

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**COLCHICUM MICRANTHUM VE COLCHICUM
CHALCEDONICUM ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK
ARAŞTIRMALAR**

GİZEM GÜLSOY TOPLAN

**DANIŞMAN
PROF.DR.AFİFE MAT**

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
FARMAKOGNOZİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi Anabilim Dalı
Doktora Programında Arş.Gör.Gizem Gülsoy Toplan tarafından hazırlanan Colchicum
Micranthum ve Colchicum Chalcedonicum Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar.
başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul
edilmiştir.

07 / 03 / 2016

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr.Afife MAT İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı	
2. Prof.Dr.Emine AKALIN İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmasotik Botanik Anabilim Dalı	
3.Doç.Dr.Çağlayan GÜRER İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı	
4.Doç.Dr.Sevda S.SELÇUK Marmara Üniv Ecz Fak Farmakognozi Anabilim Dalı	
5.Doç.Dr.Ayhan ALTINTAŞ And.Ünv. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı	

BEYAN

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

GİZEM GÜLSOY TOPLAN

İTHAF

Her zaman yanımda olan Canım Aileme ithaf ediyorum..

TEŞEKKÜR

Bu tezin yapılması için gerekli olanakları sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında ilgisini, desteğini ve samimiyetini hissettiğim, çalışmalarımı büyük bir özen ve titizlikle yönlendiren danışmanım, değerli hocam Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Afife MAT'a en içten saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında bana yol gösteren, değerli bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr.Günay SARIYAR'a en içten saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın içinde yer alan YBSK analizlerini ve izolasyon çalışmalarını University College of London Eczacılık Fakültesi Farmakognozi laboratuvarında yürütme olanağı sağlayan bölüm başkanı Sayın Prof.Dr. Simon GIBBONS'a, Londra'daki çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini gördüğüm Dr.Proma KHONDAR'a ve Dr.Takahiro MATSUMOTO'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında güler yüzü ve desteğini her zaman hissettiğim Doç.Dr.Çağlayan GÜRER'e ve Farmakognozi Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine, yardımcılara ve elemanlarına da en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez bitkilerimin seçilmesinde yardımcı olan değerli hocam Prof.Dr.Nurhayat SÜTLÜPINAR ve Prof.Dr.Neriman ÖZHATAY'a, türlerin teşhisinde ve botanik açıdan incelenmesinde yardımcı olan Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Emine AKALIN'a ve Dr.Sırrı YÜZBAŞIOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sitotoksik aktivite çalışmalarımı yürütmeme olanak sağlayan, güler yüzü ile bilgi ve yardımını esirgemeyen Sayın Yrd.Doç.Dr.Ayca YILDIZ PEKÖZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Aktivite çalışmalarım sırasında güleryüzü ve samimiyetini hissettiğim Ecz.Sevdenur KARATAŞ ÖZTÜRK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen, daima yanımda olan aileme en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm tez çalışmam sırasında sevgisini ve desteğini her an hissettiğim, her zaman yanımda olan canım eşim Ecz. Umut Can TOPLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45655





Colchicum micranthum Boiss.

(Foto: Gizem Gülsoy Toplan)



Colchicum chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* Azn.

(Foto: Gizem Gülsoy Toplan)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	İX
TABLolar LİSTESİ.....	Xİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	XV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİİİ
ÖZET	XX
ABSTRACT.....	XXİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Botanik Bölüm	4
2.1.1. Liliaceae Familyası	4
2.1.2. <i>Colchicum</i> L.....	4
2.1.3. <i>Colchicum micranthum</i> Boiss.	5
2.1.4. <i>Colchicum chalcedonicum</i> Azn.	6
2.2. Kimyasal Bölüm	10
2.2.1. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Kimyası	10
2.2.2. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Biyosentezi	12
2.2.3. <i>Colchicum</i> Türlerinden Elde Edilen Alkaloitler	14
2.2.3.1. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Sınıflandırılması	14
2.2.3.2. Nötral ve Nötral-Fenolik Tropolon Alkaloitleri.....	15
2.2.3.3. Bazık ve Bazık-fenolik Tropolon Alkaloitleri	17
2.2.3.4. Tropolon Halkası Taşımayan <i>Colchicum</i> Alkaloitleri	18
2.2.4. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Sentezi.....	24
2.2.5. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Tanınması.....	25
2.2.6. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Yapı-Aktivite İlişkileri.....	26
2.2.7. <i>Colchicum</i> Türlerinde Bulunan Fenolik asit ve Flavon Bileşikleri.....	28
2.2.8. Türkiye’de Yetişen <i>Colchicum</i> Türleri Üzerindeki Çalışmalar	30

2.3. Farmakolojik Bölüm	31
2.3.1. Kolşisin'in Tedavide Kullanımı	32
2.3.1.1. Kolşisin'in Farmakokinetiği	35
2.3.1.2. Kontrendikasyonları ve İlaç etkileşimleri	36
2.3.1.3. Veriliş Yolları ve Dozu	36
2.3.1.4. Uyarılar ve Önlemler	37
2.3.1.5. Yan Etkiler/Advers Etkiler	38
2.3.1.6. Hamilelerde ve Emziren Annelerde Kullanımı	38
2.3.1.7. Toksisitesi	38
2.3.1.8. Saklama Koşulları	39
2.3.2. <i>In vitro</i> Çalışmalar	39
2.3.3. <i>In vivo</i> Çalışmalar	40
2.3.4. Klinik Çalışmalar	40
2.3.5. Kolşisin'in Etki Mekanizması	45
2.4. Kanseri ve Tedavisinde Kullanılan Doğal Kaynaklı Maddeler	47
2.4.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesi	47
2.4.2. Kanseri Hücre Yapısı	48
2.4.3. Kanseri Kolşisin	49
2.4.4. Kanseri	49
2.4.5. Kanseri Tedavisinde Kullanılan Doğal Kaynaklı Maddeler	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. Materyal	52
3.2. Genel Metodlar	52
3.2.1. Fitokimyasal Ön Denemeler	52
3.2.1.1. Alkaloid Aranması	52
3.2.1.2. Flavon Türevlerinin Aranması	53
3.2.1.3. Antrasen Türevlerinin Aranması	53
3.2.1.4. Saponin Aranması	53
3.2.1.5. Tanen Bileşiklerinin Aranması	53
3.2.2. Ekstraksiyon Metodu	54
3.2.3. Alkaloid Tüketilmesi Metodu	54
3.2.4. Kromatografik Metodlar	55
3.2.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	55

3.2.4.2. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	57
3.2.4.3. Sütun Kromatografisi	57
3.2.4.4. KFE (Katı Faz Ekstraksiyonu)	58
3.2.4.5. Preparatif Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi	58
3.2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini	58
3.2.5.1. Ekstrelerin ve Örnek Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.2.5.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.2.5.3. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	60
3.2.6. Spektral Yöntemler	61
3.2.6.1. Nükleer Magnetik Rezonans Spektrumu (NMR).....	61
3.2.6.2. Kütle (Mass) Spektrumu	61
3.2.7. Sitotoksik Aktivite Testlerinde Kullanılan Yöntemler	61
3.2.7.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Tayini.....	63
3.2.7.2. LDH Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Tayini.....	65
4. BULGULAR.....	67
4.1. <i>Colchicum micranthum</i> Üzerinde Fitokimyasal Ön Deneme Bulguları	67
4.2. <i>Colchicum chalconicum</i> subsp. <i>chalconicum</i> Üzerinde Fitokimyasal Ön Deneme Bulguları	67
4.3. Alkaloidlerin Ayrılması ve Saflaştırılması:	68
4.3.1. <i>C. micranthum</i> Alkaloidlerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloidlerin Yapılarının Aydınlatılması:	68
4.3.1.1. <i>C. micranthum</i> Sonbahar Yumru A Ekstresi (Mic.Ys.-A).....	69
4.3.1.2. <i>C. micranthum</i> Çiçek A Ekstresi (Mic.Ç.-A).....	72
4.3.2. <i>C.chalconicum</i> subsp. <i>chalconicum</i> Alkaloidlerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloidlerin Yapılarının Aydınlatılması:	74
4.3.2.1. <i>C. chalconicum</i> subsp. <i>chalconicum</i> Tohum A Ekstresi (Chal.T.-A) ..	74
4.3.2.2. <i>C.chalconicum</i> subsp. <i>chalconicum</i> Yumru Sonbahar Ekstresi (Chal.Ys.-A).....	76
4.3.2.3. <i>C. chalconicum</i> subsp. <i>chalconicum</i> Çiçek A Ekstresi (Chal.Ç.-A)	77
4.3.3. İzole Edilen Alkaloidlerin Yapılarının Aydınlatılması.....	80
4.3.3.1. Kolşisin	80
4.3.3.2. 2-Demetilkolşisin	84
4.3.3.3. <i>N</i> -deasetil- <i>N</i> -formilkolşisin.....	88

4.3.3.4. 4-Hidroksikolşisin	92
4.3.3.5. Demekolsin	95
4.3.3.6. Kolşifolin.....	99
4.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Miktar Tayini Sonuçları.....	103
4.4.1. Kolşisin Ölçü Eğrisi	103
4.4.2. Ekstrelerin Verim Hesabı Sonuçları	103
4.4.3. <i>C.micranthum</i> Ekstrelerinde Miktar Tayini Sonuçları.....	104
4.4.4. <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> Ekstrelerinde Miktar Tayini Sonuçları	106
4.5. Sitotoksik Aktivite Sonuçları	109
4.5.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Sonuçları.....	109
4.5.1.1. <i>C.micranthum</i> Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları	109
4.5.1.2. <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları.....	111
4.5.1.3. Kolşisin'in Aktivite Sonuçları.....	112
4.5.2. LDH Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Sonuçları.....	116
4.5.2.1. <i>C.micranthum</i> Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları	116
4.5.2.2. <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları.....	118
4.5.2.3. Kolşisin'in Aktivite Sonuçları.....	120
5. TARTIŞMA	123
KAYNAKLAR	129
ÖZGEÇMİŞ	139

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Türkiye’de yetişen Sonbaharda çiçek açan <i>Colchicum</i> türleri.....	8
Tablo 2-2: Türkiye’de yetişen İlkbaharda çiçek açan <i>Colchicum</i> türleri.....	9
Tablo 2-3: Nötral ve nötral-fenolik tropolon alkaloitleri.....	15
Tablo 2-4: Bazik ve bazik-fenolik tropolon alkaloitleri	17
Tablo 2-5: Homoproaporfin alkaloitleri 1	19
Tablo 2-6: Homoproaporfin alkaloitleri 2	20
Tablo 2-7: Homoaporfin alkaloitleri.....	21
Tablo 2-8: Homomorfinan alkaloitleri.....	22
Tablo 2-9: Türkiye’de yetişen <i>Colchicum</i> türlerinden elde edilen maddeler	30
Tablo 2-10: Kanser tedavisinde kullanılan doğal maddeler	51
Tablo 3-1: Metanol ekstrlerine ait kodlar	54
Tablo 3-2: Kullanılan Çözücü Sistemleri ve Oranları	56
Tablo 3-3: <i>Colchicum</i> türleri için YBSK’da kullanılan gradient yöntem.....	59
Tablo 4-1: <i>C. micranthum</i> bitkisine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları.....	67
Tablo 4-2: <i>C. chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> bitkisine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları	67
Tablo 4-3: <i>C. micranthum</i> bitkisine ait ekstre miktarları.....	68
Tablo 4-4: KFE’de kullanılan çözücü sistemleri ve oranları.....	70
Tablo 4-5: KFE’de kullanılan çözücü sistemleri ve oranları.....	72
Tablo 4-6: <i>C. chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> bitkisine ait ekstre miktarları	74
Tablo 4-7: KFE’de kullanılan çözücü sistemleri ve oranları.....	76
Tablo 4-8: Sütun kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri ve oranları.....	78
Tablo 4-9: Bitkilerin yüzde verim hesabı	104
Tablo 4-10: <i>C. micranthum</i> ekstrlerine ait kolşisin miktarı (%).....	106
Tablo 4-11: <i>C. chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> ekstrlerine ait kolşisin miktarı (%)	108
Tablo 4-12: MTT yöntemi ile yapılan sitotoksisite çalışmasındaki IK_{50} değerleri	113
Tablo 4-13: A 549 hücre serisi üzerinde MTT yöntemi ile yapılan <i>C. micranthum</i> ekstrlerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart	

sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri.....	114
Tablo 4-14: A 549 hücre serisi üzerinde MTT yöntemi ile yapılan <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri.....	115
Tablo 4-15: LDH yöntemi ile yapılan sitotoksisite çalışmasındaki IK_{50} değerleri.....	120
Tablo 4-16: A 549 hücre serisi üzerinde LDH yöntemi ile yapılan <i>C.micranthum</i> ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri.....	121
Tablo 4-17: A 549 hücre serisi üzerinde LDH yöntemi ile yapılan <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri.....	122
Tablo 5-1: <i>C.micranthum</i> ve <i>Colchicum chalcedonicum</i> subsp. <i>Chalcedonicum</i> türlerinden elde edilen alkaloitler	124
Tablo 5-2: Ülkemizde <i>Colchicum</i> türleri üzerinde yapılan çalışmalar	125

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kolşisin	11
Şekil 2-2: Tropolon halkası (sikloheptatrienolon)	11
Şekil 2-3: <i>Colchicum</i> alkaloidlerin biyosentezi	12
Şekil 2-4: <i>Colchicum</i> alkaloidlerin biyosentez şeması 1	13
Şekil 2-5: <i>Colchicum</i> alkaloidlerin biyosentez şeması 2	14
Şekil 2-6: Tropolon alkaloidlerinin ana halka yapısı	15
Şekil 2-7: Fenetilizokinolin alkaloidleri ana halka yapısı	18
Şekil 2-8: Homoproaporfin alkaloidleri ana halka yapısı	19
Şekil 2-9: Homoproaporfin alkaloidleri ana halka yapısı	19
Şekil 2-10: Homoaporfin alkaloidleri ana halka yapısı	20
Şekil 2-11: Homomorfinan alkaloidleri ana halka yapısı	21
Şekil 2-12: Allokolşisin	22
Şekil 2-13: Lumikolşisin türevleri	23
Şekil 2-14: Tiyokolşikozit	24
Şekil 2-15: İzokolşisin (inaktif)	25
Şekil 2-16: Oberlin-Zeisel Reaksiyonu	25
Şekil 2-17: <i>Colchicum</i> Türlerinde Bulunan Fenolik asit ve Flavon Bileşikleri	29
Şekil 2-18: Hücre döngüsü	45
Şekil 2-19: Mikrotübüllerin görünümü	46
Şekil 3-1: Mikroskopta Thoma lamı görüntüsü	63
Şekil 3-2: 96 kuyucuklu mikropalakadaki MTT deney düzeneği	64
Şekil 3-3: Laktat Dehidrojenaz (LDH) Enziminin Aktivite Şeması	65
Şekil 3-4: 96 kuyucuklu mikropalakadaki LDH deney düzeneği	66
Şekil 4-1: <i>C.micranthum</i> A ekstrelerinin UV'deki İTK görüntüsü	69
Şekil 4-2: : Fr.12-13'e ait YBSK Kromatogramı	71
Şekil 4-3: Fr.12-13'e ait Preparatif YBSK Kromatogramı	71
Şekil 4-4: Fr ₁₂₋₁₄ 2 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	73
Şekil 4-5: Fr ₁₅₋₁₆ 4 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	73

