabilir niteliktedir (Voigt, 2005). 4.83'te 5000 hücre/oyuk sinyal-gürültü oranı bulunmakta ve 1000-2000 hücre/oyuk çözünürlüğü vardır (Vichai ve ark., 2006). SRB'nin bitiş noktası kolorimetrik ve tahribatsız olup ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Tetrazolyum analizleri [2,3-Bis(2-metoksi- 4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (XTT) veya 3-(4,5-dimetiltiazol -2)-2,5-difenil tetrazolyum bromit (MTT)] veya klojenik analizleri ile kıyaslandığında IC₅₀ değerleri benzer sonuçları vermektedir. SRB testinin bu analizlere kıyasla dikkate değer bir önemi bulunmaktadır. Son noktanın ölçümü zamanının kritik olmamasından kaynaklı olarak diğer tetrazolyum analizlerine göre daha pratiktir. Mikroplakalı yıkayıcı ve mikropate okuyucu kullanılarak otomatik hale getirildiğinde, yüksek verimli tarama yaklaşımları için uygundur (Voigt, 2005).

SRB (C₂₇H₃₀N₂O₇S₂) iki sülfonik grup içeren anyonik parlak pembe bir aminoksanten protein boyası olup molekül ağırlığı 558.666 g/mol'dür (Vichai ve ark., 2006).

Bu analizin geliştirilmesi süresinde optimal bekleme süreleri ve kullanılan miktarlar yine Skehan ve arkadaşları tarafından bulunmuş olup, buldukları sonuçlara göre; 96 kuyucuklu kültür plakasının oyukları başına 100 µL'ye %0,4 SRB tatbik edilmesi önerilmektedir. Bağlanmış olan SRB'nin ayrılması için de asetik asit ile en az dört kere yıkanması önerilmektedir (Voigt, 2005).

SRB (Sülforodamin B), Sigma Aldrich'den (ACS) satın alındı. HT-29 hücreleri, (American Type Collection; ATCC katalog numarası HTB-38) ve MCF-7 hücreleri, National Cancer Institute'den temin edildi. HT-29 hücre serisi ile yapılan sitotoksosite testi, daha önce tarif edildiği gibi gerçekleştirildi (Ren ve ark., 2011). MCF-7 hüceleri ile yapılan sitotoksosite deneyinde ise, hücreler, L-glutamin ile doyurulmuş Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 ortamı, Mediatech Inc.'den satın alındı. Ayrıca ortam, %10'luk sığır ceninine ait serum ile desteklenmiş ve bu Atlanta Biologicals (GA, USA)'den satın alındı. Bunun yanında, %1'lik a/h Gibco® Antibiyotik-Antimikotik solüsyonu, Life Technologies isimli firmadan sağlandı. Sonuçta bu ortam (medium), nemlendirilen inkübatörde (% 95 hava, % 5 CO₂ ve 37 °C'de) inkübe edildi. Hücreler % 80-90 çoğalma oranına erişince alt kültür hazırlandı.

Öncelikle, test edilecek ekstreler ve izole edilen bileşikler, DMSO (Dimetilsülfoksit) ile çözüldü ve hemen sonra on katı H₂O ile dilüe edildi. Beş kat seri dilüsyon %10'luk DMSO kullanılarak hazırlandı. Deneyde, 96'lık plakadaki her bölüme, pozitif kontrol olarak kampotesin kullanılması ile, test edilecek bileşiklerin 10 µL'si ikişer kere olmak üzere ilave edildi. DMSO ise (% 10'luk) negatif kontrol olarak kullanıldı. Uygun konsantrasyonda test bileşikleri ve ekstreleri ile, her bölüm başına, 60.000 hücre elde edebilmek için, hasat edilen hücrelerin 190 µL'si, daha sonra 96'lık plakaya ekildi. Tohumlanmış plakalar % 95 hava ve % 5 CO₂ içeren ortamda 37 °C'de 3 gün inkübe edildi. Hücreler 3 gün sonra, % 20'lik soğuk trikloroasetik asit (TCA) kullanılarak 100 µL'ye sabitlenerek, 4 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Plakalar daha sonra musluk suyu ile yıkandı ve yine 30 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bundan sonra sabitlenmiş olan hücreler 100 µL'de % 0.4 h/h SRB içeren % 1'lik asetik asit ile 30 dakika oda sıcaklığında boyandı. Fazla SRB'yi yıkamak için asetik asit (% 1'lik) daha sonra kullanıldı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında tekrar kurutuldu. Bundan sonra, 200 µL tamponsuz Tris baz (pH=10) oyuklara eklenerek, bağlı olan SRB'yi çözmek için 1 saat boyunca çalkalandı. Çözülen SRB'nin absorbansı 515 nm'de Spectra Max 340 kullanılarak ölçüldü. IC₅₀ değerleri lineer olmayan regresyon analizi ile hesaplandı (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. SRB yönteminin şematik gösterimi

3. BULGULAR

3.1. Ekstraksiyona Ait Bulgular

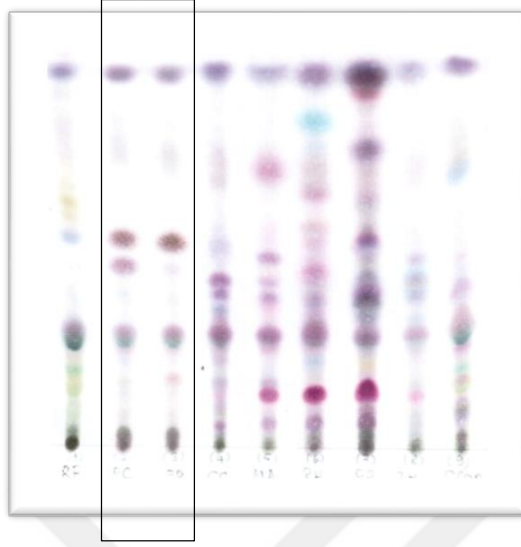
İzolasyon ve aktivite tayini deneylerinde, daha fazla örnek toplayabilme şansına sahip olduğumuz *P. cordaeana* kullanılmıştır. *P. platyphylla* ile sadece ön denemeler ve ön aktivite tayinleri yapılabilmektedir. Böylece, *Porella cordaeana*'ya ait örnekler uygun şekilde kurutulup, parçalandıktan sonra tartımı alınmış olup (230,44 g) dietileter ile 3 hafta karanlık ve serin bir yerde ara sıra karıştırarak yapılan ekstraksiyon ve süzme işlemi, ve rotavaporda yoğunlaştırma sonucu 6 g koyu yeşil renkli, yağlı ve yoğun yapıda, ham ekstre elde edilmiştir.

3.2. Kromatografik Yöntemlere Ait Bulgular

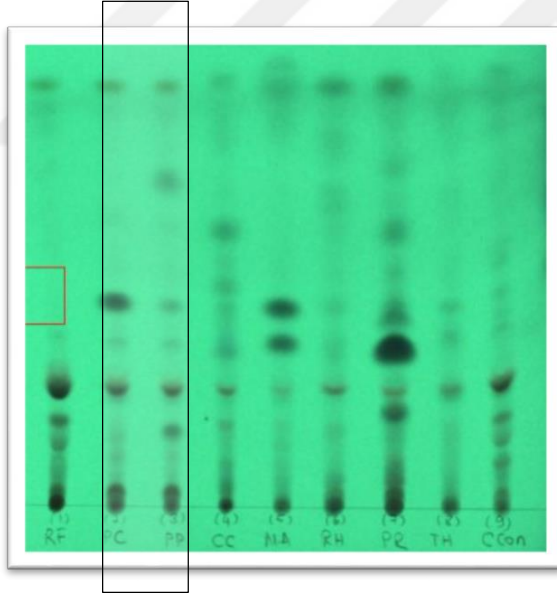
3.2.1. İnce Tabaka Kromatografisine (İTK) Ait Bulgular

Çalışmamızda ekstreler (eterli ekstreler) İTK ile incelenmiş olup, bunun sonucunda elde edilmiş olan İTK'ne ait plakların fotoğrafları çekilmiştir. Ekstrelerin ayrımı, İTK kullanılarak gerçekleştirildikten sonra, karşılaştırmalı fotoğrafları da (Şekil 3.1- 3.4 arasında) verilmiştir. Bitkilerin eterli ekstrelerindeki bileşikler, hekzan ve etil asetatın farklı bileşimleri ile hazırlanan mobil faz yardımı ile (R_f değerleri de gözlemlenerek) plakta verdikleri lekeler göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, yapılan uygulamalarda; ekstreler için uygulanan İTK'da, hem gün ışığında, hem de UV dalga boylarında (254 ve 366 nm), hem de reaktif uygulandıktan sonra gün ışığı, UV yardımı ile; ayrıca yine aynı plağa ısı uygulanması ile incelenmiştir. Tüm bu çalışmalara ait bulgular aşağıdaki resimlerde verilmiştir (Şekil 3.1-3.4).

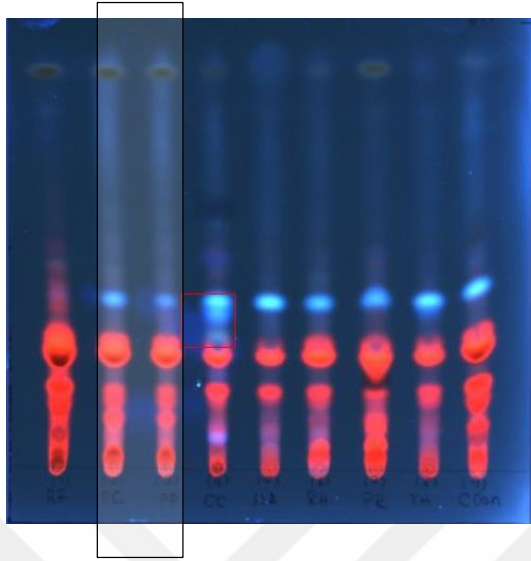
Şekillerden de anlaşılacağı üzere, plakta ilk ilerleyen lekelerle ait bileşikler, aromatik bileşikler, daha sonra terpenler, daha sonra plakta daha üst kısımda kalan bileşikler ise hidrokarbonları temsil etmektedir.



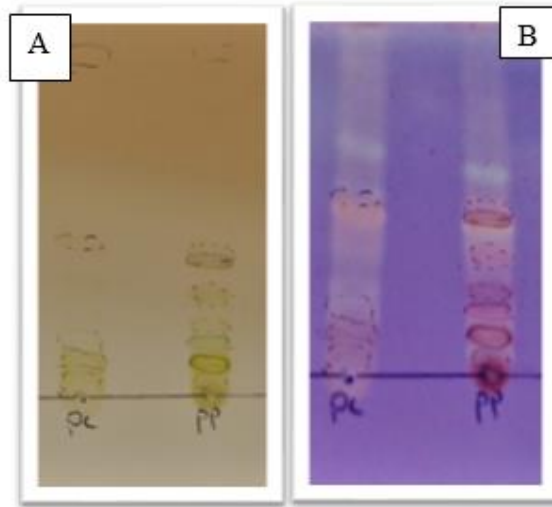
Şekil 3.1. PC (*Porella cordeana*) ve PP (*P. playthphlla*) eterli ekstreleri n-hekzan:etilasetat (4:1)-Godin reaktifi ile 100 °C’de yakılması ile, gün ışığında



Şekil 3.2. PC (*Porella cordeana*) ve PP (*P. playthphlla*) eterli ekstreleri n-hekzan:etilasetat (4:1)-Godin reaktifi ile 100 °C’de yakılması ile ve 254 nm UV ışığında



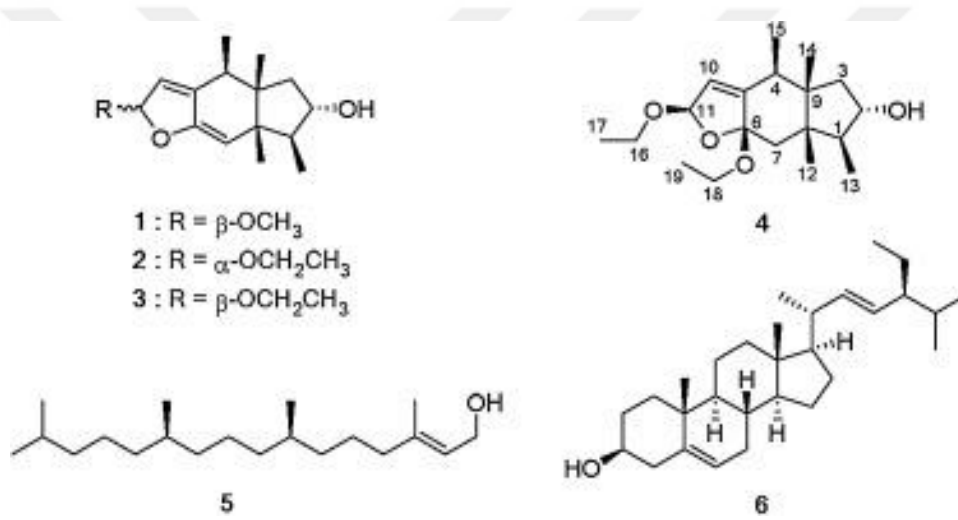
Şekil 3.3. PC (*Porella cordeana*) ve PP (*P. playthphlla*) eterli ekstreleri n-hekzan:etilasetat (4:1)-Godin reaktifi ile 100 °C’de yakılması ile ve 366 nm UV ışığında



Şekil 3.4. A: PC (*Porella cordeana*) ve PP (*P. playthphlla*) eterli ekstrelerinin gün ışığında görünümü, B: PC (*Porella cordeana*) ve PP (*P. playthphlla*) eterli ekstrelerinin reaktif püskürtülüp (MeOH: H₂SO₄, 1:1), 366 nm’de incelenmesi ile elde edilen ITK kromatogramları

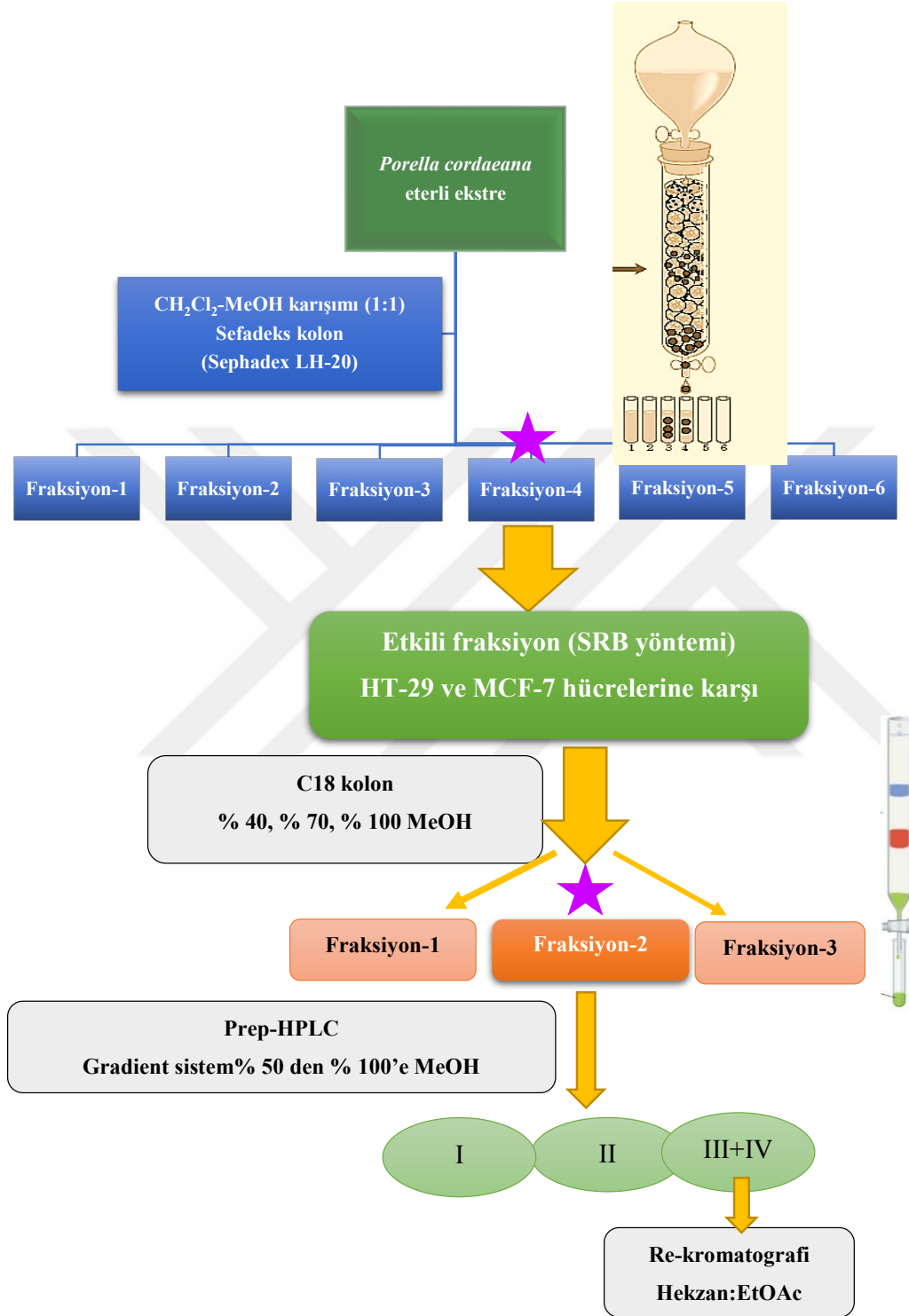
3.2.2. İzolasyona Ait Bulgular

İzolasyon çalışmaları biyoaktivite eşliğinde yapılmıştır. Biyoaktivite eşliğinde yapılan izolasyon çalışmaları sırasında, *Porella cordaeana*'dan, 4 yeni bileşik izole edilirken, bu bileşikler; Porellasetal A, B, C ve D olarak isimlendirilmiş, ve 2 bilinen bileşik de fitol ve stigmasterol olarak izole edilen bileşikler arasına girmiştir. Bu bileşiklere ait formüller aşağıda verilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *Porella cordaeana*'dan izole edilen yeni bileşikler: Porellasetal A(1), B(2), C(3), D(4) ve diğerleri fitol (5) ve stigmasterol (6)

Biyoaktivite eşliğinde yapılan izolasyona ait şema, aşağıda ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (Şekil 3.6). İzole edilen bileşikler, en aktif fraksiyon ele alınarak elde edilen bileşiklerdir.



Şekil 3.6. Biyoaktivite eşliğinde yapılan izolasyon şeması

Porellasetallerin Karakterizasyonu:

Özet olarak, spektroskopik analizler sonucunda elde edilen bileşikler aşağıdaki şekilde karakterize edilmişlerdir ve elde edilen HPLC kromatogramı (Şekil 3.7) verilmiştir:

Porellasetal A (1)

Renksiz yağ $\alpha_D^{20} -10^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log E) 202 (3.83), 256 (3.49) nm; IR (KBr) V_{max} 3425 (br), 2971, 1728, 1455, 1378, 1028 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) ve ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD), Tablo da; HRESIMS m/z 287.1619 $[M^+Na]^+$ ($C_{16}H_{26}O_3Na$, 301.1774 için hesaplanan)

Porellasetal B (2)

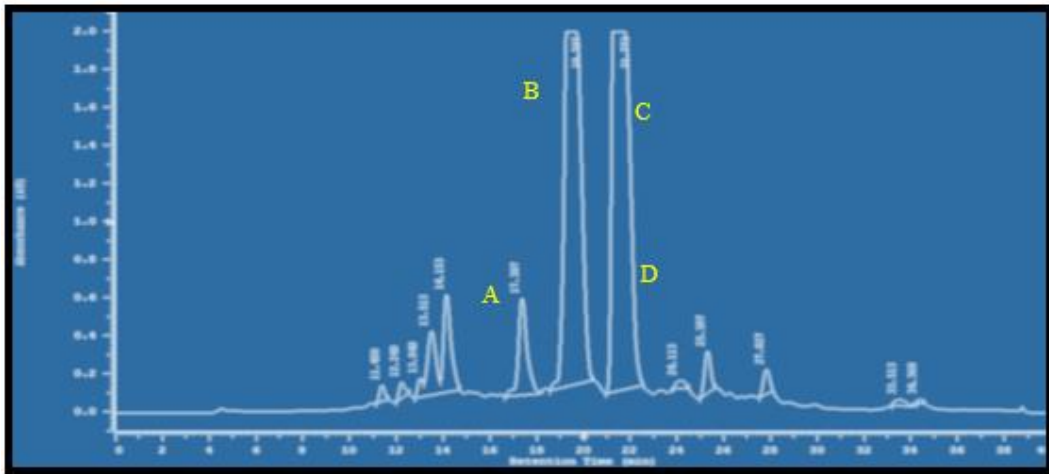
Renksiz yağ $\alpha_D^{20} -10^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log E) 204 (3.47) nm; IR (KBr) V_{max} 3432 (br), 2971, 1728, 1455, 1376, 1025 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) ve ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD), Tablo da; HRESIMS m/z 301.1776 $[M^+Na]^+$ ($C_{17}H_{26}O_3Na$, 301.1774 için hesaplanan)

Porellasetal C (3)

Sarı yağ $\alpha_D^{20} -10^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log E) 201 (3.79), 256 (3.50) nm; IR (KBr) V_{max} 3427 (br), 2971, 1728, 1455, 1378, 1025 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) ve ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD), Tablo da; HRESIMS m/z 301.1776 $[M^+Na]^+$ ($C_{17}H_{26}O_3Na$, 301.1774 için hesaplanan)

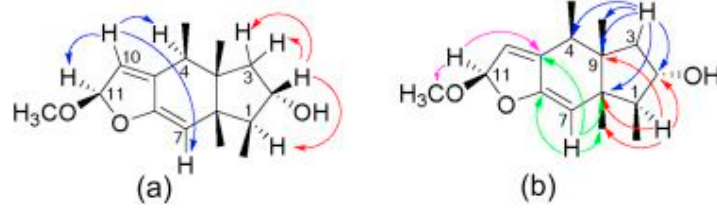
Porellasetal D (4)

Renksiz yağ $\alpha_D^{20} -10^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log E) 200 (2.97) nm; IR (KBr) V_{max} 3446 (br), 2971, 1455, 1377, 1338, 1155, 1187, 1156, 1099, 1065, 1019 cm^{-1} ; 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) ve ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD), Tablo da; HRESIMS m/z 347.2182 $[M^+Na]^+$ ($C_{19}H_{32}O_4Na$, 347.2193 için hesaplanan)

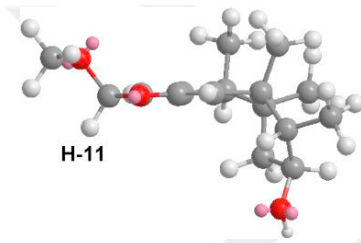


Şekil 3.7. İzole edilen porellasetallerin, 254 nm'de HPLC kromatogramı (Bileşikler preparative HPLC ile de bu alandan toplanmıştır)

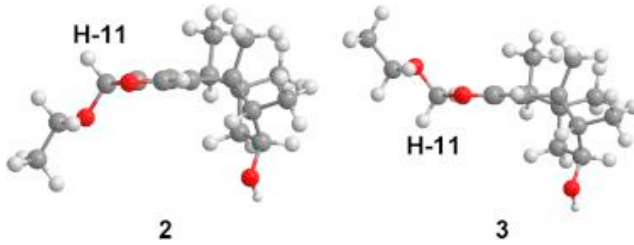
3.3. Yapı Aydınlatılmasına Ait Bulgular



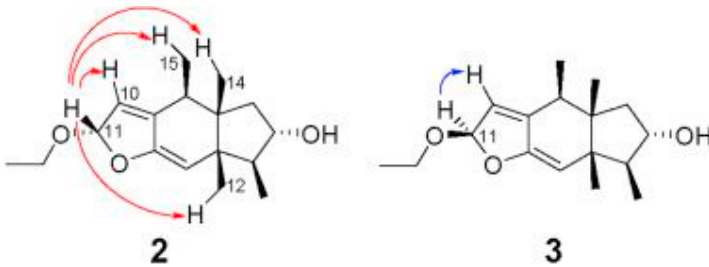
Şekil 3.8. Porellasetal A'nın (a) 1-D COSY spektrumunda korelasyon (b) Tüm yapıyı aydınlatmak için yararlanılan, HMBC korelasyonu



Şekil 3.9. Porellasetal A (1) 3 boyutlu görünümü



Şekil 3.10. Porellasetal B (2) ve Porellasetal C (3)'nin 3 boyutlu görünümü



Şekil 3.11. Porellasetal B (2) ve Porellasetal C (3)'nin C-11 deki relatif konfigürasyonunun NOESY korelasyonu ile incelenmesi

Şekil 3.12- 3.72 arasında Porellasetal A-D maddelerinin her birine ait sırasıyla; UV, IR, NMR ve MS spektrumları verilmiştir.

Porellasetal A'nın yapısı tek boyutlu ve iki boyutlu NMR deneyleriyle belirlenmiştir. İlk olarak, bu bileşikte mevcut olan kısmi yapılar, tek boyutlu seçici Korelasyon Spektroskopisi (1-D COSY) ile oluşturulmuştur (Şekil 3.8 (a)). UV spektrumunda görüldüğü gibi çift bağ konjugasyonunun varlığını daha da kanıtlanmıştır (Şekil 3.12). Daha sonra, molekülün tüm yapısını aydınlatmak için HMBC'den yararlanılmıştır (Şekil 3.8 (b)). Elde edilen diğer spektrumlar sonucunda (Şekil 3.12-3.24) Porellasetal A'nın 3 boyutlu yapısı ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.9).

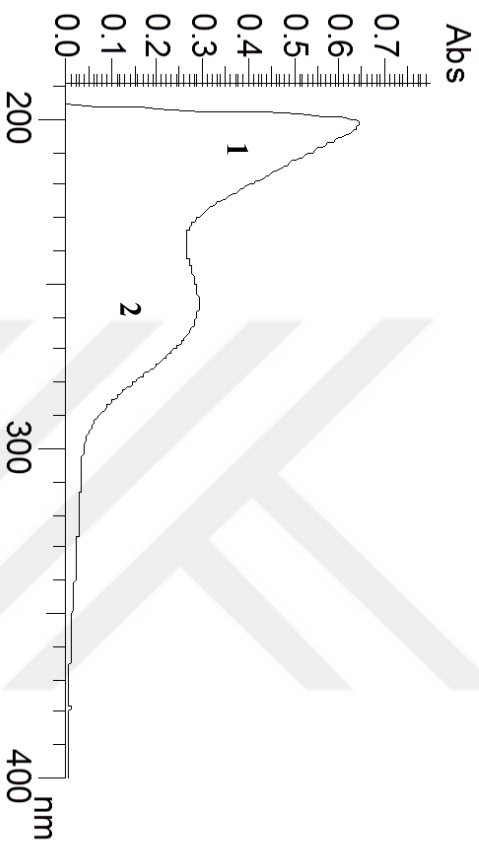
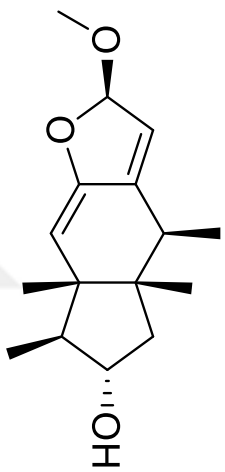
Porellasetal B'nin yapısı da spektroskopik veriler sonucunda (Şekil 3.25-3.39) ^1H ve ^{13}C NMR spektrumlarının incelenmesi, aynı zamanda bir pinguisane tipi seskiterpenoid olduğunu işaret etmektedir. NMR spektrumları sonucu metoksil grubu yerine bir etoksil grubuna atfedilebilen bir dizi sinyaller hariç, Porellasetal A'ya yapısal olarak çok benzemektedir (Şekil 3.10 (2)).

Porellasetal C'ye ait spektrumlar incelenmiş (Şekil 3.40-3.54) ve HMBC ve 1-D COSY spektrumları sonucu Porellasetal B ile özdeş olan Porellasetal C maddesinin bağlar arası korelasyonu gerçekleştirilmiş ve Porellasetal B ile C'in epimer olduğu da kanıtlanmıştır. Şekil 3.11 (2 ve 3)'de NOESY spektrumunun incelenmesi ile elde edilen spektrumlar sonucu kimyasal yapıları görülmektedir.

Porellasetal D'ye ait spektrumlar (Şekil 3.55-3.70) ilerdeki şekillerde yer almaktadır. Bu maddeye ait ^1H NMR spektrumu da daha önce bahsedilen üç yeni bileşiğe benzer olmakla beraber, Porellasetal D'nin de aynı zamanda bir pinguisane tipi seskiterpenoit olduğunu ortaya çıkarmıştır. Porellasetal A-C'nin aksine, Porellasetal D'nin UV spektrumu (Şekil 3.55), konjuge olmuş doymamış sistemin absorpsiyon özelliklerini göstermemiştir.

3.3.1. Spektroskopik Yöntemlere Ait Bulgular

PORELLASETAL A(1)

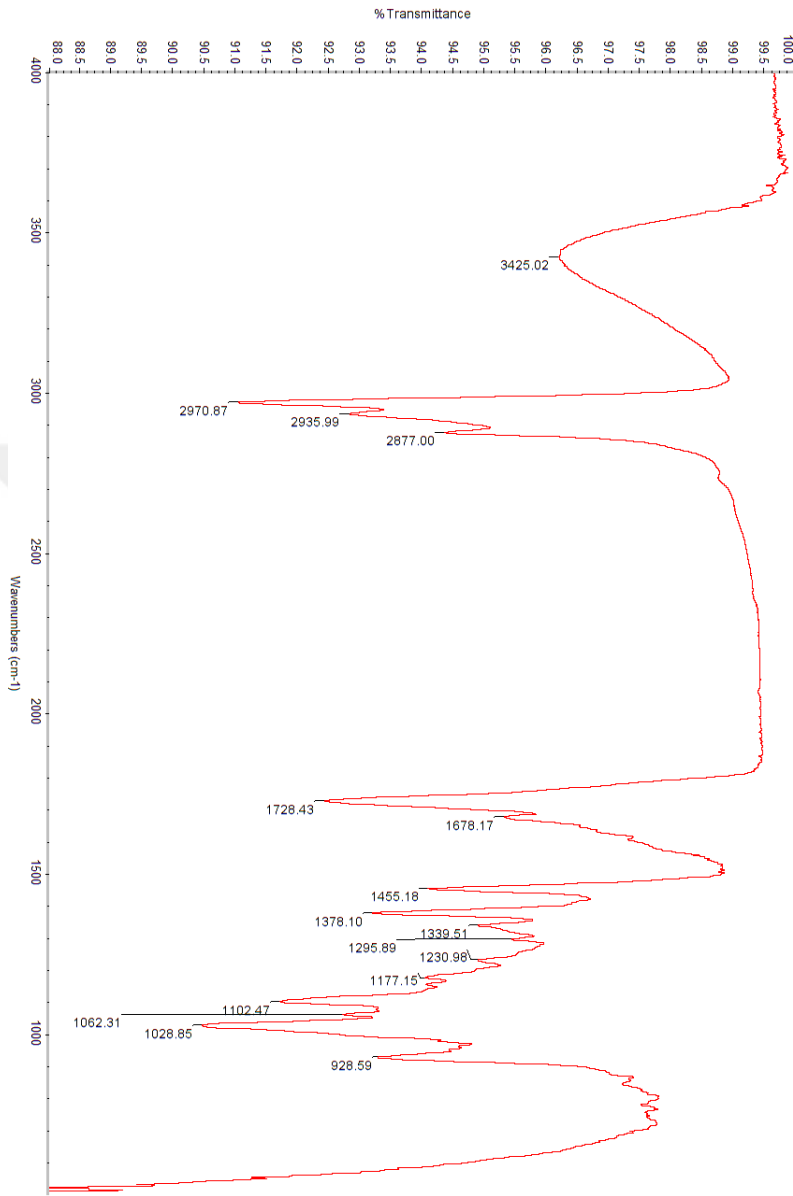
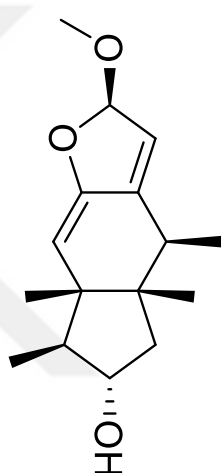


Şekil 3.12. UV spektrum (0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)

Çizelge 3.1. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyları ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayıları

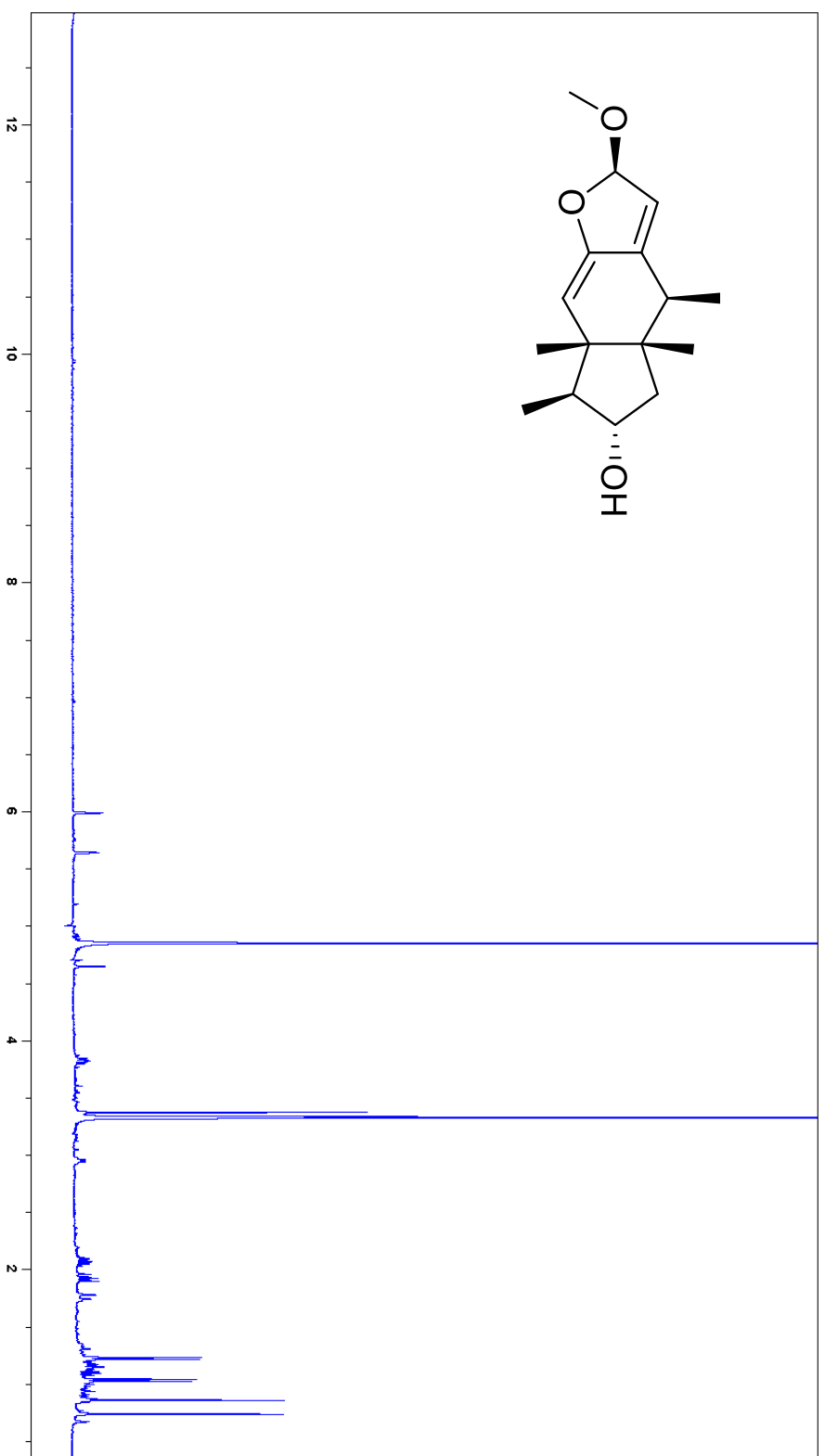
Peak	λ_{max} (nm)	Absorbance at λ_{max}	$\text{Log } [\epsilon] \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$
1	201.5	0.645	3.83
2	255.5	0.292	3.49

Porellasetal A (1)