Şekil 4-6: <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> A ekstrelerinin UV'deki İTK görüntüsü	74
Şekil 4-7: Chal.T.-A'nın 1 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	75
Şekil 4-8: T-A-2 nolu bantın 2 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	75
Şekil 4-9: Chal.Ys.-A'nın 4 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	77
Şekil 4-10: Fr. ₄₄₋₄₅ 2 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	78
Şekil 4-11: Fr. ₄₇₋₅₀ 4 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı	79
Şekil 4-12: Kolşisin	80
Şekil 4-13:Kolşisin'in ¹ H NMR spektrumu (Fr ₁₁₋₁₃ -m-3 kodlu madde)	82
Şekil 4-14:Kolşisin'in kütle spektrumu (Fr ₁₁₋₁₃ -m-3 kodlu madde)	83
Şekil 4-15: 2-Demetilkolşisin	84
Şekil 4-16:2-demetilkolşisin'in ¹ H NMR spektrumu (Fr. ₁₂₋₁₃ -m-1 kodlu madde)	86
Şekil 4-17:2-demetilkolşisin'in kütle spektrumu (Fr. ₁₂₋₁₃ -m-1 kodlu madde).....	87
Şekil 4-18: <i>N</i> -deasetil- <i>N</i> -formilkolşisin.....	88
Şekil 4-19 : <i>N</i> -Deasetil- <i>N</i> -FormilKolşisin'in ¹ H NMR spektrumu (T-A-2-3 kodlu madde)	90
Şekil 4-20: <i>N</i> -Deasetil- <i>N</i> -FormilKolşisin'in kütle spektrumu (T-A-2-3 kodlu madde). 91	
Şekil 4-21: 4-Hidroksikolşisin.....	92
Şekil 4-22:4-hidroksikolşisin'nin ¹ H NMR spektrumu (Fr. ₄₇₋₅₀ -m-1 kodlu madde)	94
Şekil 4-23: Demekolsin	95
Şekil 4-24: Demekolsin'in ¹ H NMR spektrumu (T-A-1 kodlu madde)	97
Şekil 4-25:Demekolsin'in kütle spektrumu (T-A-1 kodlu madde).....	98
Şekil 4-26: Kolşifolin.....	99
Şekil 4-27:Kolşifolin'in ¹ H NMR spektrumu.....	101
Şekil 4-28:Kolşifolin'in kütle spektrumu	102
Şekil 4-29: Kolşisin'e ait ölçü eğrisi.....	103
Şekil 4-30: <i>C.micranthum</i> ilkbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı	104

Şekil 4-31: <i>C.micranthum</i> sonbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı	105
Şekil 4-32: <i>C.micranthum</i> çiçek metanol ekstresinin YBSK kromatogramı.....	105
Şekil 4-33: <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> ilkbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı	106
Şekil 4-34: <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> sonbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı	107
Şekil 4-35: <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> çiçek metanol ekstresinin YBSK kromatogramı.....	107
Şekil 4-36: <i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i> tohum metanol ekstresinin YBSK kromatogramı	108
Şekil 4-37: Mic.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	109
Şekil 4-38: Mic.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği.....	110
Şekil 4-39: Mic.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	110
Şekil 4-40: Chal.T. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	111
Şekil 4-41: Chal.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	111
Şekil 4-42: Chal.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği.....	112
Şekil 4-43: Chal.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	112
Şekil 4-44: Kolşisin'in doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	113
Şekil 4-45: Mic.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	116
Şekil 4-46: Mic.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği.....	117
Şekil 4-47: Mic.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	117
Şekil 4-48: Chal.T. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	118
Şekil 4-49: Chal.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	118
Şekil 4-50 : Chal.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği.....	119
Şekil 4-51: Chal.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	119
Şekil 4-52: Kolşisin'in doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği	120
Şekil 5-1: Türlerin Kolşisin Miktarı (% h)	124
Şekil 5-2: Türlerin MTT sonuçlarının karşılaştırılması	126
Şekil 5-3: Türlerin LDH sonuçlarının karşılaştırılması	127

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A 549: İnsan Akciğer Karsinoma Hücresi

A: Nötral asidik ekstre

AChE: Asetilkolinesteraz

AST: Aspartat aminotransferaz

ATP: Adenozin trifosfat

BChE: Butirilkolinesteraz

BID: Günde iki defa

Ç: Çiçek

Chal. : *Colchicum chalconicum* Azn.

CYP3A4: Sitokrom P450 3A4

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ESI: Electrospray Ionization

FBS: Fetal Bovine Serum

FMF: Ailevi Akdeniz Ateşi

HL60: Promiyeloid Lösemi Hücre Serisi

HPLC: High-performance Liquid Chromatography

İK₅₀: %50 İnhibisyon Sağlayan Konsantrasyon

İSTE: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu

İTK: İnce Tabaka Kromatografi

K562: Kronik miyeloit lösemi hücre serisi

KFE: Katı Faz Ekstraksiyon

LDH: Laktat dehidrojenaz

MCF-7: İnsan göğüs adenokarsinoma hücre serisi

Mic. : *Colchicum micranthum* Boiss.

mRNA: Mesajcı RNA

MS: Kütle (mass) spektroskopisi

MTT: 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromit

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NMR: Nükleer Manyetik Rezonans

PBS: Phosphate-buffered saline

SRB: Sulforhodamine B colorimetric assay

T : Tohum

UV: Ultraviyole

WST-1: 4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitro-fenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat

XTT: 2,3-bis[2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil]-2H-tetrazolium-5-karboksanilit

YBSK: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Yi: Yumru (İlkbahar)

Ys: Yumru (Sonbahar)

ÖZET

Gülsoy Toplan, G. (2016). *Colchicum micranthum* ve *Colchicum chalconicum* Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognosi ABD. Doktora Tezi, İstanbul.

Çok eski yıllardan beri tedavide kullanılan *Colchicum* türleri, günümüzde de tedavideki önemini korumaktadır. *Colchicum* türleri taşıdığı tropolon sınıfı alkaloidler sebebiyle tedavide gut, Ailevi Akdeniz Ateşi, amiloidoz, siroz, Behçet hastalığı, psoriasis, Hodgkin lenfoma, Myelöit Lösemi ve cilt kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. *Colchicum* alkaloidlerinin sentezinde henüz ekonomik ve verimli bir yöntem olmaması sebebiyle, Kolşisin ve diğer alkaloidleri yüksek oranda taşıyan *Colchicum autumnale* türünden izolasyon ile elde edilmektedir. Türkiye *Colchicum* türleri açısından en zengin ülkelerden birisi olmasına rağmen Dünya’da *Colchicum* alkaloidleri için kaynak olarak gösterilen *Colchicum autumnale* ülkemizde yetişmemektedir. Bu türün ilaç endüstrisi için yeterli miktarı karşılayamaması araştırmacıları tropolon alkaloidleri bakımından zengin yeni *Colchicum* kaynakları bulmaya yöneltmiştir. Anabilim dalımızda 1970 yılından beri *Colchicum* türleri üzerinde çalışmakta ve ülkemizde yetişen *Colchicum* türlerinin içerikleri aydınlatılmaya devam edilmektedir. Yapılan çalışmalar ülkemizde yetişen *Colchicum* türlerinin kimyasal içeriklerinin de *C.autumnale* ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğunu göstermiştir.

Tez çalışmamızda İstanbul’da yetişen biri endemik iki türün toprakaltı ve topraküstü kısımları ayrı ayrı çalışılarak kimyasal içerikleri ve biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Endemik bir tür olan *C.micranthum*’dan Kolşisin, Kolşifolin, 2-Demetilkolşisin, N-deasetil-N-formilkolşisin; *C.chalconicum*’dan ise Kolşisin, Demekolsin, Kolşifolin, 4-Hidroksikolşisin, N-deasetil-N-formilkolşisin, 2-Demetilkolşisin alkaloidleri izole edilerek H^1 NMR ve ESI/MS yöntemleri ile yapıları aydınlatılmıştır. Metanol ekstraktlarında yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) tekniği ile kolşisin miktarları hesaplanmıştır. En yüksek Kolşisin miktarı *C.chalconicum*’un tohumlarında tespit edilmiştir. *C.chalconicum* ve *C. micranthum*’den elde edilen metanol ekstraktları sitotoksik aktiviteleri yönünden A549 hücre serileri üzerinde MTT ve LDH yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Tüm ekstraktlar yüksek sitotoksikite gösterirken, en yüksek toksisite tohum ekstresinde saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Colchicum micranthum*, *Colchicum chalconicum*, Tropolon alkaloidleri, sitotoksik aktivite, Kolşisin.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45655

ABSTRACT

Gülsoy Toplan, G. (2016). Pharmacognostical Investigations on *Colchicum micranthum* and *Colchicum chalcedonicum*. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacognosy, PhD Thesis. İstanbul.

Colchicum species, which are widely used as medication for years, still remain important in treatment. Tropolone alkaloids content of the species help in the treatment of FMF, gout, amyloidosis, cirrhosis, Behcet's Disease, psoriasis, Hodgkin Lymphoma, myeloid leukemia and skin cancers. An economic and efficient synthesis method of *Colchicum* alkaloids haven't found yet, that's why colchicine and other alkaloids are obtained from *Colchicum autumnale* by extraction. Although there are many *Colchicum* species in Turkey, *Colchicum autumnale*, seen as the main source of tropolone alkaloids by the world, does not grow in the Turkey. The wide variety of *Colchicum* species in Turkey orient the researchers to investigate new sources of *Colchicum* rich in tropolone alkaloids. In our department, *Colchicum* species have been studied for more than 45 years and the contents of the *Colchicum* species growing in our country are still being studied today. The studies conducted show that the chemical composition of *Colchicum* species in Turkey are comparable to that of *Colchicum autumnale*.

In present work, two species (one endemic to Turkey) which grow in Istanbul, were evaluated for their alkaloids and biological activities in analyzing their aerial parts and underground parts separately. Colchicine, Colchifoline, 2-demetilcolchicine were isolated from *C. micranthum* while colchicine, demecolcine, colchifoline, 4-hydroxycolchicine, N-deacetyl-N-formylcolchicine were isolated from *C. chalcedonicum* and their structures were elucidated by ¹HNMR and ESI/MS methods. Colchicine amounts in methanol extracts were determined using high pressure liquid chromatography (HPLC). The seeds of *C. chalcedonicum* possessed highest amount of colchicine among all extracts. Methanol extracts obtained from *C. chalcedonicum* and *C. micranthum* were investigated for their cytotoxic activity on A 549 cell series using MTT and LDH methods. All extracts showed high cytotoxicity, while the highest toxicity was determined in seed extract.

Key words: *Colchicum micranthum*, *Colchicum chalcedonicum*, Tropolone alkaloids, cytotoxic activity, Colchicine.

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no 45655.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkilerin tedavide kullanılışı insanlık tarihi kadar eskidir. Bazı bitkilerin antik çağlardan beri kullanımları bilinmekte ve günümüzde hala aynı amaçlarla kullanılmaktadır.

Colchicaceae familyasında yer alan *Colchicum* cinsi, çok uzun yıllardan beri tedavide kullanılmaktadır¹. Eski Mısır'ın Ebers Papirus'unda listelenen 700 bitki içerisinde yer alan *Colchicum* türlerinin, tedavide kullanılan kısımlarının tohumları ve yumrusudur².

Colchicum isminin kökeni Colchis (Doğu Karadeniz, Batum Yöresi, Güney Kafkasya) kelimesinden gelir. Asırlardan beri Hermodactyl, Sürinjan, Kolkikon ve *Colchicum* adlarıyla anılan bu bitkinin M.Ö. 800'lerde Hindistan ile Arabistan arasında ticaret amacıyla taşındığı bilinmektedir³.

Ülkemiz *Colchicum* türleri açısından en zengin ülkelerden birisidir, yaklaşık olarak 50 *Colchicum* türü doğal olarak yetişmektedir, bunlardan yaklaşık 20 kadarı endemiktir.⁴

Colchicum cinsini, botanik açıdan ilk kez 1.yy'da Anazarba'lı Yunan hekim Padanius Dioscorides 'kolchicon' ismiyle tanımlamış, daha sonra İsveç'li botanikçi Carl von Linne, Dioscorides'in verdiği isme sadık kalarak bitkiyi Latince '*Colchicum*' olarak isimlendirilmiştir. *Colchicum* ekstrelerinin gut tedavisinde kullanıldığını belirten ilk kaynak yine Dioscorides tarafından yazılan 'Materia Medica' dır⁵. 6. yy'da Alexander of Trallis tarafından *Colchicum* ekstreleri ile gut tedavisinin yapıldığı kayıtlıdır. *Colchicum* yumruları oldukça toksik olmasına karşın ağrılar üzerindeki hızlı etkisinden ötürü ilk defa 1618'de London Pharmacopoeia'da listelenmiştir. 1639 yılına kadar London Pharmacopoeia listelerinde kalan *Colchicum*, daha sonra listeden çıkarılmıştır. *Colchicum* türleri esas olarak 1763'te Viyana'da Anton Stoerck tarafından hazırlanan ekstre ve pilüllerin gut hastalığına karşı kullanılması ile modern tedavi alanına girmiştir. Tıbbi tedavide öneminin artmasıyla *Colchicum* yeniden London Pharmacopoeia listelerinde yerini almıştır^{6,7}.

Colchicum türlerinin kimyasal yapısı üzerindeki çalışmalar, 1820 yılında Fransız eczacılar Pelletier ve Caventou'nun *Colchicum autumnale* tohumlarından

alkaloit yapısındaki ‘‘Kolşisin’’i izole etmesiyle başlamış ve ardından Kolşisin’in ana halka yapısı üzerindeki çalışmaları sürdürmüşlerdir. Zeisel (1883-1913) yaptığı çalışmalarda Kolşisin’in metoksil gruplarını tespit etmeyi başarmıştır. Dewar 1945 yılında Kolşisin üzerinde yaptığı çalışmalarda, C halkasının aromatik karakterde sikloheptatrienolon yapısında olduğunu göstermiştir. 1952 yılında King ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada X-Ray kristalografisi ile kolşisinin kimyasal yapısı tamamen aydınlatılmıştır. Eigsti ve Dustin tarafından yapılmış ve Kolşisin’in bitki ve hayvanlarda hücre bölünmesi üzerinde olan güçlü etkisi keşfedilmiştir^{8,7,9}.

Kolşisin hücre bölünmesini metafaz safhasında durdurarak güçlü bir antikanser etki oluşturmaktadır. Ancak Kolşisin’in tedavideki en büyük sorunu sahip olduğu bu etki amacıyla kullanılmak istendiğinde letal doz ve tedavi dozunun birbirine çok yakın olmasıdır¹⁰.

Colchicum türlerinden izole edilen bir diğer önemli alkaloit olan Demekolsin, Kolşisin gibi antikanser etki gösterir ve toksisitesi Kolşisin’e oranla çok daha azdır. Bu nedenle Hodgkin hastalığı, Myelöit Lösemi ve cilt kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır¹¹. Kolşisin’in yüksek toksisiteye sahip olmasının sonucu olarak hem izolasyon çalışmaları hem de sentez kimya çalışmaları hep kolşisine benzer etki gösteren ancak toksisitesi çok daha az olabilecek kolşisin türevlerinin bulunmasını amaçlamaktadır¹².

Antikanser aktivitesinin yanı sıra iyi bir antienflamatuar ajan olan Kolşisin, gut (damla) hastalığında, Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF)’de, amiloidozda, sirozda, Behçet hastalığında, psoriaziste sıklıkla kullanılmaktadır^(9,13,14,15,16,17,18). Ayrıca Kolşisin’in hücre bölünmesine etki ederek kromozom sayısını arttırması sayesinde, meyve ve çiçek yetiştiriciliğinde, daha büyük ürünler elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır¹.

Günümüze kadar Kolşisin sentezi ile ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen henüz ekonomik ve verimli bir yöntem bulunamadığından Kolşisin eldesi halen bitkiden izolasyon ile yapılmaktadır⁽⁸⁾. İçerdiği Kolşisin miktarının yüksek olması sebebiyle, Kolşisin eldesinde kullanılan en önemli tür olan *Colchicum autumnale*, Türkiye’de doğal olarak yetişmemektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye’de Kuzeydoğu bölgesinde yetişen *Colchicum* türlerinden *C.speciosum*’un da Kolşisin alkaloitleri bakımından oldukça zengin olduğu saptanmış ve böylece bu türden elde edilen tohumlar Kolşisin eldesi amacıyla dış ülkelere satılmaya başlanmıştır¹⁹.

Kolşisin ile yapılan bir çok yarı sentez çalışmasında elde edilen maddeler bugün tedavide kullanılmaktadır. Son yıllarda 3-demetiltiyokolşisinden hareketle hazırlanan tiyokolşikozit tedavide miyorelaksan (kas gevşetici) etkisi ile kullanılmaktadır^{12,20,21}.

Türkiye’de kolşisin ve kolşisinden hareketle sentezlenmiş olan ve sıklıkla kullanılan *Colchicum-Dispert*, *Kolsin*, *MuscoRil*, *Muscoflex*, *Thiospa*, *Adeleks* gibi preparatlar mevcuttur.

Anabilim dalımızda *Colchicum* türleri üzerinde 1970 yılında Prof. Dr. Turhan Baytop ve Günay (Özcöbek) Sarıyar tarafından başlatılmış ve Prof. Dr. Nurhayat Sütülpınar tarafından günümüze dek sürdürülmüştür. Yapılan tüm bu araştırmalarda Türkiye’de yetişen birçok *Colchicum* türü üzerinde miktar tayini ve izolasyon çalışmaları yapılmıştır^{22,23,24,25}.

Yukarıdaki araştırmaların devamını amaçlayan bu tez çalışmamızda İstanbul ve çevresinden toplanan biri endemik iki taksonun *Colchicum chalcedonicum* ve *Colchicum micranthum* türlerinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının bileşenlerinin izole edilerek, izole edilen maddelerin yapıları spektral analizlerle aydınlatılmış ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi (YBSK) tekniği ile kolşisin miktarları hesaplanmıştır. *Colchicum chalcedonicum* ve *Colchicum micranthum* türleri üzerindeki farmakognozik araştırmaların yanı sıra bitkinin farklı kısımlarından elde edilen ekstrelerin A549 hücre serileri üzerinde MTT ve LDH yöntemleri kullanılarak sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bölüm

2.1.1. Liliaceae Familyası

Çok yıllık, nadiren tek yıllık; genellikle rizomlu, kormuslu, soğanlı ya da tuberli; nadiren de dikenli tırmanıcı bitkilerdir. Yapraklar tabanda ya da gövdede (nadiren sapsız karşılıklı iki sıra üzerinde ve tabanlarıyla birbirlerini örter vaziyette sık dizilişli), bazen de ovat ya da linear yaprağa benzer şekillerdeki gövdelerde (kladotlar) pullara indirgenmiş durumdadır. Çiçek durumu birleşik salkım (panikula), salkım (rasem), şemsiye (umbella) ya da yalancı şemsiye (korimbus) şeklinde veya çiçekler tektir. Periant iki sıralı (nadiren iç sıranın ortadan kalkması ile tek sıralı); segmentler (4 -) 6 (- 8) adet, serbest ya da birleşik, genellikle petalimsidir. Stamenler (4 -) 6 (- 10). Nektaryumlar sepallerde, tabanda ya da periant üzerinde. Ovaryum 3- gözlü, daima üst durumlu (nadiren perigin disk ile birlikte). Stiluslar 1-3, nadiren 5, basit ya da lopludur. Meyva bir kapsula ya da bakka; tohumlar ise yuvarlak, üç yüzlü ya da tabla şeklindedir.²⁶

2.1.2. *Colchicum* L.

Liliaceae familyasında yer alan *Colchicum* cinsi çok yıllık bitkilerdendir. Toprakaltı gövdesi tunikalı bir kormus, bazen uzamış yatay rizoma benzer stolonlu çıkıntılı olan sürünücü gövdeler şeklinde (soboller); tunikalar zarımsı, kağıtsı veya derimsi, genellikle tüpsü, kalıcı bir 'boyun' içinde son bulur.

Gelişen yapraklar ve çiçek durumu zarımsı bir kın içindedir (katafil). Yapraklar tabanda, kısmen çiçek açma evresinde (sinantus) veya çiçeklenmeden sonra (histerantus), bazen çiçekler solduğunda (subsinantus) gelişir. Çiçeklerin her biri küçük bir brakteli ve çok kısa saplı tek veya demet halinde, sap kapsüllerin olgunlaştığı sırada uzamaktadır. Periant çan veya huni şeklinde, tekerleksi ya da yıldızsı, morumsu kırmızı, pembe veya beyaz, bazen damalıdır. Periant segmentleri 6 adet, iki sıralı tabanda tüp şeklinde birleşmiş. Stamenler periant parçalarının tabanı ile birleşmiş, 1 veya 2 sıralı; filamentler ince, bazen tabanda kalınlaşmış; anterler filamentlerin tepesine sırtından bağlı, oynak (Türkiye'deki türlerde), iç yüzünden açılır. Stiluslar 3 adet,

serbest, stigmalar nokta şeklinde veya stilus boyunca tek taraflı olarak aşağıya doğru uzanır, ovaryum toprakaltındadır. Meyve septisit kapsül şeklinde ve 3 gözlüdür; tohumlar ise çok sayıda, yuvarlağa yakın veya yuvarlaktır. ²⁶

2.1.3. *Colchicum micranthum* Boiss.

Kormus 2.5-3 x(1.3-)1.5-2.7 cm, hemen hemen küremsi- ovat, dıştaki tunika kırmızımsı kahverengi, içteki kısım soluk kestane kahverengi, zarımsı, boyun 1-4 cm kadar çoğunlukla az gelişmiştir. Yapraklar (2-)3, ve bitki çiçeklendikten sonra gelişir (histerantus), şeritsi -dar mızraksı, (10-)14-20 cm x (3-)5-8(-10) mm, tepesi obtus veya bazen subakut, tüysüzdür. Çiçekler 1-2(-5), dar çan şeklinde yada huni şeklindedir. Periant segmentleri beyaz -soluk morumsu pembe renkte, dar ters mızraksı veya dar linear- eliptik (1.8-)2.5-3(-4) cm x(3-)5-3(-1 1) mm boyutlarında yuvarlak veya obtus uçlu (nadiren akut) tüysüzdür. Filamentler 6-10 mm tüysüz, anterler sarı (3-)4-5 x 0.75-1.5 mm boyutlarındadır. Polenler sarı renktedir. Stilus düz, kısa, kıvrık, hafiften tepede şişkin, stigmalar 1 mm dekuranttir. Kapsül dar elipsoit-ovat, 1.8-2.5 cmx6-8 mm, kahverengi, tüysüz, apikulattır.

Colchicum micranthum Boiss. büyük çoğunlukla *Erica* ve *Arbutus* makilerinde, dağ yamaçlarında, meşe çalılıkları ve ormanlık alanlarda 480 – 500 m arasında doğal olarak yetişmektedir.

Türkiye’de yayılışı:

A2(E) İstanbul: Büyükdere, Kılıçpınar’dan Kestane suyu boyunca , A. Baytop (ISTE 10351, fl.)! Kilidjbounar, 22 w 1906, Azn. (leaf & fr.)! A2(A) İstanbul: Kurtköy, Pendik, A. Baytop(ISTE 12229,fi.)! Yakacık, 12ix 1897,Azn. (fl.)

Çiçeklenme zamanı:

Ağustos-Ekim

Sinonim:

Colchicum parvulum Janka.

Colchicum micranthum Boiss. endemik bir türdür. İstanbul’daki plansız yapılaşma nedeniyle tehdit altındadır. Yumrularının ve çiçeklerinin ufak olması sebebiyle narin çiğdem olarak adlandırılır.

2.1.4. *Colchicum chalcedonicum* Azn.

Kormus 2-4.5 x 1.5-2.5 cm. elipsoit-ovat veya ovattan globose-ovat; dıştaki tunika koyu kırmızı-kahverenginden koyu kahverengiye dönen renklerde, derimsi, boyun (1-) 1.5—6(—7.5) cm kadardır. Yapraklar 3-6, bitki çiçeklendikten sonra gelişir (histerantus), dik-toprak üzerinde yatık, şeritsi-dar dikdörtgensi veya eliptik-dikdörtgensi, (2.5-)4—22(-30) x (0.4-)1-3(-4.5) cm, subakuttan yuvarlağa (bazen kukullat). Çiçekler 1-2(-3)., huni şeklinde veya hemen hemen çan şeklinde. Periant segmentleri belirgin damalı, dar dikdörtgensi-terz mızraksı yada nadiren mızraksı, (2.5-)3-5.5(-6.5) cm x (4—)5-13(-15) mm. boyutlarında, çoğunlukla taban kısmında belirgin omurgalı, sivri-yuvarlak uçludur. Filament kanalları seyrek papillalı. Stamenler (1.2-)1.4-2.9 cm filamentler beyazımsı, hafifçe genişlemiş tabanı soluk-orta sarı ile kahve-sarı veya morumsu çerçevesi; anterler ± koyu renkli veya sarı. (3-)4-9 mm; polen sarıdan kahvemsî-sarı. Stilus apexte hafifçe kalın, neredeyse düz ± kanca gibi veya hafif kavisli: stigmalar dekurant 1.5-4.5(-5.5) mm. Kapsül elipsoid ve oblong-ovoid, 1.2-2.5 x 0.5-1.5 cm. genellikle morumsu-parlak kırmızıdır.

Colchicum chalcedonicum Azn. biri endemik olmak üzere iki alttürü bulunmaktadır.

1. Yapraklar 3-4(-6), genellikle 4, ± toprak üzerinde yatık, 2.5-10 x 0.4-2.5 cm, ((şeritsi) - dar dikdörtgensi den eliptik-dikdörtgensi, kenarlar ± dalgalı, tüysüz veya bazen hafifçe pürüzlü: periant segmentleri 2.5-5 cm x 4-14.5 mm. belirgin damalı: stamenler 1.2-2.6 cm: anterler 3-8 mm. ± koyu renkli (grimsi ile kahvemsî-sarı, mor, koyu grimsi-mor, morumsu-kahverengi), bazen ise sarı**subsp. chalcedonicum.**

2- Yapraklar (3-)4—6, genellikle 5. hemen hemen dik, 12-30 x 2—4.5 cm. şeritsi-dar dikdörtgensi, kenarlar kabaca dalgalı, tüysüz veya bazen kısa silli: perianth segmentleri 4-6.5 cm x 7-15 mm, küçük-noktalı veya damalı; stamenler 2-2.9 cm; antherler 5-9 mm. genellikle sarı..... **subsp. punctatum (endemik).**

Türkiye’de yayılışı:

A2(E) İstanbul: Galata dere, 16 ix 1918. Azn.1 A2(A) İstanbul [Çamlıca tepe]. 2 iv 1896. fr. 14 v 1896. Azn.1.: Aydos Dağ, Yakacık aşağı yamaçları, 200-300 m, Brickell & Mathew 8553!; Aydos Dağı ve Samandıra arası. 200 m, K. Persson 424!; İstanbul Kanal çevrelerinde 10 v 1896. Nemetz!

Dünya'daki yayılışı:

Yunanistan

Çiçeklenme zamanı:

Ağustos-Ekim

Sinonim:

C.turcicum Janka var. *chalcedonicum* (Azn.)

Colchicum chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* Azn. Kadıköy ve civarında yayılış gösterdiğinden Kadıköy çiğdemi olarak adlandırılır.

Colchicum türleri sonbaharda çiçek açan ve ilkbaharda çiçek açan türler olmak üzere göre 2 grupta sınıflandırılmaktadır.

- Sonbaharda çiçek açan türler; bu türler sonbaharda çiçek açar, bu mevsimde yaprak oluşumu olmaz. Toprak üzerinde sadece çiçek vardır. Yapraklar ilkbahar sonuna doğru oluşur, meyva yaz mevsimi başında meydana gelir. Yapraklar genellikle geniş ve büyüktür
- İlkbaharda çiçek açan türler; bu türlerde çiçek ilkbaharda oluşur. Çiçek ve yaprak aynı zamanda meydana gelir. Yapraklar darca lineardır. Sonbaharda çiçek açan türlerin yumruları genellikle daha büyük ve tohum verimleri daha yüksektir.

Not: *Colchicum* cinsi son yayınlarda Colchicaceae familyasına dahil edilmektedir.

Türkiyede yetişen *Colchicum* türleri Tablo 2-1 ve Tablo 2-2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1:Türkiye’de yetişen ve Sonbaharda çiçek açan *Colchicum* türleri

Sonbaharda Çiçek Açan Türler			
<i>Colchicum balansae</i>	<i>Colchicum decaisnei</i>	<i>Colchicum lingulatum</i> subsp. <i>rigescens</i>	<i>Colchicum soboliferum</i>
<i>Colchicum baytopiorum</i>	<i>Colchicum dolichantherum</i>	<i>Colchicum macrophyllum</i>	<i>Colchicum speciosum</i>
<i>Colchicum bivonae</i>	<i>Colchicum heldreichii</i>	<i>Colchicum micaceum</i>	<i>Colchicum stevenii</i>
<i>Colchicum boissieri</i>	<i>Colchicum hirsutum</i>	<i>Colchicum micranthum</i>	<i>Colchicum szovitsii</i> subsp. <i>branchyphyllum</i>
<i>Colchicum chalconicum</i> subsp. <i>chalconicum</i>	<i>Colchicum ignescens</i>	<i>Colchicum paschei</i>	<i>Colchicum turcicum</i>
<i>Colchicum chalconicum</i> subsp. <i>punctuatum</i>	<i>Colchicum imperatoris-frederici</i>	<i>Colchicum persicum</i>	<i>Colchicum umbrosum</i>
<i>Colchicum chlorobasis</i>	<i>Colchicum inundatum</i>	<i>Colchicum poryphyllum</i>	<i>Colchicum variegatum</i>
<i>Colchicum cilicicum</i>	<i>Colchicum kotschy</i>	<i>Colchicum sanguicolle</i>	
<i>Colchicum davisii</i>	<i>Colchicum kurdicum</i>	<i>Colchicum sieheanum</i>	

Tablo 2-2: Türkiye’de yetişen ve İlkbaharda çiçek açan *Colchicum* türleri

İlkbaharda Çiçek Açan Türler			
<i>Colchicum antepense</i>	<i>Colchicum figlalii</i>	<i>Colchicum minutum</i>	<i>Colchicum szovitsii</i>
<i>Colchicum atticum</i>	<i>Colchicum lagotum</i>	<i>Colchicum munzureense</i>	<i>Colchicum szovitsii</i> subsp. <i>szovitsii</i>
<i>Colchicum burtii</i>	<i>Colchicum leptanthum</i>	<i>Colchicum raddeanum</i>	<i>Colchicum trigynum</i>
<i>Colchicum crocifolium</i>	<i>Colchicum manissadjianii</i>	<i>Colchicum serpentinum</i>	<i>Colchicum triphyllum</i>

2.2. Kimyasal Bölüm

2.2.1. *Colchicum* Alkaloitlerinin Kimyası

Alkaloitler bitkilerden elde edilen, kuvvetli fizyolojik aktivite gösteren, halka içinde veya dışında azot taşıyan, az veya çok bazik karakterde maddelerdir ²⁷.