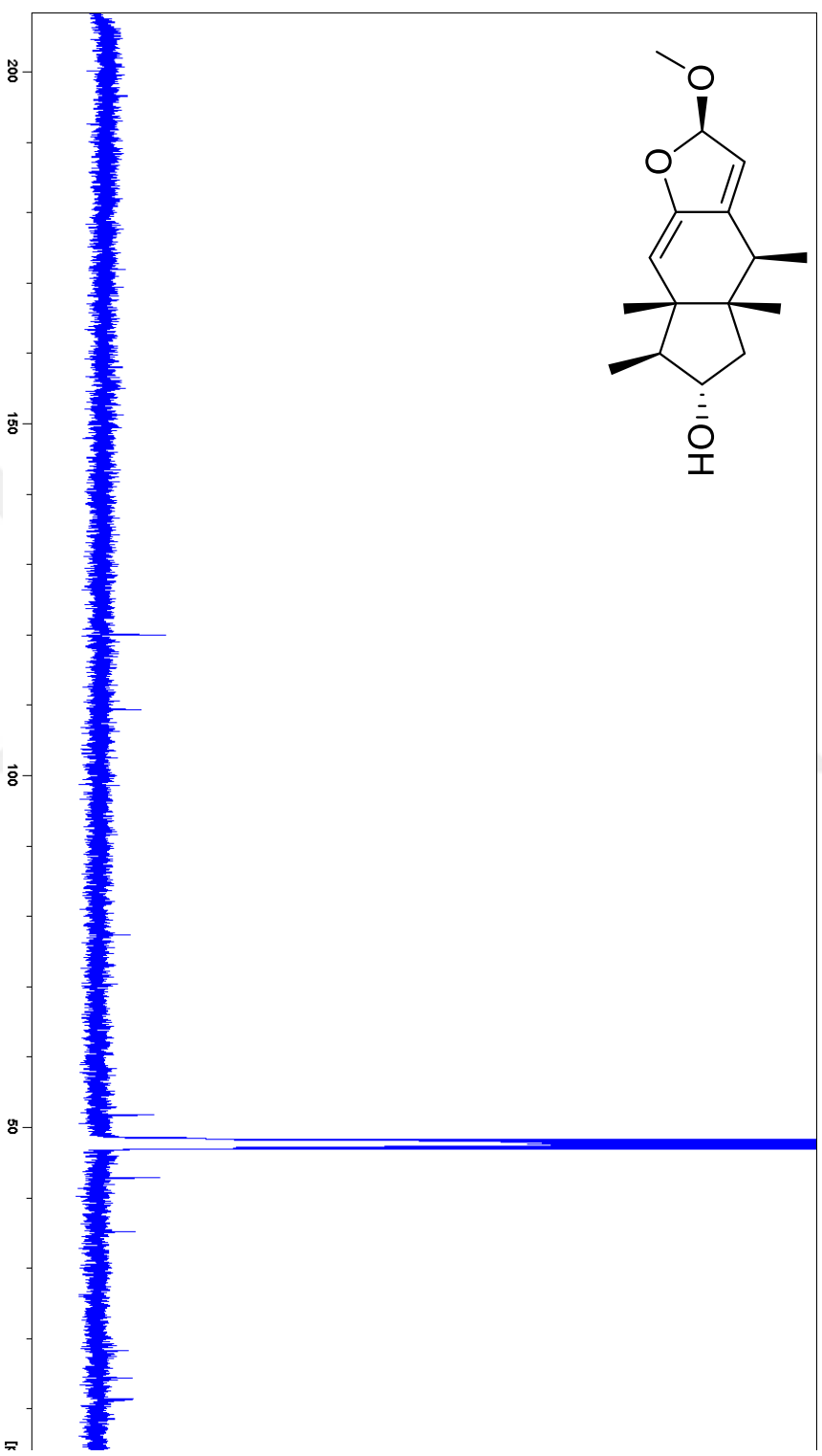
Şekil 3.13. KBr film içinde IR spektrumu (1)

Porellasetal A (1)



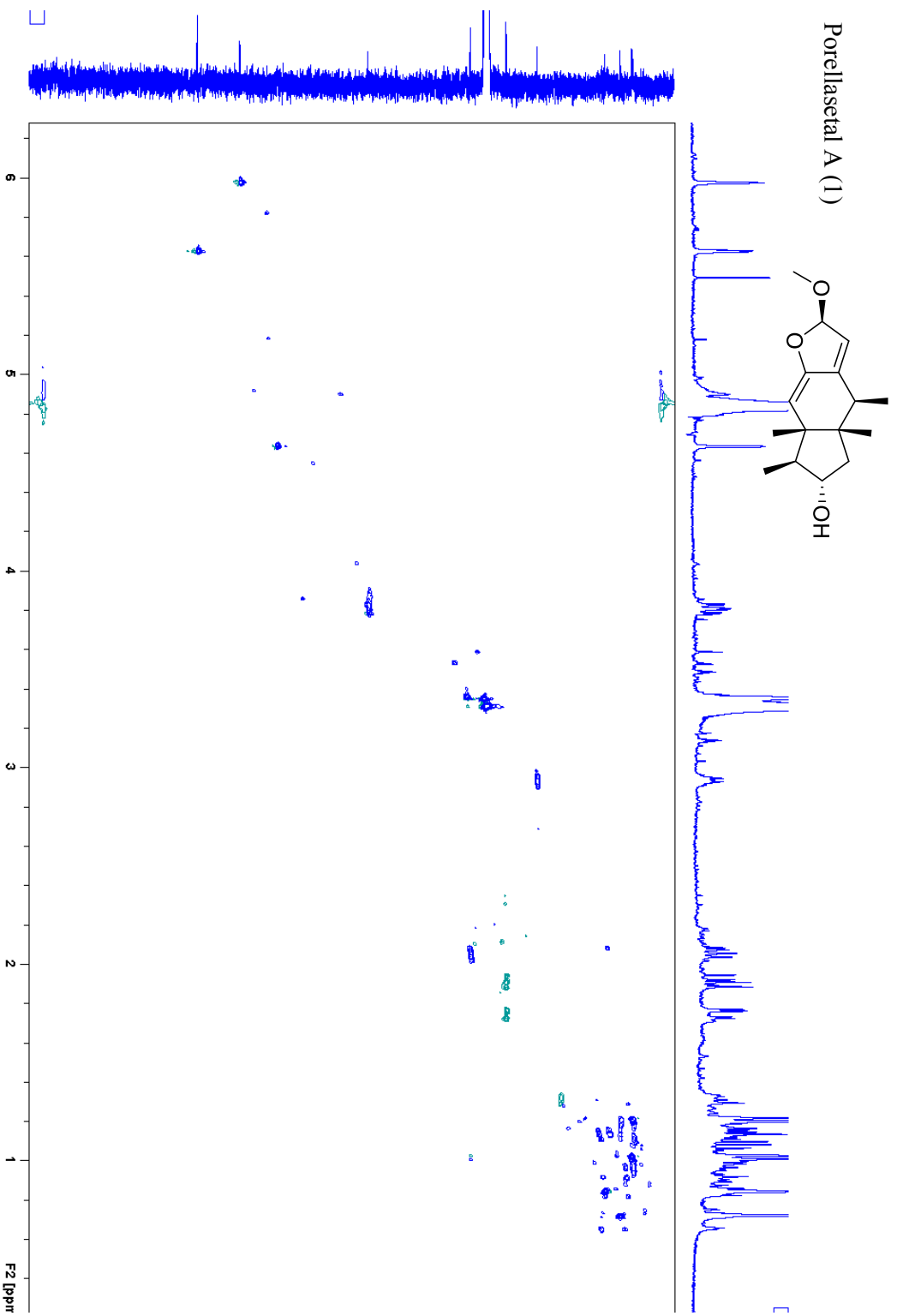
Şekil 3.14. ^1H NMR spektrumu (1) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal A (1)



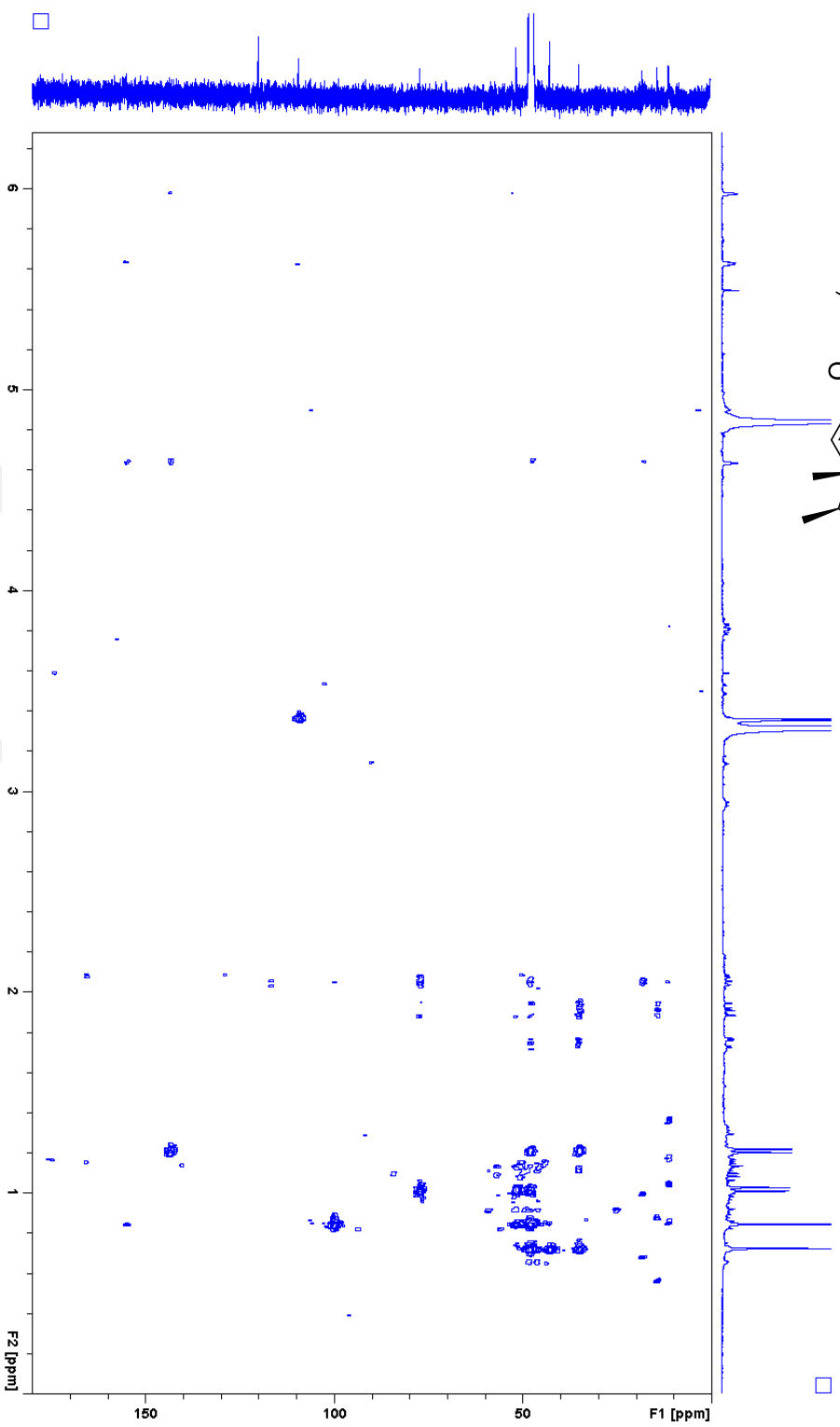
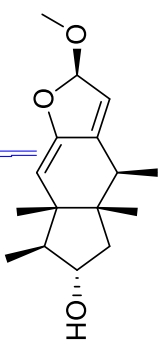
Şekil 3.15. ^{13}C NMR spektrumu (1) (100 MHz, CD_3OD)

Porellasetal A (1)



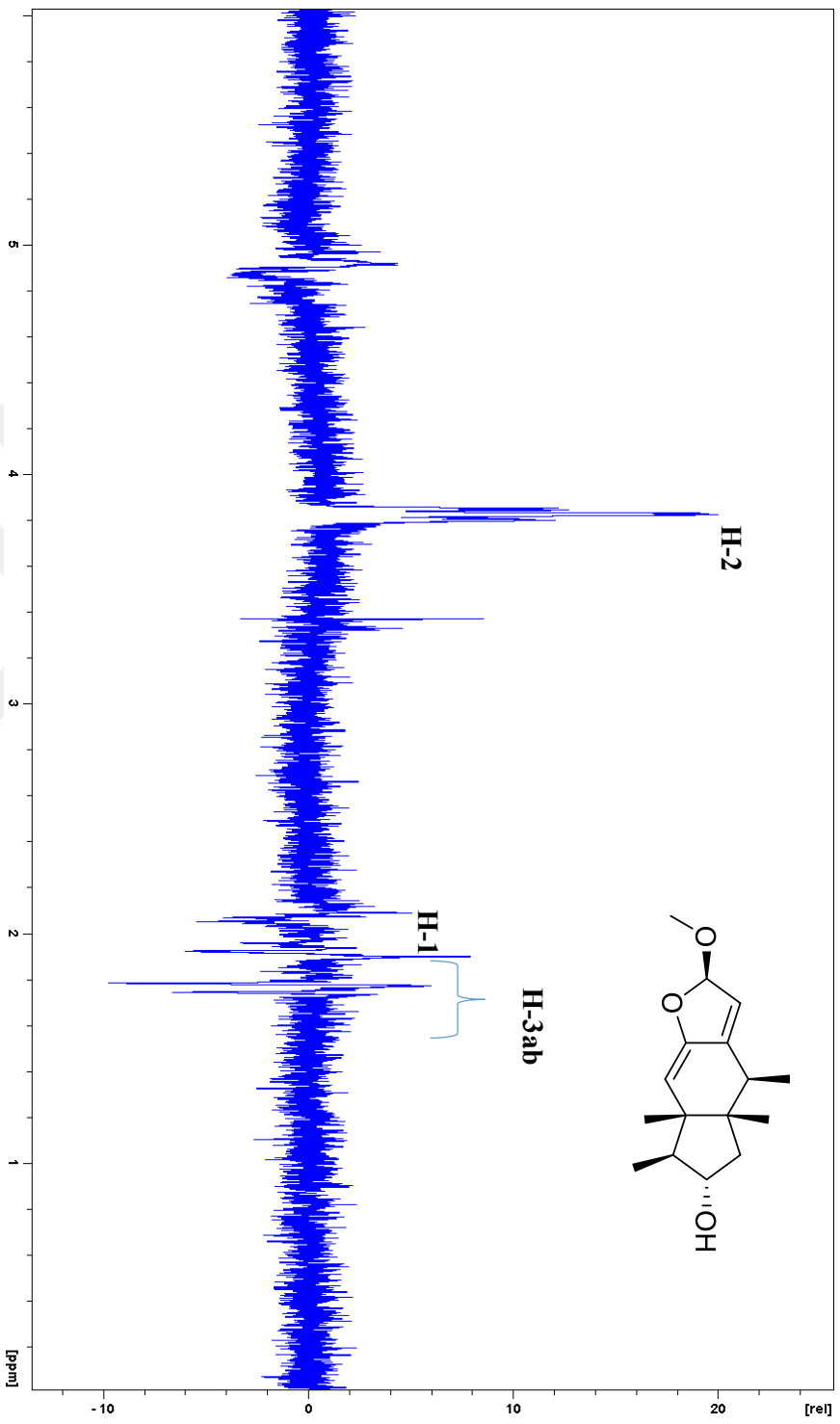
Şekil 3.16. HSQC spektrumu (1) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal A (1)



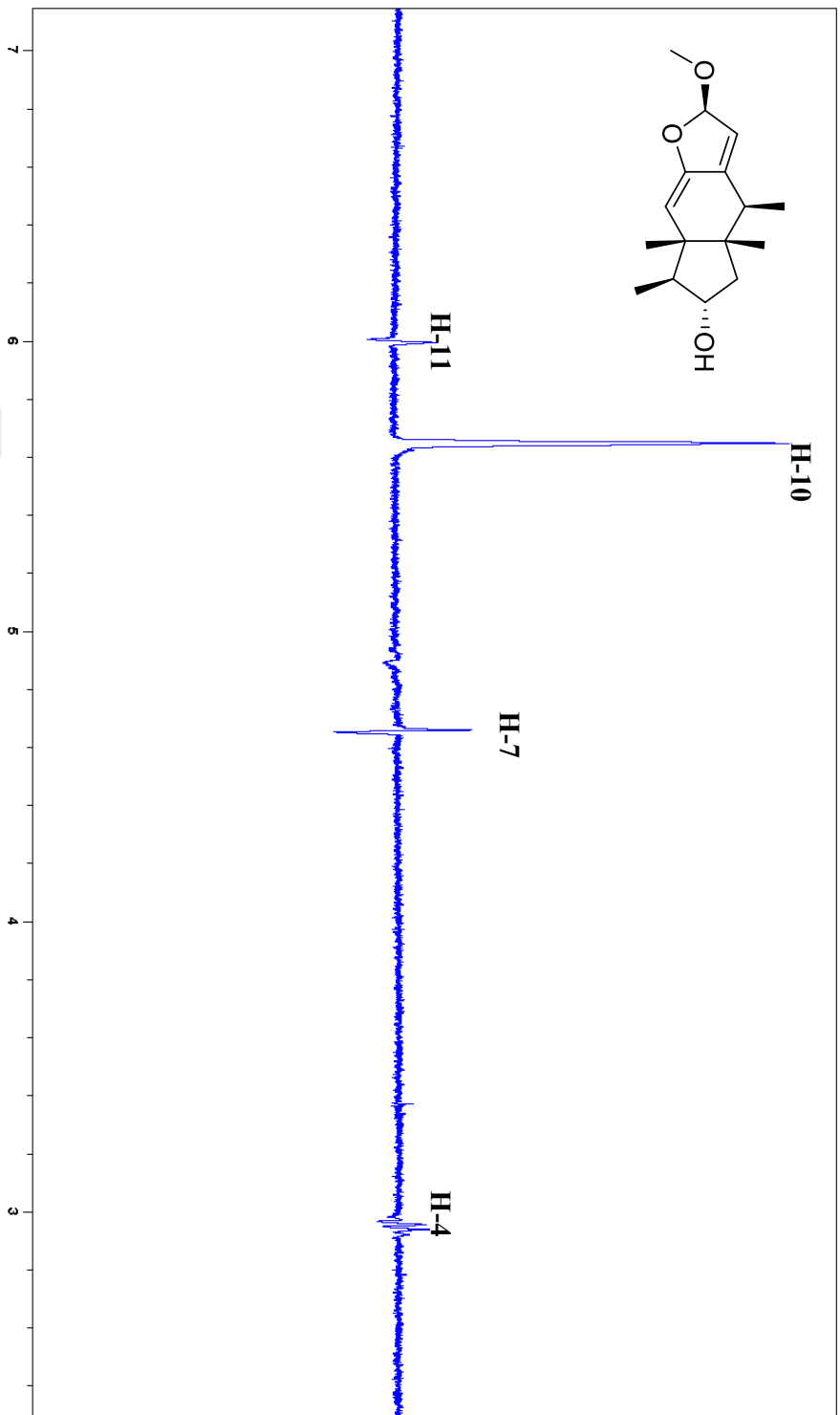
Şekil 3.17. HMBC spektrumu (1) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal A (1)



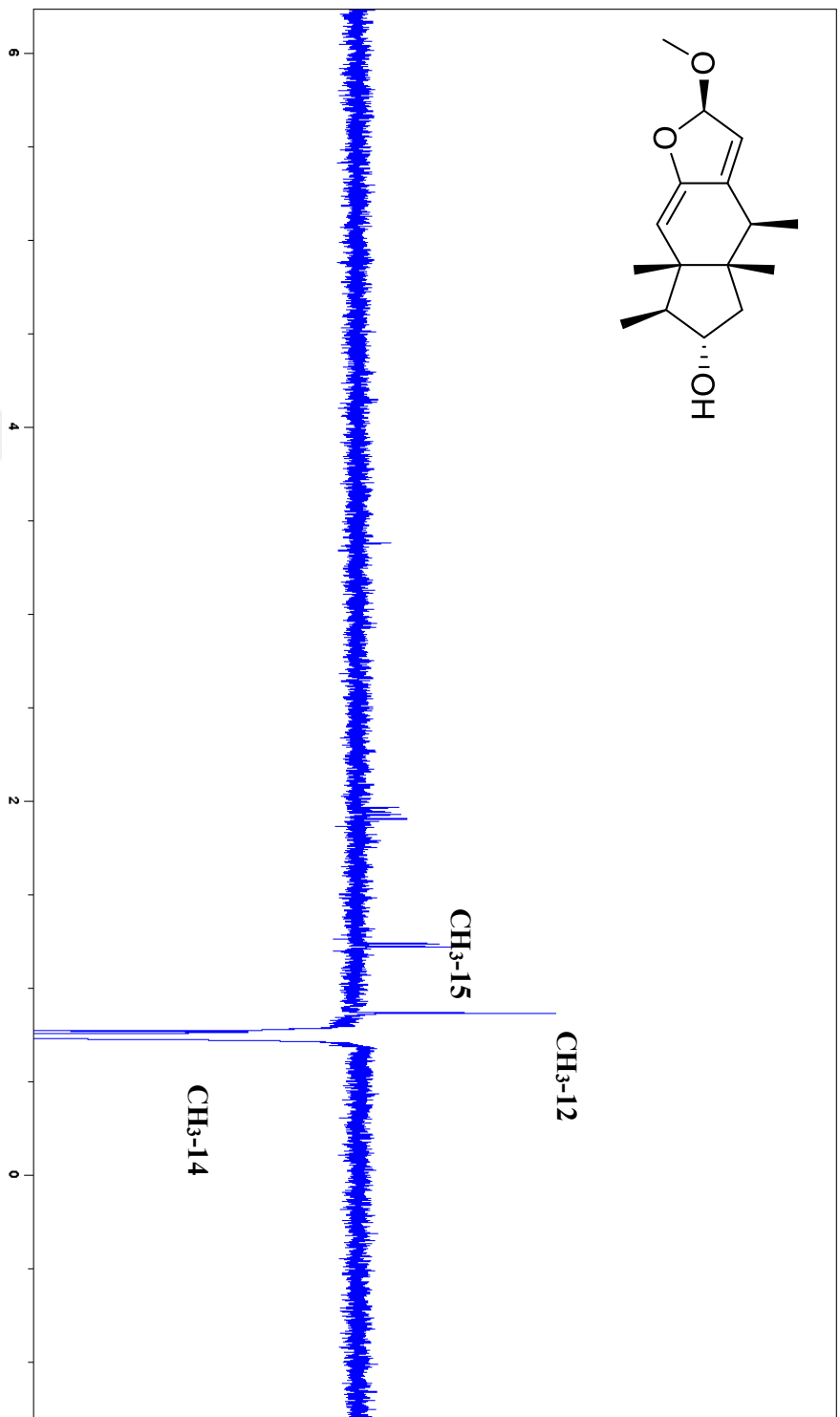
Şekil 3.18. 1-D COSY spektrumu (1) (δ 3.80 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal A (1)



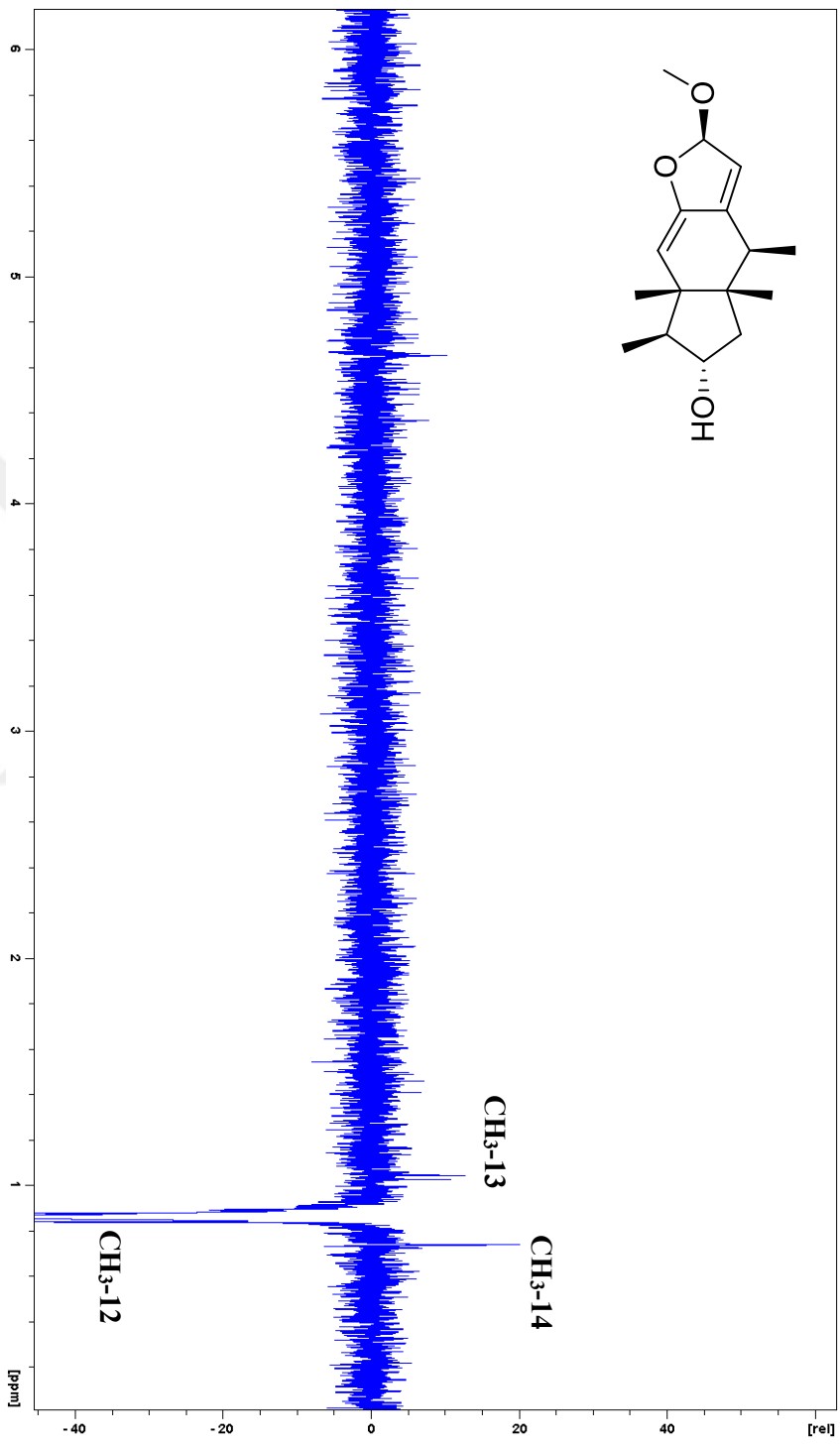
Şekil 3.19. 1-D COSY spektrumu (1) (δ 5.62 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal A (1)



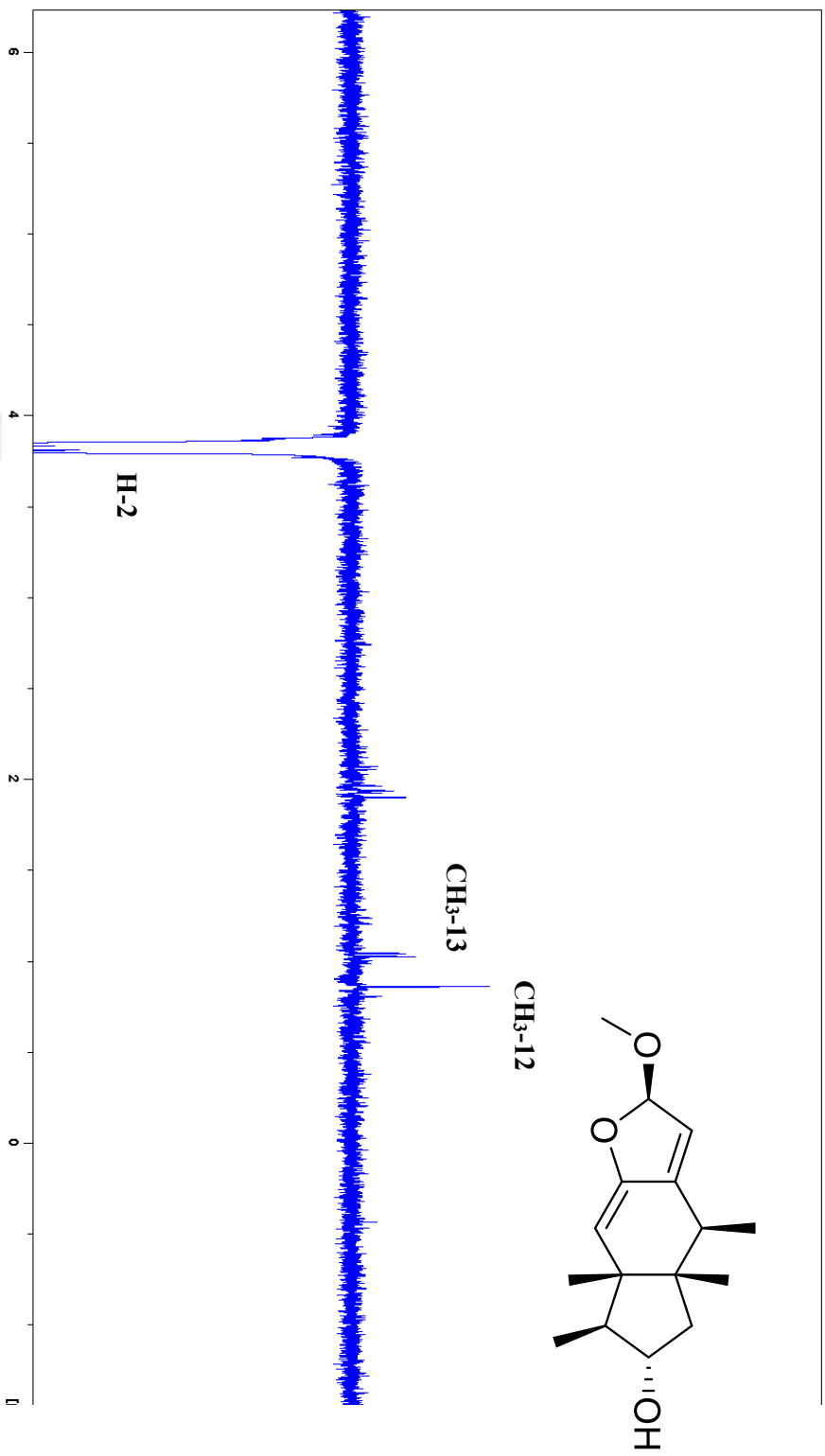
Şekil 3.20. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 0.72 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal A (1)



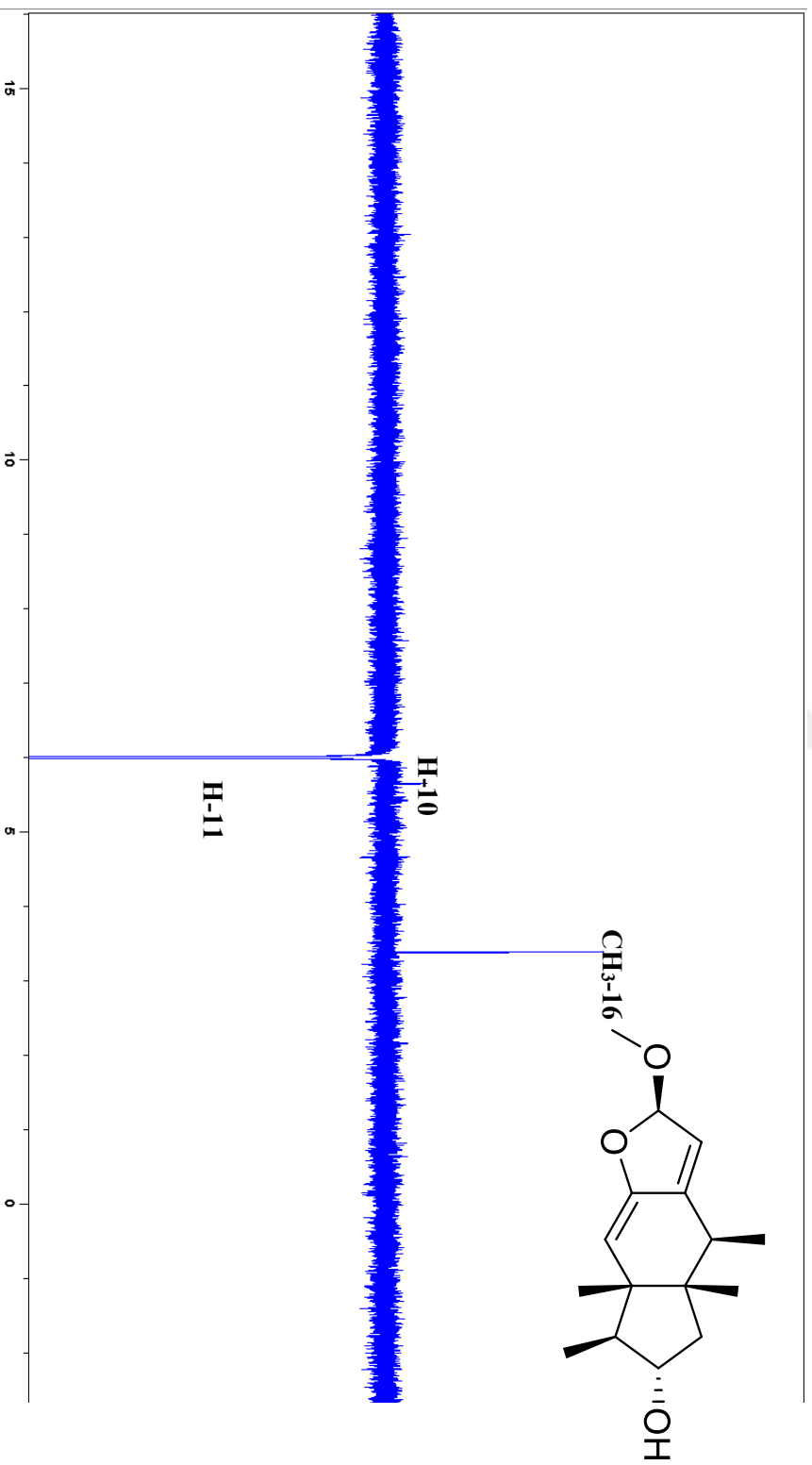
Şekil 3.21. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 0.84 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal A (1)



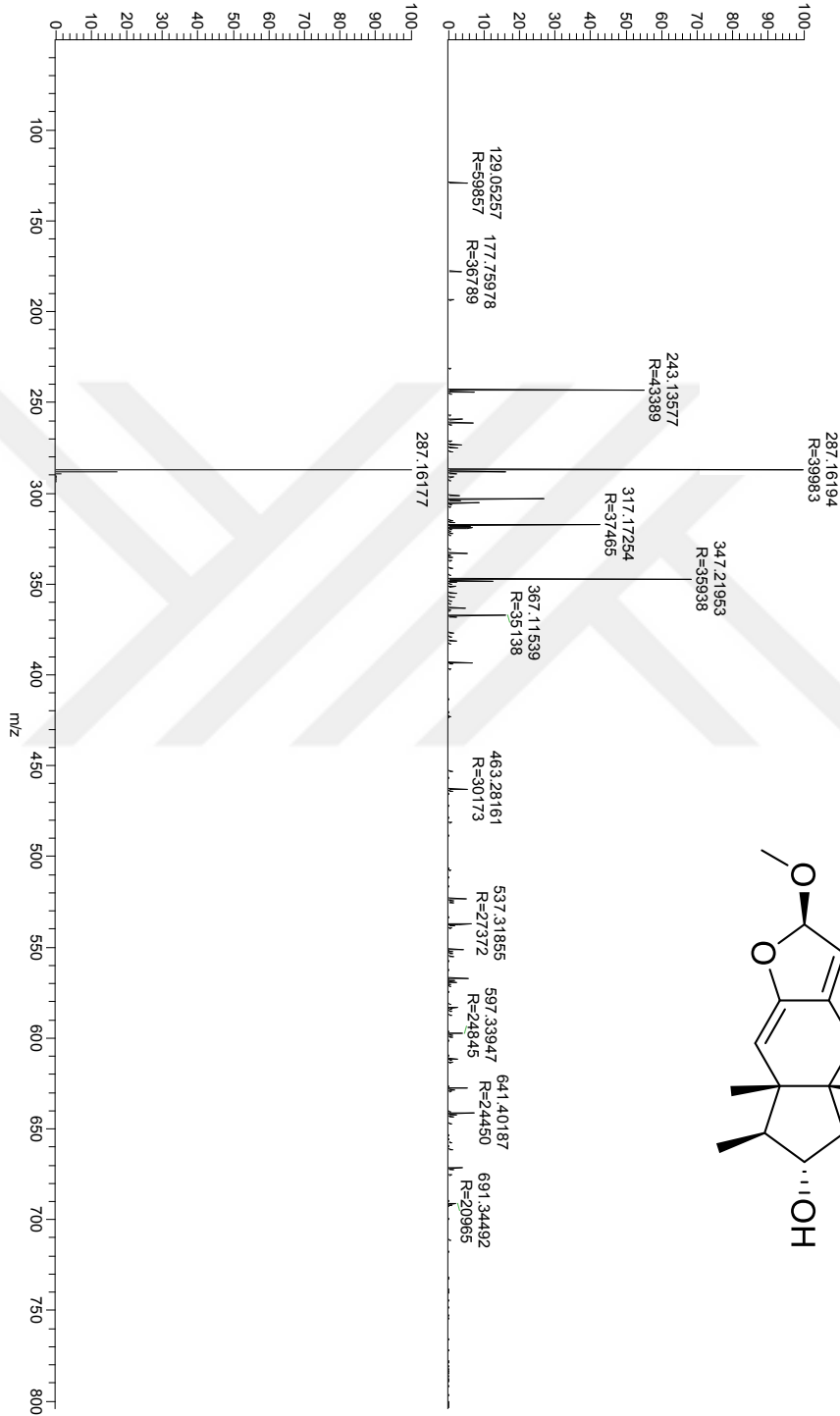
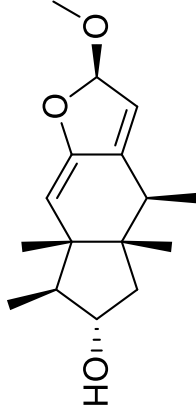
Şekil 3.22. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 3.80 de ışınlama ile alınan sinyal ile) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal A (1)



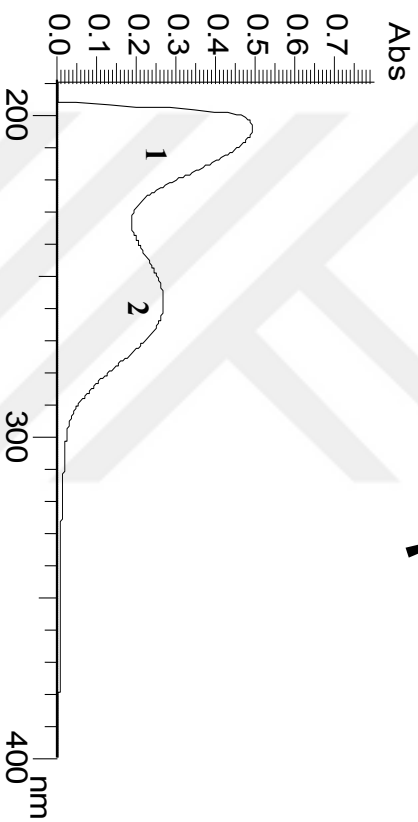
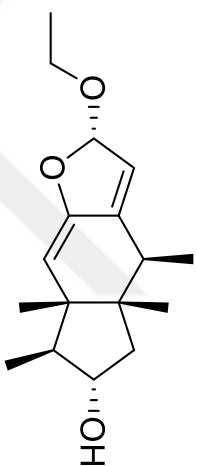
Şekil 3.23. 1-D NOESY spektrumu (1) (δ 5.94 de ısnılama ile alman sinyal ile) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal A (1)



Şekil 3.24. HRESIMS (1), $C_{16}H_{20}O_3$, at m/z : 287.1619 $[M+Na]^+$ ($C_{16}H_{20}O_3Na$ için hesaplanan, 287.1617)

PORELLASETAL B (2)

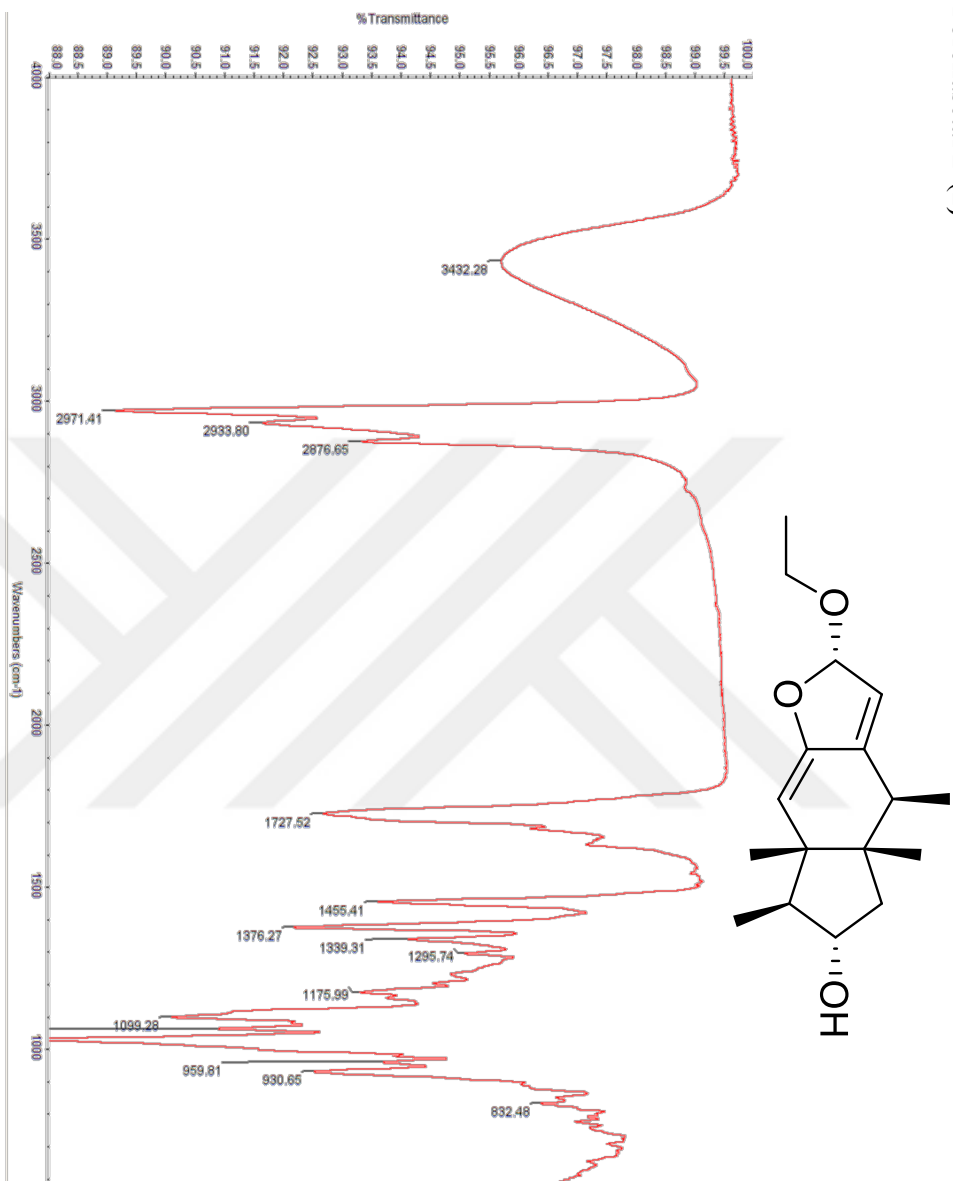


Şekil 3.25. UV spektrum (0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)

Çizelge 3. 2. Bileşiğin maksimum absorptansta dalga boyları ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayıları

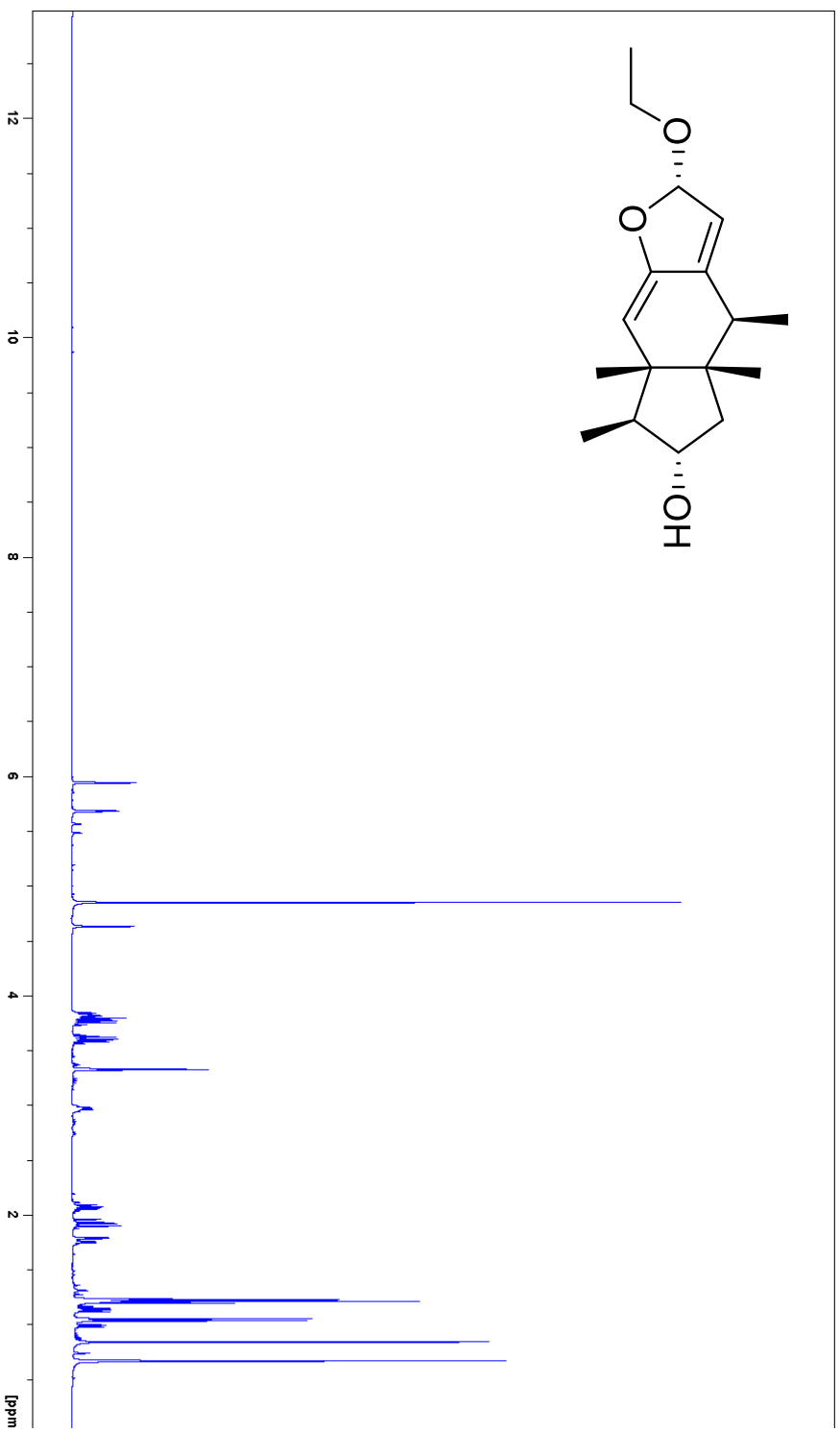
Peak	λ_{max} (nm)	Absorbance at λ_{max}	Log [ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)]
1	204	0.492	3.74
2	258.5	0.268	3.47

Porellasetal B (2)



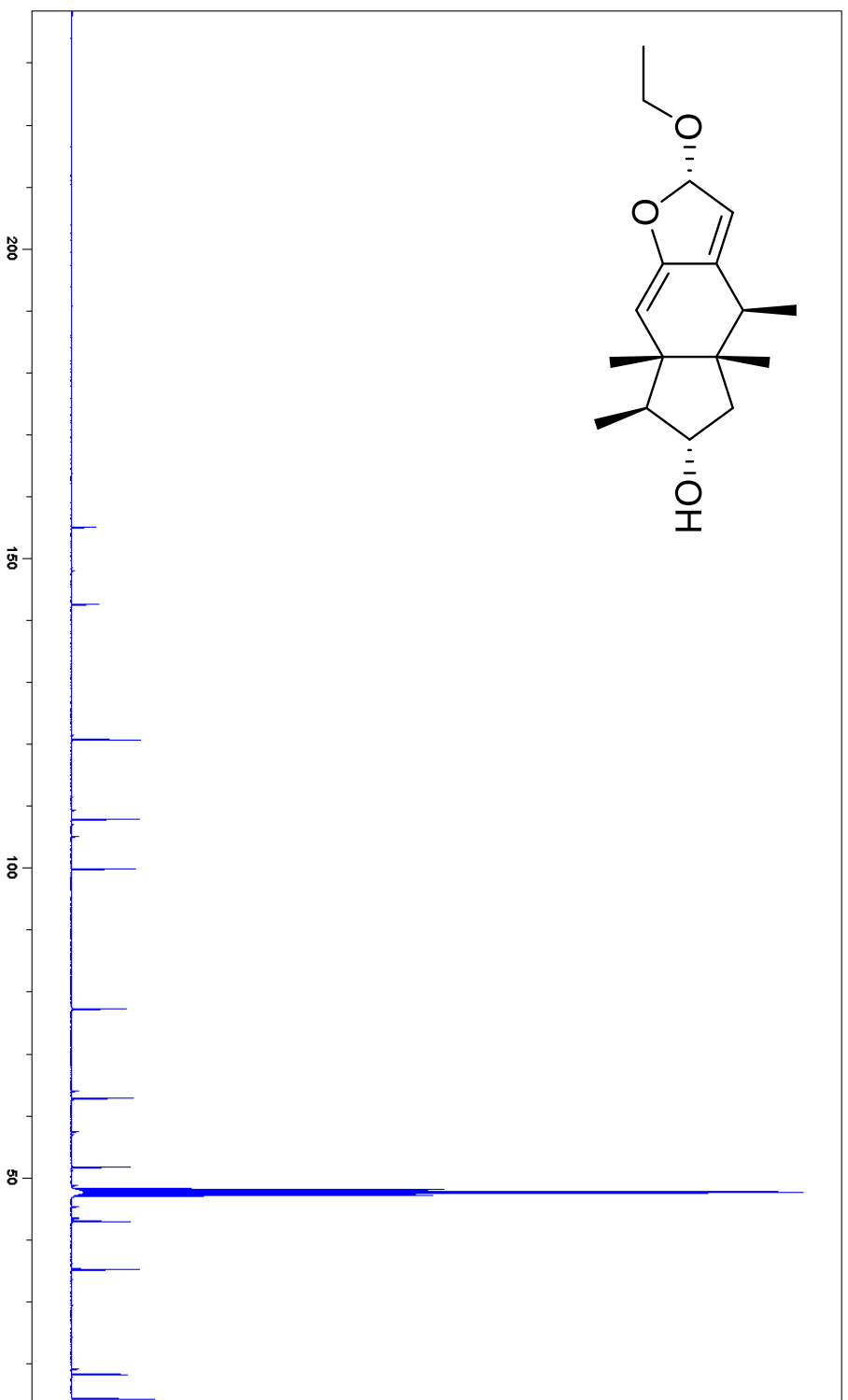
Şekil 3.26. KBr film içinde IR spektrumu (2)

Porellasetal B (2)



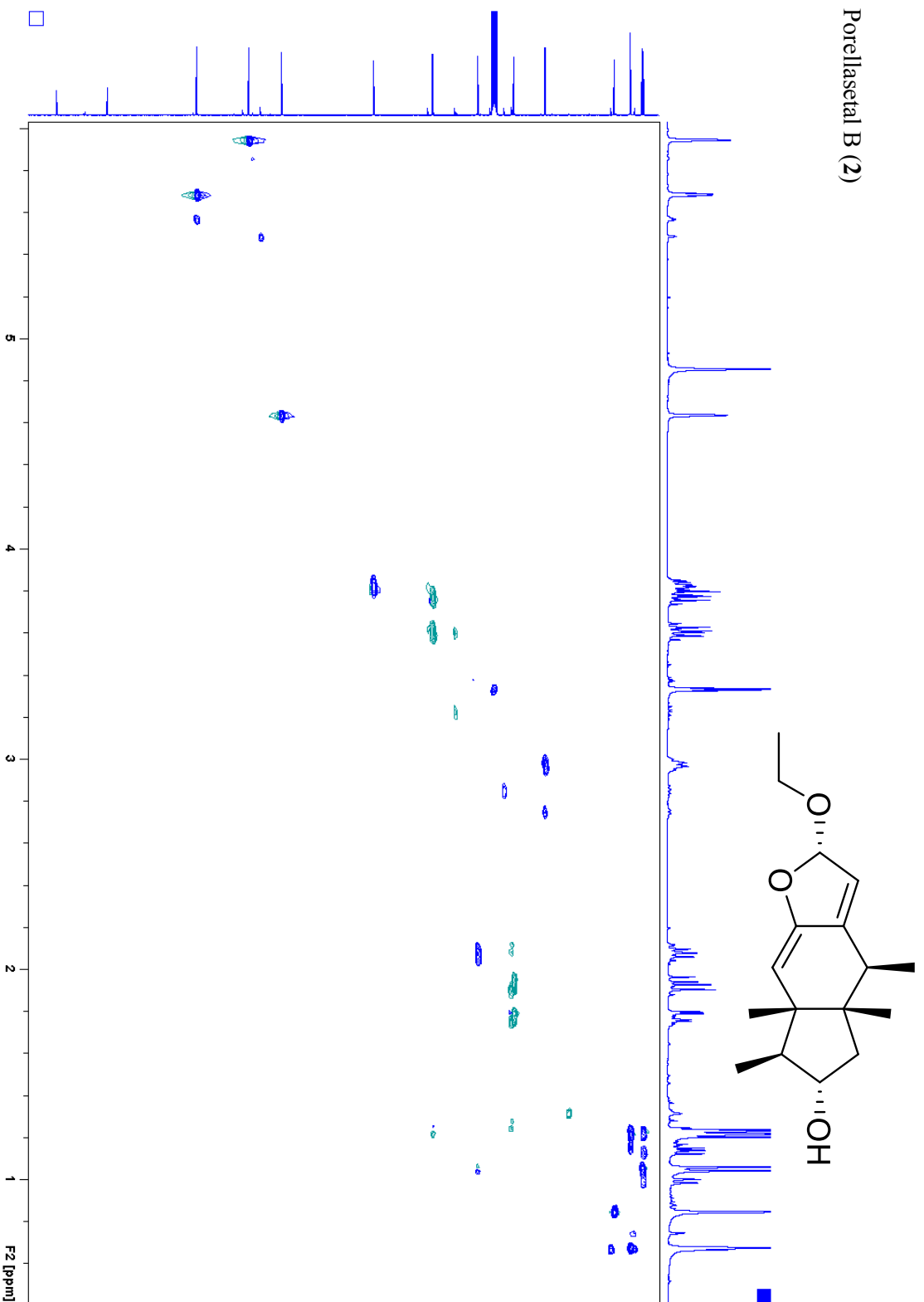
Şekil 3.27. ^1H NMR spektrumu (2) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal B (2)



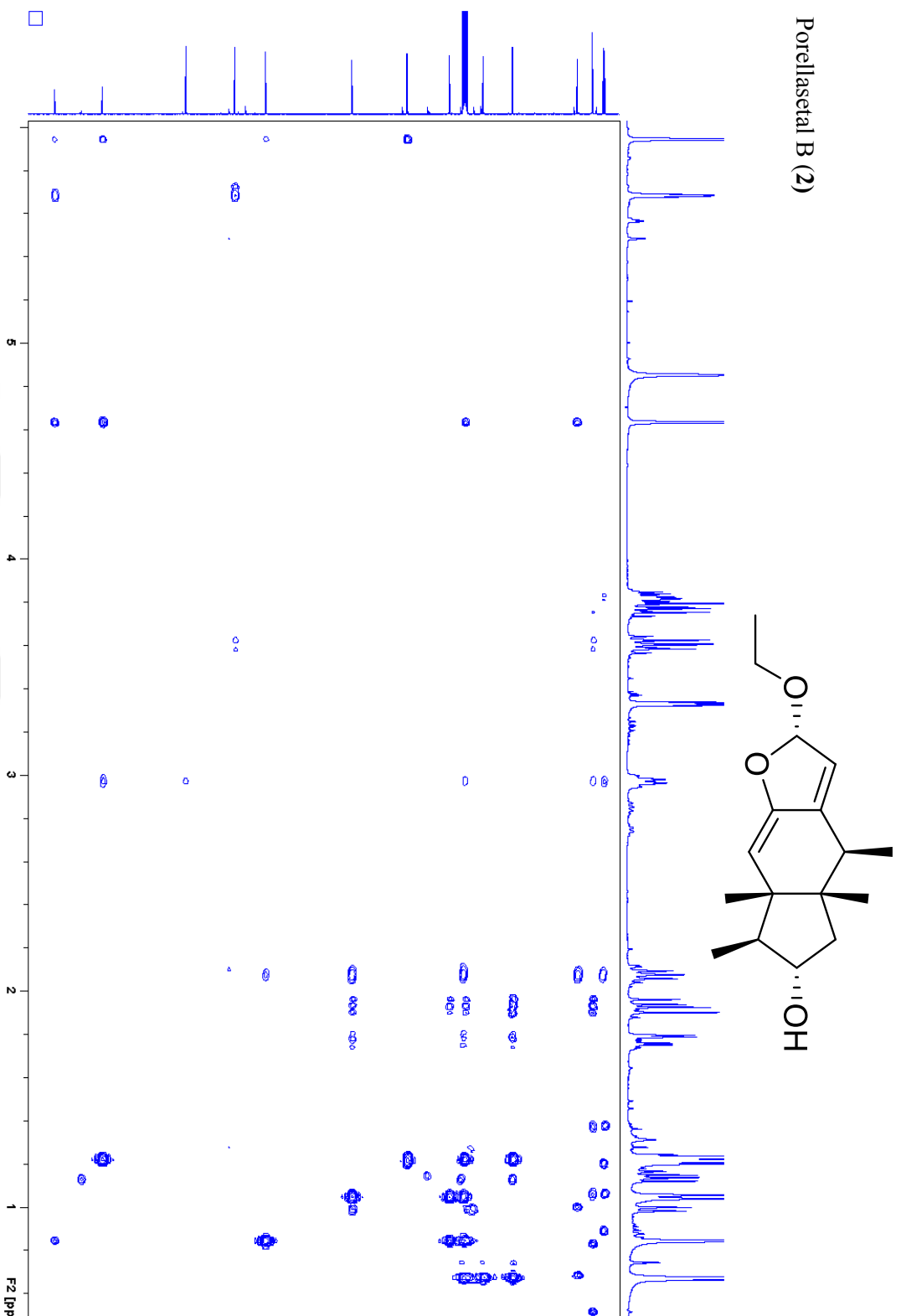
Şekil 3.28. ^{13}C NMR spektrumu (2) (100 MHz, CD_3OD)

Porellasetal B (2)



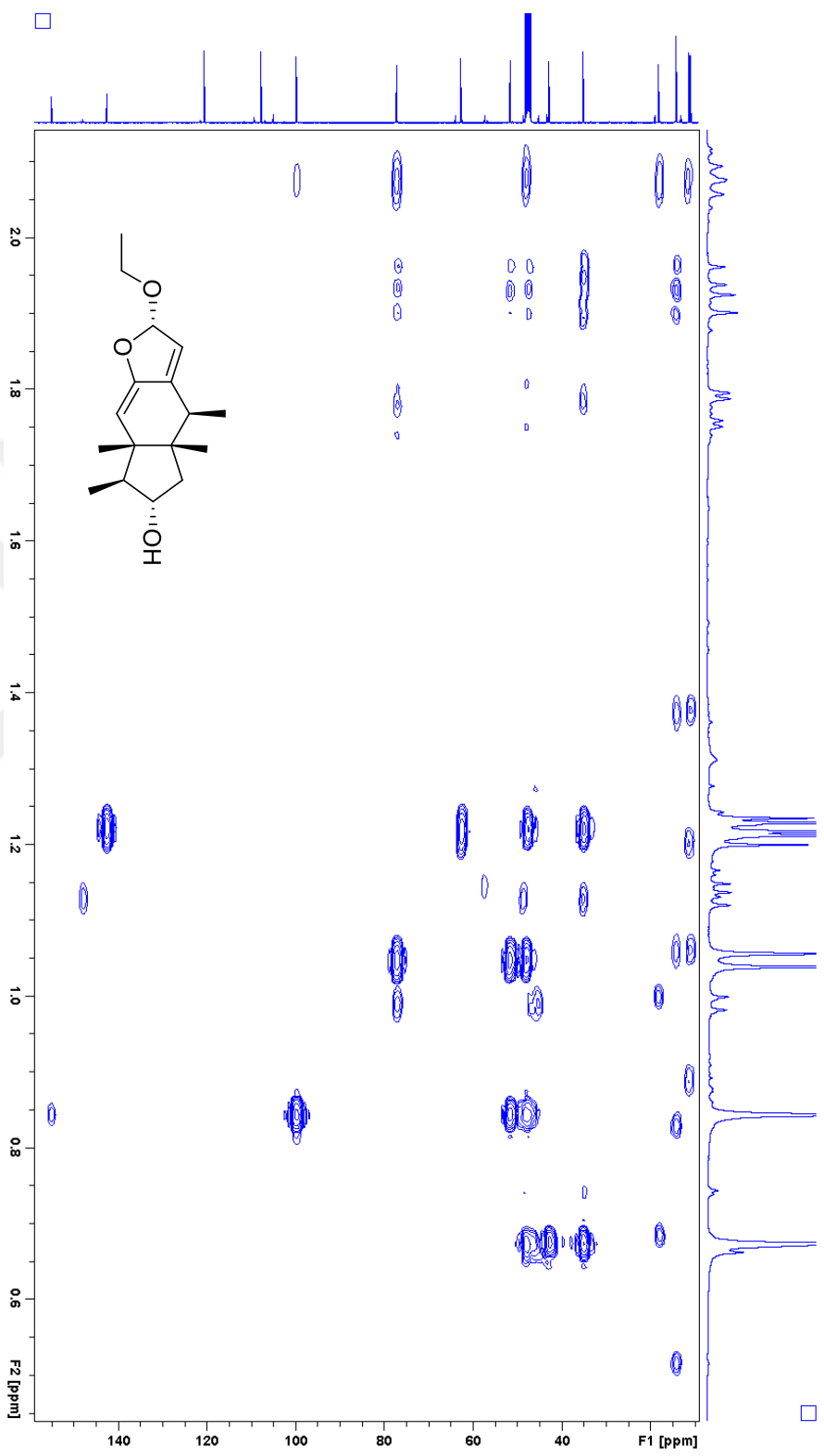
Şekil 3.29. HSQC spektrumu (2) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



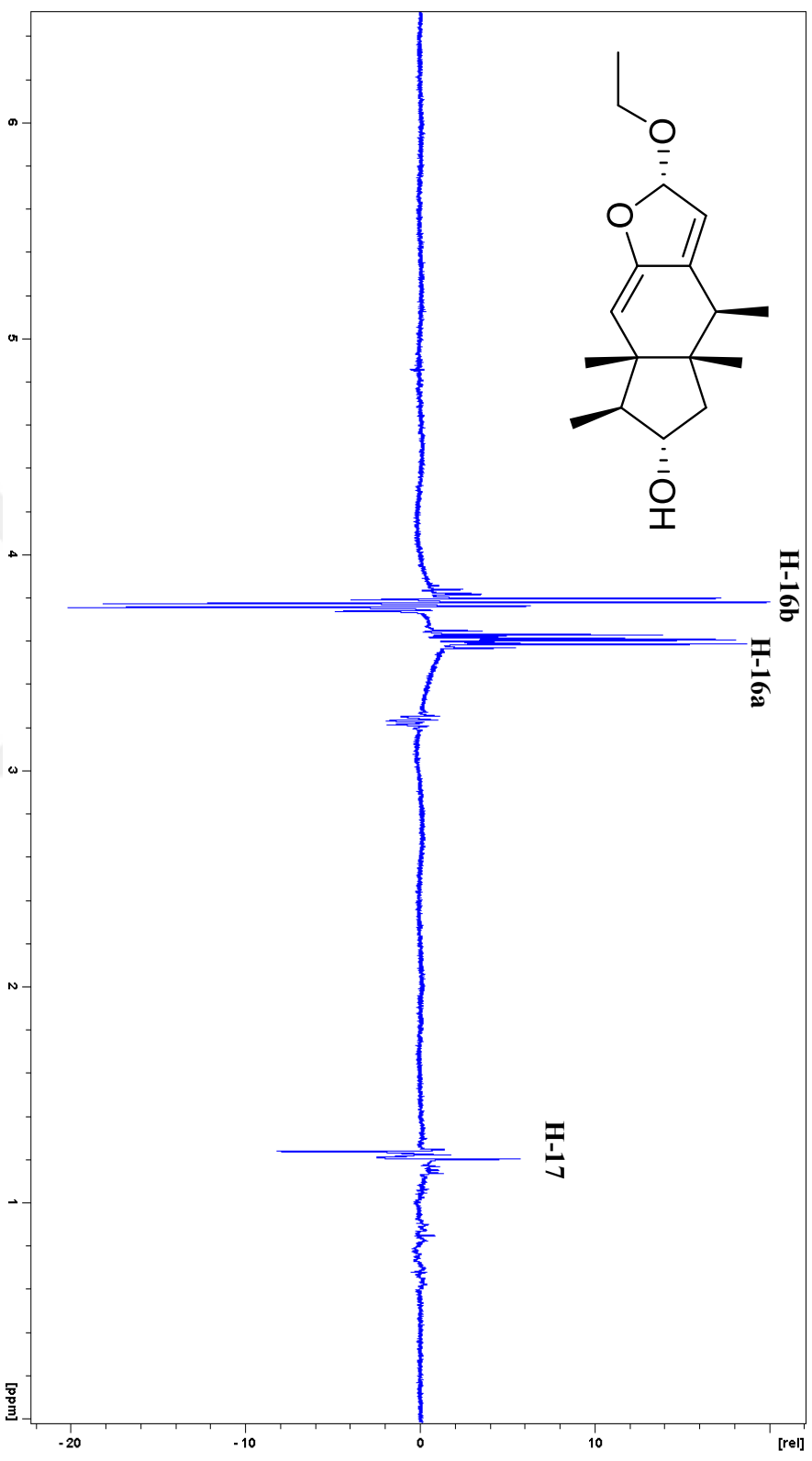
Şekil 3.30. HMBC spektrumu (2) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



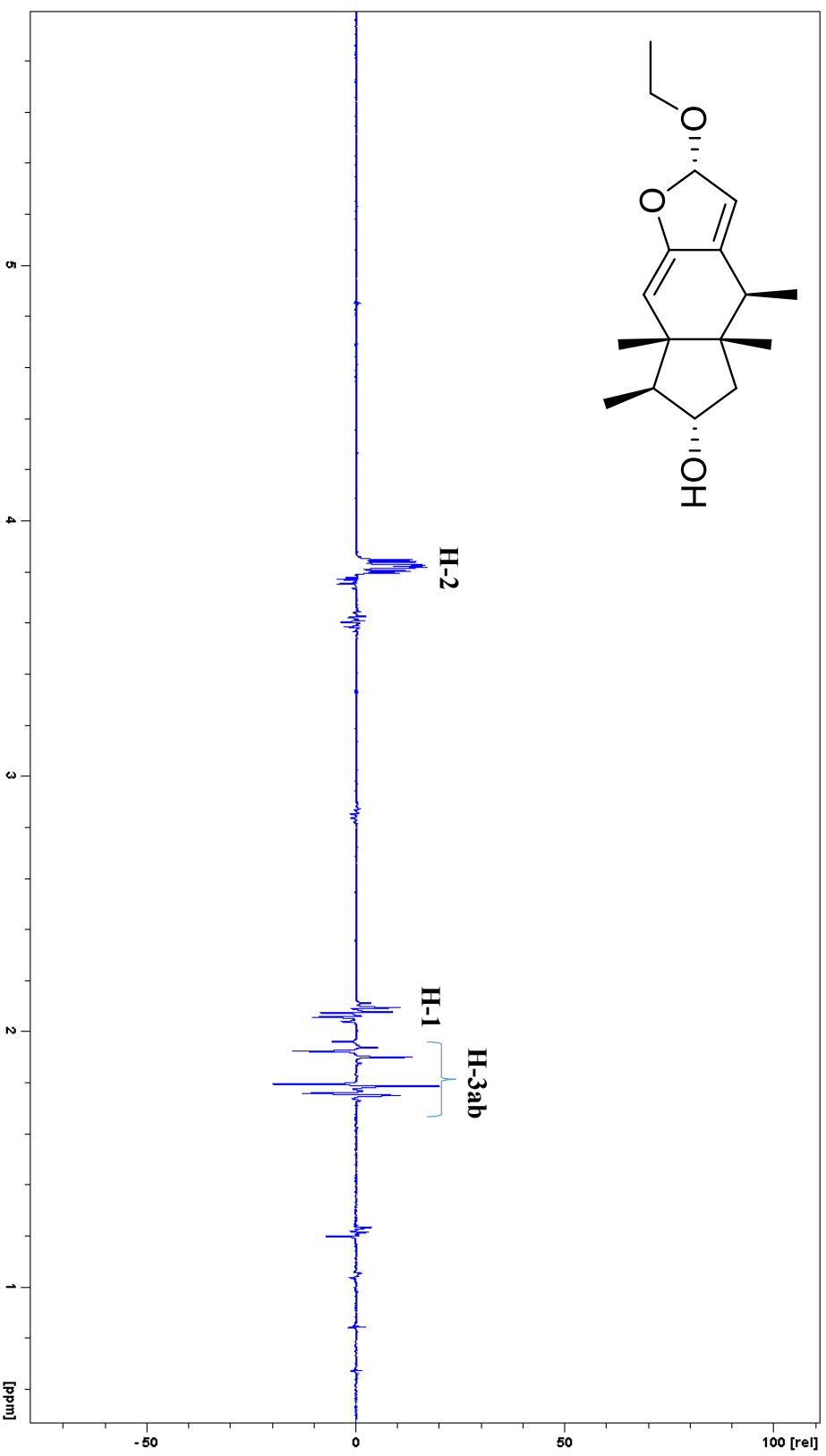
Şekil 3.31. HMBC spektrumu (2) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal B (2)



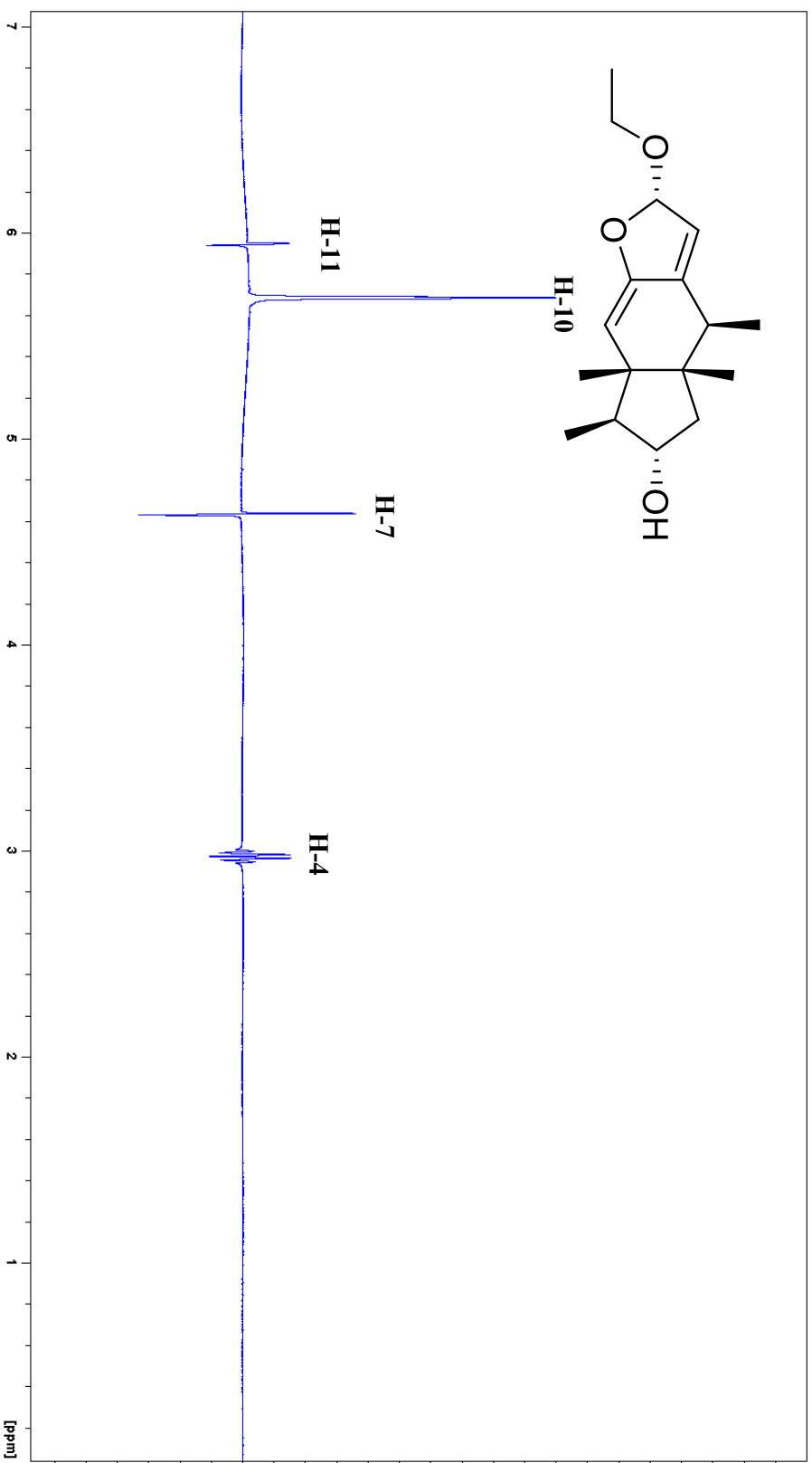
Şekil 3.32. 1-D COSY spektrumu (2) (δ 3,80 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



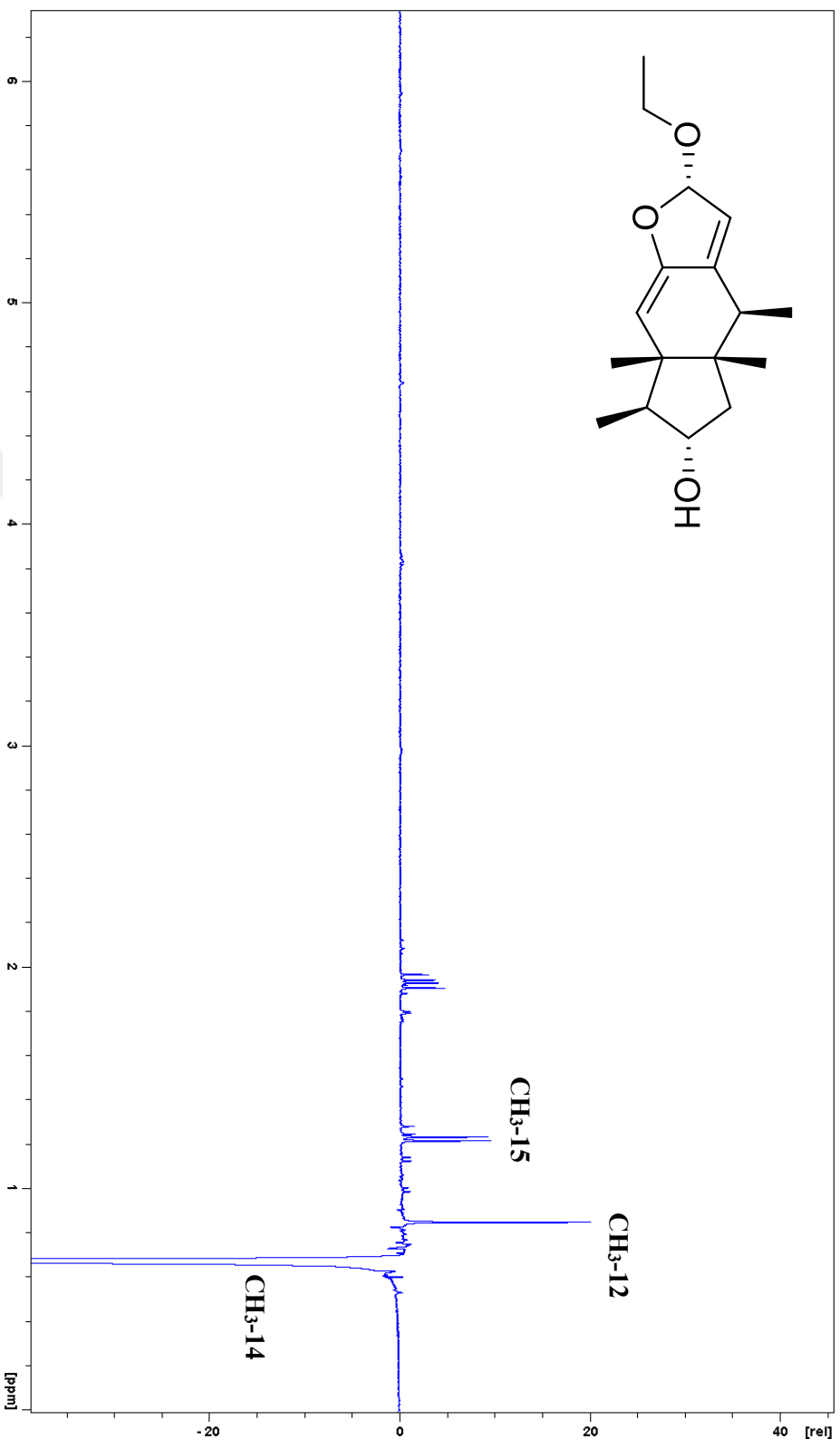
Şekil 3.33. 1-D COSY spektrumu (2) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