Alkaloitler:

Gerçek alkaloitler; biyosentezleri aminoasitlerden başlayan, azotu heterosiklik yapıda taşıyan, az miktarlarda dahi kuvvetli fizyolojik aktivite gösteren bazik karakterli doğal maddelerdir.

Psödoalkaloitler; biyosentezleri aminoasitlerden başlamaz ancak diğer özellikleri gerçek alkaloitlerle aynıdır.

Protoalkaloitler; biyosentezleri aminoasitten başlar, ancak azotu halka içinde değil halka dışında taşırlar. Diğer özellikleri gerçek alkaloitlerle aynıdır.

Bitkilerde nadiren bir tek alkaloit bulunur. Genellikle aynı esas yapıyı taşıyan major alkaloitler ve bunların farklı sübtitüentlerine sahip bir grup minör alkaloit birlikte bulunur.

Colchicum türlerinde bulunan Tropolon alkaloitleri protoalkaloitlerdir.

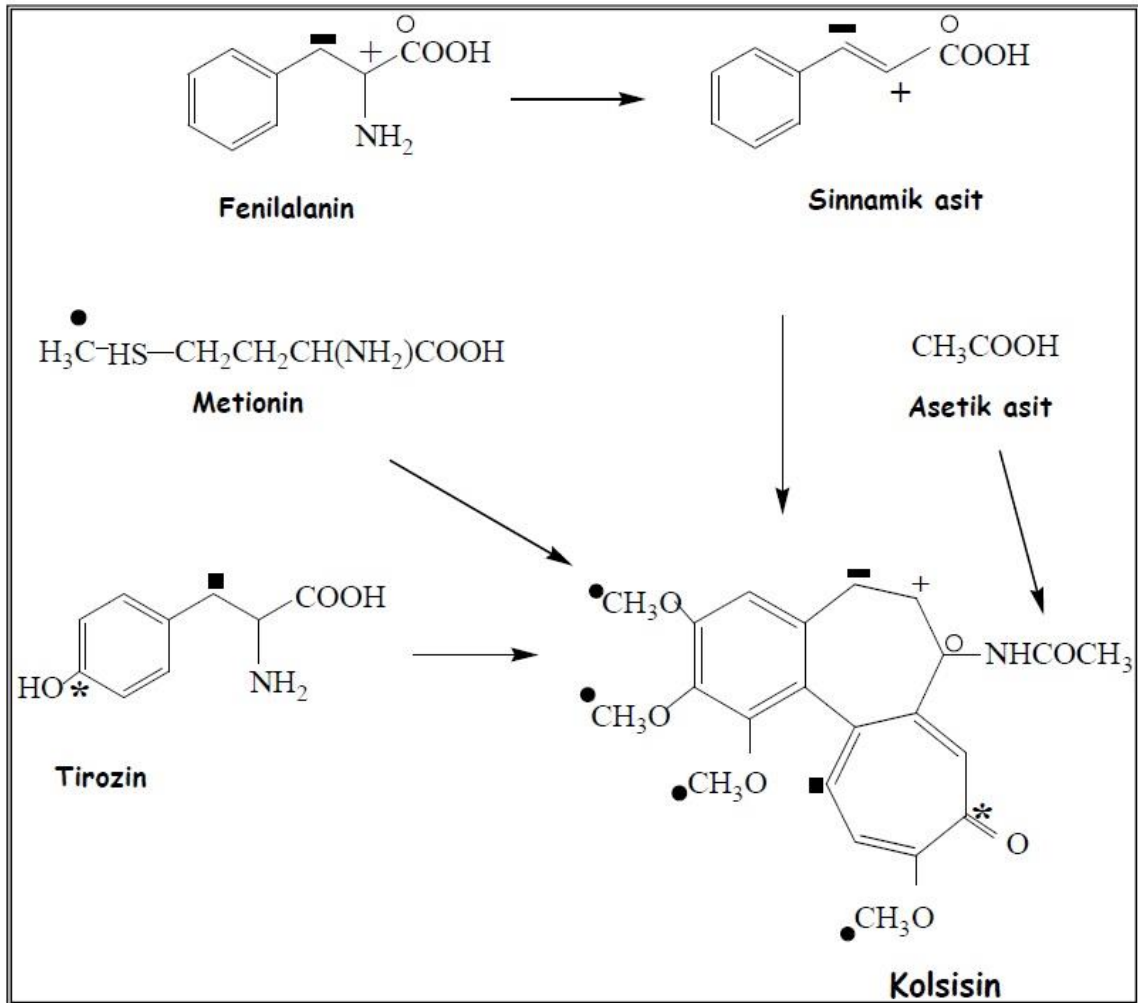
Uzun bir süre *Colchicum autumnale*'nin aktif bileşiğinin yalnızca Kolşisin olduğu düşünülmüştür. Ancak gerek başka *Colchicum* türleri üzerinde gerekse *C. autumnale* üzerinde yapılan izolasyon çalışmaları ile yeni tropolon alkaloitleri keşfedilmiştir. Kolşisin, ana halkası benzosikloheptanotropolon yapısında olan bir protoalkaloittir. Bu halka yapısına sahip alkaloitlere genel olarak “tropolon alkaloitleri” olarak isimlendirilir⁶.

Kolşisin’de halka dışındaki azota asetamit grubu bağlıdır. Bu asetamit grubu 4 tane metoksil taşıyan benzosikloheptano tropolon halka sisteminde sikloheptana bağlı olarak bulunur. Burada tropolon, bir keton grubu taşıyan, yedi üyeli ve doymamış bir halkadır. 4 metoksil grubunun 3’ü benzen, biri tropolon halkasına bağlanmıştır.

Colchicum türleri üzerinde yapılan kimyasal çalışmalarda tropolon alkaloidleri dışında bunların lumi türevleri ve tropolon halkası taşımayan alkaloidler de izole edilmiştir.

2.2.2. *Colchicum* Alkaloidlerinin Biyosentezi

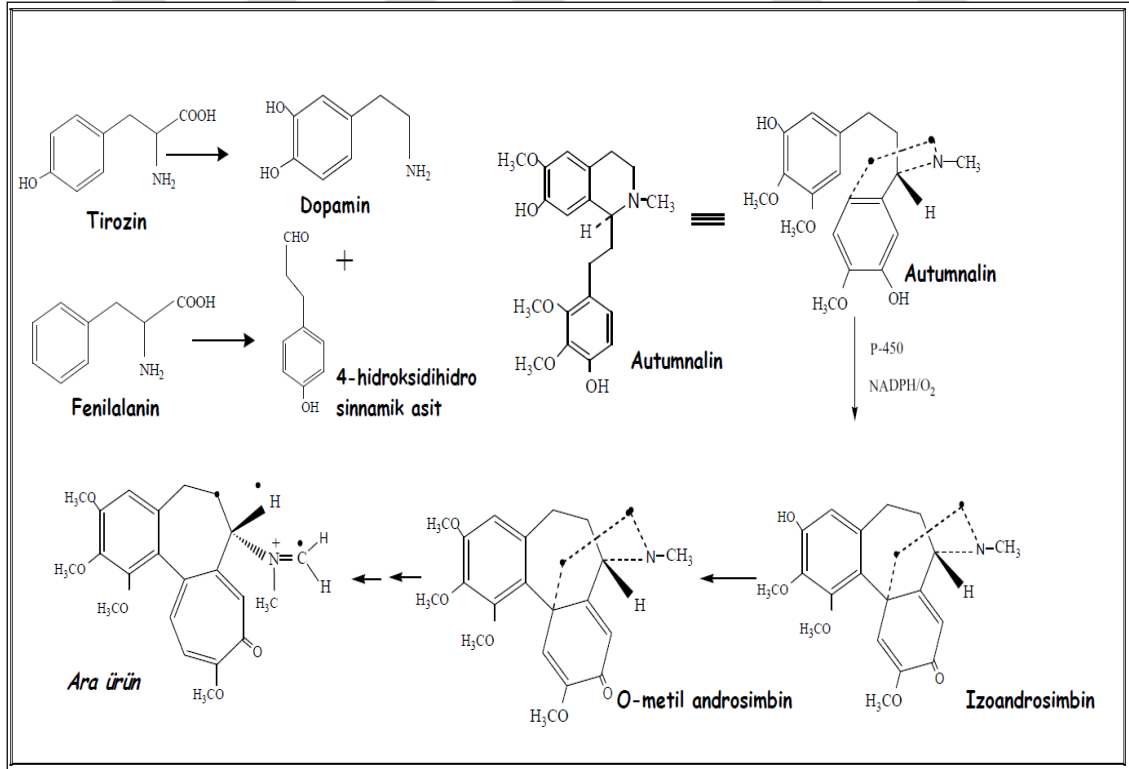
Kolşisin ve türevi alkaloidlerin biyosentezi ile ilgili bir çok araştırma yapılmış ve bu bileşiklerin biyosentezi birçok değişik şekilde gösterilmiştir. *Colchicum* alkaloidleri üzerinde ilk biyosentez çalışmaları Battersby ve Leete tarafından 1960'lı yıllarda başlamıştır. İzotopla işaretlenmiş fenilalanin, tirozin, metionin, asetik asit ve sinnamik asit yardımıyla yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, Kolşisindeki asetamido grubunun asetik asitten, A halkası ve 5, 6, 7 ve 12 nolu karbon atomlarının fenilalanin ve sinnamik asitten ve tropolon halkasının tirozinden meydana geldiğini göstermişlerdir.



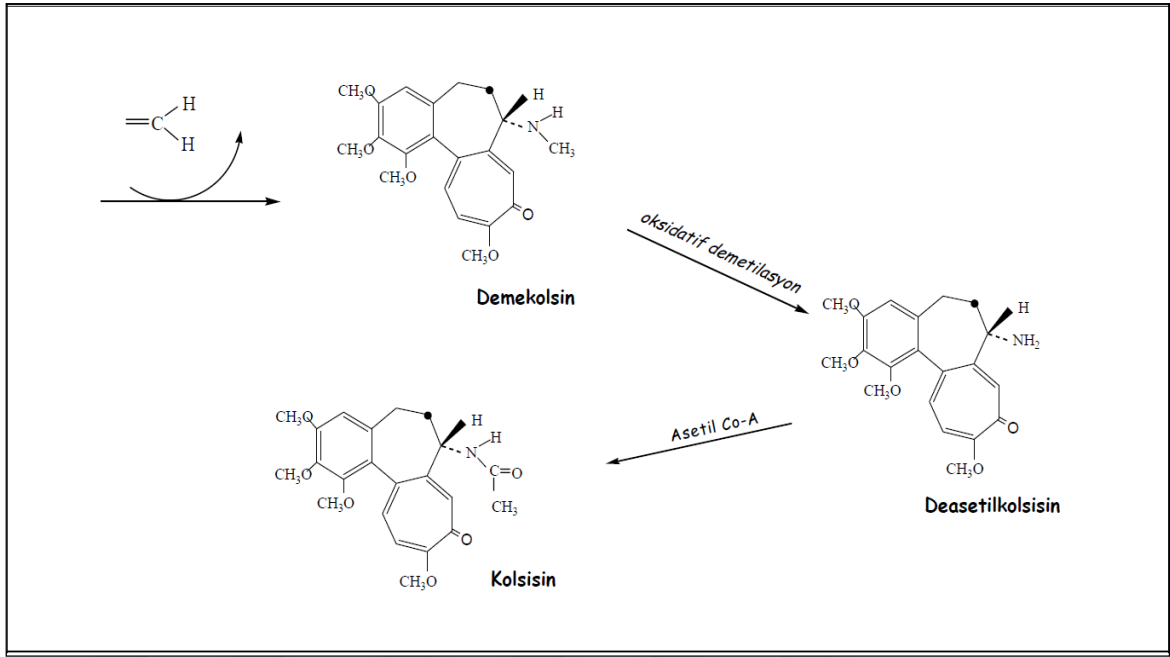
Şekil 2-3: *Colchicum* alkaloidlerinin biyosentezi

Belleau'nun öne sürdüğü biyosentez modelinde 3,4,5-trihidroksifenilpürivik asit üzerinden olmaktadır. Bu asitin iki molekülünün oksidasyonu ile önce bir ortokinon bileşiği daha sonra orto-para bileşiği oluşur. Oksidatif parçalanma ve redüksiyon ile monosiklik bir ara madde oluşur. Bu maddeye amonyak katılmasıyla CO₂ ve H₂O çıkışı tropolon halkası meydana gelir. Bunun redüksiyonu ile deasetilkolşisin oluşur.

Radyoaktif bileşiklerle yapılan çalışmalarda (S)-autumnalin'in Kolşisin sentezinde öncü madde olduğu tespit edilmiştir. Kolşisin biyosentezinin dayanağı olan en önemli olay ise "fenol-oksidatif eşleşme"dir. Bu kimyasal olayın gerçekleşmesinden Sitokrom P-450, NADPH ve oksijene bağlı enzim sistemleri sorumludur. Oksidatif eşleşme olayında bağlanmanın hangi konumdan meydana geldiği de biyosentez açısından önemlidir. Alkaloidlerde genel olarak para-para ya da orto-para konumlarından bağlanma meydana gelir. Para-para bağlanmanın özellikle autumnalinden isoandrosimbin oluşumu esnasında üç oksijenli halkada orto-para bağlanmaya bir alternatif olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolşisinde hem orto-para hem de para-para bağlanmanın gerçekleşiyor olabileceğini belirtmektedir.