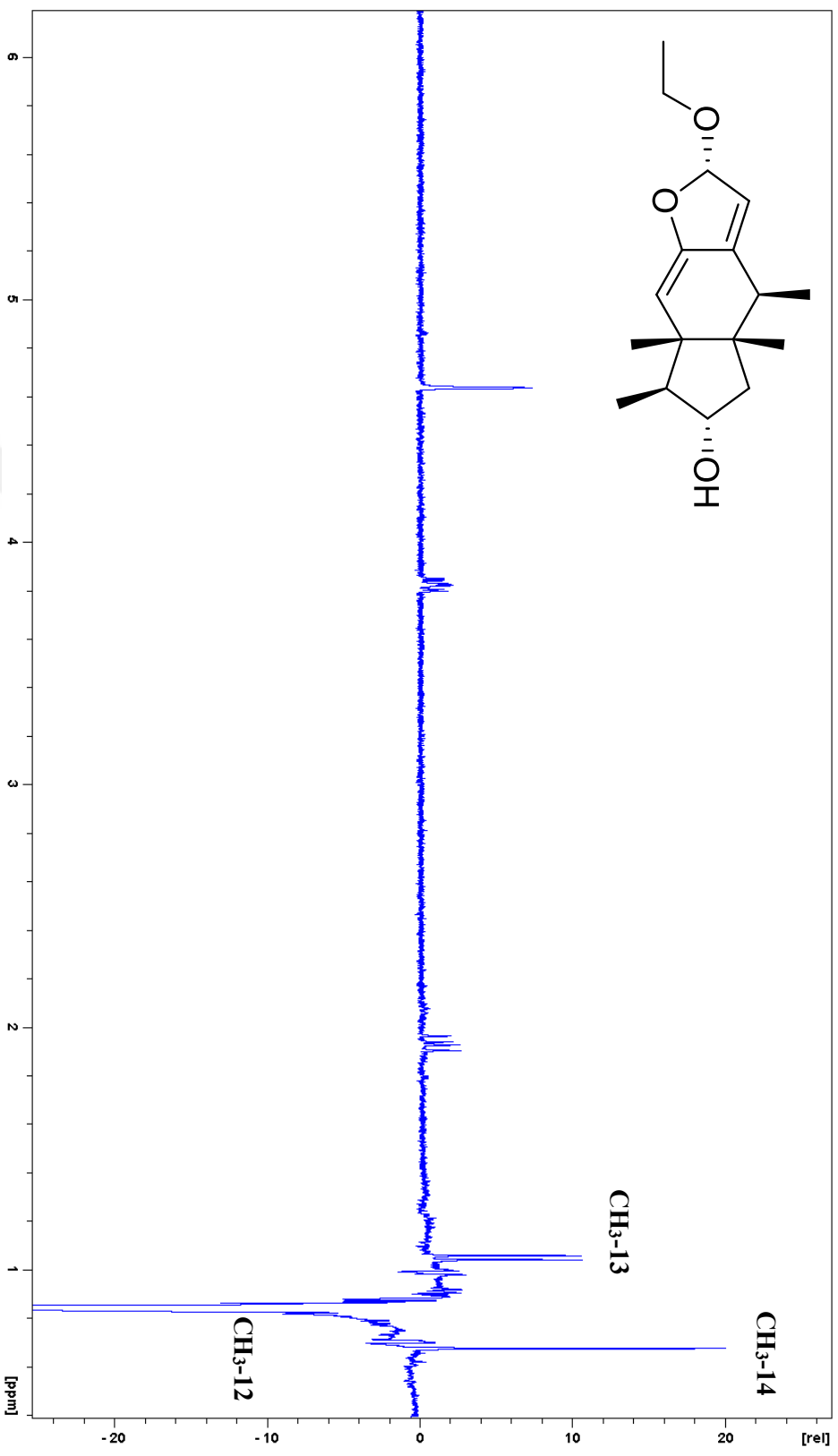
Şekil 3.34. 1-D COSY spektrumu (2) (δ 5.68 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal B (2)



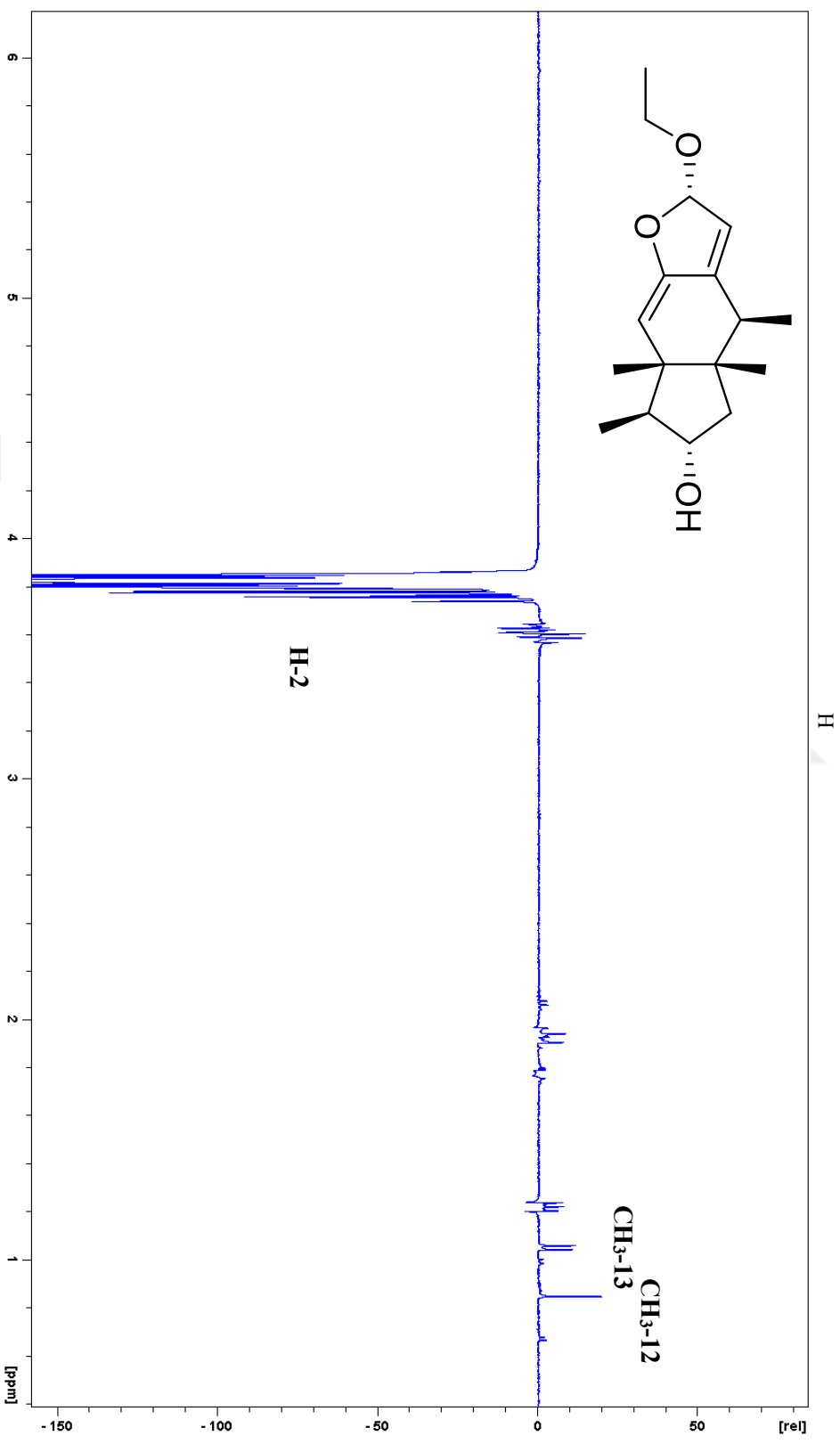
Şekil 3.35. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 0.67 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



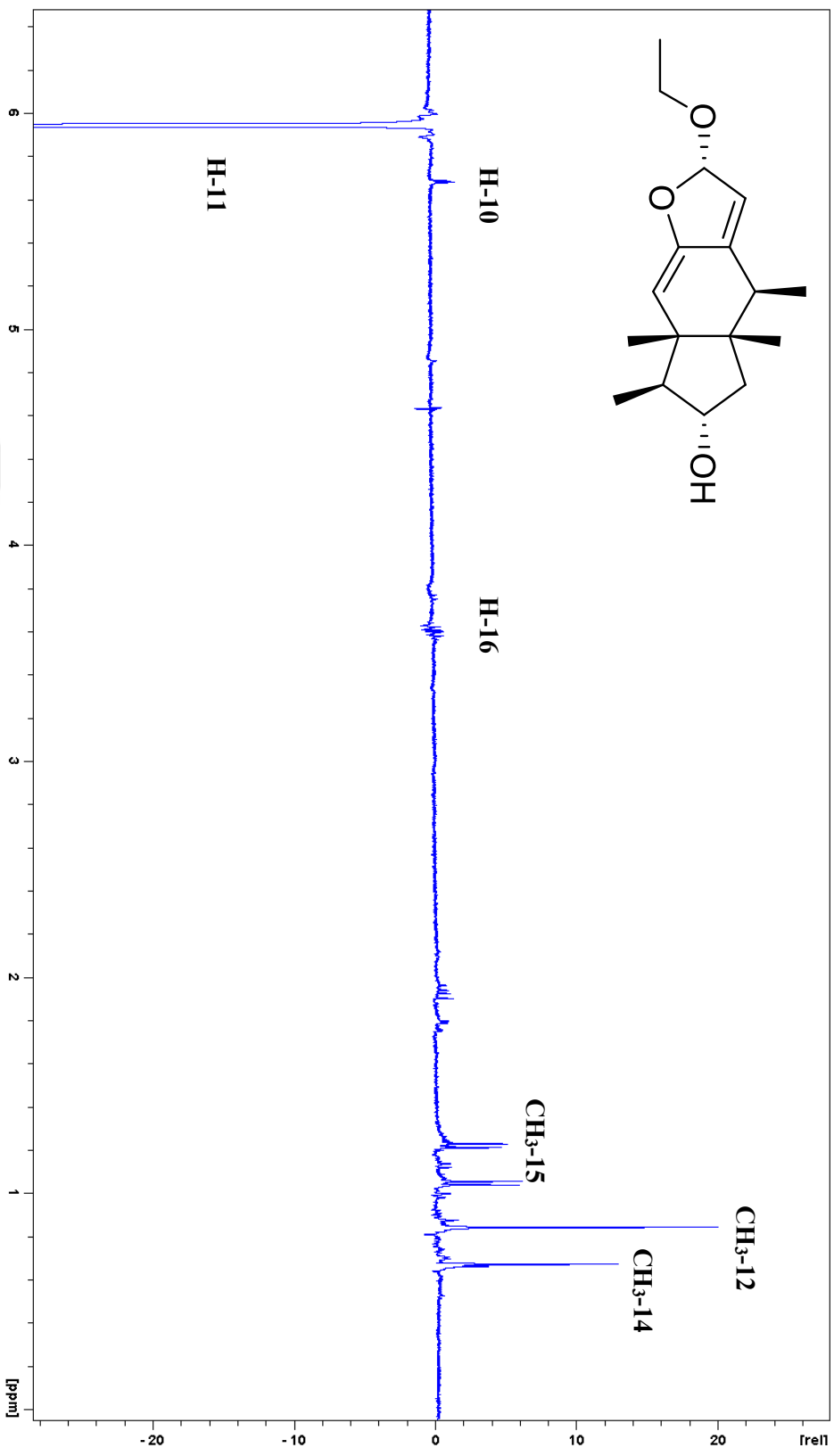
Şekil 3.36. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 0.84 de ısınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



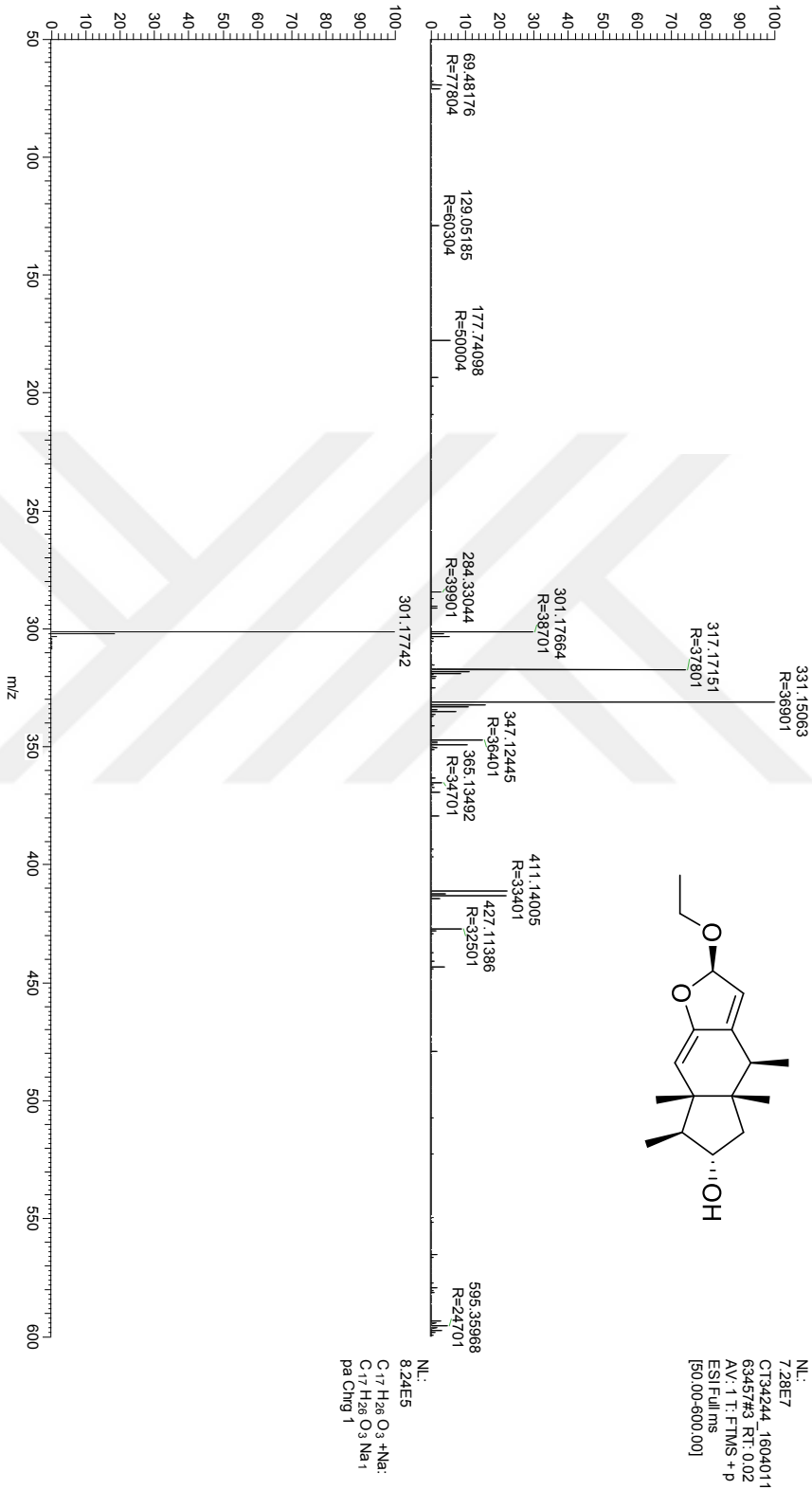
Şekil 3.37. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)



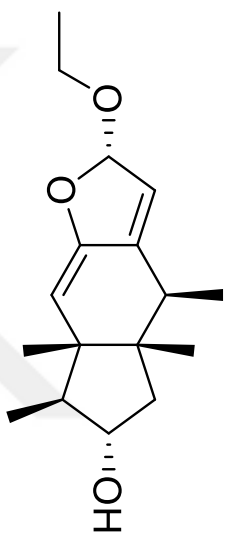
Şekil 3.38. 1-D NOESY spektrumu (2) (δ 5,94 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal B (2)

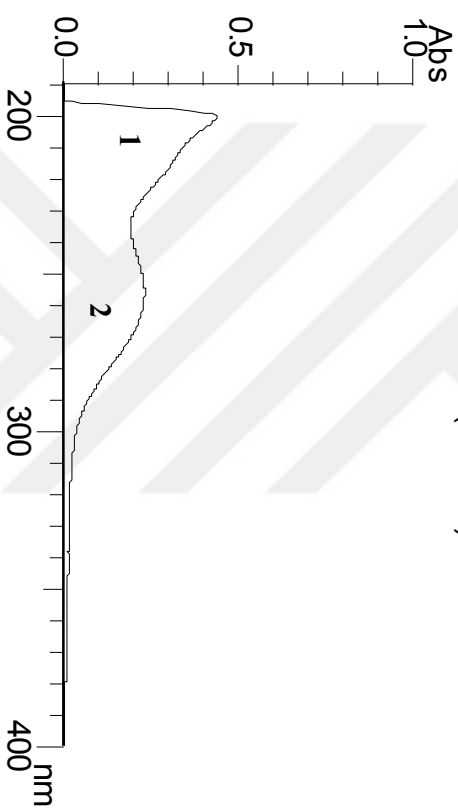


Şekil 3.39. HRESIMS (2), C₁₇H₂₆O₃, at m/z: 301.1775 [M+Na]⁺ için hesaplanan 301.1774)

PORELLASETAL C (3)



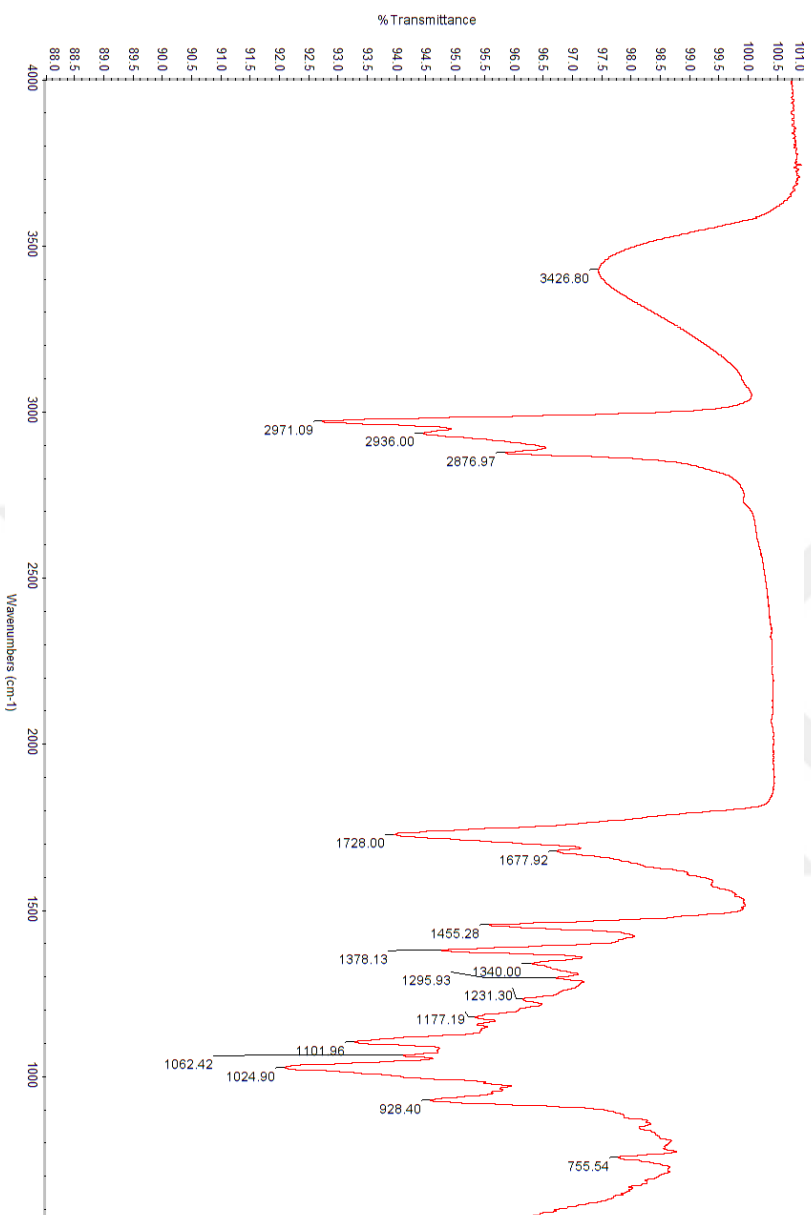
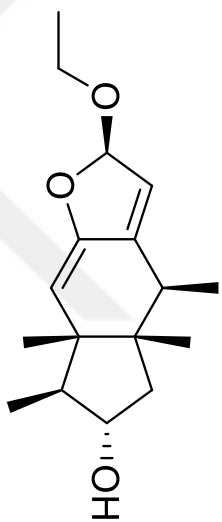
Şekil 3.40. UV spektrum (0.025 mg/mL, silika küvet kullanılarak, kalınlık 1 cm)



Çizelge 3.3. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyları ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayıları

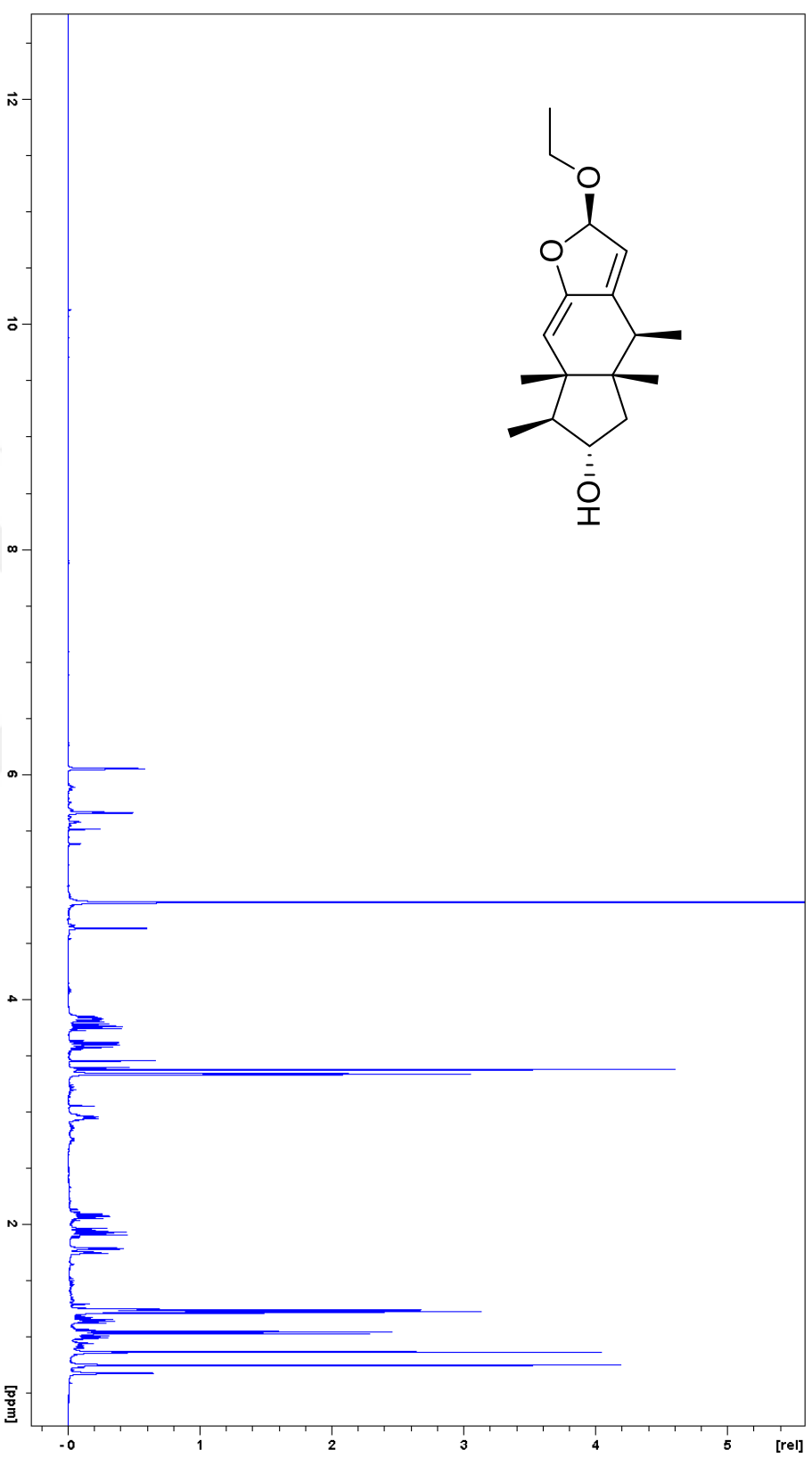
Peak	$\lambda_{\max}$ (nm)	Absorbance at $\lambda_{\max}$	$\text{Log } [\epsilon] \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1})]$
1	201	0.438	3.79
2	256	0.230	3.51

Porellasetal C (3)



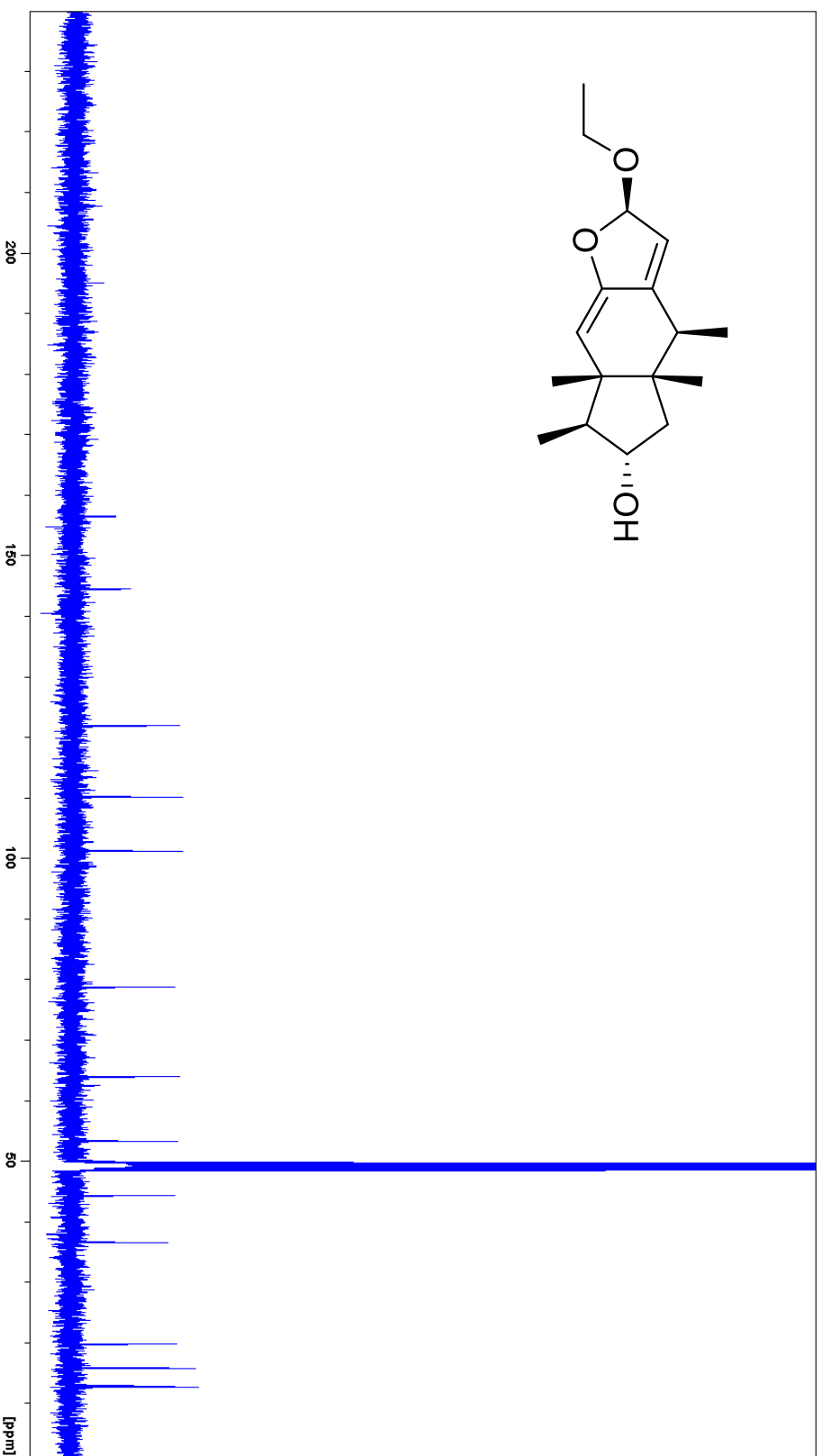
Şekil 3.41. KBr film içinde IR spektrumu (3)

Porellasetal C (3)



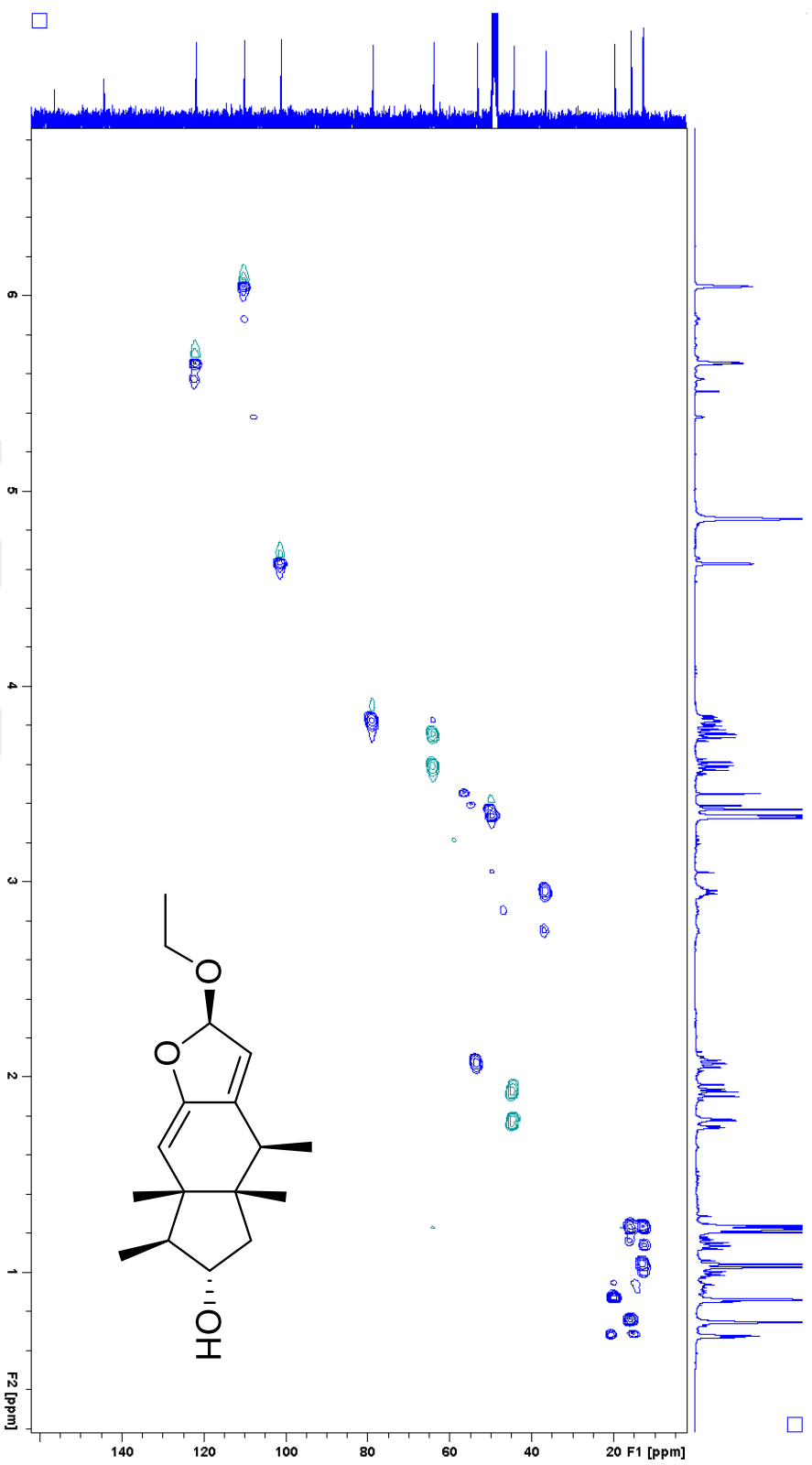
Şekil 3.42. ^1H NMR spektrumu (3) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal C (3)



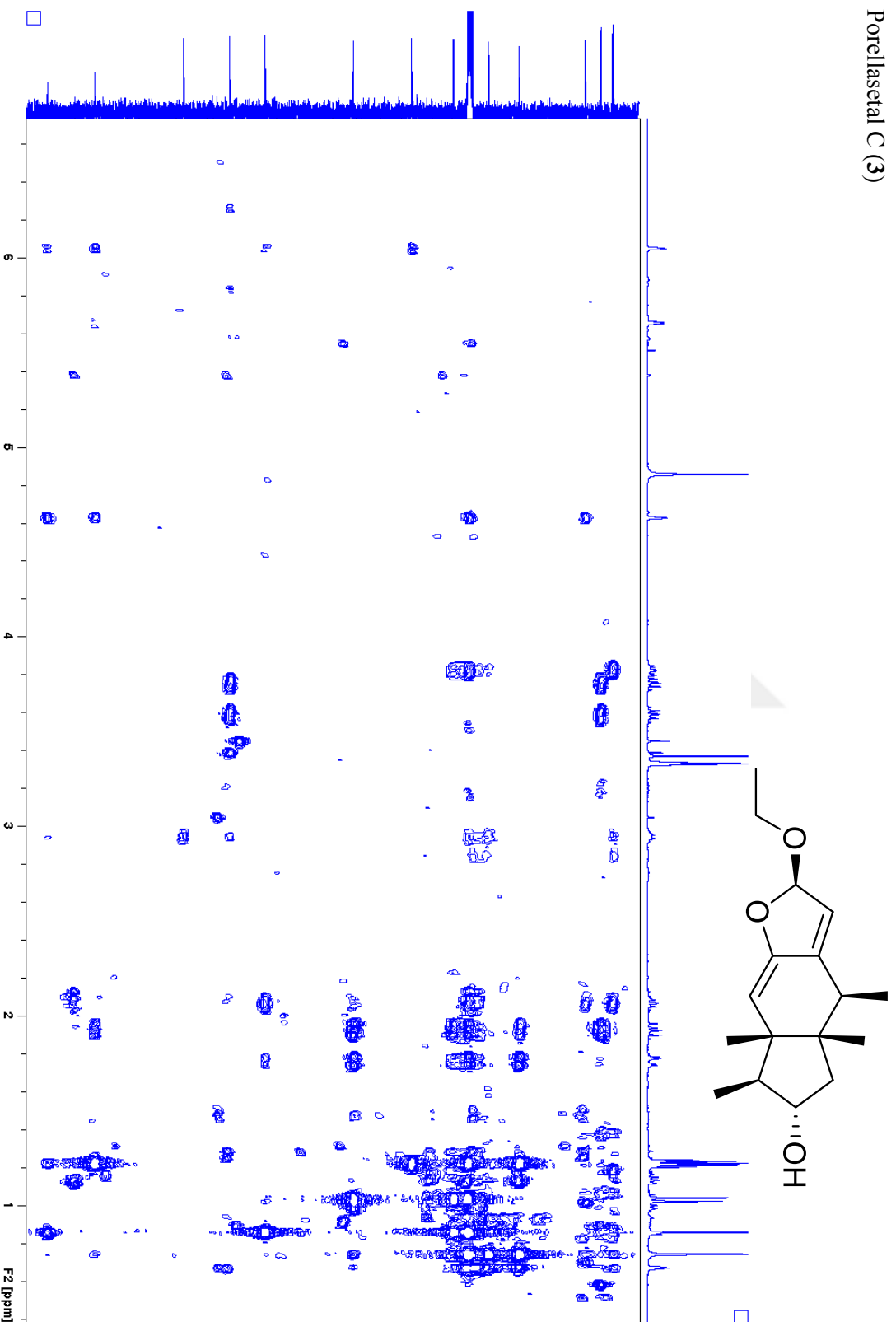
Şekil 3.43. ^{13}C NMR spektrumu (3) (100 MHz, CD_3OD)

Porellasetal C (3)



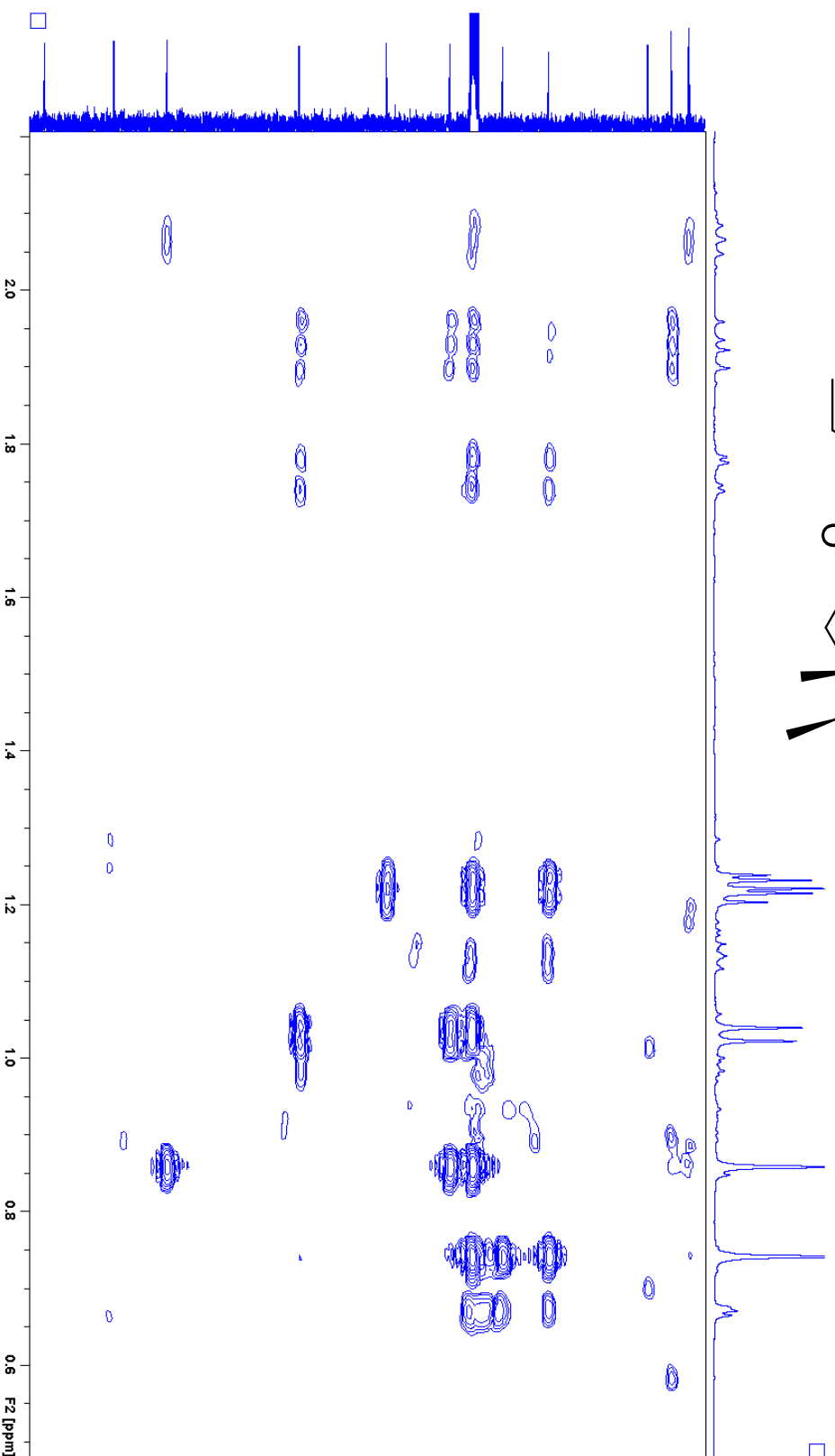
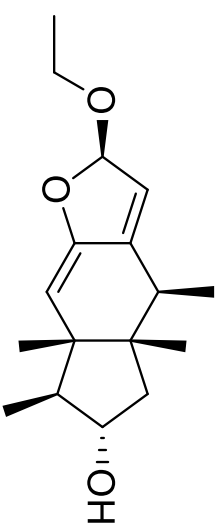
Şekil 3.44. HSQC spektrumu (3) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal C (**3**)



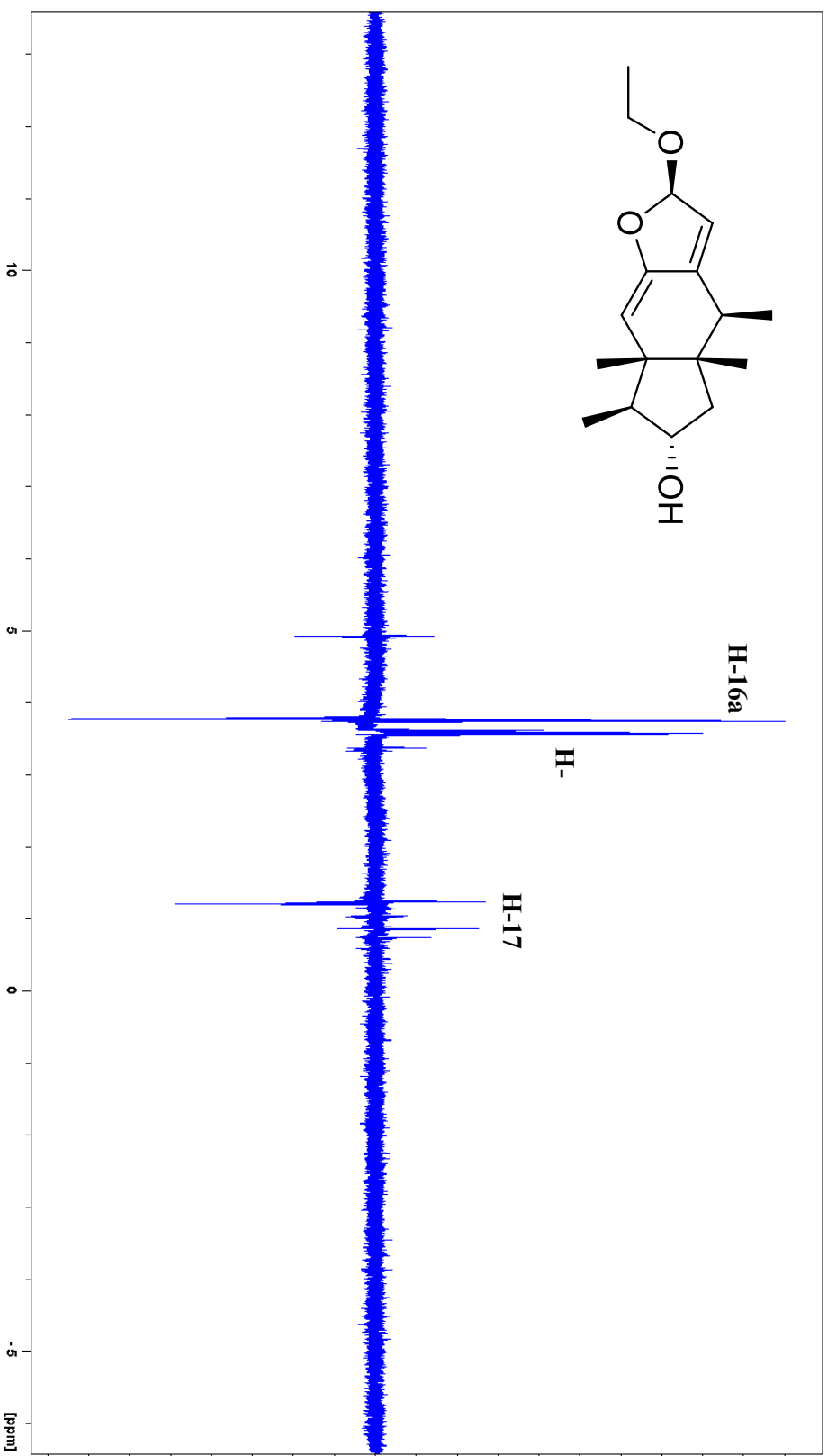
Şekil 3.45. HMBC spektrumu (**3**) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



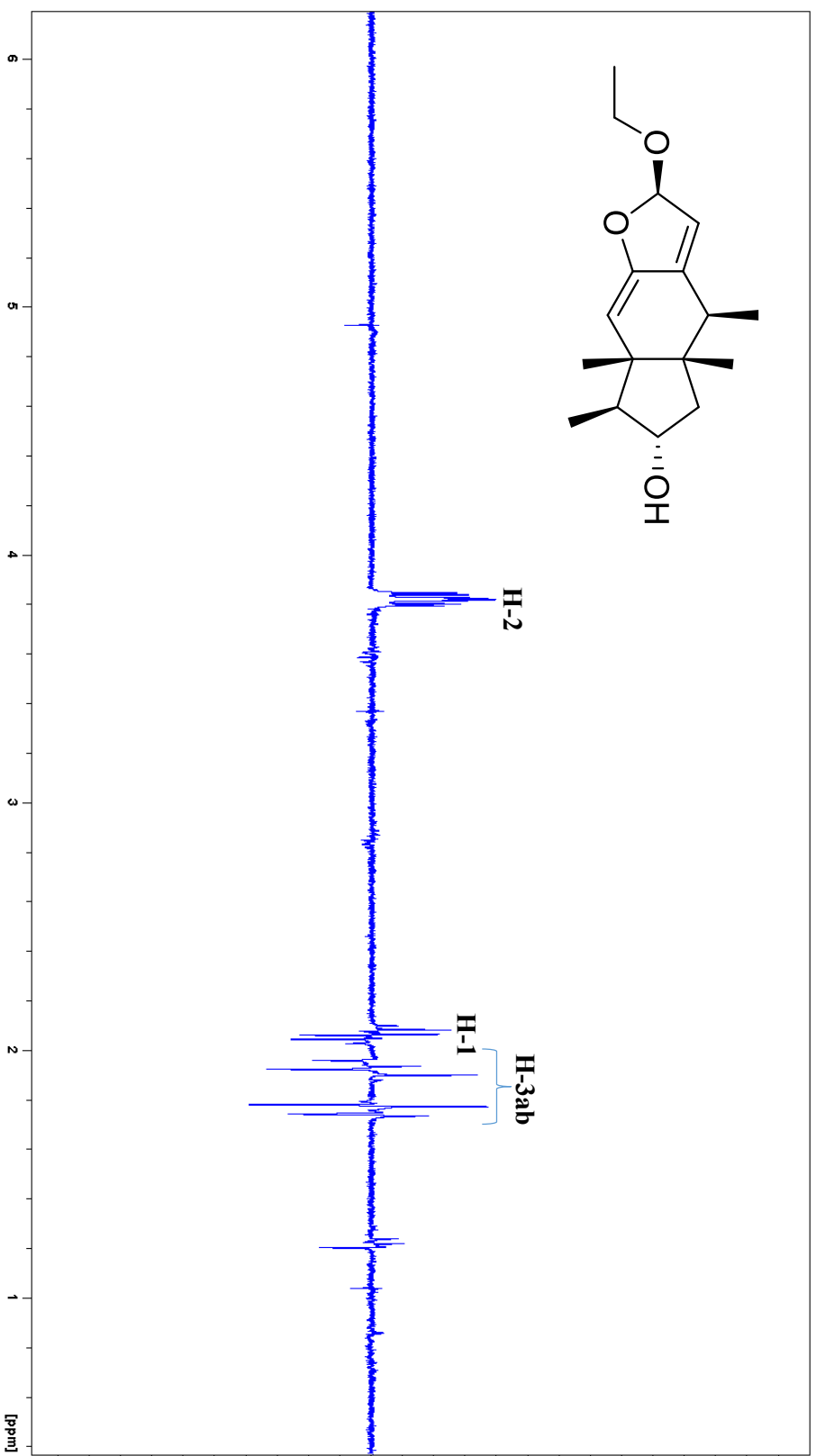
Şekil 3.46. HMBC spektrumu (3) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



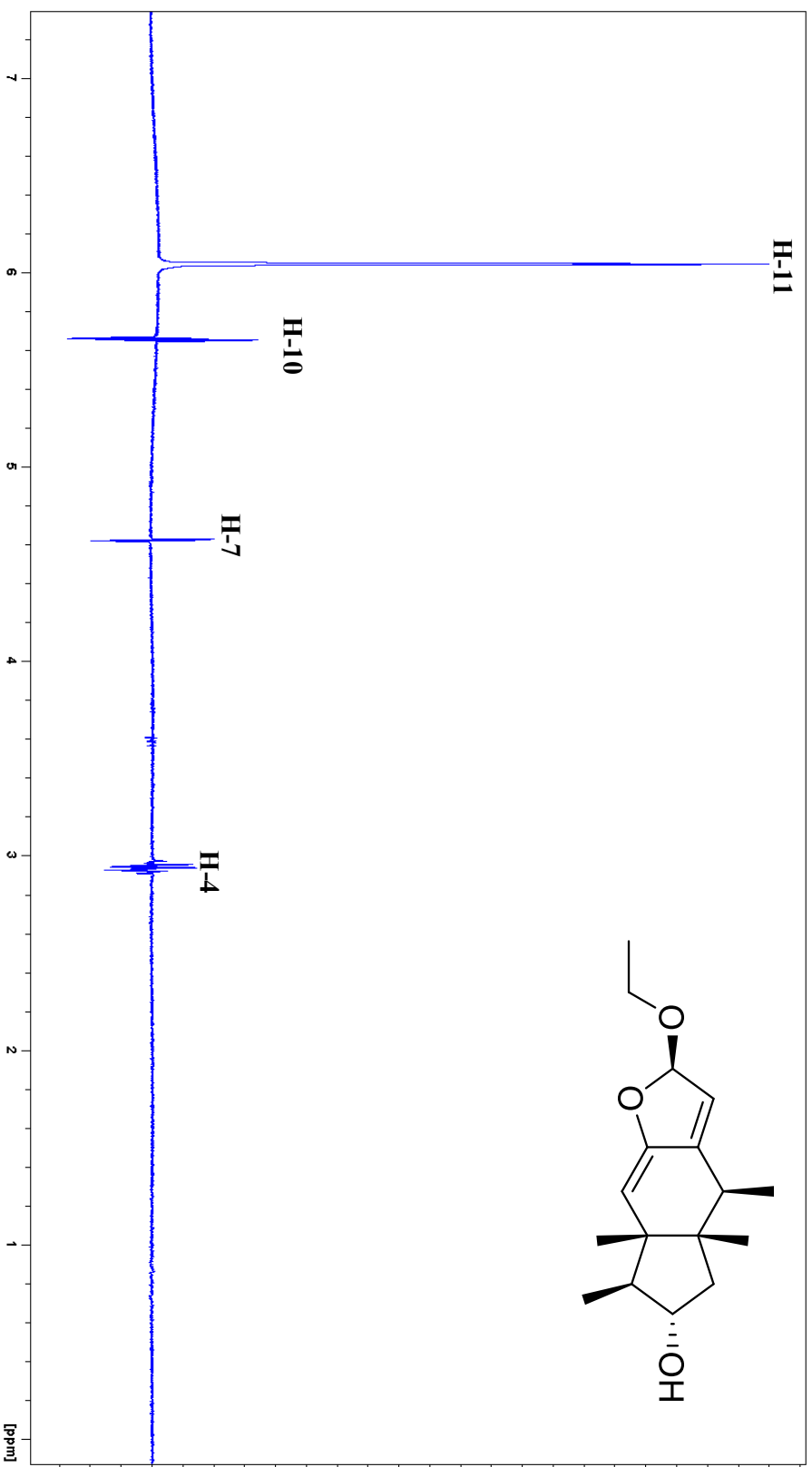
Şekil 3.47. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 3.59 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



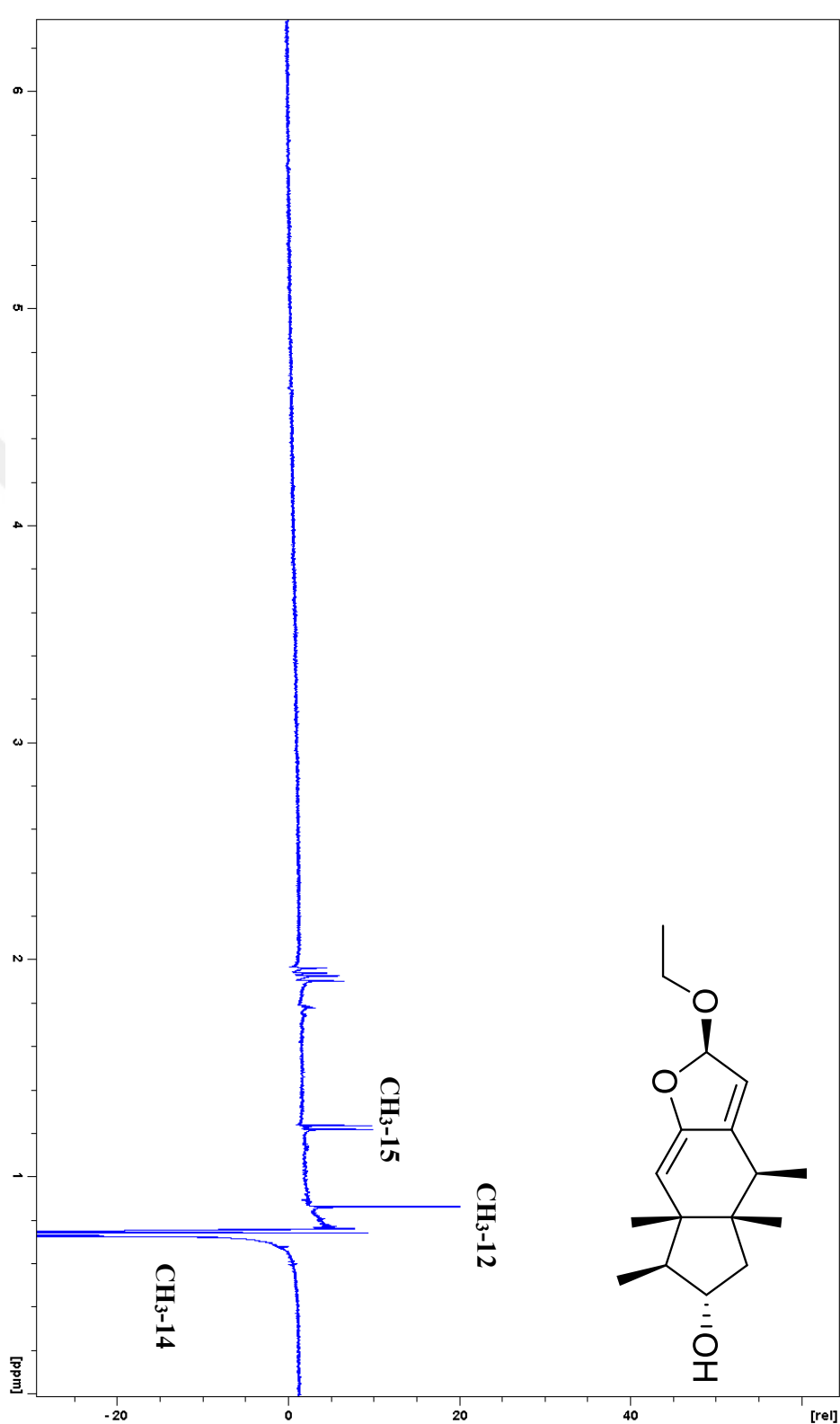
Şekil 3.48. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



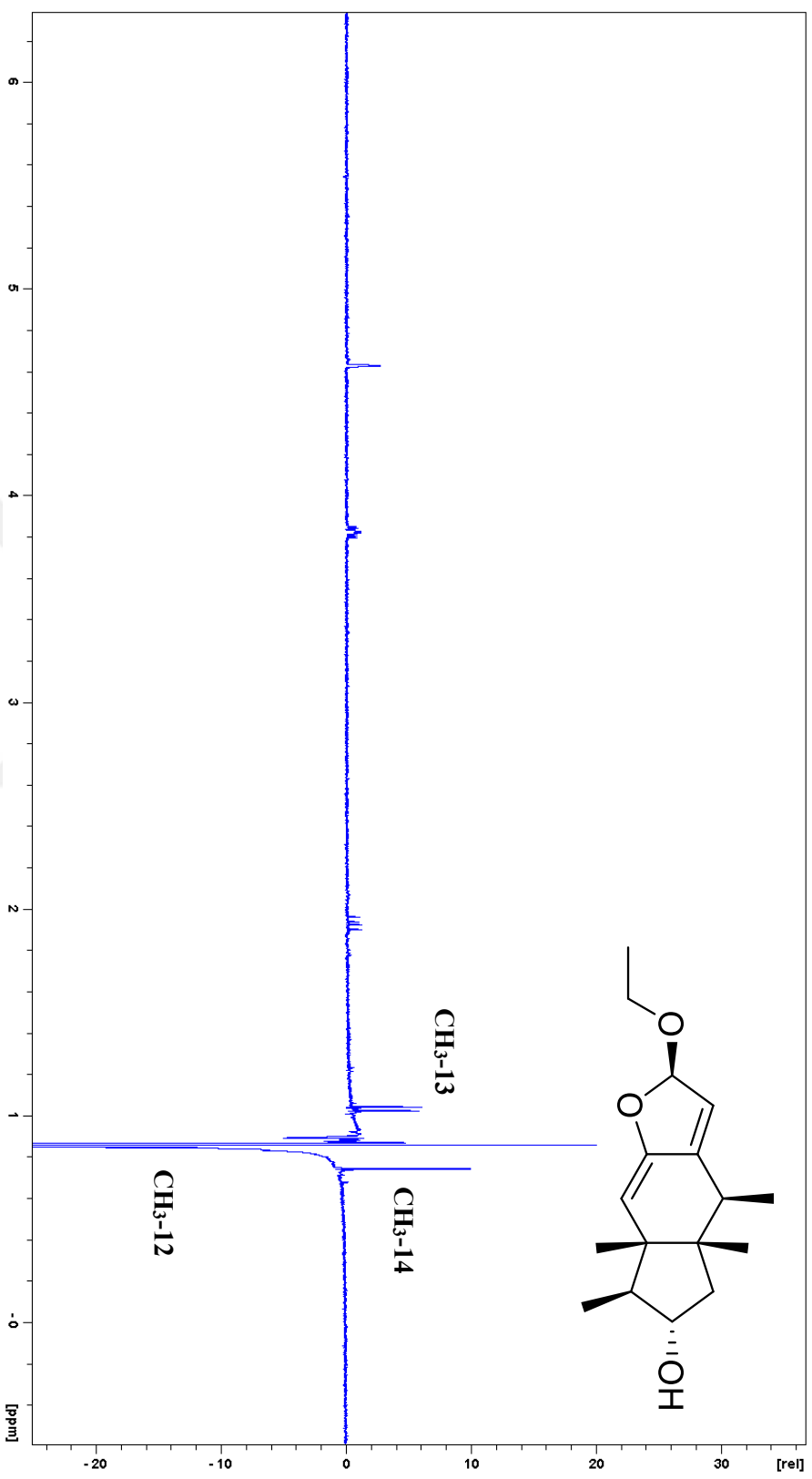
Şekil 3.49. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 6,04 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



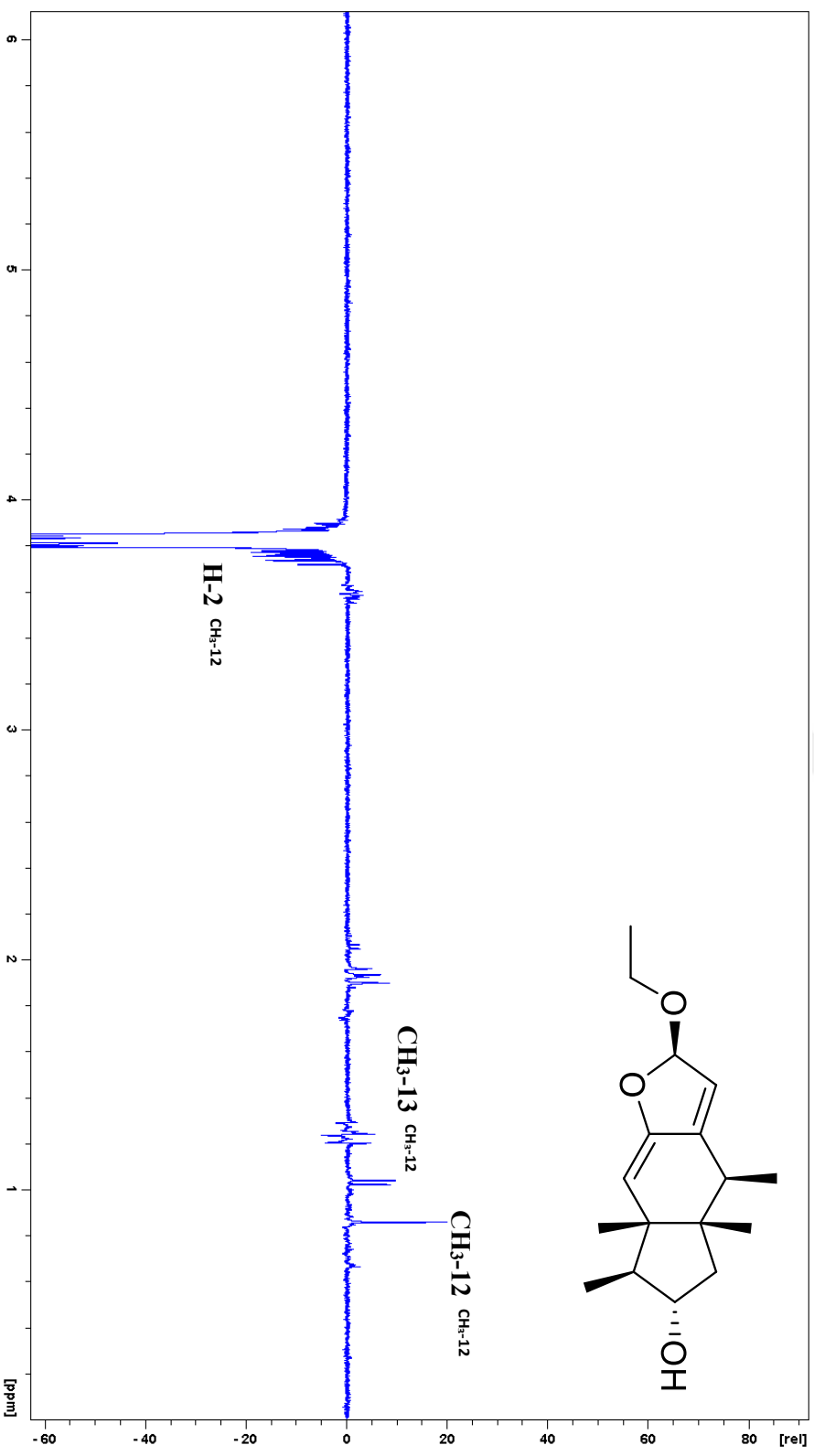
Şekil 3.50. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 5.48 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



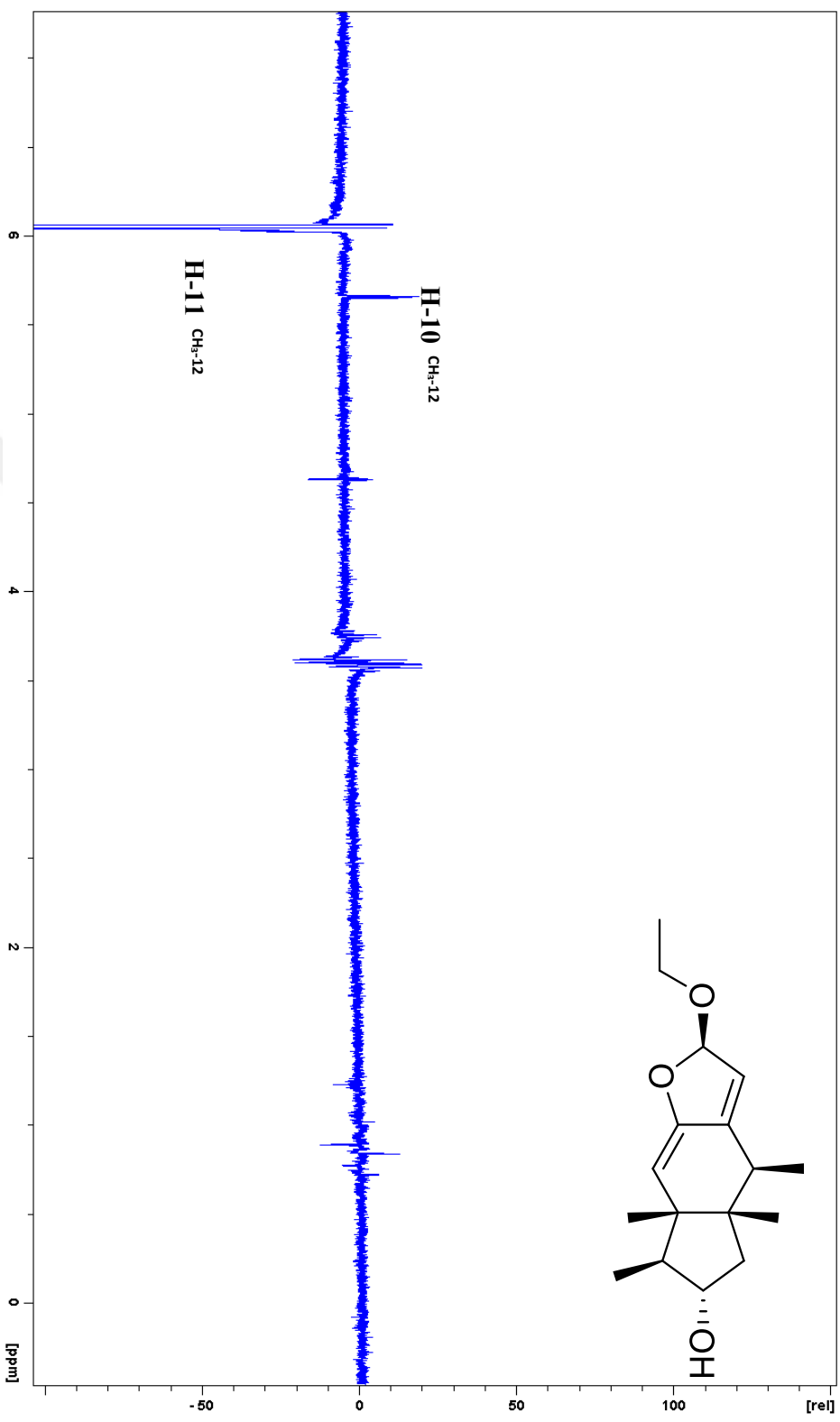
Şekil 3.51. 1-D NOESY spektrumu (3) (δ 0.86 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



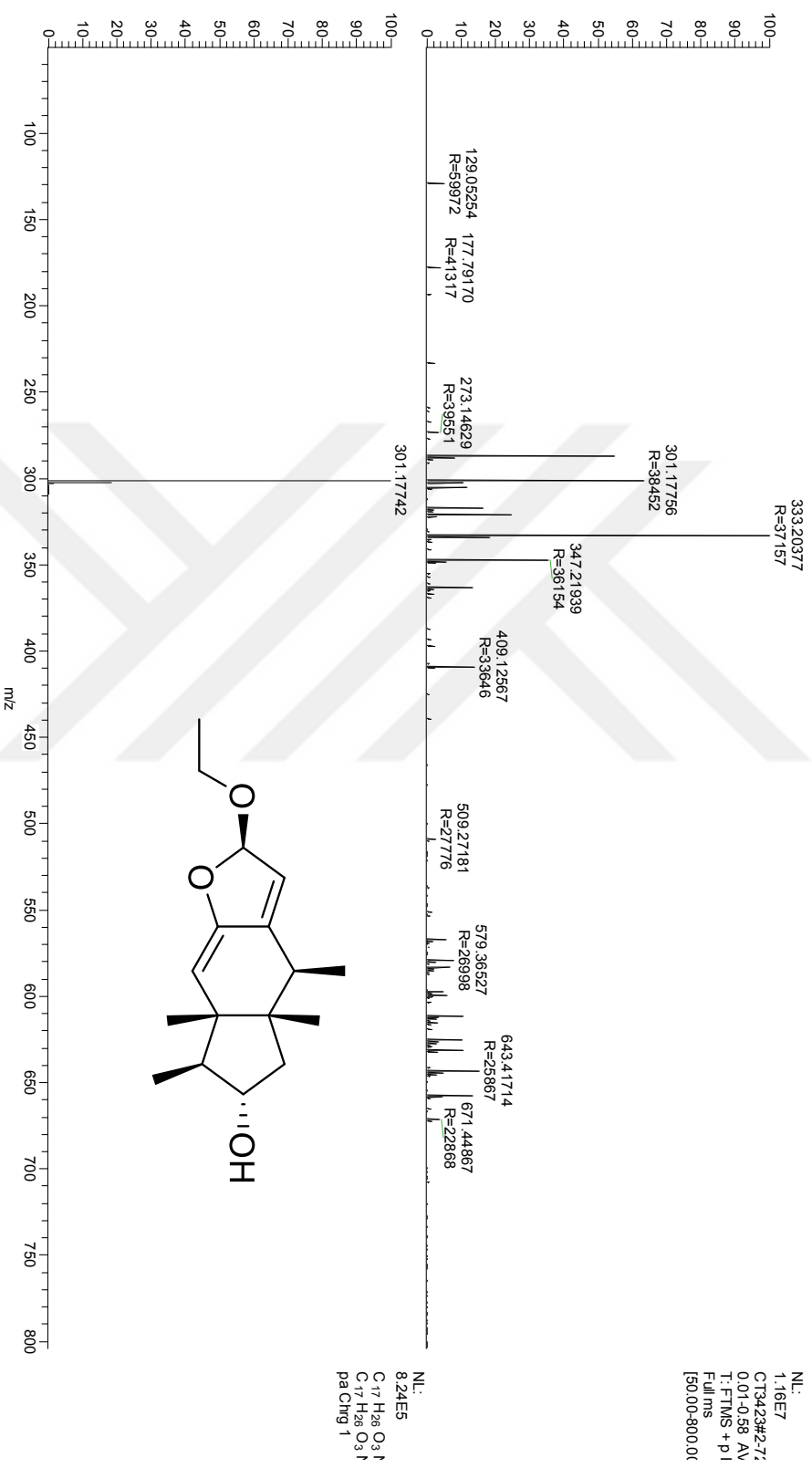
Şekil 3.52. 1-D NOESY spektrumu (3) (δ 3.82 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal C (**3**)



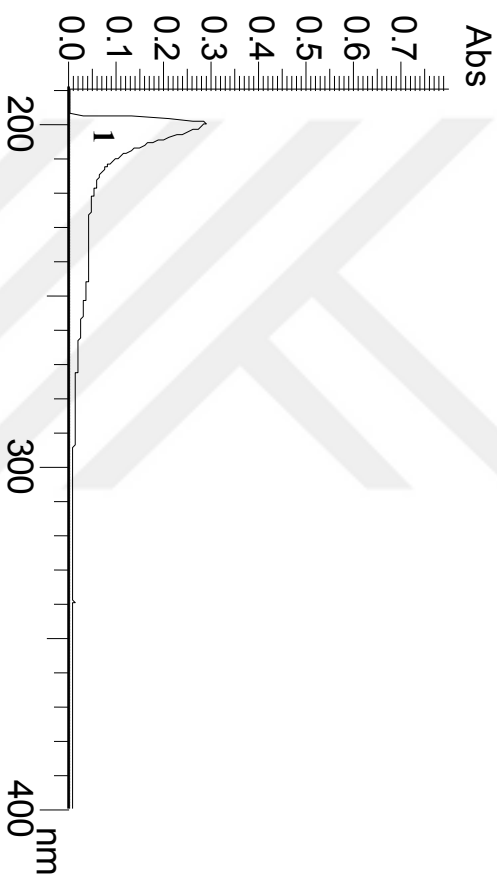
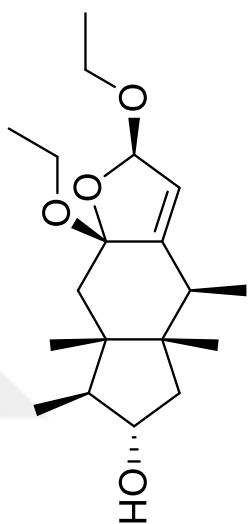
Şekil 3.53. 1-D NOESY spektrumu (**3**) (δ 6,04 de ısınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal C (3)



Şekil 3.5.54. HRESIMS (3), $C_{17}H_{26}O_3$, at m/z : 301.1775 $[M+Na]^+$ ($C_{17}H_{26}O_3Na$ için hesaplanan 301.1774)

Porellasetal D (4)