Şekil 2-4: *Colchicum* alkaloidlerinin biyosentez şeması 1



Şekil 2-5: *Colchicum* alkaloitlerinin biyosentez şeması 2

2.2.3. *Colchicum* Türlerinden Elde Edilen Alkaloitler

2.2.3.1. *Colchicum* Alkaloitlerinin Sınıflandırılması

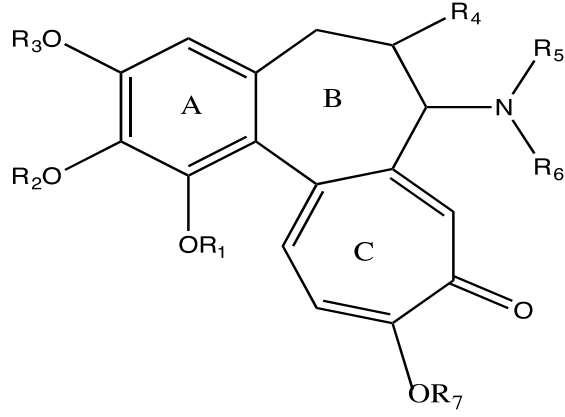
I. Tropolon Alkaloitleri ve Lumi Türevleri

- a) Nötral ve Nötral - fenolik alkaloitler
- b) Bazik ve Bazik- fenolik alkaloitler
- c) Glikozidik alkaloitler

II. Tropolon Halkası Taşımayan Alkaloitler

- a) Fenetiltetrahidroizokinolin alkaloitleri
- b) Homopromorfinan alkalotleri
- d) Homoproaporfin alkaloitleri
- e) Homoaporfin alkaloitleri
- f) Aporfin alkaloitleri

2.2.3.2. Nötral ve Nötral-Fenolik Tropolon Alkaloitleri



Şekil 2-6: Tropolon alkaloitlerinin ana halka yapısı

Tablo 2-3:Nötral ve nötral-fenolik tropolon alkaloitleri

<i>Nötral-fenolik Alkaloitler</i>	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
kolşisin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	COCH ₃	CH ₃
2-demetilkolşisin	CH ₃	H	CH ₃	H	H	COCH ₃	CH ₃
3-demetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	COCH ₃	CH ₃
2,3-didemetilkolşisin	CH ₃	H	H	H	H	COCH ₃	CH ₃
<i>N</i> -deasetilformil kolşisin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	CHO	CH ₃
2-demetil- <i>N</i> -formil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	H	CH ₃	H	H	CHO	CH ₃
3-demetil- <i>N</i> -formil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CHO	CH ₃
2-asetil-2-demetilkolşisin	CH ₃	COCH ₃	CH ₃	H	H	COCH ₃	CH ₃

kolşikozit	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅	H	H	COCH ₃	CH ₃
<i>N</i> -metilkolşisin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	COCH ₃	CH ₃
<i>N</i> - deasetilmetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃
Kolşisein	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	COCH ₃	H
2-demetilkolşisein	CH ₃	H	CH ₃	H	H	COCH ₃	H
3-demetilkolşisein	CH ₃	CH ₃	H	H	H	COCH ₃	H
<i>N</i> -deasetil- <i>N</i> - formilkolşisein	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	CHO	H
<i>N</i> -asetildemekolsin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	COCH ₃	CH ₃	CH ₃
<i>N</i> -formildemekolsin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CHO	CH ₃	CH ₃
kolşifolin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	COCH ₂ OH	CH ₃
2-demetilkolşifolin	CH ₃	H	CH ₃	H	H	COCH ₂ OH	CH ₃
3-demetilkolşifolin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	COCH ₂ OH	CH ₃
kornigerin	CH ₃	-CH ₂ - metilendioksi		H	H	COCH ₃	CH ₃
kornigerein	CH ₃	-CH ₂ - metilendioksi		H	H	COCH ₃	OH
kolşisilin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	H	COCH ₃	CH ₃
2-demetilkolşisilin	CH ₃	H	CH ₃	OH	H	COCH ₃	CH ₃
3-demetil- <i>N</i> - deasetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃

2.2.3.3. Bazik ve Bazik-fenolik Tropolon Alkaloitleri

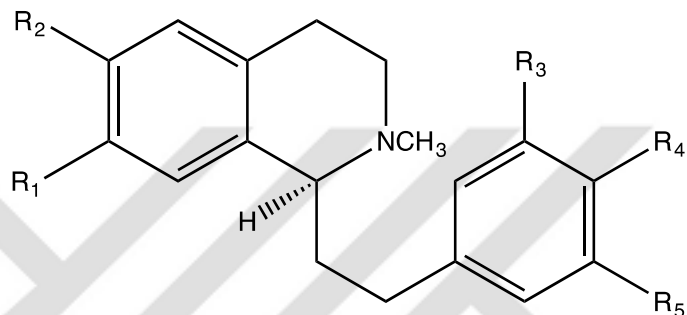
Tablo 2-4: Bazik ve bazik-fenolik tropolon alkaloitleri

<i>Bazik-fenolik Alkaloitler</i>	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
demekolsin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
<i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃
3-demetil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃
2-demetil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃
2,3-didemetil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	H	H	H	H	H	CH ₃
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃
<i>N</i> -deasetilkolşisein	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H
3-demetildemekolsin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₃
2-demetildemekolsin	CH ₃	H	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
demekolsein	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	H
<i>N</i> -metildemekolsein	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
<i>N</i> -metildemekolsin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
2,3-didemetildemekolsin	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃
<i>N</i> -Formildemekolsin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CHO	CH ₃	CH ₃
speciosin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	2-hidroksitoluen	CH ₃	CH ₃
<i>N</i> -toksikarbonildemekolsin	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	COOC ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃

2.2.3.4. Tropolon Halkası Taşımayan *Colchicum* Alkaloitleri

▪ Fenetilizokinolin Alkaloitleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Colchicaceae familyasından altı tane fenetilizokinolin alkaloidi izole edilmiştir. Bunlardan en önemlisi biyosentez aşamasında anahtar bir rol oynayan Autumnalin'dir.

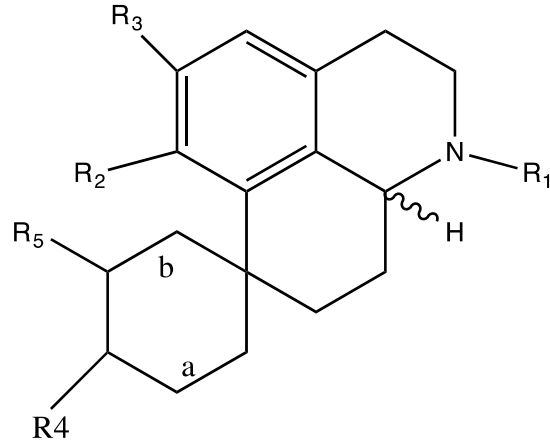


Şekil 2-7: Fenetilizokinolin alkaloitleri ana halka yapısı

Maddeler	R1	R2	R3	R4	R5	H
autumnalin	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	β
izoautumnalin	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	β
kolşietanamin	OCH ₃	OH	H	OH	H	α
kolşietin	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H	α

▪ Homoproaporfin Alkaloitleri

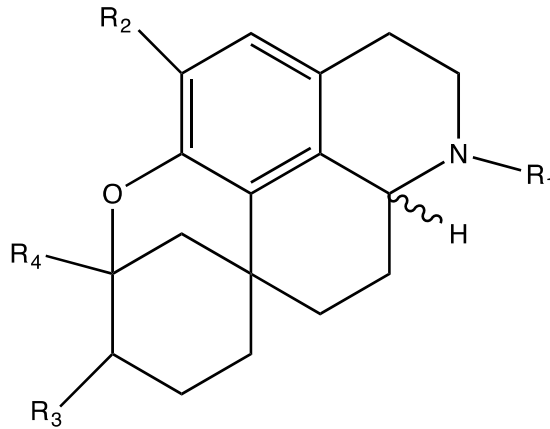
Avrupa'da yetişen *Colchicum* türlerinden homoproaporfin yapısında minör alkaloitler izole edilmiştir. Bu alkaloitlerden bir kısmı üzerinde antikolinesteraz aktivite çalışmaları yapılmış ve ortalama bir etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 2-8: Homoproaporphin alkaloitlerinin ana halka yapısı

Tablo 2-5: Homoproaporphin alkaloitleri 1

Maddeler	R1	R2	R3	R4	R5	H	a	b
bulbokodin	CH ₃	OH	OCH ₃	=O	H	β	çift	tek
kreysiginon	CH ₃	OH	OCH ₃	=O	OCH ₃	α	çift	çift
dihidrokreysiginon	CH ₃	OH	OCH ₃	=O	OCH ₃	α	tek	çift
trigamin	CH ₃	OH	OCH ₃	OH	H	β	tek	tek

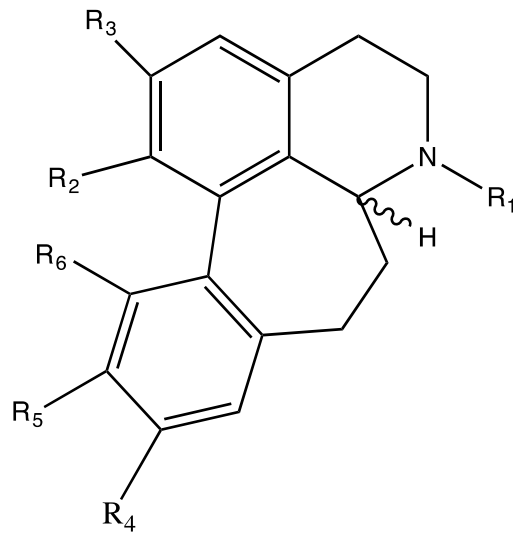


Şekil 2-9: Homoproaporphin alkaloitlerinin ana halka yapısı

Tablo 2-6: Homoproaporfin alkaloitleri 2

Maddeler	R1	R2	R3	R4	H
kesselridin	CH ₃	OH	OH (α)	OH (β)	β
regelamin	CH ₃	OCH ₃	OH (α)	OH (β)	β
kesselringin	CH ₃	OH	OH (α)	OCH ₃ (β)	β
regelin	CH ₃	OCH ₃	OH (α)	OCH ₃ (β)	β
lutein	CH ₃	OH	OH (β)	OCH ₃ (β)	β
regelinin	CH ₃	OCH ₃	OH (β)	OCH ₃ (β)	β
robustamin	CH ₃	OCH ₃	OH (β)	OCH ₃ (β)	α

▪ Homoaporfin Alkaloitleri



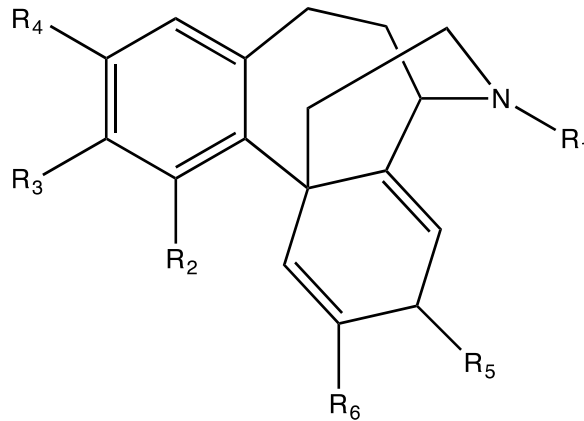
Şekil 2-10: Homoaporfin alkaloitlerinin ana halka yapısı

Tablo 2-7: Homoaporfin alkaloidleri

Maddeler	R1	R2	R3	R4	R5	R6	H
(-)-kreysigin	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	β
baytopin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	α
merenderin	CH ₃	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	α
szovitsamin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	α
androsimin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	α
androsin	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	α
(+)-kreysigin	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	α
O- metilkreysigin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	α

▪ Homomorfinan (androsimbin) Alkaloidleri

Colchicum türlerinden androsimbin ve O-metilandrosimbin'in izole edilerek yapılarının aydınlatılmasının biyosentez aşamasının anlaşılmasında önemli katkısı olmuştur.



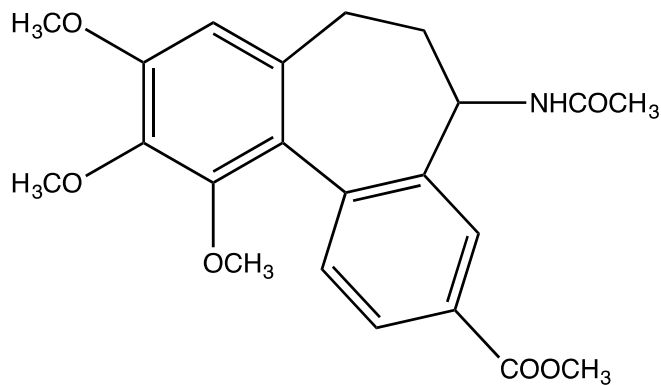
Şekil 2-11: Homomorfinan alkaloidleri ana halka yapısı

Tablo 2-8: Homomorfinan alkaloidleri

Maddeler	R1	R2	R3	R4	R5	R6	a
androsimbin	CH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	=O	OCH ₃	çift
O- metilandrosimbin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	=O	OCH ₃	çift
izoandrosimbin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	=O	OCH ₃	çift
kollutin	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	=O	OCH ₃	çift
szovitsidin	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	çift
kolşiritsin	H	OCH ₃	-OCH ₂ O-		=O	OCH ₃	çift

▪ Allokolşisin Türevleri

Allo türevler aynı zamanda dibenzosikloheptilaminler olarak da adlandırılan, bifenil halka yapısına sahip, bitkide doğal olarak bulunan alkaloidlerdir. Allo türevlerinin tubulin polimerizasyonu önleyici etkileri yüksek, toksisitesi ise Kolşisin'e oranla daha azdır. Ancak yapılan *in vivo* çalışmalarda antitümöral ajan olarak çok kuvvetli bir aktiviteye sahip olmadıkları saptanmıştır. Allo türevlerin sentezi tropolon türevlerinden çok daha kolaydır. Kolşisin ve izokolşisinin sodyum metoksitli ortamda muameleleri ile de elde edilebilirler.

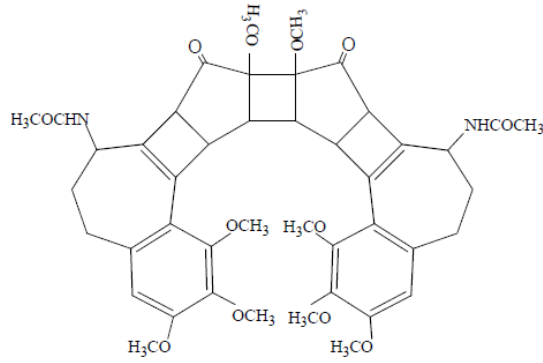


Şekil 2-12: Allokolşisin

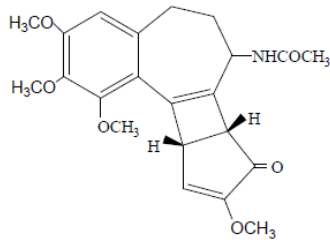
▪ Lumikolşisin Türevleri

Tropolon halkasına sahip alkaloidler ışığa, özellikle de gün ışığından çok kolay etkilenmektedir. Bu alkaloidler ışık etkisi ile α -, β - ve γ -lumi türevlerinden oluşan bir karışıma dönüşürler.

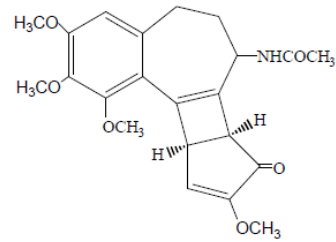
Tropolon alkaloidlerinin izomeri olan bu maddeler, ışık etkisi ile meydana geldikleri için fotoizomer olarak adlandırılırlar. Bu türevler arasında en fazla oluşan β -lumi türevleridir. Lumi türevleri doğal olarak bitkide bir miktar oluştuğu düşünülse de büyük çoğunluğunun izolasyon çalışmalarında tropolon alkaloidlerinin bozunma ürünü olabileceği düşünülmektedir. Yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında Lumikolşisinlerin tubuline bağlanmadığı dolayısıyla antimitotik etkiye sahip olmadıkları gösterilmiştir.