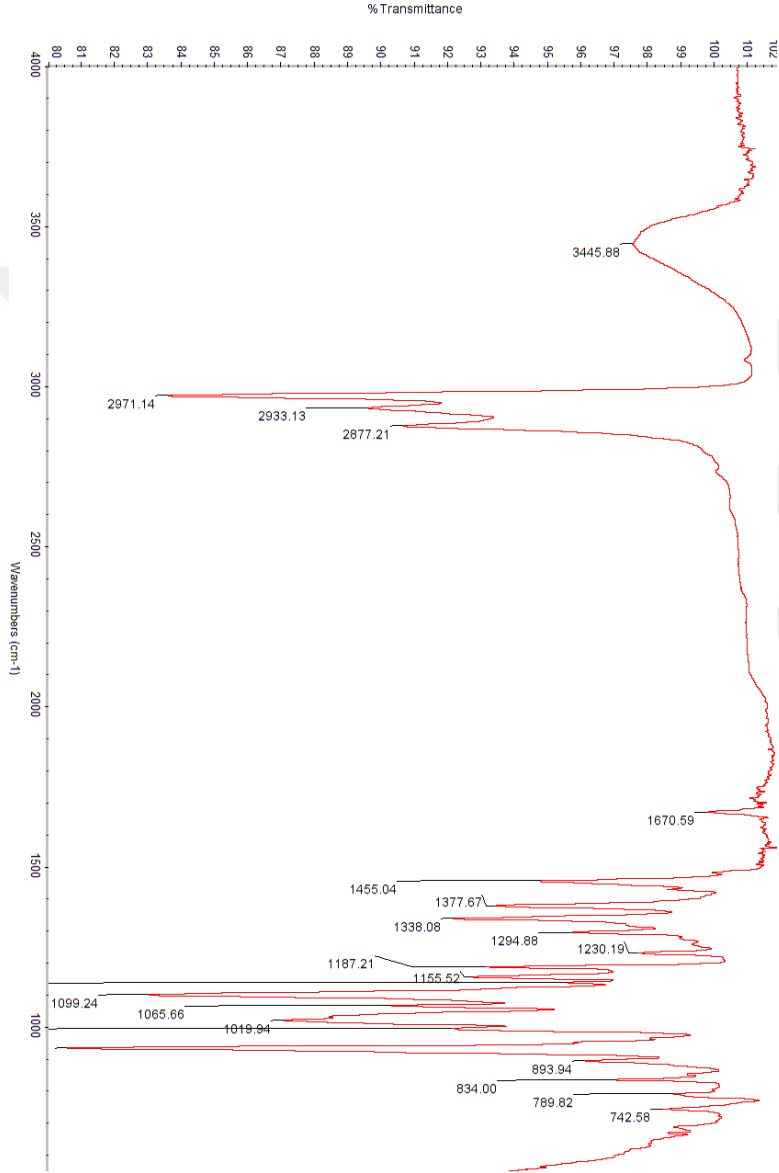
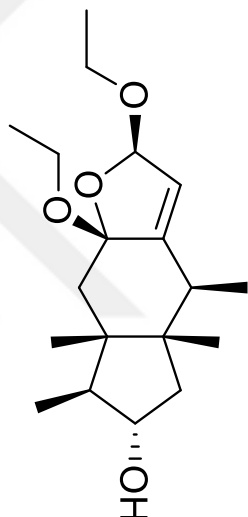


Şekil 3.55. UV spektrumu (0.025 mg/mL, silika kütet kullanılarak, kalınlık 1 cm)

Çizelge 3. 4. Bileşiğin maksimum absorbansta dalga boyu ve kendisine ait molar ekstinksiyon katsayısı

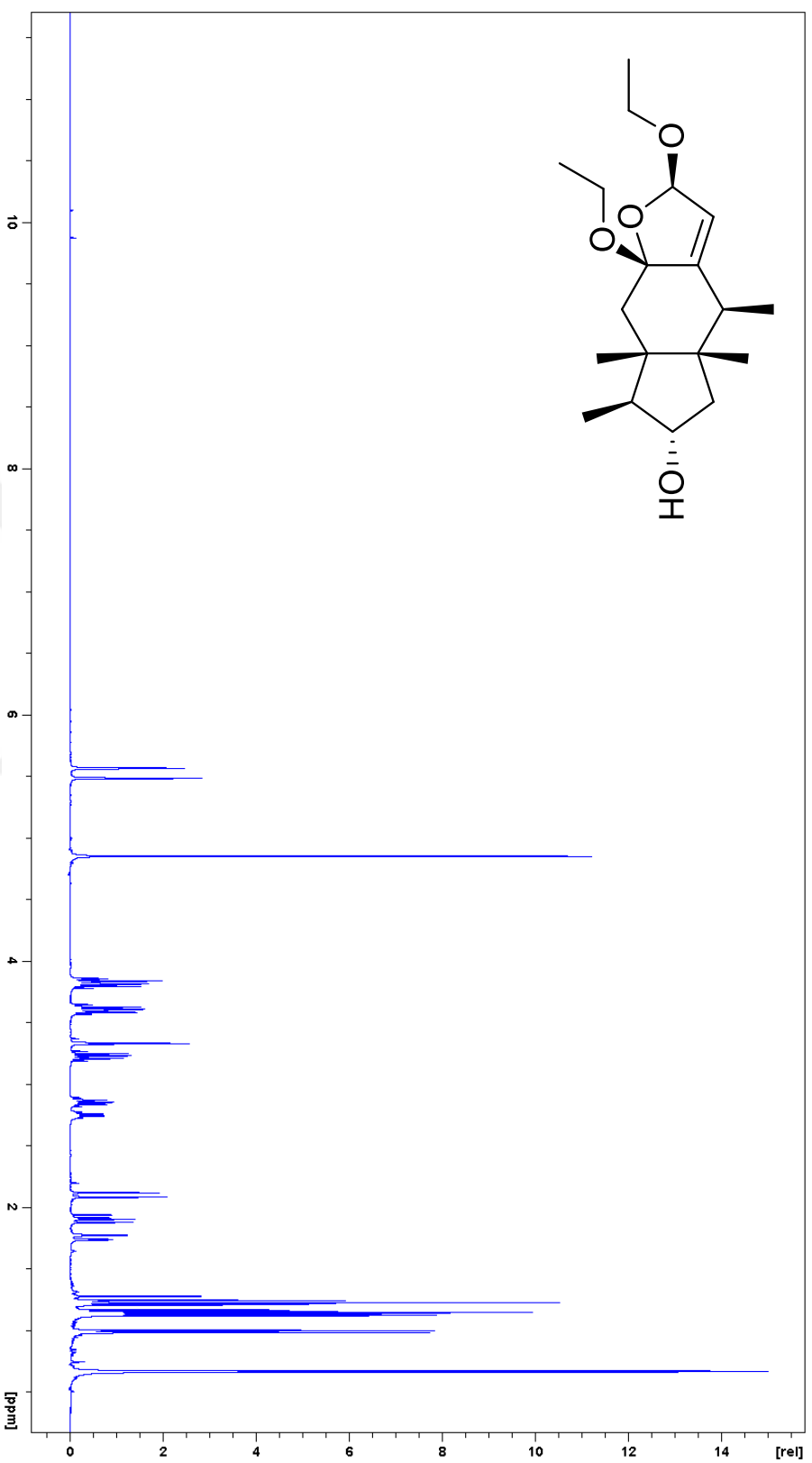
Peak	λ_{max} (nm)	Absorbance at λ_{max}	Log [ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)]
1	200	0.287	2.97

Porellasetal D (4)



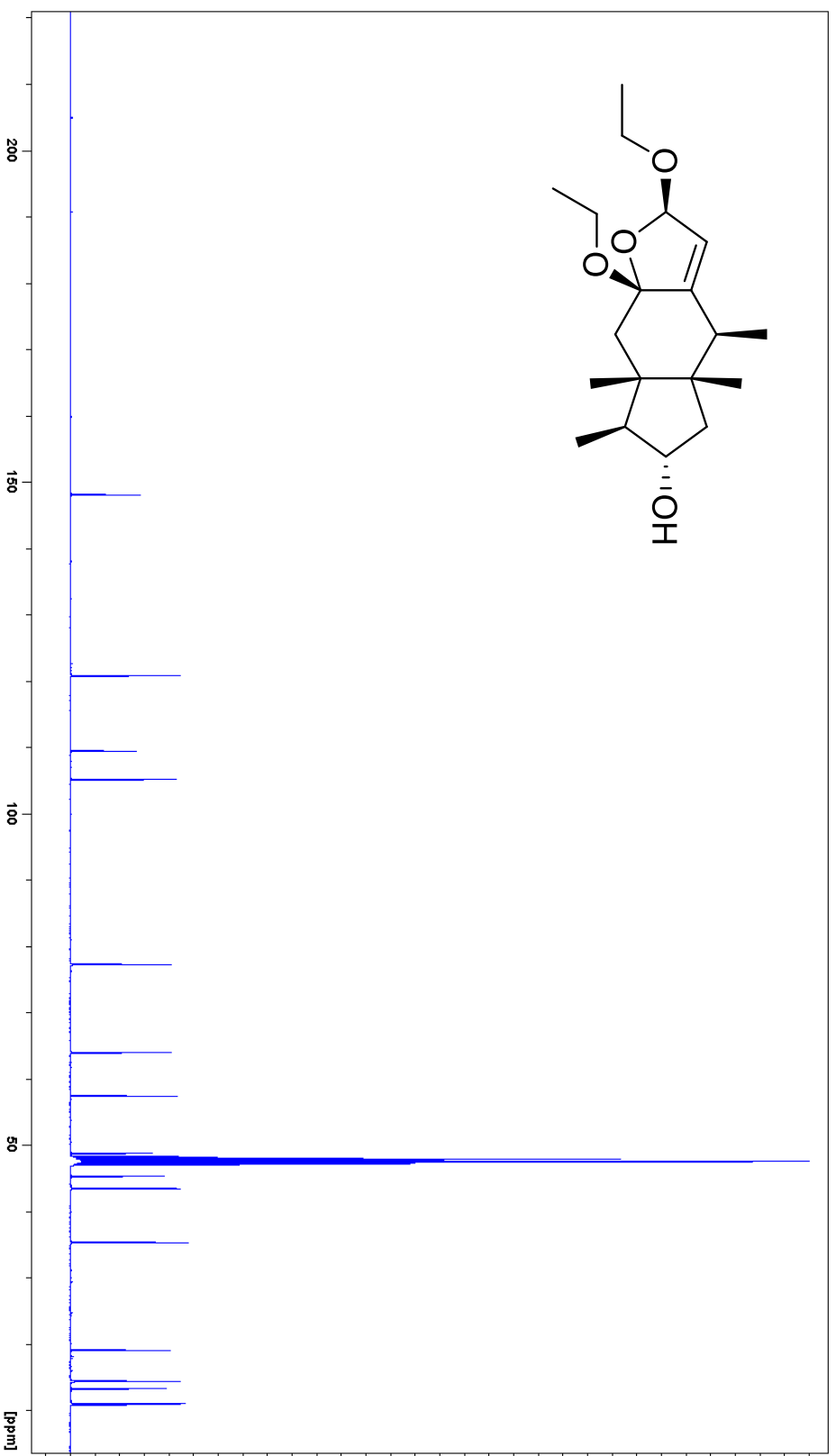
Şekil 3.56. KBr film içinde IR spektrumu (4)

Porellasetal D (4)



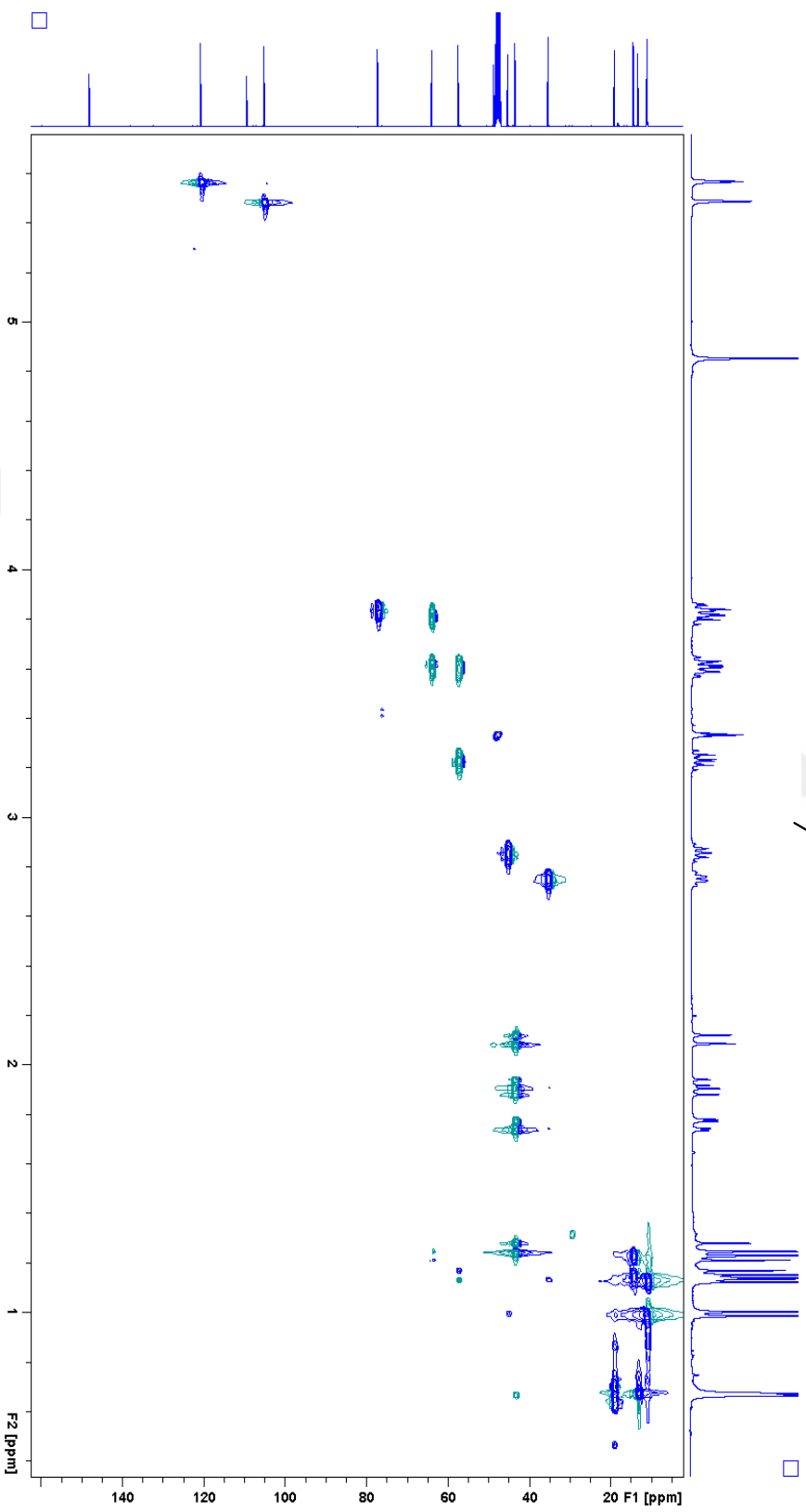
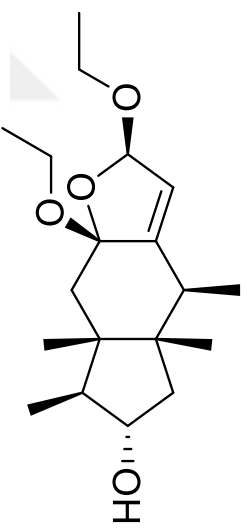
Şekil 3.57. ^1H NMR spektrumu (4) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal D (4)



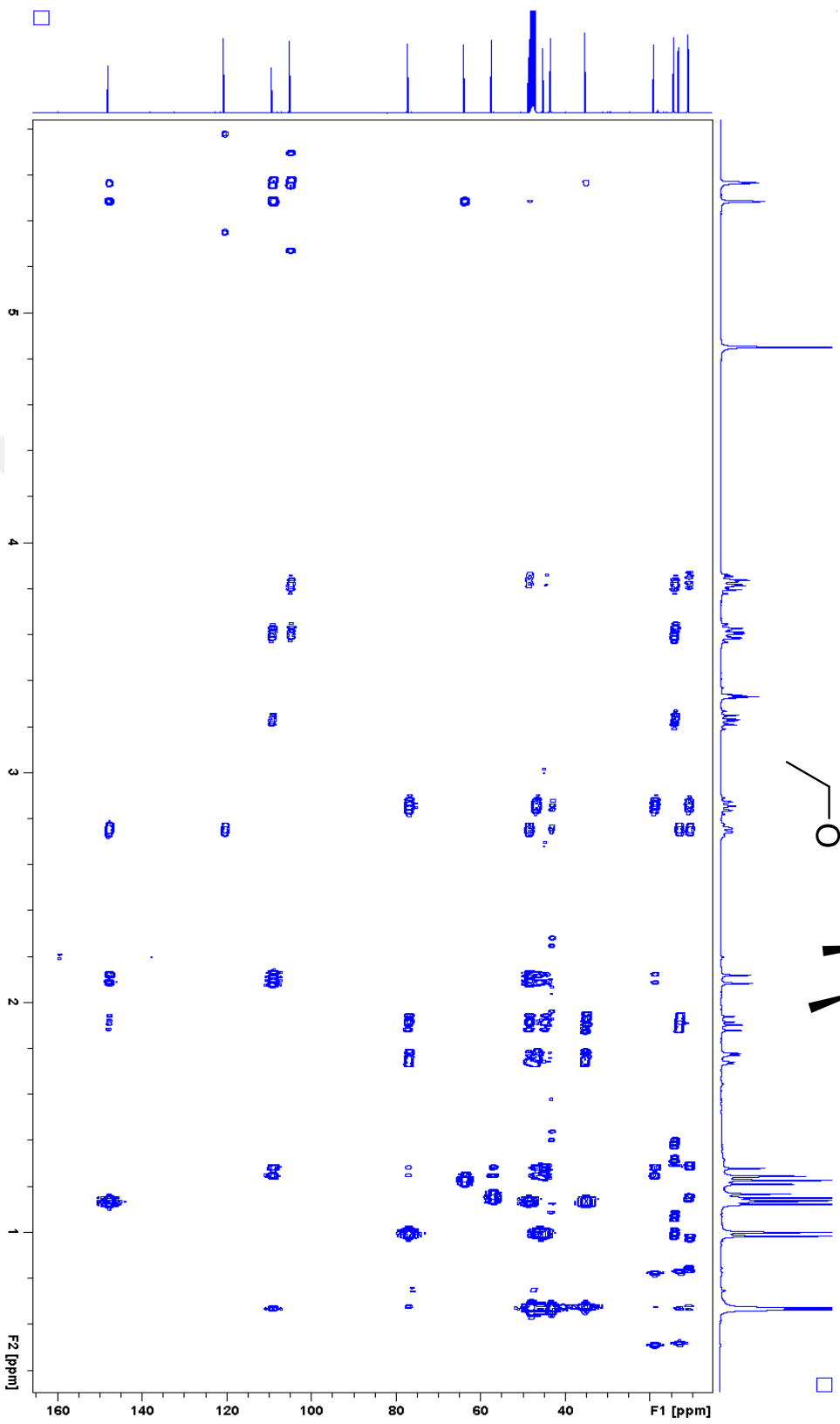
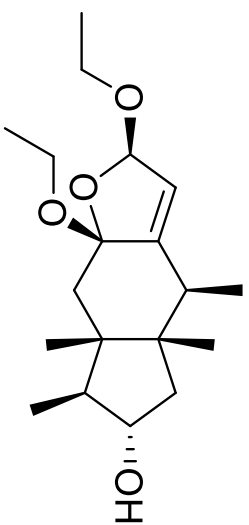
Şekil 3.58. ^{13}C NMR spektrumu (4) (100 MHz, CD_3OD)

Porellasetal D (4)



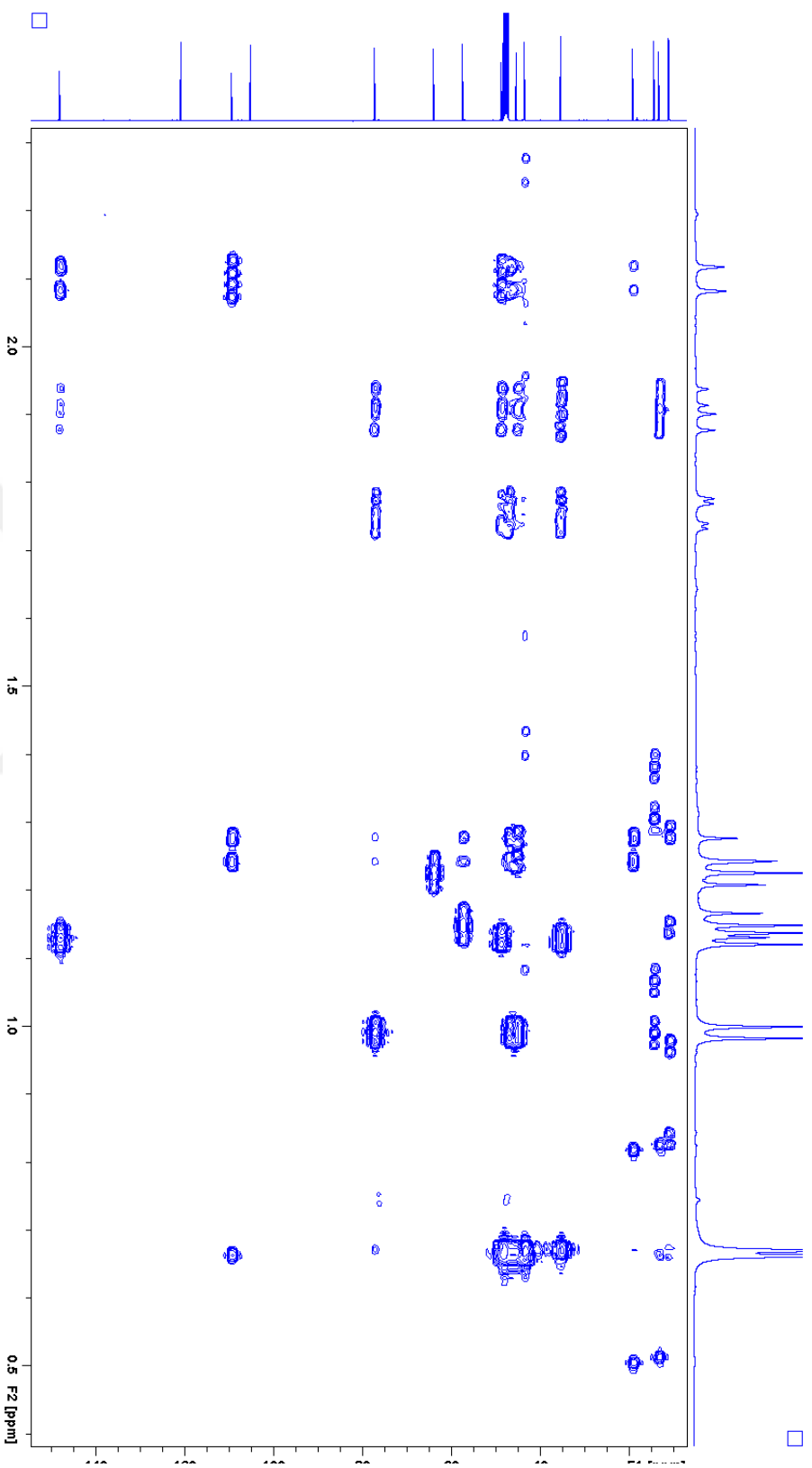
Şekil 3.59. HSQC spektrumu (4) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



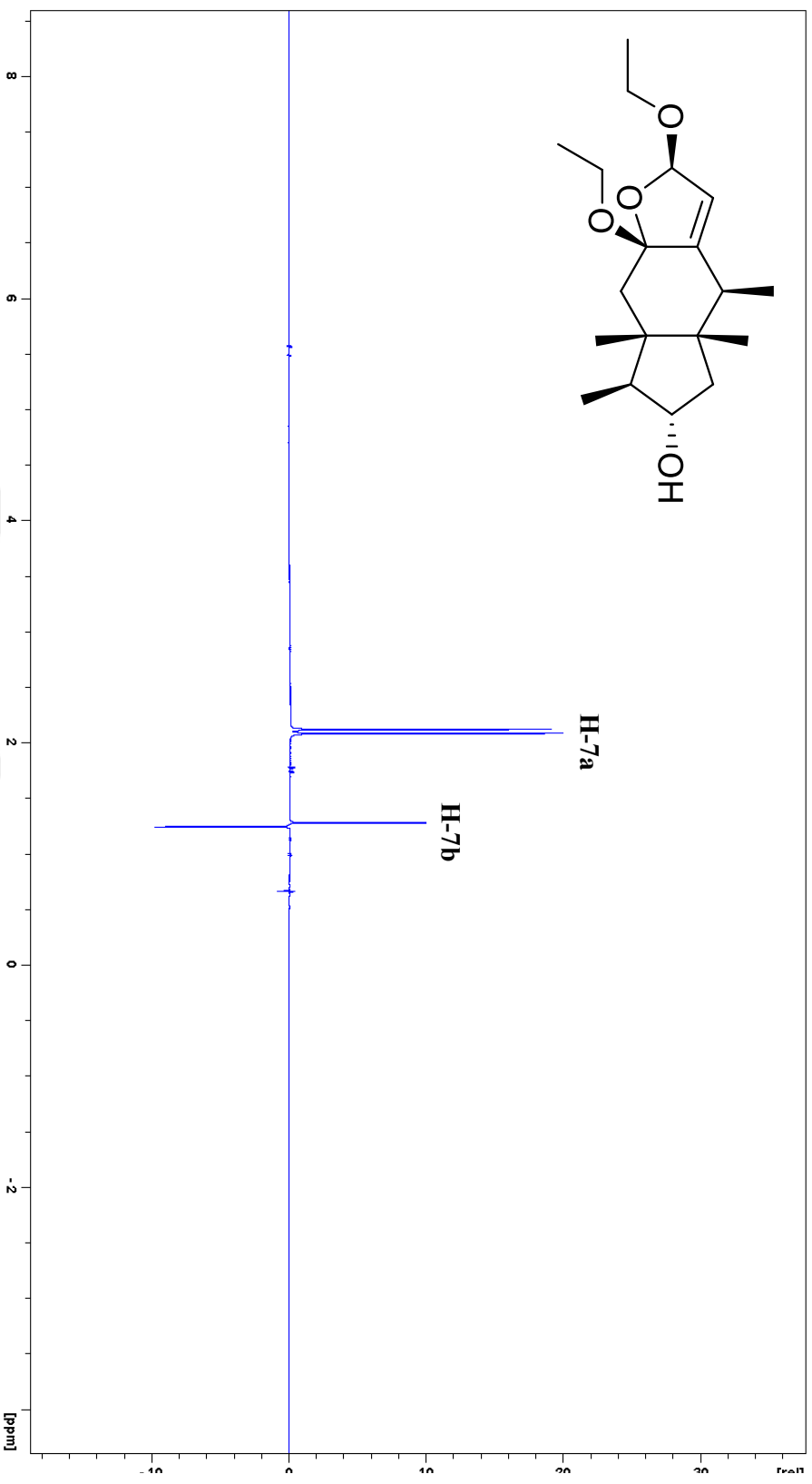
Şekil 3.60. HMBC spektrumu (4) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



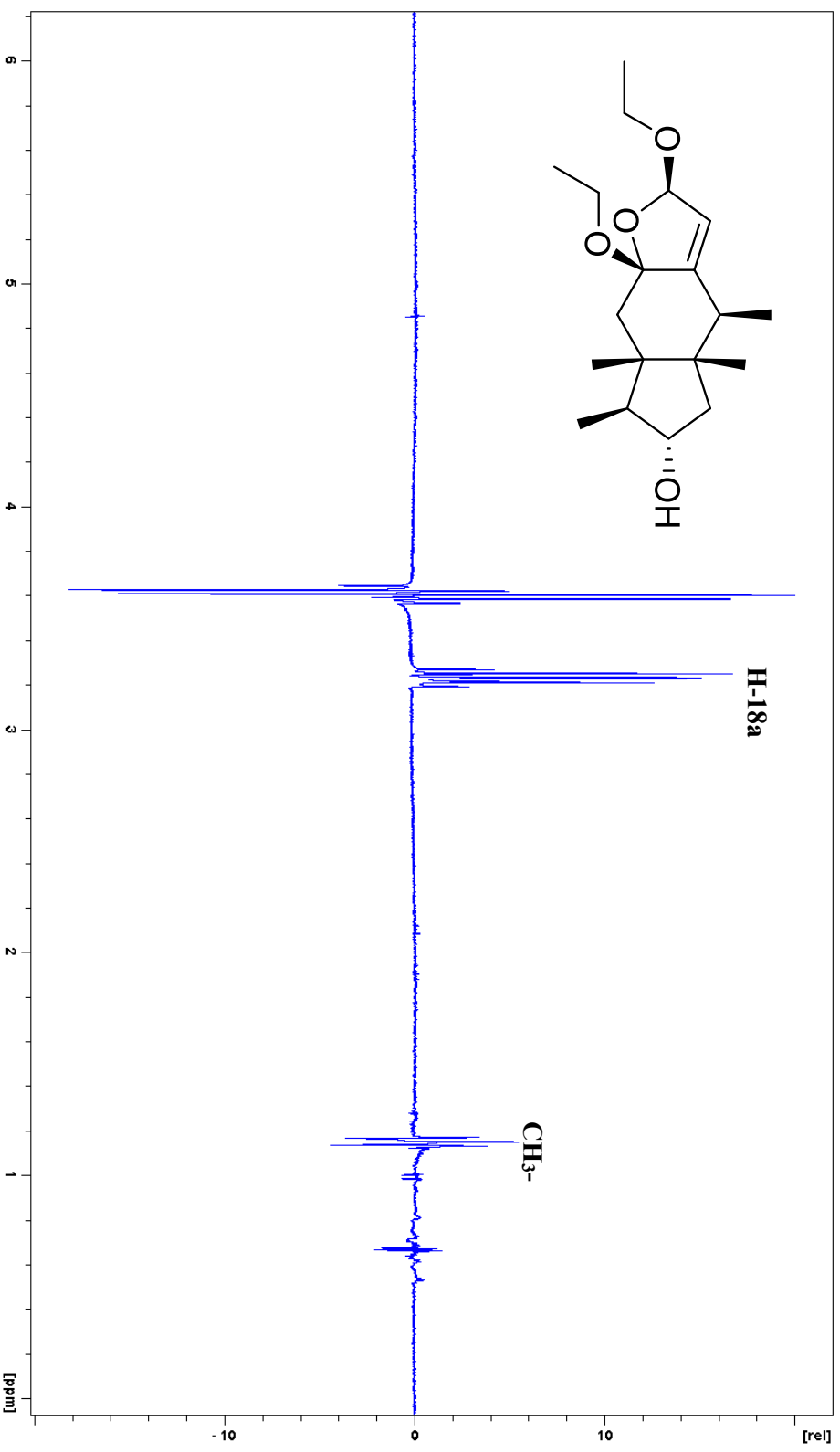
Şekil 3.61. HMBC spektrumu (4), (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



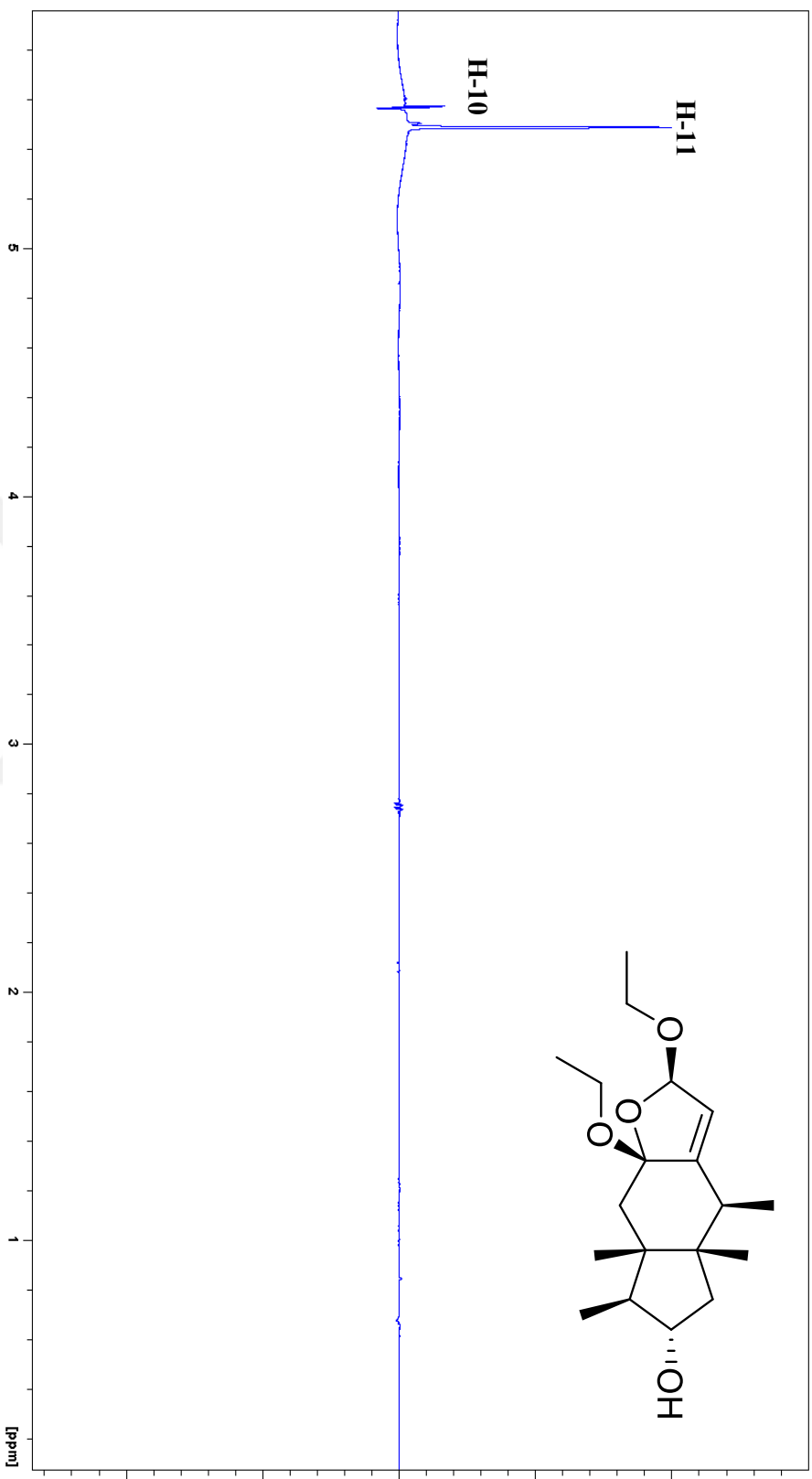
Şekil 3.62. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 2.10 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal D (4)



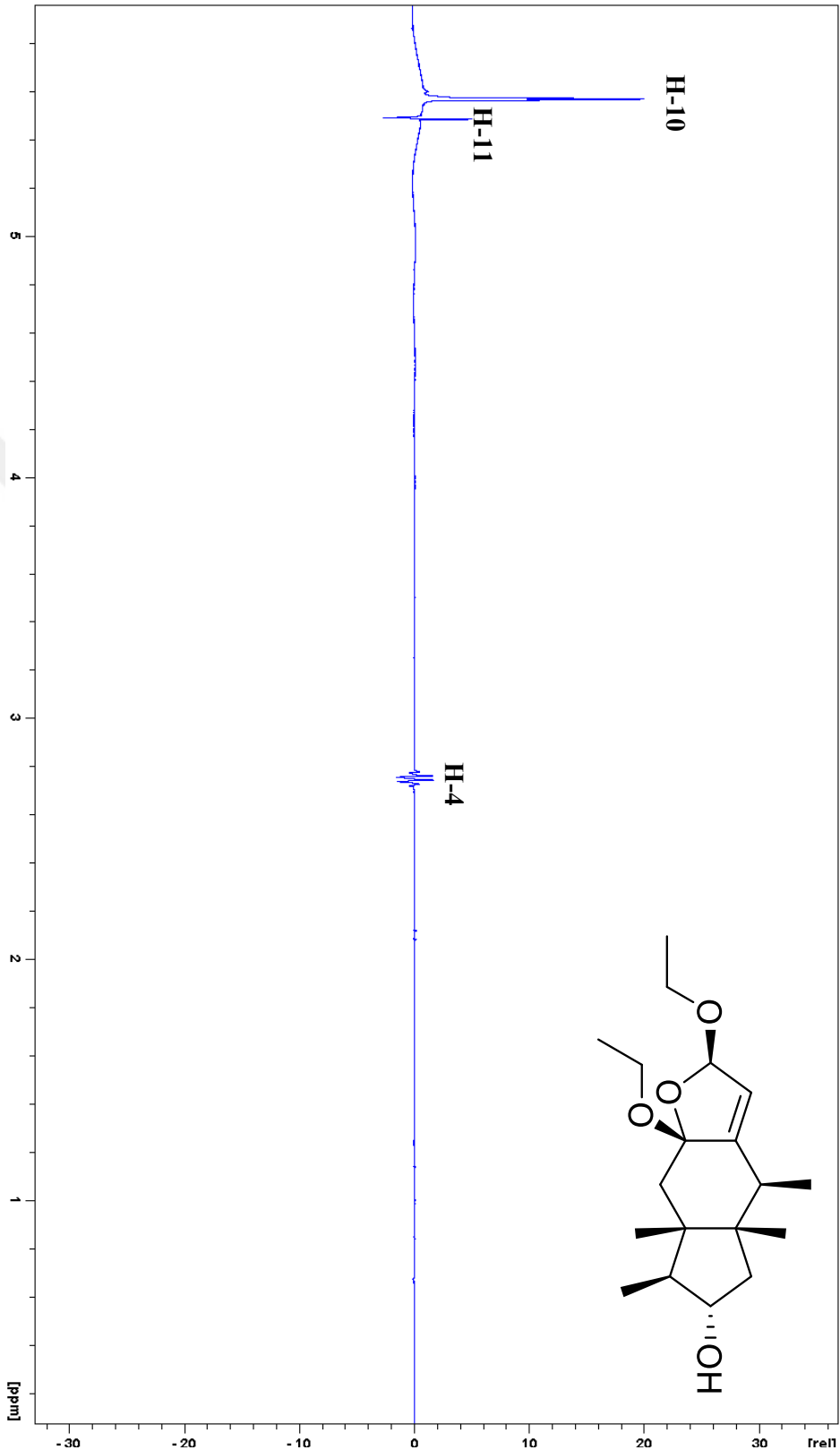
Şekil 3.63. 1-D COSY spektrumu (3) (δ 3.22 de işinlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



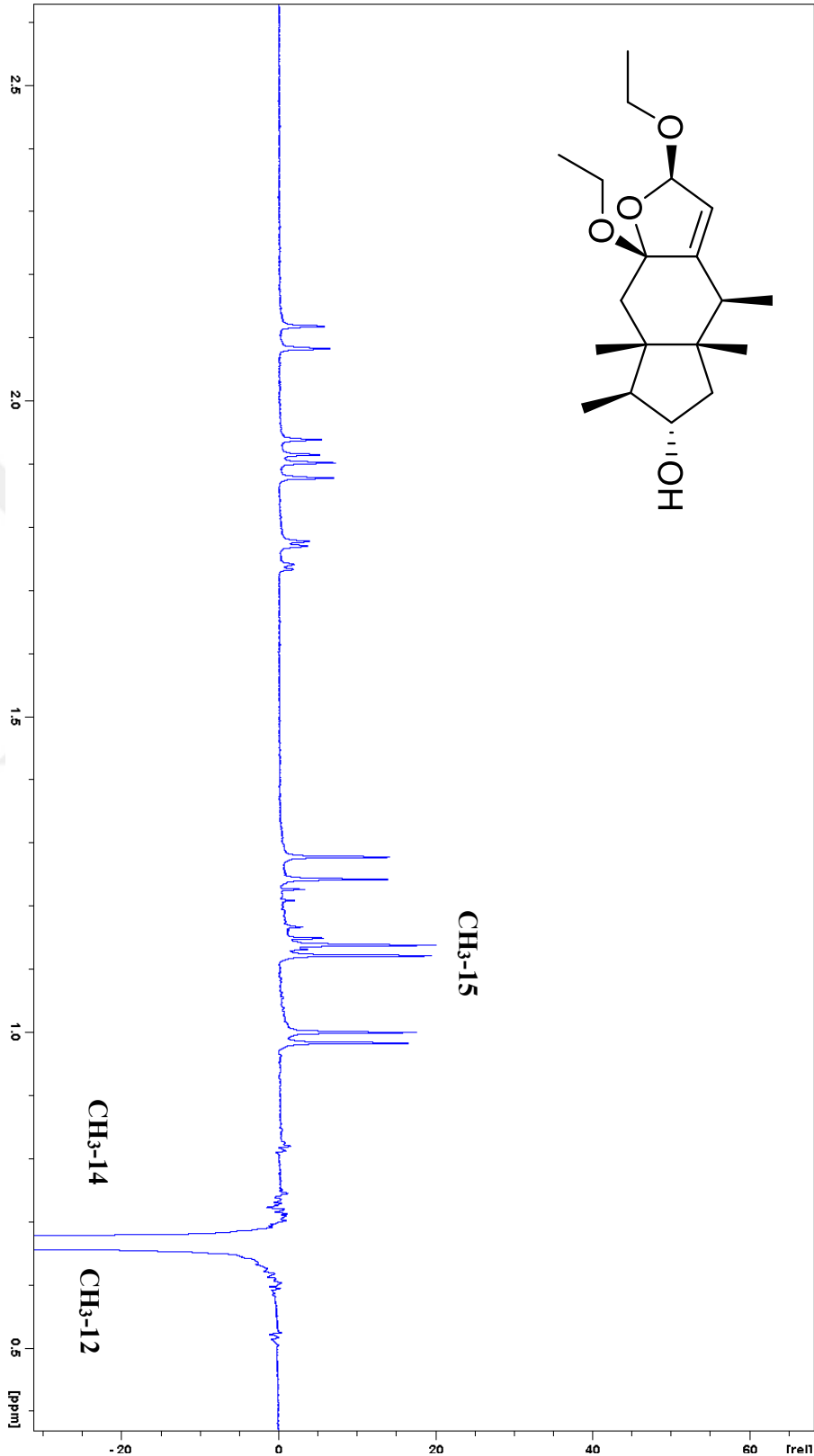
Şekil 3.64. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 5,48 de ısınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD_3OD)

Porellasetal D (4)



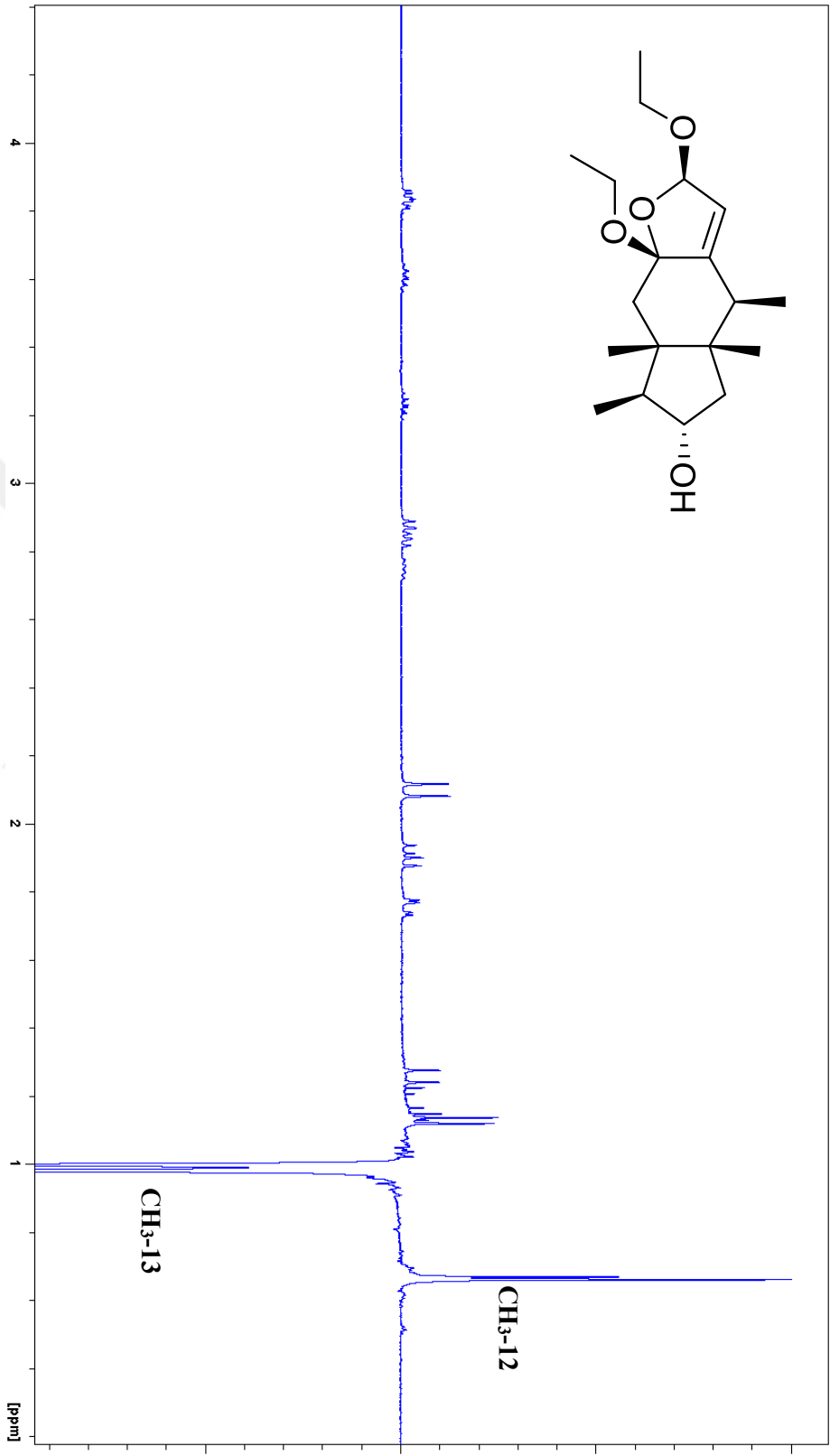
Şekil 3.65. 1-D COSY spektrumu (4) (δ 5.56 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



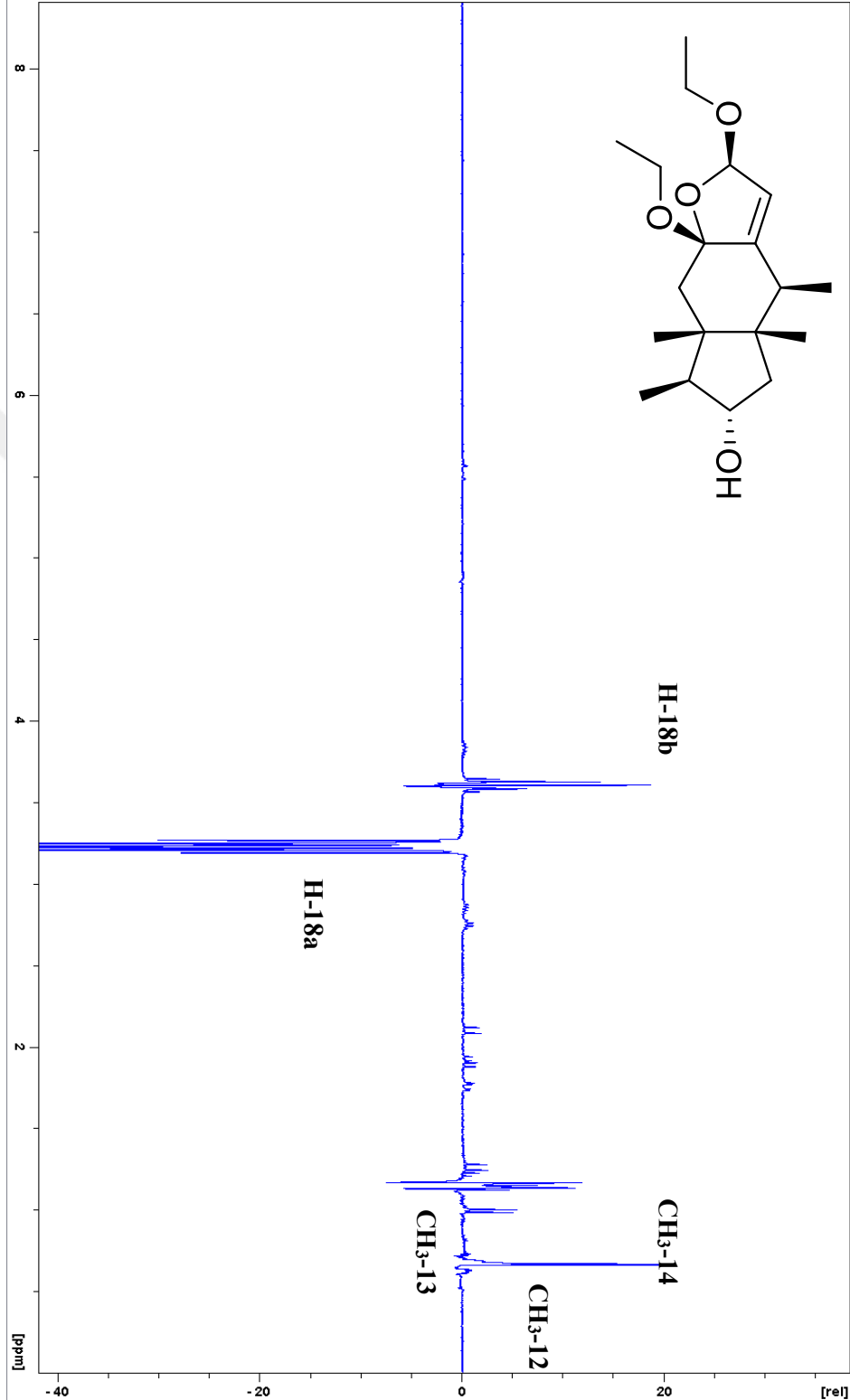
Şekil 3.66. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 0.67 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



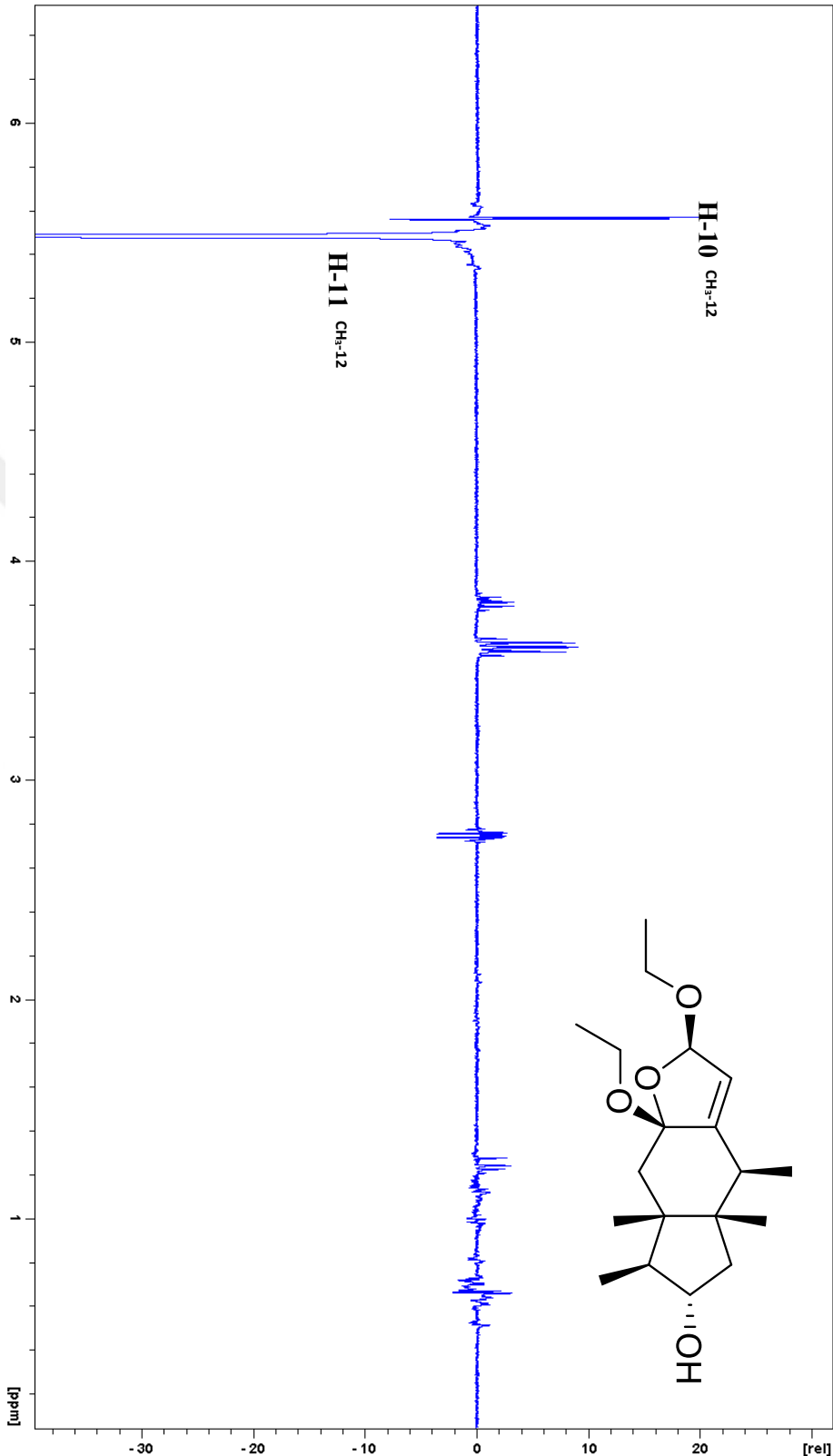
Şekil 3.67. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 0.99 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



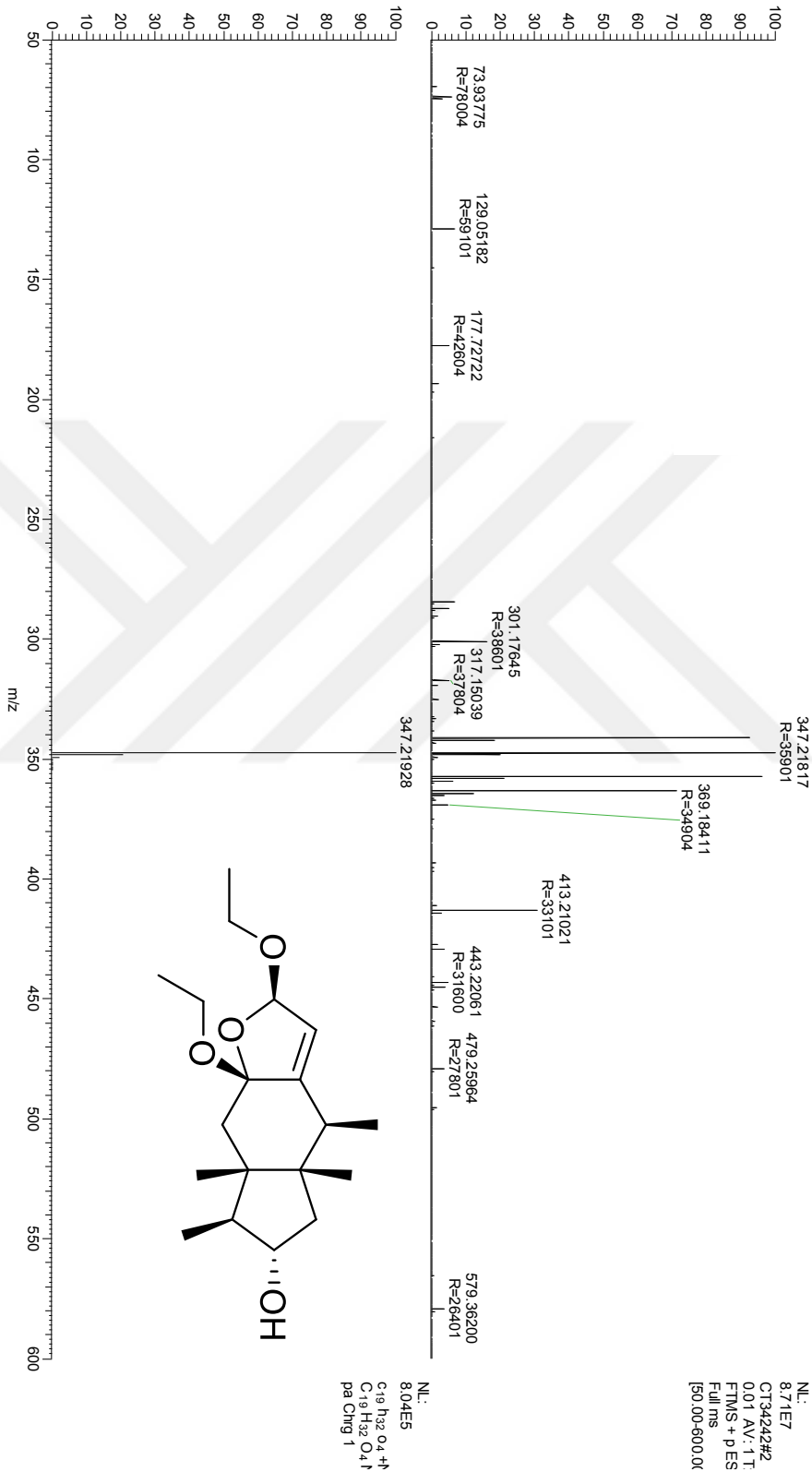
Şekil 3.68. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 3.22 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



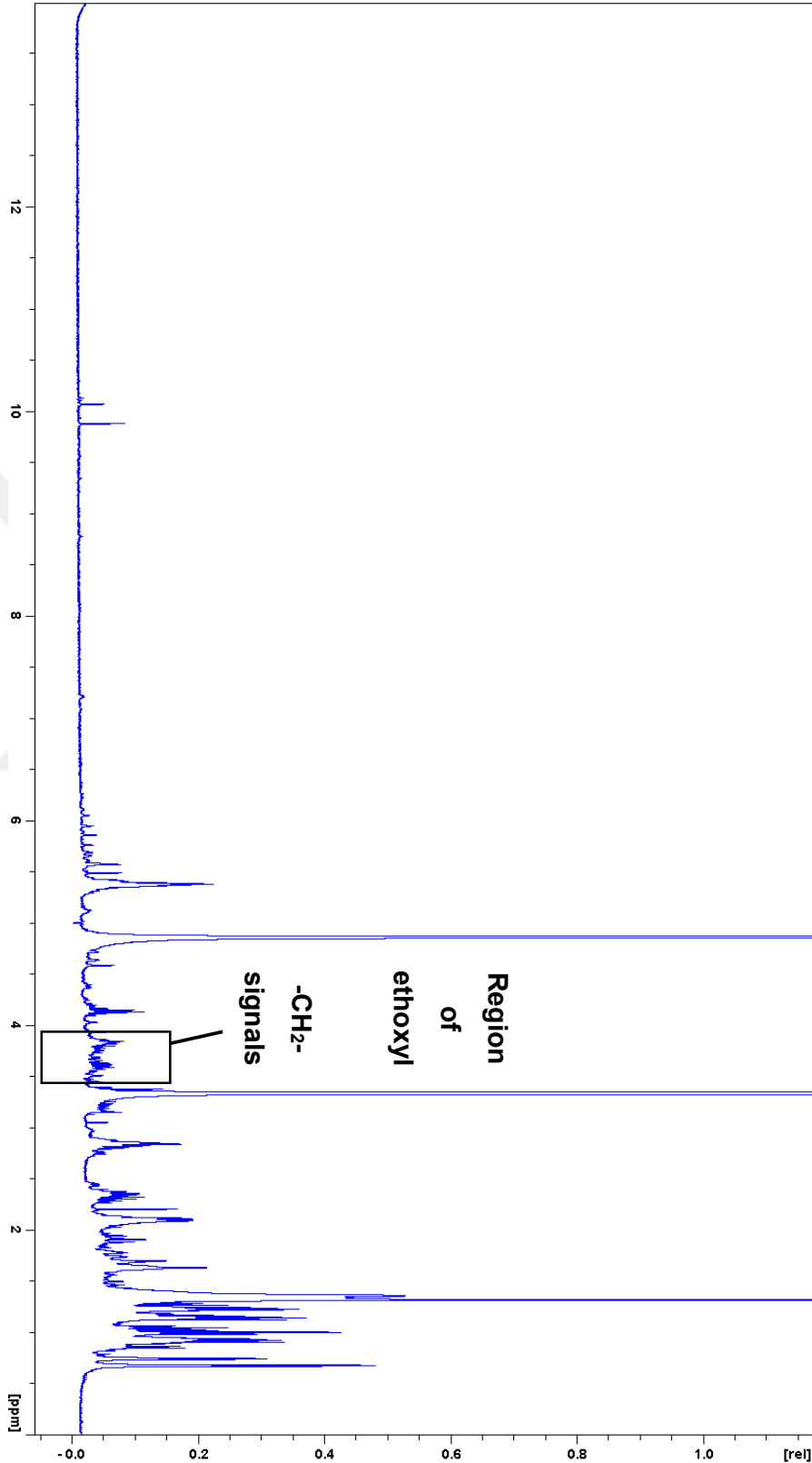
Şekil 3.69. 1-D NOESY spektrumu (4) (δ 5.48 de ışınlama ile alınan sinyal) (400 MHz, CD₃OD)

Porellasetal D (4)



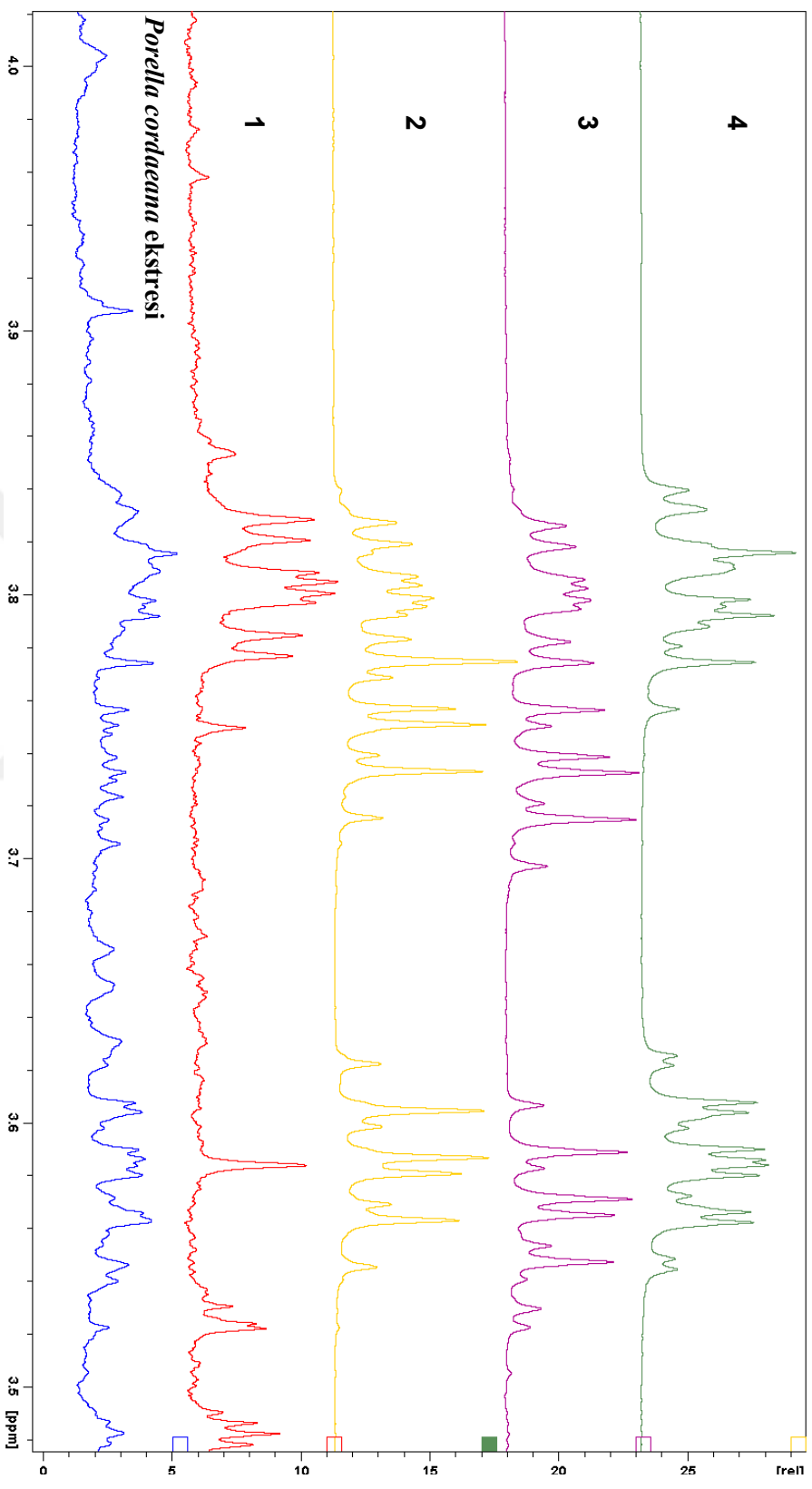
Şekil 3.70. HRESIMS (4), C₁₉H₃₂O₄, at m/z: 347.2181 [M+Na]⁺ (C₁₉H₃₂O₄Na için hesaplanan 347.2192)

Porella corduana ekstresi



Şekil 3.71. *Porella corduana*'nın eterli ekstresinin ^1H NMR spektrumu

Porella cordaeana ekstresi

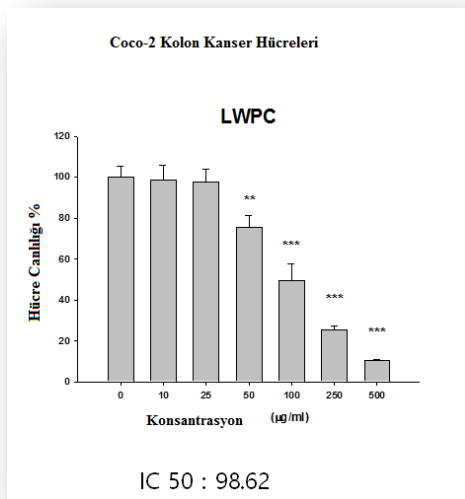


Şekil 3.72. *Porella cordaeana* ekstresi ve 1-4 bileşiklerinin ¹H NMR spektrumlarının 3.5pp den 4 ppm'e kadar karşılaştırılması (eroksil bölgesi sinyallerine göre

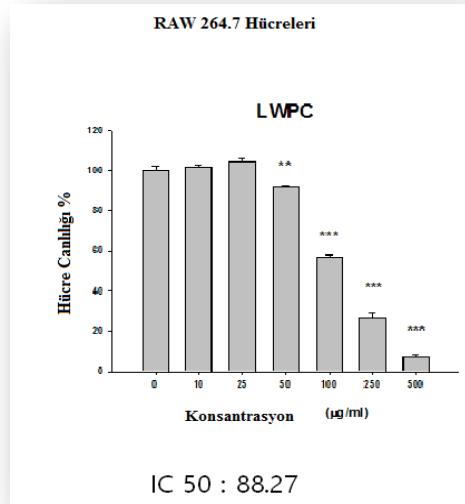
3.4. Biyolojik Aktivite Bulguları

3.4.1. MTT Deneyine Ait Bulgular

Porella cordaeana'nın sitotoksik etkisi HT29 (Kolon kanser hücreleri) ve MCF-7 (İnsan meme kanseri hücreleri) hücreleri üzerinde denenmeden önce, farklı kanser hücrelerine karşı da denenmiştir. Caco-2 (kolon kanser hücreleri), RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerine sitotoksitesisi gibi farklı hücre kültürleri üzerinde incelenmiştir. Söz konusu olan sitotoksik etki, bileşiklerin ancak yüksek konsantrasyonlarında gözlenebilmiştir (Şekil 3.73). Aşağıdaki şekillerde (Şekil 3.73 ve 3.74) eterli ekstrenin konsantrasyona bağlı olarak gösterdiği etkilere ait sonuçlar grafikler halinde verilmiştir. Bu grafiklerden anlaşıldığı üzere düşük konsantrasyonlarda *Porella cordaeana* bitkisinin herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, RAW 264.7 makrofaj hücreleri üzerine etkisi de incelenerek, ekstrenin NO (Nitrik oksit) üretimini inhibe edici etkisi gözlenmiştir. Bu deneyde NO inhibisyonu üzerine kuvvetli etkileri olduğu sonucuna varılmış, ancak bu doğrultuda yapılacak çalışmalar daha sonraki aşamalara bırakılmıştır.



Şekil 3.73. *Porella cordaeana*'nın Caco-2 (Kolon Kanseri Hücreleri) Üzerindeki Sitotoksitesisi



Şekil 3.74. *Porella cordaeana*'nın RAW 264.7 Makrofaj Hücreleri Üzerine Sitotoksitesisi

3.4.2. SRB Deneyine Ait Bulgular

Porellasetal A, B, C ve D olarak isimlendirilen 4 yeni bileşik izole edilerek bilim dünyasına ve literatüre kazandırılmıştır. Daha sonra, bu bileşiklerin, HT29 (Kolon kanser hücreleri) ve MCF-7 (İnsan meme kanseri hücreleri) üzerine antiproliferatif etkileri, sülfürodamin B (SRB) yöntemi ile incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Elde edilen IC₅₀ konsantrasyonları Çizelge 3.5’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre çok önemli bir derece de antiproliferatif bulgular elde edilememiştir. Bununla birlikte bileşiklerin, doza bağlı olarak, orta seviyede etkileri bulunmaktadır.

Çizelge 3.5. Porellasetal A, B, C, D bileşiklerinin HT29 (Kolon kanser hücreleri) ve MCF-7 (İnsan meme kanseri hücreleri) üzerine sitotoksik etkisi

BİLEŞİKLER (IC ₅₀ µg/ml)	HT29	MCF-7
Porellasetal A	>20	19.2
Porellasetal B	>20	11.2
Porellasetal C	16.3	7.4
Porellasetal D	>20	>20
Kamptothecin	-	0.005
Taksol	0.00082	-

4. TARTIŞMA

Çalışmamızın konusu olan *Porella cordeana* ve *P. platyphylla* türleri üzerinde yapılan literatür araştırmaları sonucunda, bu ciğerotlarının ana bileşenlerinin, *P. cordeana* için daha çok seskiterpenler ve flavonoidler olduğu bulunmuştur. Bunun yanında, *P. platyphylla*'nın ana bileşenlerinin ise, monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, flavonoid ve steroidler olduğu tarafımızca yapılan incelemeler sonucunda anlaşılmıştır.

P. cordeana üzerinde yapılan biyoaktivite çalışmalarında ise hem ekstrelerde, hem de izole edilen bileşiklerde sitotoksik aktivite ölçülmüş ve düşük düzeyde sitotoksik etkisinin bulunduğu gözlenmiştir. Genellikle, ciğerotlarında bulunan aromatik yapıda olan bibenzil yapısının sitotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. *Porella* türlerinde ise, bu yapıya rastlanmamakla beraber gözlenen sitotoksik aktivitelerinin, seskiterpen yapılarından kaynaklandığı gözlenmektedir.

Çalışmamızda *P. cordeana*'dan majör bileşikler olarak, seskiterpen türevi bileşikler yanında, fitol ve stigmasterol de izole edilmiştir. Biyoaktivite eşliğinde yapılan izolasyon çalışmaları ile sürekli aktif fraksiyon seçilerek elde edilen bileşiklerin yapıları aydınlatılarak bilim dünyasına dört yeni bileşik kazandırılmıştır. Bu bileşikler pinguisan türevi (Tip V) seskiterpenler olarak isimlendirilmektedir. Bu yapılan deney sonuçlarına göre çok yüksek bir etki gözlenemese de daha önce ciğerotları üzerine yapılan çalışmalarda çok değerli aktivitelere sahip olan bileşiklerin izole edildiğini ve çok etkili oldukları bilinmektedir. Ayrıca, ciğerotlarının çok etkili bileşiklere sahip oldukları da bilinmektedir. Farmakolojik olarak etkili bileşiklere sahip olmalarının yanında, ciğerotlarında yeni bileşiklerin izole edilme olasılığı da biyolojik çeşitliliklerinin çok olması nedeniyle oldukça yüksektir. Yeni bileşiklerin izole edilmesi, yeni ilaç etken maddelerinin keşfi açısından da önem taşımaktadır.

Toplanan türlerden *P. cordeana*'nın miktarı yüksek olduğu için, tüm izolasyon ve aktivite çalışmaları bu tür üzerinden yürütülmüştür. Aslında, yapılan ön denemelerde de bu türün içeriğinin daha ilginç olduğu, diğer türün ise daha önce yapılan pek çok çalışma ile benzerlik gösterebileceği ön görüşü nedeniyle de *P. cordeana* araştırmamızın ana materyalini oluşturmuştur. *P.*

platyphylla 'nın miktar bakımından çok az olmasından dolayı, sadece İTK ile ön incelemeleri yapılmış ve *P. cordeana* ile kıyaslanmıştır. Yaptığımız bu deneyde ise içerik bakımından ne kadar farklı oldukları ilk bakışta bile göze çarpmaktadır. Daha öncesinde yapılmış olan çalışmalarda *Porella* türlerine ait olan bu iki türün birbirine çok benzemesine rağmen farklı kimyasal içeriklere sahip oldukları zaten literatürde belirtilmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmadan kazanılan bilgiler doğrultusunda, ülkemizde bulunan ciğerotlarının kullanılması ve değerlendirilmesine yönelik ilerde yapılacak çalışmalara ışık tutacak önemli veriler elde edilmiş olup, bu araştırmada da ilk defa ortaya konmuştur.

Çalışmamızın konusu olarak, 2013 yılı Nisan ayında Aydın'dan toplanan *Porella cordeana* ve *P. platyphylla* seçilmiştir. Seçilen örneklerden *P. cordeana*'ya ait eterli ekstrenin ve izole edilerek literatüre kazandırdığımız **4 yeni bileşiğin** sitotoksik aktivitesine bakılmıştır. *P. cordeana* ile ülkemizde izolasyon ve aktivite çalışmalarına rastlanmazken, bu tezde gerçekleştirdiğimiz çalışmanın bu açıdan ilklerden biri olması, ayrıca yeni bileşiklerin izole edilmesi açısından da önem kazanmıştır.

Porella cordeana'nın eterli ekstresinden sitotoksik aktivite tayini MTT ile yapılmış olup; IC₅₀ değerleri Caco-2 (Kolon Kanseri Hücreleri) ve RAW 264.7 (Fare Makrofaj Hücreleri) üzerinde sırasıyla; 98.62 ve 88.27 µg/mL olarak bulunmuştur. Ham ekstremin düşük sitotoksik aktivite gösterirken, makrofaj hücreleri üzerine olan etkilerinin yüksek olması nedeniyle, ilerde anti-enflamatuar özellikleriyle değerlendirilebileceği düşünülebilir.

Yapılan çalışmada izole edilen bileşiklerle biyoaktivite çalışması da SRB yöntemi ile yapılmış olup; Porellasetal A, B, C, D bileşiklerinin HT29 (Kolon kanser hücreleri) ve MCF-7 (İnsan meme kanseri hücreleri) üzerine sitotoksik etkisi kamptotesin ve taksol ile kıyaslanmıştır. Bu bileşiklerin çok yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olmadıkları sonucuna ulaşılmıştır.

İlerleyen çalışmalarda, izole edilen bu bileşiklerin daha farklı biyoaktivitelerine bakılarak, başka çalışmalara konu olabileceğini düşünülmektedir.

Bu çalışma ile Türkiye'de yetişen bazı *Porella* türlerinin fitokimyasal içeriklerinin aydınlatılması sağlamış ve ülkemizde yetişen diğer *Porella* türleri üzerinde ilerde yapılabilecek çalışmalara yol gösterici olacağını göstermiştir. Ülkemizde genel olarak ciğerotları üzerindeki fitokimyasal ve

biyolojik aktivite çalışmalarının yetersiz olduğu görülmektedir. Daha ayrıntılı çalışmaların yapılması bu konudaki bilimsel eksikliğin giderilmesi açısından çalışmamız önemlidir. Bunun yanında, ülkemiz ciğerotları çeşitliliği açısından da oldukça zengin bir floraya sahiptir. Bu ciğerotları, farklı ve çeşitli içerikleri nedeniyle de yeni bileşiklerin izole edilebilmesi için zengin bir kaynak oluşturmaktadır. Bizim yaptığımız bu çalışmada da *P. cordeana* ve *P. platyphylla*, kimyasal bileşikleri açısından karşılaştırılmış, öncelik verilen *P. cordeana* ile daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak önemli sonuçlara ulaşılmıştır.