α -Lumikolşisin



β -Lumikolşisin



γ -Lumikolşisin

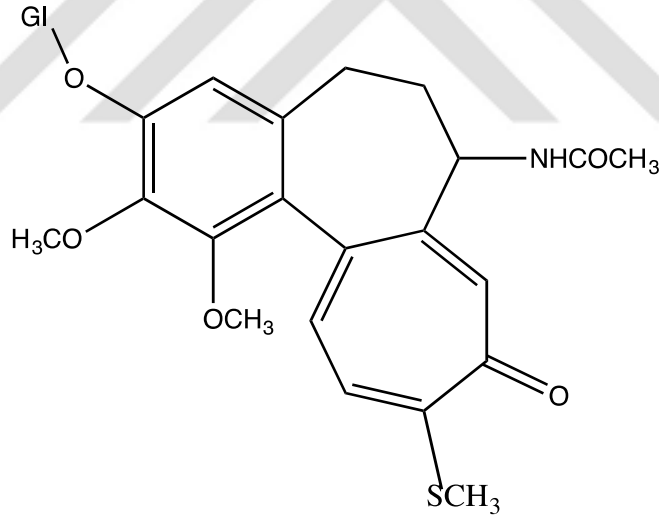
Şekil 2-13: Lumikolşisin türevleri

2.2.4. Colchicum Alkaloitlerinin Sentezi

Colchicum türlerinden Kolşisin'in izole edilip yapısının aydınlatılması ve biyolojik aktivitelerinin ortaya konması, Kolşisin ve türevlerinin sentetik olarak eldesine yönelik bir çok araştırmaya yol açmıştır. Tedavi alanında oldukça geniş yer tutan Kolşisin'in sentezinde verimli ve ekonomik bir sentez yöntemi bulmak amacıyla birçok araştırmacı çok uzun yıllardır çalışmaktadır.

Kolşisin'in sahip olduğu güçlü antimitotik etki sebebiyle antitümöral ajan olarak kullanımı yüksek toksisitesi nedeniyle mümkün değildir. Bu sebeple sentez çalışmalarının bir diğer amacı da Kolşisin kadar etkili ancak toksisitesi çok daha düşük yeni türevler elde etmektir.

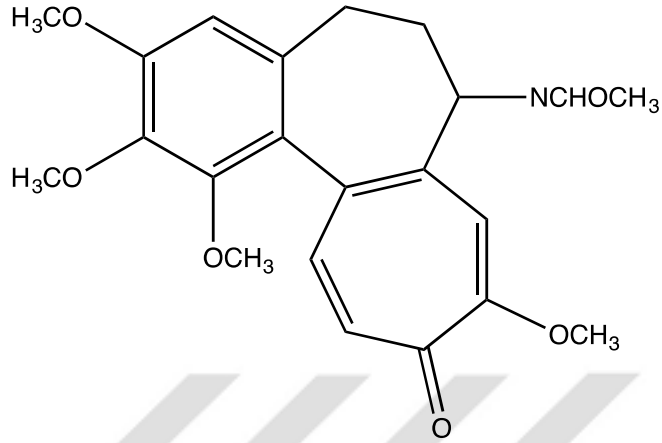
Sentetik olarak elde edilen tiyo türevlerin yapılan çalışmalarda kas gevşetici etkisinin olduğu gözlenmiştir. 3-demetiltiyokolşisin glikozit (tiyokolşikozit) kas gevşetici etki dolayısıyla oral veya enjektabl formlarında tedavide en çok kullanılan ilaçların başında gelmektedir.



Şekil 2-14: Tiyokolşikozit

Kolşisin'in C halkasındaki 9. ve 10. karbona bağlı metoksi ve okso gruplarının yer değiştirmesi ile sentezlenen maddeler izokolşisinler olarak adlandırılır. İzokolşisin, kolşisinin diazometan ile O-metilasyonu sonucunda elde edilir. Antimitotik aktivite için 9.karbondaki okso grubu oldukça önemlidir. Bu grupların yerlerinin değişmesi

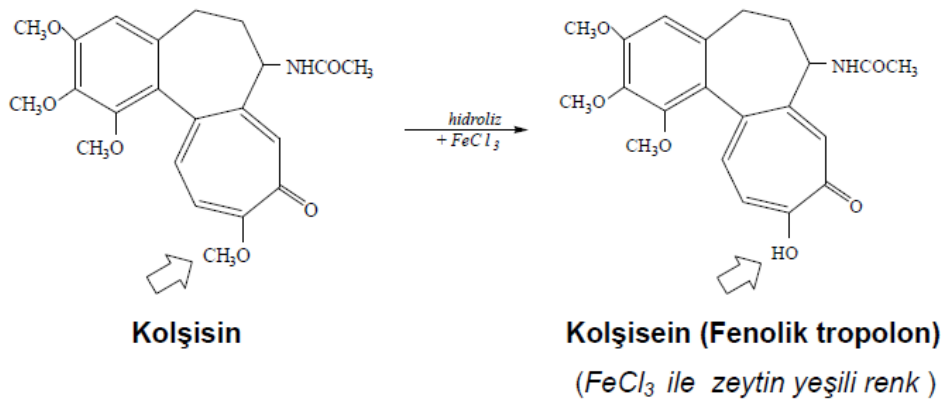
aktiviteyi ortadan kaldırır. Bu sebeple izokolşisinlerin aktif değildir ancak aktivite için izokolşisinler üzerindeki sentez çalışmaları devam etmektedir.



Şekil 2-15: İzokolşisin (inaktif)

2.2.5. *Colchicum* Alkaloidlerinin Tanınması

Tropolon halkasındaki metoksil grubu dilüe asit veya alkaliler ile kolayca hidroliz olarak hidroksil grubuna dönüşür. Kolşisin dilüe HCl veya NaOH ile hidrolizi sonucu fenolik tropolon yapısındaki Kolşisein'e döner. % 5'lik FeCl_3 ile zeytin yeşili renk verirken, kloroformda bu renk kırmızıya döner. (Oberlin-Zeisel Reaksiyonu)



Şekil 2-16: Oberlin-Zeisel Reaksiyonu

Lumi türevler ve sekokolşisin Oberlin-Zeisel Reaksiyonunu vermez.

Tropolon halkası taşıyan alkaloitler kristal halde iken açık sarı renklidir, fenolik yapı taşıyan tropolon alkaloitleri ise koyu sarı veya açık turuncu renktedir. Lumi türevleri ve sekokolşisin ise renksizdir.

Genel alkaloit belirteci Dragendorff ile 7. Karbonda amit grubu taşıyan tropolon alkaloitleri turuncu renk verir. Lumi türevler Dragendorff belirteci ile turuncu zamanla kıızıl-kahveye dönüşen oldukça koyu bir leke verir.

Tropolon alkaloitleri Carr-Price belirteci ile sarı renk verir.

C-2 ve C-3'te serbest fenolik grup içeren tropolon alkaloitleri, gün ışığında silikajelde sarı renk verirler.

Tropolon alkaloitleri, UV₂₅₄ nm'de koyu menekşe renk verirler. UV₃₆₆ nm'de kolşisin alkaloitleri bej, demekolsin alkaloitleri kahverengi (A halkasında fenolik grup taşıyanlar hariç) ve lumi türevleri ise gri renk alır. UV₃₆₆ nm'de, A halkasında fenolik grup taşıyan tropolon alkaloitleri koyu mor, 10. Karbonda -OH grubu taşıyanlar sarı-kahve renkte görülmektedir.

Tropolon alkaloitleri konsantre H₂SO₄ ile 48 saat kalıcı sarı renk verir. Kornigerin, 2-demetilkolşisin ve 2-demetildemekolsin sarı-turuncu bir renk verir ve bu renk zamanla koyu turuncuya döner. Lumi türevlerde ise konsantre H₂SO₄ ilave edilmesi ile anında kırmızı-mor veya turuncu bir renk meydana gelir, 6 saatin sonunda bu renk açık beje dönüşür.

Kolşisin, Wagner belirteci (I₂ / KI) ile hafif asitli ortamda kahverengi bir çökelti verirken, etanoldeki çözeltisine FeCl₃ ilave edilirse kırmızı renk açığa çıkar.

2.2.6. *Colchicum* Alkaloitlerinin Yapı-Aktivite İlişkileri

Yapılan çalışmalar sonunda sadece a-S-konfigürasyonlu biaril sisteme sahip bileşiklerin aktif olduğu görülmüştür. Konfigürasyonu a R'ye dönüştürmek aktivitenin kaybolmasına sebep olur. Sentez çalışmaları sonunda elde edilen rasemik karışımların saf a-S izomerlerden daha düşük aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Üç ana halka yapısına sahip olan Kolşisin'in kimyasal yapısı üzerinde yapılan çalışmalarda, biyolojik aktivitenin bu halka yapılarına ve halkadaki sübstitüentlere bağlı olarak değiştiği anlaşılmıştır.

A halkası

- A halkasında aromatik sübstitüsyon biyolojik aktivite üstünde oldukça yüksek bir etkiye sahiptir. 2. ve 3. karbonlardaki metoksil gruplarının kalkması toksisiteyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Ancak 3-demetilkolşisin mikrotübüllere bağlanmada kolşisin kadar aktif olmasına rağmen, 2-demetilkolşisin'de bu etki önemli ölçüde azalmıştır. 1-demetilkolşisin ve Kolşikozitte ise biyolojik aktivite ortadan kalmaktadır.
- Etoksi türevlerinin de Kolşisin'e benzer aktivite gösterdiği saptanmıştır.
- 2. ve 3. karbondaki fenol grupların asetillenmesi biyolojik aktivitenin yanında toksisiteyi de arttırır.
- Yapılan çalışmalarda A halkasının tübüline bağlanmada etkili olduğu saptanmıştır.
- Biyolojik aktivite için A halkası ve sübstitüentleri önemlidir.

B halkası

- C-7 de bulunan N sübstitüsyonu biyolojik aktivite açısından önemlidir. C-7 amido grubunda zincirin uzaması aktiviteyi azaltır. En yüksek etkiyi N-deasetil-N-formilkolşisin gösterir.
- N-açıl bileşiklerin N-deasetil türevlerine göre hem tübüline bağlanma hem de antitümör etki açısından daima daha aktif olduğu belirlenmiştir.
- N-açıl yerine N-aril bağlanması ise aktivitenin azalmasına sebep olur N de hiç sübstitüsyon bulunmaması aktiviteyi etkilemez.
- N-halojenizasyon aktivitede değişime neden olur. Floroasetilkolşisin Kolşisin'den 4 kat daha yüksek aktivite gösterirken, iyodoasetilkolşisin 6 kat daha az aktivite göstermektedir.

- B halkasının tübüline bağlanmada fazla etkisinin olmadığı düşünülmektedir. Fakat yapılan bir çalışmada kolşisinin sadece B halkasında küçük süstitüentler bulunduğu zaman tübüline bağlanmanın daha hızlı geliştiğı gözlenmiştir.
- C-7 kolşisin'in kiral merkezidir, optikçe aktifliğı sağlar.

C halkası

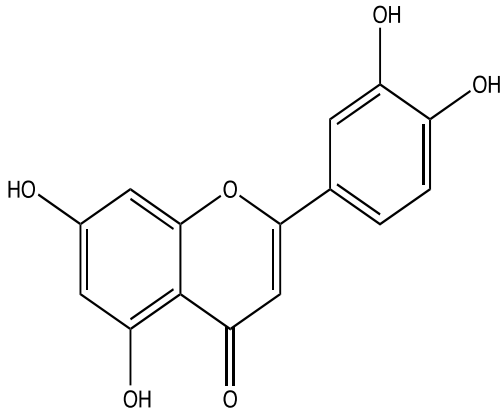
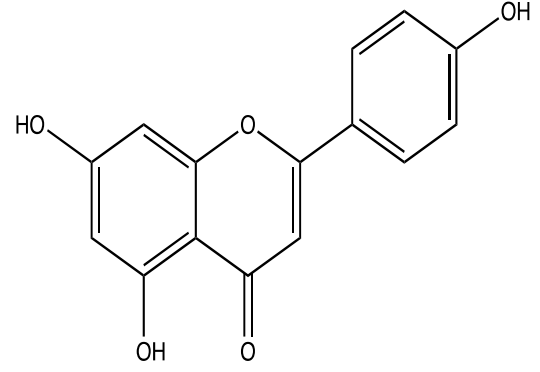
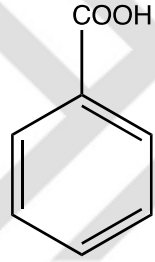
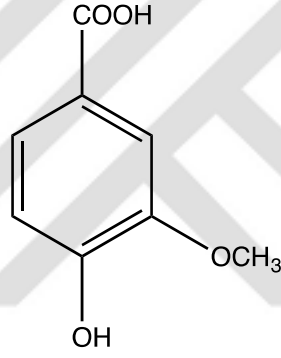
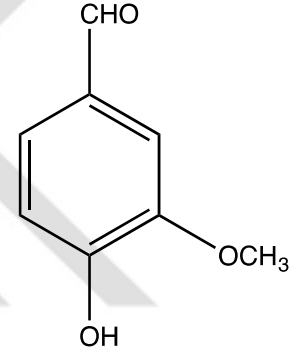
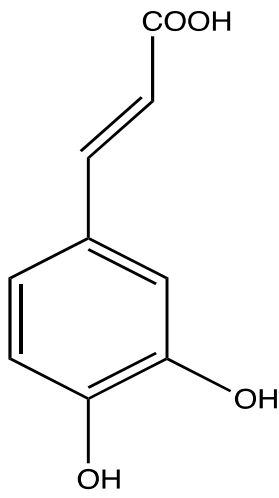
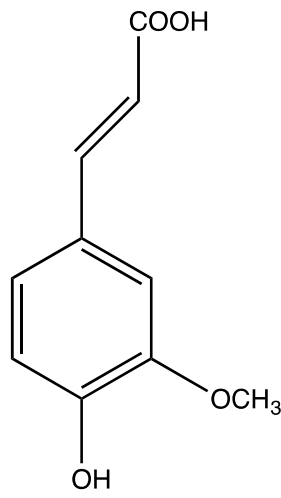
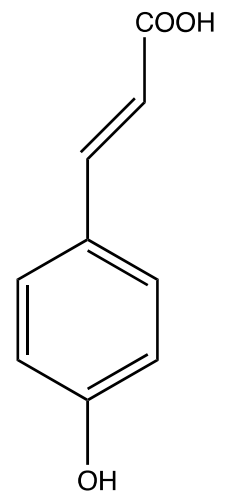
- Biyolojik aktivite için C halkası çok önemlidir. C halkası 9. karbondaki keto grubu taşıyan bir tropolon halkasıdır. Bu halkanın hidrojenasyonu veya benzen halkasına dönüşmesi aktiviteyi ortadan kaldırır.
- C-10'daki metoksil grubunun hidroksil grubu ile değişmesi aktivitenin kaybolmasına sebep olur. C-10'da -OH taşıyan kolşisein inaktiftir.
- C-10'daki metoksi grubunun amino veya tiyo eter grupları ile yer değiştirmesi aktivitede önemli bir değişime sebep olmaz.
- C-10'daki metoksil grubu diğer yerlerdeki, metoksil gruplarına göre daha kolay hidroliz olur.
- Lumikolşisinlerde tropolon halka yapısı bozulduğundan mikrütübüller üzerine olan etki gözlenmemektedir.