Bundan sonraki çalışmalar diğer ciğerotları üzerinde grubumuz tarafından devam ettirilerek daha farklı çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Bunun yanında ilerde ciğerotları üzerinde yapılacak olan araştırmalara bu tez aracılığı ile yol gösterileceğine de inanılmaktadır.

ÖZET

***Porella cordeana* ve *Porella platyphylla*'nın (Porellaceae) Kimyasal Bileşikleri ve Biyolojik Aktiviteleri Yönünden Karşılaştırılması**

Bu çalışmada, Porellaceae familyasına ait olan *Porella cordeana* ve *P. platyphylla* üzerinde fitokimyasal ve biyolojik aktiviteye ait araştırmaların yapılması amaçlanmıştır. Birbirine çok benzeyen *Porella cordeana* ve *P. platyphylla* türlerinin; kimyasal yapılarının ve aktivitelerinin karşılaştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmuştur. Öncelikle, her iki türün İTK ile eterli ekstrelerinin kimyasal içerikleri karşılaştırılmış ve bir ön fikir elde edilmiştir. Daha sonra, *P. cordeana*'ya ait eterli ekstrenin, Caco-2 (kolon kanseri hücreleri) üzerindeki ve RAW 264.7 (fare makrofaj hücreleri) üzerinde sitotoksitesi MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ekstrenin yüksek bir sitotoksik aktivitesi olmamakla birlikte, fare makrofajlarına sitotoksik etkisinin olmaması anti-enflamatuar etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, fazla miktarda toplanmış olan ve tür ayrımı gerçekleştirilmiş olan *P. cordeana* ile, izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. İzolasyon çalışmaları sonucunda **4 yeni bileşik** izole edilmiş olup, yapıları NMR, IR, UV ve MS spektroskopileri ile aydınlatılması sonucu Porellasetal A-D olarak isimlendirilen pinguisan tipi (Tip V) seskiterpenik bileşiklere ulaşılmış ve literatüre kazandırılmıştır. İzolasyon çalışması yapılan tür *P. cordeana* eterli ekstresi ve izole edilen bileşiklerinin biyoaktivite tayini SRB yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Aktivite tayininde, elde edilen bileşiklerin HT29 (kolon kanser hücreleri) ve MCF-7 (insan meme kanseri hücreleri) üzerine sitotoksik etkisi, kamptotesin ve taksol gibi bilinen iki madde ile kıyaslanmış, ancak yüksek bir etkiye rastlanamamıştır. Bununla birlikte, daha sonra farklı aktivitelerin incelenmesi planlanmıştır.

Ülkemiz ciğerotları bakımından bir potansiyel oluşturmaya rağmen bu bitki grubu ile yapılan çalışmaların henüz yeterli olmadığı bir gerçektir.

Bu çalışma ile, bundan sonra yapılacak diğer çalışmalara yol gösterilecek ve temel bir çalışma olarak araştırmacılar bu kaynaktan yararlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik Aktivite, Ciğerotları, Kimyasal İçerik, Marchantiophyta, *Porella* Porellaceae, *Porella cordeana*, *Porella platyphylla*

SUMMARY

Comparison of *Porella cordeana* and *Porella platyphylla* (Porellaceae) for the chemical composition and biological activity

In this study, phytochemical and biological activity studies on *Porella cordeana* and *P. platyphylla* belonging to Porellaceae family were aimed. *Porella cordeana* and *P. platyphylla* species which are very similar to each other; The comparison of chemical structures and activities is the purpose of this study. Firstly, the chemical contents of the ether extracts were compared with each other, and a preliminary idea was obtained. Subsequently, the cytotoxicity of the *P. cordeana* extract, Caco-2 (colon cancer cells) and RAW 264.7 (mouse macrophage cells) was assessed by MTT assay. Although there is no high cytotoxic activity of the extract, the lack of its cytotoxic effect on mouse macrophages suggests that it may be an anti-inflammatory effect. However, isolation studies with *P. cordeana*, which had been collected in excess and species differentiation were carried out, have been continued. As a result of the isolation studies, 4 new compounds were isolated and the results were illuminated by NMR, IR, UV and MS spectroscopy. The resulting pinguisan type (Type V) sesquiterpenic compounds, named Porellasetala-D, were reached and the literature was gained. The isolation of *P. cordeana* was carried out by the SRB method and the bioactivity of the isolated compounds was determined. In the activity assay, the cytotoxic effect of the compounds obtained on HT29 (colon cancer cells) and MCF-7 (human breast cancer cells) was compared with two known substances such as camptothecin and taxol, but no high efficacy was observed. However, it was planned to examine different activities later on.

Despite the fact that our country has a potential in terms of liverworts, the work done with this group of plants is still not enough.

With this work, other work to be done from now on will be guided and as a basic study, researchers will be able to benefit from this source.

Key words: Biological Activity, Chemical Content, Liverworts, Marchantiophyta, *Porella*, Porellaceae, *Porella cordeana*, *Porella platyphylla*

KAYNAKLAR

- AINGE, G.D., GERARD, P.J., HINKLEY, S.F., LORIMER, S.D., WEAVES, R.T., (2001). Hodgsonox, a new class of sesquiterpene from the liverwort *Lepidolaena hodgsoniae*. Isolation Directed by Insecticidal Activity. *The Journal of organic chemistry*, **66**(8), 2818-2821.
- ALLOUCHE, N., APEL, C., MARTIN M.T., DUMONTET, V., GUERRITTE, F., LITAUDON, M. (2009). Cytotoxic sesquiterpenoids from Winteraceae of Caledonian rainforest. *Phytochemistry*, **70**(4), 546-553.
- ASAKAWA, Y. (1982). *Chemical constituents of the Hepaticae* (pp. 1-285). Springer Vienna.
- ASAKAWA, Y., (1990). Biologically active substances from bryophytes. *Biologically active substances from bryophytes.*, 259-287.
- ASAKAWA, Y. (1994). Highlights in phytochemistry of hepaticae-biologically active terpenoids and aromatic compounds. *Pure and applied chemistry*, **66**(10-11), 2193-2196.
- ASAKAWA, Y. (1995). *Chemical Constituents of the Bryophytes*. (pp. 1-562). Springer Vienna.
- ASAKAWA, Y. (2001). Recent advances in phytochemistry of bryophytes-acetogenins, terpenoids and bis (bibenzyl) s from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinean and European liverworts. *Phytochemistry*, **56**(3), 297-312.
- ASAKAWA, Y. (2004). Chemosystematics of the Hepaticae. *Phytochemistry*, **65**(6), 623-669.
- ASAKAWA, Y. (2007). Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, **79**(4), 557-580.
- ASAKAWA, Y. (2008). Liverworts-potential source of medicinal compounds. *Current Pharmaceutical Design*, **14**(29), 3067-3088.
- ASAKAWA, Y. (2011). Bryophytes: chemical diversity, synthesis and biotechnology. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, **26**(5), 318-320.
- ASAKAWA, Y., (2015). Search for new liverwort constituents of biological interest. *Natural Products Recent Advances*, pp 25-92.
- ASAKAWA, Y., YAMAMURA, A., WAKI, T., TAKEMOTO, T. (1980). Caespitenone, a new cyclopropanoid pseudoguaiane and ent-sesquiterpenes from *Porella* species. *Phytochemistry*, **19**(4), 603-607.

- ASAKAWA, Y., CAMPBELL, E.O. (1982). Terpenoids and bibenzyls from some New Zealand liverworts. *Phytochemistry*, **21**(11), 2663-2667.
- ASAKAWA, Y., TAKIKAWA, K., TOYOTA, M., UEDA, A., TORI, M., KUMAR, S. (1986). Sesqui- and diterpenoids from the liverworts *Porella densifolia* subsp. *appendiculata* and *Porella densifolia* var. *fallax*. *Phytochemistry*, **26**(4), 1019-1022.
- ASAKAWA, Y., MASUYA, T., TORI, M., CAMPBELL, E.O. (1987). Long chain alkyl phenols from the liverwort *Schistochila appendiculata*. *Phytochemistry*, **26**(3), 735-738.
- ASAKAWA, Y., TOYOTA, M., UEDA, A. (1990). Sacculatane- and clerodane-type diterpenoids from the liverworts *Porella perrottetiana* and *Heteroscyphus bescherelei*. *Phytochemistry*, **29**(7), 2165-2167.
- ASAKAWA, Y., LUDWICZUK, A., NAGASHIMA, F., TOYOTA, M., HASHIMOTO, T., TORI, M., FUKUYAMA, Y., HARINANTENAINA, L. (2009). Bryophytes: bio- and chemical diversity, bioactivity and chemosystematics. *Heterocycles*, **77**(1), 99-150.
- ASAKAWA, Y., LUDWICZUK, A. (2013a). Bryophytes: Liverworts, mosses, and hornworts: Extraction and isolation procedures. *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols*, 1-20.
- ASAKAWA, Y., LUDWICZUK, A., NAGASHIMA, F. (2013b). Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, **91**, 52-80.
- BAEK, S.-H., PERRY, N.B., LORIMER, S.D., (2003). ent-Costunolide from the liverwort *Hepatostolonophora paucistipula*. *Journal of Chemical Research*, 2003(1), 14-15.
- BASILE, A., SORBO, S., GIORDANO, S., LAVITOLA, A., CASTALDO, C.R. (1998). Antibacterial activity in *Pleurochaete squarrosa* extract (Bryophyta). *International journal of antimicrobial agents*, **10**(2), 169-172.
- BOSANUET, S. (2014). *Atlas of British & Irish*. Vol.1, p: 206-207.
- BUCZKOWSKA, K., RABSKA, M., GONERA, P., PAWLACZYK, E.M., WAWRZYNIAK, P., CZOLPINSKA, M., BACZKIEWICZ, A. (2016). Effectiveness of ISSR markers for determination of the *Aneura pinguis* cryptic species and *Aneura maxima*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **68**, 27-35.
- BUKVICKI, D., GOTTARDI, D., VELJIC, M., MARIN, P.D., VANNINI, L., GUERZONI, M.E. (2012). Identification of volatile components of liverwort (*Porella cordaeana*) extracts using GC/MS-SPME and their antimicrobial activity. *Molecules*, **17**(6), 6982-6995.
- BUNGERT, M., GABLER, J., ADAM, K. P., ZAPP, J., BECKER, H. (1998). Pinguisane sesquiterpenes from the liverwort *Porella navicularis*. *Phytochemistry*, **49**(4), 1079-1083.
- BURGESS, E.J., LARSEN, L., PERRY, N.B. (2000). A cytotoxic sesquiterpene caffeate from the liverwort *Bazzania novae-zelandiae*. *Journal of natural products*, **63**(4), 537-539.

- CHANDRA, S., CHANDRA, D., BARH, A., PANKAJ, PANDEY, R. K., SHARMA, I., P. (2016)
CHANDRA, S., CHANDRA, D., BARH, A., PANDEY, R. K., SHARMA, I. P. (2017).
Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **7**(1), 94-98.
- CHENG, A. X. (2008). Effect of plagiocin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacologica Sinica*, **29**(12), 1478-1485.
- CRONQUIST, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press.
- CORZO, F.L., GILABERT, M., ALCAIDE, M.F., BARDON, A. (2012). Toxicity of *Porella chilensis* sesqui- and diterpenoids against larvae of the corn pest *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical entomology*, **41**(5), 414-419.
- CULLMANN, F., BECKER, H. (1999). Sesquiterpenoids from the liverwort *Porella canariensis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **54**(3-4), 151-155.
- DEY, A., MUKHERJEE, A. (2015). Therapeutic potential of bryophytes and derived compounds against cancer. *Journal of Acute Disease*, **4**(3), 236-248.
- EVANS, F. J., SCHMIDT, R. J. (1980) Plants and plant products that induce contact dermatitis. *Planta medica*, **38**(04), 289-316.
- FIGUEIREDO, A. C., SIM-SIM, M., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G., SANTOS, P. A., FONTINHA, S. S., SCHRIPEMA, J., DEANS, S. G., SCHEFFER, J. J., (2002). Composition of the essential oil from the liverwort *Marchesinia mackaii* (Hook.) SF gray grown in Portugal. *Journal of Essential Oil Research*, **14**(6), 439-442.
- FRAHM, J. P., 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.
- FREY, W., FRAHM, J. P., FISCHER, E., LOBIN W. (2006). *The liverworts, mosses and ferns of Europe*. Apollo Books, pp. 50.
- FUKUYAMA, Y., TORI, M., WAKAMATSU, M., ASAKAWA, Y. (1988). Norpinguisone methyl ester and norpinguisanolide, pinguisane-type nor-sesquiterpenoids from *Porella elegantula*. *Phytochemistry*, **27**(11), 3557-3561.
- FUKUYAMA, Y., ASAKAWA, Y., (1991). Novel neurotrophic isocuparane-type sesquiterpene dimers, mastigophorenes A, B, C and D, isolated from the liverwort *Mastigophora diclados*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (11), 2737-2741.
- FUKUYAMA, Y., KODAMA, Y., (1996). Search for novel neurotrophic factor-like substances in natural products. *Food & Food Ingredients J*, 45-56.

- GILABERT, M., RAMOS, A. N., SCHIAVONE, M. M., ARENA, M. E., BARDON, A. (2011). Bioactive sesqui- and diterpenoids from the Argentine liverwort *Porella chilensis*. *Journal of Natural Products*, **74**(4), 574-579.
- GOKLER, I. (1993). Az bilinen biyolojik zenginliğimiz Ciğerotları. *Ekoloji*, **6**, 17-18.
- GOKLER, I. (2004). Türkiye Ciğerotları ve Boynuzsu Otlar Veritabanı. PROJE NO: TBAG-Ç.SEK/ 18 (102T146)
- GOKLER, I. (2015). Çanakkale İli Boynuzsu Otları ve Ciğerotları Üzerine Taksonomik ve Ekolojik Bir Araştırma. *Journal of Anatolian Natural Sciences*, **6** (2), 35-43.
- GUNER, A., AYDINKAL, R.M., ALKAYIS M.F., CINGAY, B., ERDAG, A., OZENOGU KIREMIT, H., OZKAN, A.M., OZTEKIN, M., KANOGLU, S.S., KADIOGLU, Z., KESKIN, M., KIRMACI, M., KULTUR, S., NAHMEDOV, A., TUG, G.N., YASARKAN, O. (2017). Türkçe Bitki Adları. ERDAG, A., KURSCHNER, H. Türkiye Bitkileri Listesi (Karayosunları). Ali Nihat Gökyiğit Vafkı Yayını, İstanbul.
- GUO, X. L., LENG, P., YENG, Y., YU, L. G., LOU, H. (2008). Plagiochin E, a botanic-derived phenolic compound, reverses fungal resistance to fluconazole relating to the efflux pump. *Journal of applied microbiology*, **104**(3), 831-838.
- HARINANTENAINA, L., LUANG, D. N., NISHIZAWA, T., HASHIMOTO, T., KOHCHI, C., SOMA, G. I., ASAKAWA, Y., (2005) Bis (bibenzyls) from liverworts inhibit lipopolysaccharide-induced inducible NOS in RAW 264.7 cells: a study of structure – activity relationships and molecular mechanism. *Journal of natural products*, **68**(12), 1779-1781.
- HARINANTENAINA, L., TAKAHARA, Y., NISHIZAWA, T., KOHCHI, C., SOMA, G. I., ASAKAWA, Y. (2006). Chemical constituents of malagasy liverworts, Part V: Prenyl bibenzyls and clerodane diterpenoids with nitric oxide inhibitory activity from *Radula appressa* and *Thysananthus spathulistipus*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **54**(7), 1046-1049.
- HARINANTENAINA, L., ASAKAWA, Y. (2007). Malagasy liverworts, source of new and biologically active compounds. *Natural Product Communications*, **2**(6), 701-709.
- HARRIS, E. S. (2008). Ethnobryology: traditional uses and folk classification of bryophytes. *The bryologist*, **111**(2), 169-217.
- HARRIGAN, G. G., AHMAD, A., BAJ, N., GLASS, T. E., GUNATILAKA, A. A., KINGSTON, D. G. (1993). Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. *Journal of natural products*, **56**(6), 921-925.
- HASHIMOTO, T., TORI, M., & ASAKAWA, Y. (1988). A highly efficient preparation of lunularic acid and some biological activities of stilbene and dihydrostilbene derivatives. *Phytochemistry*, **27**(1), 109-113.

- HASHIMOTO, T., OKUMURA, Y., SUZUKI, K., TAKAOKA, S., KAN, Y., TORI, M., & ASAKAWA, Y. (1995). The absolute structures of new 1 β -hydroxy-sacculatane-type diterpenoids with piscicidal activity from the liverwort *Pellia endiviifolia*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **43**(11), 2030-2032.
- HASHIMOTO, T., IRITA, H., & YOSHIDA, M., KIKKAWA, A., TOYOTA, M., KOYAMA, H., MOTOIKE, Y., ASAKAWA, Y. (1998a). Chemical constituents of the Japanese liverworts *Odontoschisma denudatum*, *Porella japonica*, *P. acutifolia* subsp. *tosana* and *Frullania hamatiloba* (Proceedings of the IAB Symposium on 2000' s Bryology, Beijing China, May 26-31, 1997). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, (84), 309-314.
- HASHIMOTO, T., IRITA, H., TANAKA, M., TAKAOKA, S., ASAKAWA, Y. (1998b). Two novel Diels-Alder reaction-type dimeric pinguisane sesquiterpenoids and related compounds from the liverwort *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. *Tetrahedron letters*, **39**(19), 2977-2980.
- HASHIMOTO, T., IRITA, H., TANAKA, M., TAKAOKA, S., ASAKAWA, Y. (2000). Pinguisane and dimeric pinguisane-type sesquiterpenoids from the Japanese liverwort *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. *Phytochemistry*, **53**(5), 593-604.
- HENTSCHEL, J., ZHU, R. L., LONG, D. G., DAVISON, P. G., SCHNEIDER, H., GRANSTEIN, S. R., HEINRICHS, J. (2007). A phylogeny of *Porella* (Porellaceae, Jungermanniopsida) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **45**(2), 693-705.
- HSIAO, G., TENG, C. M., WU, C. L., KO, F. N. (1996). Marchantin H as a natural antioxidant and free radical scavenger. *Archives of biochemistry and biophysics*, **334**(1), 18-26.
- HUANG, W. J., WU, C. L., LIN, C. W., CHI, L. L., CHEN, P. Y., CHIU, C. J., HUANG C.Y., CHEN C. N. (2010). Marchantin A, a cyclic bis (bibenzyl ether), isolated from the liverwort *Marchantia emarginata* subsp. *tosana* induces apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer letters*, **291**(1), 108-119.
- KLINK, J. W. V., ZAPP, J., BECKER, H. (2002). Pinguisane-type sesquiterpenes from the South American liverwort *Porella recurva* (Taylor) Kuhnemann. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **57**(5-6), 413-417.
- KOMALA, I., ITO, T., NAGASHIMA, F., YAGI, Y., ASAKAWA, Y. (2010). Cytotoxic, radical scavenging and antimicrobial activities of sesquiterpenoids from the Tahitian liverwort *Mastigophora diclados* (Brid.) Nees (Mastigophoraceae). *Journal of natural medicines*, **64**(4), 417-422.
- KOMALA, I., ITO, T., NAGASHIMA, F., YAGI, Y., ASAKAWA, Y. (2011). Cytotoxic bibenzyls, and germacrane-and pinguisane-type sesquiterpenoids from Indonesian, Tahitian and Japanese liverworts. *Natural product communications*, **6**(3), 303-309.
- KONDOH, M., NAGASHIMA, F., SUZUKI, I., HARADA, M., FUJII, M., ASAKAWA, Y., WATANABE, Y. (2005). Induction of apoptosis by new ent-kaurene-type diterpenoids

- isolated from the New Zealand liverwort *Jungermannia* species. *Planta medica*, **71**(11), 1005-1009.
- KUMAR TYAGI, A., BUKVICKI, D., GOTTARDI, D., VELJIC, M., GUERZONI, M. E., MALIK, A., MALIK, P. D. (2013). Antimicrobial potential and chemical characterization of serbian liverwort (*Porella arboris-vitae*): SEM and TEM observations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- LABBE, C., FAINI, F., VILLAGRAN, C., COLL, J., & RYCROFT, D. S. (2005). Antifungal and insect antifeedant 2-phenylethanol esters from the liverwort *Balantiopsis cancellata* from Chile. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**(2), 247-249.
- LEPOITTEVIN, J. P., BENEZRA, C., ASAKAWA, Y. (1989). Allergic contact dermatitis to *Ginkgo biloba* L.: relationship with urushiol. *Archives of dermatological research*, **281**(4), 227-230.
- LIN, S. J., WU, C. L. (1996). Isoplagiochilide from the liverwort *Plagiochila elegans*. *Phytochemistry*, **41**(5), 1439-1440.
- LIU, Y., PETERSON, D. A., KIMURA, H., SCHUBERT, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, **69**(2), 581-593.
- LORIMER, S. D., PERRY, N. B. (1994). Antifungal hydroxy-acetophenones from the New Zealand liverwort, *Plagiochila fasciculata*. *Planta medica*, **60**(04), 386-387.
- LORIMER, S. D., PERRY, N. B., BURGESS, E. J., FOSTER, L. M. (1997). 1-Hydroxyditerpenes from two New Zealand liverworts, *Paraschistochila pinnatifolia* and *Trichocolea mollissima*. *Journal of Natural Products*, **60**(4), 421-424.
- LU, Z. Q., FAN, P. H., JI, M., & LOU, H. X. (2006). Terpenoids and bisbibenzyls from Chinese liverworts *Conocephalum conicum* and *Dumortiera hirsuta*. *Journal of Asian natural products research*, **8**(1-2), 187-192.
- LUDWICZUK, A., GRADSTEIN, S. R., NAGASHIMA, F., ASAKAWA, Y. (2011). Chemosystematics of *Porella* (Marchantiophyta, Porellaceae). *Natural product communications*, **6**(3), 315-321.
- MEERLOO, J., KASPERS, G. J., CLOOS, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.
- MITRE, G., KAMIYA, N., BARDON, A., ASAKAWA, Y. (2004). Africane-type sesquiterpenoids from the Argentine liverwort *Porella swartziana* and their antibacterial activity. *Journal of natural products*, **67**(1), 31-36.
- MORITA, H., TOMIZAWA, Y., TSUCHIYA, T., HIRASAWA, Y., HASHIMOTO, T., ASAKAWA, Y. (2009). Antimitotic activity of two macrocyclic bis (bibenzyls),

- isoplagiochins A and B from the liverwort *Plagiochila fruticosa*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **19**(2), 493-496.
- NABORS M. W. (2004). *Introduction to Botany*. Pearson Benjamin Cumming, 424-434.
- NAGASHIMA, F., & ASAKAWA, Y. (2001). Sesqui-and diterpenoids from two Japanese and three European liverworts. *Phytochemistry*, **56**(4), 347-352.
- NAGASHIMA, F., KASAI, W., KONDOH, M., FUJII, M., WATANABE, Y., BRAGINS, J. E., ASAKAWA, Y. (2003). New ent-kaurene-type diterpenoids possessing cytotoxicity from the New Zealand liverwort *Jungermannia* species. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **51**(10), 1189-1192.
- NAGASHIMA, F., MOMOSAKI, S., WATANABE, Y., TAKAOKA, S., HUNECK, S., ASAKAWA, Y. (1996a). Sesquiterpenoids from the liverworts *Bazzania trilobata* and *Porella canariensis*. *Phytochemistry*, **42**(5), 1361-1366.
- NAGASHIMA, F., MOMOSAKI, S., WATANABE, Y., TOYOTA, M., HUNECK, S., & ASAKAWA, Y. (1996b). Terpenoids and aromatic compounds from six liverworts. *Phytochemistry*, **41**(1), 207-211.
- NILSSON, E. (1973). Apigenin-6, 8-di-C-glycoside from *Porella platyphylla*. *Phytochemistry*, **12**(3), 722-723.
- NUMATA, A., KATSUNO, T., YAMAMOTO, K., NISHIDA, T., TAKEMURA, T., & SETO, K. (1984). Plant constituents biologically active to insects. IV. Antifeedants for the larvae of the yellow butterfly, *Eurema hecabe mandarina*, in *Arachniodes standishii*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **32**(1), 325-331.
- ONO, K., SAKAMOTO, T., TANAKA, H., ASAKAWA, Y. (1996). Sesquiterpenoids from a cell suspension culture of the liverwort *Porella vernicosa* Lindb. *Flavour and fragrance journal*, **11**(1), 53-56.
- OZENOGLU KIREMIT, H. (2005). Beydağları (Antalya) Ciğerotları (Hepaticae) florasının araştırılması. Tez No: 169688, 1-276.
- OZENOGLU KIREMIT, H., SUKATAR, A., GOKLER, I. (2007). Studies on the Hornworts and Liverworts Flora of Antalya. *Turkish Journal of Botany*, **31**, 529-537.
- OZENOGLU KIREMIT, H., KECELI, T. (2009). An Annotated Check List of the Hepaticae and Anthocerotae of Turkey. *Cryptogamie Bryologie*, **30**(3), 343-356.
- PATON, J. (1999). The Liverworts Flora of the British Isles. *Harley Books*, Horkesley, Colchester, Essex CO6 4 AH, England, 626 s.
- PERRY, N. B., BURGESS, E. J., BAEK, S. H., WEAVERS, R. T. (2001). The first atisane diterpenoids from a liverwort: polyols from *Lepidolaena clavigera*. *Organic letters*, **3**(26), 4243-4245.

- PERRY, N. B., BURGESS, E. J., TANGNEY, R. S. (1996a). Cytotoxic 8, 9-secokaurane diterpenes from a New Zealand liverwort, *Lepidolaena taylorii*. *Tetrahedron letters*, **37**(52), 9387-9390.
- PERRY, N. B., FOSTER, L. M. (1995). Sesquiterpene/quinol from a New Zealand liverwort, *Riccardia crassa*. *Journal of natural products*, **58**(7), 1131-1135.
- PERRY, N. B., PERRY, L. M., LORIMER, S. D., MAY, B. C., WEAVERS, R. T., TOYOTA, M., NAKAISHI, E., ASAKAWA, Y. (1996b). Isoprenyl phenyl ethers from liverworts of the genus *Trichocolea*: Cytotoxic activity, structural corrections, and synthesis. *Journal of natural products*, **59**(8), 729-733.
- PIIPPO, S., NORRIS, D. H. (1996, January). Arevision of Californian *Porella* (Hepaticae). In *Annales Botanici Fennici* (pp. 137-152). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- REN, Y., MATTHEW, S., LANTVIT, D. D., NINH, T. N., CHAI, H., FUCHS, J. R., SOEJARTO, D.D., DE BLANCO, E.J.C., SWANSON, S.M., KINGHORN, A. D. (2011). Cytotoxic and NF- κ B inhibitory constituents of the stems of *Cratoxylum cochinchinense* and their semisynthetic analogues. *Journal of natural products*, **74**(5), 1117-1125.
- PORLEY, R. D. (2013). *England's Rare Mosses and Liverworts: Their History, Ecology, and Conservation*. Princeton University Press.
- QUANG, D. N., ASAKAWA, Y. (2010). Chemical constituents of the Vietnamese liverwort *Porella densifolia*. *Fitoterapia*, **81**(6), 659-661.
- RADULOVIC, N. S., FILIPOVIC, S. I., ZLATKOVIC, D. B., DORDEVIC, M. R., STOJANOVIC, N. M., RANDJELOVIC, P. J., MITIC K.V., JEVTOVIC-STOIMENOV T. M., RANDELOVIC, V. N. (2016). Immunomodulatory pinguisane-type sesquiterpenes from the liverwort *Porella cordaeana* (Porellaceae): the “new old” furanopinguisanol and its oxidation product exert mutually different effects on rat splenocytes. *RSC Advances*, **6**(48), 41847-41860.
- SCHER, J. M., BRUGGES, E. J., LORIMER, S. D., PERRY, N. B. (2002). A cytotoxic sesquiterpene and unprecedented sesquiterpene-bisbibenzyl compounds from the liverwort *Schistochila glaucescens*. *Tetrahedron*, **58**(39), 7875-7882.
- SCHER, J. M., SPEAKMAN, J. B., ZAPP, J., BECKER, H. (2004). Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) SF Gray. *Phytochemistry*, **5**(18), 2583-2588.
- SCHWARTNER, C., BORS, W., MICHEL, C., FRANCK, U., MILLER-JAKIC, B., NENNINGER, A., WAGNER, H. (1995). Effect of marchantins and related compounds on 5-lipoxygenase and cyclooxygenase and their antioxidant properties: a structure activity relationship study. *Phytomedicine*, **2**(2), 113-117.

- SHI, Y. Q., LIAO, Y. X., QU, X. J., YUAN, H. Q., LI, S., QU, J. B., LOU, H. X. (2008). Marchantin C, a macrocyclic bisbibenzyl, induces apoptosis of human glioma A172 cells. *Cancer letters*, **262**(2), 173-182.
- SHI, Y. Q., ZHU, C. J., YUAN, H. Q., LI, B. Q., GAO, J., QU, X. J., SUN, B., CHENG, Y. N., LI, S., LI X., Lou, H. X. (2009). Marchantin C, a novel microtubule inhibitor from liverwort with anti-tumor activity both in vivo and in vitro. *Cancer letters*, **276**(2), 160-170.
- SHU, Y. F., WEI, H. C., WU, C. L. (1994). Sesquiterpenoids from liverworts *Lepidozia vitrea* and *L. fauriana*. *Phytochemistry*, **37**(3), 773-776.
- SHY, H. S., WU, C. L., PAUL, C., KONIG, W. A., EAN, U. J. (2002). Chemical constituents of two liverworts *Metacalypogeia alternifolia* and *Chandonanthus hirtellus*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **49**(4), 593-598.
- SODERSTROM, L., HAGBORG, A., VON KONRAT, M., BARTHOLOMEW-BEGAN, S., BELL, D., BRISCOE, L., BROWN, E., CARGILL, D.C., COSTA, D.P., CRANDALL-STOTLER, B.J. AND COOPER, E.D., (2016). World checklist of hornworts and liverworts. *PhytoKeys*, (59), p.1.
- SUZUKI, T., TOMEHIRO, N., SATO, Y., KOBAYASHI, T., ISHII-WATANABE, A., SHINOZAKI, Y., NISHIMAKI-MOGAMI T., HASHIMOTO, T., ASAKAWA, Y., INOUE, K., OHNO, Y., YAMAGUCHI, T., KAWANISHI, T. (2008). The novel compounds that activate farnesoid X receptor: the diversity of their effects on gene expression. *Journal of pharmacological sciences*, **107**(3), 285-294.
- TAIRA, Z., TAKEI, M., ENDO, K., HASHIMOTO, T., SAKIYA, Y., & ASAKAWA, Y. (1994). Marchantin A trimethyl ether: its molecular structure and tubocurarine-like skeletal muscle relaxation activity. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **42**(1), 52-56.
- TAMEHIRO, N., SATO, Y., SUZUKI, T., HASHIMOTO, T., ASAKAWA, Y., YOKOYAMA, S., KAWANNISHI, T., OHNO, Y., INOUE, K., NAGAO, T., NISHIMAKI-MOGAMI, T. (2005). Riccardin C: A natural product that functions as a liver X receptor (LXR) α agonist and an LXR β antagonist. *FEBS letters*, **579**(24), 5299-5304.
- TAN, C. Y., INAGAKI, M., CHAI, H. B., LAMBRECHTS, M. K., ONDER, A., KIREMIT, H. Ö., RAKOTONDRAIBE, L. H. (2017). Phytochemical and cytotoxic investigations of pinguinanoids from liverwort *Porella cordaeana*. *Phytochemistry Letters*, **19**, 77-82.
- TAZAKI, H., ISHIKAWA, F., SOUTOME, H., NABETA, K. (1998). Grandilobalides A, B and C, sesquiterpenes from the liverwort *Porella grandiloba*. *Phytochemistry*, **48**(5), 851-856.
- TAZAKI, H., ITO, M., MIYOSHI, M., KAWABATA, J., FUKUSHI, E., FUJITA, T., NABETA, K. (2002). Subulatin, an antioxidic caffeic acid derivative isolated from the in vitro cultured liverworts, *Jungermannia subulata*, *Lophocolea heterophylla*, and *Scapania parvixeta*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **66**(2), 255-261.

- TORI, M., NAKASHIMA, K., TAKEDA, T., KAN, Y., TAKAOKA, S., & ASAKAWA, Y. (1996). Novel sesquiterpenoids from the Colombian liverwort *Porella swartziana*. *Tetrahedron*, **52**(18), 6339-6354.
- TOSUN, A., NAGASHIMA, F., & ASAKAWA, Y. (2015). Terpenoid and steroid components of selected liverworts. *Chemistry of Natural Compounds*, **51**(2), 387-391.
- TOSUN, A., SUNTAR, I., KELES, H., OZENOGU KIREMIT, H., ASAKAWA, Y., KUPELI AKKOL, E. (2016). Wound Healing Potential of Selected Liverworts Growing in Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13**(3).
- TOYOTA, M., NAGASHIMA, F., ASAKAWA, Y. (1989). Volatile components and pinguisane-type sesquiterpenoids from the liverwort *Porella cordaeana*. *Phytochemistry*, **28**(12), 3383-3387.
- TOYOTA, M., UEDA, A., ASAKAWA, Y. (1991). Sesquiterpenoids from the liverwort *Porella acutifolia* subsp. *tosana*. *Phytochemistry*, **30**(2), 567-573.
- TOYOTA, M., TANIMURA, K., ASAKAWA, Y. (1998). Cytotoxic 2, 3-secoaromadendrane-type sesquiterpenoids from the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Planta medica*, **64**(05), 462-464.
- TOYOTA, M., YONEHARA, Y., HORIBE, I., MINAGAWA, K., & ASAKAWA, Y. (1999). A revision of the positive sign of the optical rotation and its maximum value of α -eudesmol. *Phytochemistry*, **52**(4), 689-694.
- TROITSKY, A. V., IGNATOV, M. S., BOBROVA, V. K., MILYUTINA, I. A. (2007). Contribution of genosystematics to current concepts of phylogeny and classification of bryophytes. *Biochemistry (Moscow)*, **72**(12), 1368-1376.
- VICHAI, V., & KIRTIKARA, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols*, **1**(3), 1112-1116.
- VOIGT, W. (2005). *Sulforhodamine B assay and chemosensitivity* (pp. 39-48). Humana Press.
- WEI, H. C., MA, S. J., WU, C. L. (1995). Sesquiterpenoids and cyclic bisbibenzyls from the liverwort *Reboulia hemisphaerica*. *Phytochemistry*, **39**(1), 91-97.
- WU, X. Z., CHENG, A. X., SUN, L. M., SUN, S. J., LOU, H. X. (2009). Plagiochin E, an antifungal bis (bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1790**(8), 770-777.
- WU, X. Z., CHANG, W. Q., CHENG, A. X., SUN, L. M., LOU, H. X. (2010). Plagiochin E, an antifungal active macrocyclic bis (bibenzyl), induced apoptosis in *Candida albicans* through a metacaspase-dependent apoptotic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1800**(4), 439-447.

YOSHIDA, T., HASHIMOTO, T., TAKAOKA, S., KAN, Y., TORI, M., ASAKAWA, Y., CORDELL, G. A. (1996). Phenolic constituents of the liverwort: four novel cyclic bisbibenzyl dimers from *Blasia pusilla* L. *Tetrahedron*, **52**(46), 14487-14500.



ÖZGEÇMİŞ

1-Bireysel Bilgiler

Adı : Merve
Soyadı : Karadeniz Lambrechts
Doğum yeri ve tarihi : ADANA / 23.08.1985
Uyruğu : T.C
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresi ve Telefonu : Anıttepe mh. Gülseren sk. No:7/12 Çankaya/ ANKARA
GSM 0537 465 8708

2-Eğitimi

Yüksek Lisans	: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi-Ankara	2017
Lisans	: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi-Ankara	2007
Lise	: Meram Anadolu Lisesi	2003
İlköğretim	: Gülsüm Sami Kefeli İlköğretim Okulu	1998

3-Yabancı Dili

İngilizce, Fransızca

4-Ünvanı

Eczacı

5-Yayın

Phytochemical and cytotoxic investigations of pinguisanoids from liverwort *Porella cordaeana*.
(2017) Phytochemistry Letters 19, 77–82.

6-Poster

Cytotoxic potency of *Porella cordaeana* (Porellaceae)

7-Seminer

“Tıbbi mantarlar, 2009.”



**Yaptığımız çalışmalardan bir yayın ve
bir poster hazırlayarak yayınladık**

Phytochemistry Letters 19 (2017) 77–82



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol



Phytochemical and cytotoxic investigations of pinguisanoids from liverwort *Porella cordaeana*



Choon Yong Tan^a, Masanori Inagaki^b, Hee-Byung Chai^a, Merve Karadeniz Lambrechts^c,
Alev Önder^c, Hatice Özenoğlu Kiremit^d, Liva Harinantenaina Rakotondraibe^{a,*}

^a Division of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA

^b Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University, Hiroshima, Japan

^c Department of Pharmacognosy, Ankara University Faculty of Pharmacy, 06100, Tandoğan-Ankara, Turkey

^d Adnan Menderes University, Faculty of Education, Science Education Department, Kepez, Aydın, Turkey

ARTICLE INFO

ABSTRACT