2.2.7. *Colchicum* Türlerinde Bulunan Fenolik Asit ve Flavon Bileşikleri

Colchicum türleri üzerinde yapılan çalışmalarda bitkide alkaloidler dışında fenolik asitler ve flavon bileşiklerinin de varlığı ortaya konmuştur. Bu maddelerin *Colchicum* alkaloidlerinin biyosentezinde öncül madde olabileceğı düşünülmektedir. *Colchicum* türlerinde en çok bulunan fenolik asit ve flavon bileşiklerinin, kafeik asit, ferulik asit, benzoik asit ve türevleri, vanilik asit, vanilin, kumarik asit, 3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-propenoik asit, apigenin ve luteolin olduğu tespit edilmiştir.

Benzoik asit türevlerinden 2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit yalnızca *Wurmbeoideae* alt familyası bitkilerinde meydana geldiğinden bu bileşik kemotaksonamik açıdan önemlidir.

Bazı *Colchicum* türlerinin fenolik fraksiyonları antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri açısından incelenmiş ve özellikle çiçek ekstraktlarının yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır.

**Luteolin****Apigenin****Benzoik asit****Vanilik asit****Vanilin****Kafeik asit****Ferulik asit****Kumarik asit****Şekil 2-17:Colchicum Türlerinde Bulunan Fenolik Asit ve Flavon Bileşikleri**

2.2.8. Türkiye’de Yetişen *Colchicum* Türleri Üzerindeki Çalışmalar

Ülkemiz *Colchicum* türleri açısından oldukça zengindir. Büyük çoğunluğu anabilim dalımızda olmak üzere Türkiye’de yetişen *Colchicum* türleri üzerinde birçok izolasyon çalışması yapılmıştır. Türkiye’de yetişen *Colchicum* türlerinden elde edilen maddeler Tablo 2-9’da gösterilmiştir.

Tablo 2-9: Türkiye’de yetişen *Colchicum* türlerinden elde edilen maddeler

Tür	Çalışılan Kısımlar	Alkaloitler		Flavonlar ve Fenolik asitler	
<i>C. baytopiorum</i>	Çiçek	Kolşisin	Kolşifolin	Benzoik asit ve türevleri Kumarik asit Kafeik asit	Ferulik asit Luteolin Vanillik asit
	Yaprak	Demekolsin	2-demetilkolşifolin		
	Tohum	2-demetilkolşisin	2-demetil γ -lumikolşisin		
	Yumru	3-demetilkolşisin N-deasetil-N-formilkolşisin	2-demetildemekolsin		
<i>C. bivonae</i>	Tohum Yumru	Kolşisin	2-demetildemekolsin	-	
		Demekolsin	O-metilkreysigin		
		β -Lumikolşisin	Kolşisilin		
		γ -Lumikolşisin	Ndeasetil-N-formilkolşisilin		
		2-demetilkolşisin	N-deasetilkolşisin		
		3-demetilkolşisin Kornigerin N-formil-N-deasetilkolşisin	2,3-didemetil kolşisin		
<i>C. bornmuelleri</i>	Çiçek	Kolşisin	Kolşifolin	Benzoik asit ve türevleri Kumarik asit Kafeik asit	Ferulik asit Luteolin Vanillik asit
	Yaprak	Demekolsin	N-formil-N-deasetilkolşisin		
	Tohum	2-demetilkolşisin	2-demetil demekolsin		
	Yumru	3-demetilkolşisin Kornigerin	3-demetildemekolsin		
<i>C. kotschy</i>	Yaprak	Kolşisin	Kolşifolin	Benzoik asit ve türevleri Kumarik asit Kafeik asit Vanilin	Ferulik asit Luteolin Vanillik asit 3,4 dihidroksibenzaldeit
	Tohum	Demekolsin	2-demetil demekolsin		
	Yumru	2-demetilkolşisin	3-demetildemekolsin		
		3-demetilkolşisin			

<i>C. macrophyllum</i>	Çiçek	Kolşisin			Ferulik asit
	Yaprak	Demekolsin	N-formil-N-deasetilkolşisin	Benzoik asit ve türevleri	Luteolin
	Tohum	2-demetilkolşisin	2-demetildemekolsin	Kumarik asit	Vanillik asit
	Yumru	3-demetilkolşisin	3-demetildemekolsin	Kafeik asit	3-(4metoksifenil)-propanoik asit
		Kolşifolin			
<i>C. speciosum</i>	Çiçek	Kolşisin	Kolşifolin	Benzoik asit ve türevleri	Ferulik asit
	Yaprak	Demekolsin	N-formil-N-deasetilkolşisin	Kumarik asit	Luteolin
	Tohum	2-demetilkolşisin	2-demetildemekolsin	Kafeik asit	Vanillik asit
	Yumru	3-demetilkolşisin	3-demetildemekolsin	Sinamik asit	4-hidroksifenil-metanol
		Kornigerin			
<i>C. triphyllum</i>	Çiçek	Kolşisin	Kolşifolin	Benzoik asit ve türevleri	Ferulik asit
	Yaprak	Demekolsin	N-formil-N-deasetilkolşisin	Kumarik asit	Vanilin
	Tohum	2-demetilkolşisin	2-demetildemekolsin	Kafeik asit	Vanillik asit
	Yumru	3-demetilkolşisin	3-demetildemekolsin		
		Kornigerin			
<i>C. turcicum</i>	Çiçek	Kolşisin	Kornigerin		
	Yaprak	Demekolsin	N-formil-N-deasetilkolşisin		
	Tohum	3-demetilkolşisin	3-demetildemekolsin		
	Yumru	β -Lumikolşisin			
		Kolşifolin			
<i>C. umbrosum</i>		Kolşisin	3-demetilkolşisin		
	Tohum	Demekolsin	N-formil-N-deasetilkolşisin		
		Kolşifolin	4-hidroksikolşisin		
		Kolşisilin	Kolşikozit		

2.3. Farmakolojik Bölüm

Colchicum türleri Dioscorides zamanından beri bilinmekte ve tıbbi tedavide kullanılmaktadır.¹⁹ 1763'te Viyana'da Anton Stoerck tarafından hazırlanan ekstre ve pilüller gut hastalığına karşı ödem giderici olarak kullanılmaya başlanmış ve zamanla gut tedavisinin spesifik ilacı haline gelmiştir.⁹ *Colchicum* türlerinin major alkaloidi Kolşisin'in 1889 yılında Pernice tarafından tübülün inhibitör etkisi ortaya çıkarılmış ve bu etkisi sebebiyle antikanser ajan olarak araştırılmıştır.²⁸ 1972 yılında Goldfinger Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) tedavisinde Kolşisin'in her gün 0,6-1,8 mg doz aralığında

kullanıldığında abdominal ağrı krizlerini önlediğini göstermiş ve böylece Kolşisin FMF tedavisinin en etkili ilacı olmuştur.^{29,30}

Colchicum türleri halk arasında haricen romatizma ağrılarına karşı kullanılmıştır. Bu amaçla, bir tutam acı çiğdem tohumu 2-3 diş sarımsak ile havanda iyice dövülür ve elde edilen sulu usare tülbente emdirilerek ağrıyan bölgeye sarılır ve pansuman her gün yenilenerek tedaviye devam edilir.³

Colchicum autumnale'den Kolşisin'in izole edilerek yapısının aydınlatılması ve gösterdiği aktivitelerin ortaya konulmasının ardından *Colchicum* türlerine olan ilgi artmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda *Colchicum* türlerinden elde edilen diğer tropolon grubu alkaloidlerin de Kolşisin'e benzer farmakolojik aktivite gösterdiği saptanmıştır.¹²

Kolşisin gut, Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF), amiloidoz, Behçet hastalığı, skleroderma, akut perikardit, kronik kabızlık, eritema nodozum, primer safra sirozu, karaciğer sirozu, Hodgkin lenfoma, kronik lenfoit lösemi, melanoma, sedef hastalığı, eklem kireçlenmesi, vaskülitler, sarkoidoz, Paget hastalığı tedavisinde kullanılmaktadır.^{11,31,32,33}

Bu bölümde tedavide diğer tropolon alkaloidlerine oranla daha aktif kullanılmasından dolayı, Kolşisin'in farmakolojik etkileri üzerinde durulmuştur.

2.3.1. Kolşisin'in Tedavide Kullanımı

Kolşisin'in Türkiye'de *Colchicum-Dispert* ve *Kolsin* isimli iki preparatı mevcuttur. *Colchicum-Dispert* ve *Kolsin* draje akut ve kronik gut hastalığında, Ailevi Akdeniz Ateşinde ve Behçet hastalığında sıklıkla reçete edilmektedir. Her bir draje 0,5 mg Kolşisin içermektedir.

Gut bazı eklemlerde ani ve şiddetli gelişen ağrı, hassasiyet, kızarıklık, şişme ve sıcaklık artışı nöbetlerine neden olan bir hastalıktır. Genellikle ayak başparmağını etkilerken, bununla birlikte diz, ayak bileği, ayak, el, el bileği ve dirsek eklemleri de etkilenebilir. Ayak başparmağının tutulmasına 'podogra' denilmektedir. Nadiren hastalarda omuz, kalça ve omurga tutulumu gelişebilir. Gut hastalığındaki ağrı ve şişmenin nedeni ürik asit kristallerinin eklemde birikmesidir. Ürik asit vücutta hücre döngüsü sonucu ortaya çıkan ve normal şartlarda vücutta bulunan bir maddedir. Kanda erimiş halde bulunur ve böbrekler yoluyla idrarla atılır. Gut hastalarında ürik asit düzeyi

kanda çok yükselmiş olup, ürik asit kristalleri eklem ve diğer dokularda birikim yaparlar. Bu da eklemlerin zarında iltihaba neden olur. Akut gut hastalığının tedavisinde Kolşisin, oral olarak alındığında 8-12 saat içerisinde etki göstermeye başlar. Guta bağlı ağrı ve şişlik önemli ölçüde azalır. Semptomlar genellikle 48-72 saat içerisinde kaybolur. Kolşisin'in yan etkilerinden ötürü, gut hastalığının tedavisinde uzun dönem kullanılması tavsiye edilmez.^{16,18,34,35}

Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF), otozomal resesif geçiş gösteren, tekrarlayıcı nitelikte artrit, plörit, peritonit ve ateş atakları ile karakterize, çoğunlukla 20 yaşından önce başlayan bir hastalıktır.³⁶ FMF, Doğu Akdeniz kökenli insanlar arasında özellikle Museviler, Türkler ve Araplar'da çok sık görülür.³⁷ Hastalığa bağlı ataklar sırasında ateş ile birlikte karında, kaslarda, eklemlerde enflamasyona bağlı şiddetli ağrı atakları görülür.³⁸ Kolşisin Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) hastalığının başlıca ilacıdır. Kolşisin tedavisi ile atakların sayısının % 90 oranında azaldığı gösterilmiştir.³⁹ Kolşisin, FMF ataklarını kontrol etmenin yanı sıra hastalığın önemli komplikasyonlarından amiloidozisi önlemek için de gereklidir.^{40,41} Amiloidozis, FMF dışında kronik enflamatuvar hastalıklarda, romatoid artrit, kistik fibrozis, enflamatuvar barsak hastalığı ve tüberküloz gibi kronik enfeksiyonlarda görülebilen, amiloid isimli maddenin vücut dokularında birikmesidir. Amiloid maddesini kimyasal olarak heterojen en az 15 farklı tipte protein karışımından oluşan mikrofibriller meydana getirir. Farklı hastalıklarda farklı amiloid tipleri birikir. FMF'te gelişen amiloidozis gastrointestinal sistem, adrenal bezler ve en sık da böbreği tutar.^{38,42,43} Kolşisin düzenli kullanıldığında amiloidozisi önler ve renal amiloidozis oluşmuş hastalarda renal fonksiyonları düzeltir. Olguların %95'inde Kolşisin tedavisine olumlu cevap alınır.⁴⁴

İlk defa 1937 yılında Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından tanımlanan Behçet hastalığı, ağızda ve genital bölgede tekrarlayan aftlarla ve oküler belirtilerle karakterize multisistemik bir hastalıktır.^{45,46} Kolşisin, Behçet hastalığında özellikle üveit tedavisinde etki göstermektedir. İmmunosupresif ajanlarla veya kortikosteroidlerle birlikte kullanımı tavsiye edilmektedir.^{7,47}

Sistemik skleroz, cilt ve iç organların fibrozusu ile karakterize, bağ dokusunun sebebi bilinmeyen sistemik otoimmün bir hastalıktır. Kliniğe özgü en belirleyici özelliği cildin fibrozu (skleroderma) olmasına karşın, enflamatuvar, fibrotik ve vasküler değişiklikler gastrointestinal sistem, böbrek, akciğer ve kalp gibi iç organlarda da

görülebilmektedir. Kolşisin sklerodermanın kendisini tedavi etmez ancak, organlarda gelişen komplikasyonların tedavisinde umut vericidir.^{7,48}

Değişik hastalıklar sonucunda karaciğerin fonksiyonlarında bozulmalar meydana gelebilir. Siroz, bu bozulmalar sonucunda karaciğerin potansiyel olarak yaşamı tehdit eder nitelikte geri dönüşümsüz skarlaşmasıdır. Kolşisin karaciğer sirozu tedavisinde antienflamatuar ve antifibrotik etkileri sebebiyle kullanılmaktadır. Karaciğer sirozunda, hastalardaki serum bilirubin ve albumin değerlerini düzeltir ve protrombin oluşum süresini kısaltır.^{49,50,51}

Perikardit kalbi çevreleyen perikart zarının iltihabıdır. Akut perikarditin en sık görülen semptomu keskin ve bıçak saplanır gibi prekordiyal ve retrosternal göğüs ağrısıdır. Ağrı ani veya yavaş gelişebilir, sırt, boyun, sol omuz veya kola yayılabilir, inspirasyon veya hareketle artabilir. Kolşisinle yapılan tedavinin akut perikarditin tekrarlama olasılığını düşürdüğü gözlenmiştir.^{30,52,53}

Sedef hastalığı (psoriyazis), ailesel yatkınlık zemininde çevresel tetikleyici faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan bir deri hastalığıdır. Deri örtüsünün olduğu tüm bölgeleri tutabilir. En fazla tutulan bölgeler diz, dirsek, bel, saçlı deri, genital bölgedir. Hastalığın tam olarak nedeni bilinmediğinden semptomlara yönelik tedavi yapılmaktadır. Kortikosteroidlerle birlikte Kolşisin de Sedef hastalığının tedavisinde bir seçenektir.^{54,55}

Kanser tedavisi amacıyla radyoterapi gören gutlu hastalarda kolşisinin kanser üzerindeki olumlu etkileri bildirilmiştir.⁵⁶ Yapılan sitotoksikite çalışmalarında Kolşisin'in tümör seçiciliğinin olmadığı ve antikanser aktivite gösterdiği doz ile letal doz aralığının oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Bu sebepler Kolşisin'in kanser tedavisinde kullanımını engellemektedir.^{31,57}

Kolşisin sahip olduğu antienflamatuar etkisi sebebiyle birçok cilt rahatsızlığında kullanılmaktadır. Vücuttaki iltihabi durumlara sebep olabilen, çeşitli organları tutan rahatsızlıklarda Kolşisin bir seçenek olarak düşünülmektedir. Şiddetli dermatitlerde, Paget kemik hastalığında, malaryada, retinal hastalıklarda, Eritema nodosum tedavisinde, Sarkoidozda, Sweet sendromunda, tekrarlayan romatizmalarda ve amfizemde Kolşisin ile tedavi kayıtlıdır.^{31,39}

2.3.1.1. Kolşisin'in Farmakokinetiği

Kolşisin'in farmakokinetiğini tübülün proteini ve P-glikoprotein isimli iki protein etkiler. Tübülün proteini Kolşisin'in hücre içi reseptörüdür ve Kolşisin'in kandaki yarılanma ömrünü düzenler. P-glikoprotein ise hücresel taşıyıcı proteindir. Kolşisin'in absorpsiyonu, dokulara dağılımı, safra ve böbrekten eliminasyonunu bu protein aracılığıyla gerçekleştirmektedir. ^{28,58,59}

Kolşisin'in oral alımını takiben gastrointestinal kanaldan hızla absorbe edilir ve 30 ile 90 dakika içinde plazma pik konsantrasyonuna ulaşır. Plazma pik konsantrasyonlarında ve pik süresinde bireyler arası farklılıklar gözlenebilmektedir. Emilim bölgesindeki pH farklılıkları, gastrik doluluk oranı ve gastrointestinal mukozanın çeşitliliği bu farklılıklara sebep olarak gösterilebilir. Kolşisin vücutta lökositlerde, böbrekler, karaciğer ve dalakta yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Plazma proteinlerine % 30 oranında bağlanır. ^{39,28,60}

Kolşisin'in metabolizasyonu karaciğerdeki sitokrom P450, CYP3A4 enzim sistemleri ile olmaktadır. Moleküldeki 3 metoksil grubu karaciğerdeki enzimlerle demetilasyona uğrar. Oluşan major metabolitler 2-demetilkolşisin, 3-demetilkolşisin ve kolşiseindir. Hem Kolşisin'in hem de major metabolitlerinin safrada ve intestinal salgı içinde bulunması bu maddelerin enterohepatik siklusa girdiğini göstermektedir. ⁶¹

Kolşisin kısmen intestinal bariyer tarafından bloklanır. Sağlıklı gönüllülerle yapılan çalışmalarda biyoyararlanımının %45 olduğu saptanmıştır.⁶² Kolşisin çoğunlukla bulantı, kusma ve diyareye sebep olmaktadır, bu da biyoyararlanımı daha da azaltmaktadır. Gastrointestinal yan etkilerden kaçınmak amacıyla intravenöz uygulama da tercih edilebilir. Ancak i.v. uygulamaların da ven sklerozu veya nekroz gibi riskleri bulunmaktadır.⁶³

Oral alındığında Kolşisin'in vücutta dağılım hacmi 7-14 L/kg olarak bulunmuştur.⁶²

Kolşisin ve metabolitleri vücuttan safra kanalı ve böbrek yolları ile atılmaktadır. Safra kanalına giren metabolitlerin büyük bir kısmı enterohepatik siklusa girer. Bu durum Kolşisin'in yüksek dozlarda gastrointestinal sisteme olan yan etkilerini açıklamaktadır. Karaciğer ve böbrek rahatsızlığı olan hastalarda Kolşisin'in eliminasyonu önemli ölçüde değişeceğinden dikkatli kullanılmalı ve dozun ayarlanması iyi yapılmalıdır. ³⁹

Kolşisin'in renal klirensi 4 lt sa⁻¹, total klirensi ise yaklaşık 40 lt sa⁻¹ olarak saptanmıştır. ⁶⁴

2.3.1.2. Kontrendikasyonları ve İlaç etkileşimleri

Kolşisine aşırı duyarlılığı olanlarda, ciddi gastrointestinal, renal, hepatik ve kardiyak rahatsızlığı olanlarda ve kan diskrazileri olanlarda kontrendikedir. ²⁸

Kolşisin'in metabolizasyonunda sitokrom P450 enzimleri etkili olduğundan sitokrom P450 inhibitör ajanlarla (diltiazem, eritromisin, ketokonazol, gestoden, greyfurt suyu) etkileşime girer ve toksisite görülme riski artar. P-glikoproteini inhibe eden ajanların (siklosporin gibi) kolşisinle etkileşime girdiği bildirilmiştir. ²⁸

Kolşisin ilaçların bağırsaktan emilimini değiştirir, bu sebeple kolşisin tedavisi alan hastaların kullandığı diğer ilaçlar göz önünde bulundurulmalı ve doz ayarlaması yapılmalıdır. ³⁹

Alkol ve kolşisin birlikte kullanıldığında gastrointestinal toksisite riski artmaktadır. ⁶³

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlarla birlikte uzun süre kullanımında lökopeni, trombositopeni veya kemik iliği depresyonu riskini arttırabilir. ²⁹

Antineoplastik ve sitolitik ilaçlarla, bumetanid, diazoksit, tiyazit grubu diüretikler, etakrinik asit, furosemid, mekamilamin, pirazinamid veya triamteren serum ürik asit konsantrasyonunu arttırabilir ve proflaktik gut tedavisinin etkinliğini azaltabilir. Bu ilaçlarla Kolşisin'in birlikte kullanımında doz ayarlaması dikkatli yapılmalıdır. ³⁹

Kolşisin bazı ilaçların neden olduğu kan diskrazilerinin, kemik iliği depresanlarının ayrıca radyasyon tedavisinin sonucunda oluşan kemik iliği depresonunun etkisi arttırabilir. ²⁸

Kolşisinin sürekli veya yüksek dozlarda kullanımında B12 vitamininin emilimini azalttığı bilinmektedir. ⁶⁵

2.3.1.3. Veriliş Yolları ve Dozu

Akut gut krizlerinde atak başladığı anda 1-1,2 mg oral olarak başlanır. Daha sonra ağrı geçinceye kadar veya gastrointestinal şikayetler başlayıncaya kadar her 1-2 saatte 0,5-1,2 mg kullanılır. Oral yolla ilaç kullanımından 24-48 saat sonra ağrı ve

iltihaba bağlı semptomlarda düzelme gözlenir. Atak geçtiğinde tedavi kesilir. Gutta profilaktik olarak günde 0,5-1 mg kullanılabilir. Ufak dozlarda sürekli kullanım istenmeyen etkiler oluşmadan akut atakların şiddetini ve sıklığını azaltır.⁶⁶

Ailevi Akdeniz Ateşi ve amiloidoz baskılanmasında, akut ataklarda saatte bir olmak üzere 4 defa 0,5 mg ile başlanır. Daha sonra aynı gün içinde iki saatte bir 2 defa 0,5 mg ile devam edilir. Sonrasında 12 saatte bir 0,5 mg uygulamasıyla iki gün daha tedavi sürdürülür. Profilaktik amaçla gastrointestinal yan etkiler oluşturmuyorsa günde 2 mg'a kadar doz bölünerek verilebilir. Bu hastalarda profilaktik kolşisin tedavisi amiloidozisi önlediğinden tedavinin sürekliliği önemlidir. 5 yaşımdan küçük çocukların tedavisinde günde 0,5 mg, 5 yaşı ve daha büyük çocuklarda ise günde 1 mg doz kullanılır. Çocukların yaşı büyüdükçe kilo-doz ayarlaması da yapılabilir.³⁹

Behçet hastalığında günde 3 defa 0,5 mg kolşisin oral olarak kullanılır.⁶⁷

Kolşisin, intravenöz olarak da kullanılabilir. Etkinin hızlı görülmesi ve gastrointestinal yan etkilerin daha az ortaya çıkmasından dolayı tercih edilebilir. Kolşisin i.v. olarak günde 2 mg olmak üzere 6 saatte bir 1'er mg uygulanacak şekilde yapılır. Oral yoldan 24-48 saat içerisinde cevap alınırken, i.v. uygulama ile 6-12 saat arasında tedaviye cevap alınır.³⁹

2.3.1.4. Uyarılar ve Önlemler

Karaciğer ve böbrek fonksiyonları bozuk olan hastalarda ve ileri yaştaki hastalarda kullanımında dikkatli olunmalıdır, uygun doz ayarlaması yapılmalıdır. Kolşisin yüksek dozlarda gastrointestinal şikayetlere sebep olmaktadır özellikle peptik ülser hastalarında, spastik kolon mevcudiyetinde dikkatli olunmalıdır.^{39,28}

Yapılan bir çalışmada spermatogenezi olumsuz yönde etkilediğı saptandığından uzun süre kullanımında dikkatli olunmalıdır.⁶⁸

Uzun süre tedavi gören hastalarda düzenli kan sayımı yapılmalıdır.⁶⁹

Kolşisin ileum mukozasının fonksiyonunu bozduğundan uzun süre kullanımında geri dönüşümlü olarak B 12 vitaminin yetersiz emilimine sebep olur. Uzun süre kullanımında B 12 vitamin seviyesi takip edilmelidir.⁶⁵

2.3.1.5. Yan Etkiler/Advers Etkiler

En çok görülen yan etkiler gastrointestinal sistemde meydana gelen etkilerdir. Terapötik dozda hafif, maksimum dozda kuvvetli şiddette mide bulantısı, kusma, diyare yapar. Yan etkiler karaciğer ve böbrek yetmezliği olan hastalarda daha şiddetlidir.

Kolşisin tedavisinde kaslar üzerine ve nörolojik yan etkiler de meydana gelebilmektedir. Uzun süre kolşisin kullanımında kollarda, bacaklarda, kalça ve omuz eklemlerinde zayıflık, minör distal duyu bozuklukları, osteotendon refleks kayıpları meydana gelebilir.

Akut tedavilerde hematolojik yan etkiler gelişebilir. Yüksek dozlarda kemik iliği depresyonu, aplastik anemi, agranülositoz ve trombositopeni kaydedilmiştir. Uzun süreli düşük dozlarda adapte kolşisin tedavisinde agranülositoz ve anormal farklı kan sayımı riski genellikle düşer.

Kolşisin kullanımına bağlı olarak alerjik reaksiyonlar görülebilir. En sık rastlanan alerjik reaksiyon ürtikerdir. Ekzema, purpura, kutanöz vaskulit ve kızarıklıklar şeklinde gözlenebilir. Geri dönüşümlü alopesi de kolşisin tedavisi sırasında görülebilmektedir.

FMF hastaları ile yapılan çalışmalarda Kolşisin'in spermatogenezi olumsuz etkilediği ve libidoyu düşürdüğü tespit edilmiştir. Tedavi kesildiğinde bu etkiler ortadan kalkmaktadır.

Kolşisin tedavisi gören hastalarda laboratuvar testlerinde alkalinfosfotaz ve AST değerlerinde artış bildirilmiştir.^{39,28}

2.3.1.6. Hamilelerde ve Emziren Annelerde Kullanımı

Kolşisin ile yapılan hayvan deneylerinde yüksek dozlarda teratojen etkisi olduğu saptanmıştır. Hamilelerde kolşisin tedavisine yarar/zarar oranı hesaplanarak devam edilir. Hamileliğinde kolşisin kullanan hastalarla yapılan çalışmalarda, doğan çocukların gelişiminde herhangi olumsuz bir bulguya rastlanılmamıştır. Emziren annelerin ilacı aldıktan 8 saat sonra emzirmeleri önerilmektedir.³⁹

2.3.1.7. Toksisitesi

Kolşisin düşük güvenlik sınırına sahiptir. 0,5 mg/kg'dan daha düşük dozlarda bile toksik belirtiler gelişirken, 0,8 mg/kg'dan yüksek dozda 72 saat içinde toksisiteye

bağlı ölümler meydana gelebilir. Toksisitede ilk 6 saat içerisinde sindirim sisteminde belirgin etkiler meydana gelir. Şiddetli bulantı, kusmayı takiben şiddetli karın ağrısı ve diyare meydana gelir. Bunu takiben 12-14 saat içerisinde hipotermi, rabdomiyaliz, elektrolit dengesizlik, metabolik asidoz ve konvülsiyonlar oluşur. İlk 36-54 saat içinde kalbe direkt toksik etki gösterir. Aşırı halsizlik, solunum bozukluğu, asfiksi ve dolaşım kollapsı sonucunda ölüm meydana gelir.

İntoksikasyon tedavisi semptomatiktir. Kolşisin'in vücutta dağılım hacmi yüksek olduğundan toksisiteye bağlı ölüm oranı yüksektir. Eğer ilaç alımının üzerinden çok zaman geçmemişse mide içeriği boşaltılır ve şoku önlemek için tedbirler alınır. Hemodiyaliz veya peritoneal diyaliz yapılabilir. Atropin ve morfin meydana gelen şiddetli abdominal ağrıyı kesebilir. Solunum bozukluğunu gidermek amacıyla intübasyon gerekebilir.²⁸

2.3.1.8. Saklama Koşulları

Kolşisin etken maddesini içeren ilaçlar 30 °C'nin altında oda sıcaklığında saklanmalı ve mutlaka ışıktan korunmalıdır.

2.3.2. *In vitro* Çalışmalar

Türkiye'de yetişen *Colchicum* türlerinin yumru ve tohumlarından hazırlanan metanol ekstreleri, Alzheimer hastalığı ile ilgili enzimler olan asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraza (BChE) karşı kolinesteraz inhibitör aktiviteleri yönünden 200 µg ml⁻¹ konsantrasyonda ELISA mikropalak okuyucu kullanılarak araştırılmıştır. Buna ek olarak Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri 2000 µg/ml-1 konsantrasyonda 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) süpürücü aktivitesiyle ölçülmüştür. Asetilkolinesteraza karşı çoğu ekstre aktivite göstermezken, *Colchicum variegatum* (%35.50 ±2.26)'un metanollü ekstresinin orta derecede aktivitesi tespit edilmiştir. *Colchicum crocifolium* (%82.73 ±1.8) ve *C. variegatum* (%67.71 ±2.79) butirilkolinesteraza karşı belirgin bir aktivite göstermiştir. Bunun yanı sıra, bütün ekstrelerin %40'ın altında DPPH süpürücü aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.

In vitro çalışmalarda düşük konsantrasyonlu kolşisinin (0.1 mg/ml) malign lenfoid hücreleri, normal lenfositlere etki etmeden yok edebildiği gözlenmiştir.^{70,71,72,73}

Küçük ve büyük lenfoma hücreleri deneysel ortamda kolşisin ile yok edilirken, reaktif lenf nodlarındaki lenfositler ise dayanmayı başarmıştır. Bu sayede, kolşisin

lenfomanın histolojik tanısında bir araç olarak kullanılabilmiştir. 31 lenfomatöz ve 30 reaktif adenopatinin standart histolojik incelenmesi ile karşılaştırıldığında, kolşisin duyarlılığı > 30% kriteri kullanılarak sadece 1 yalancı-negatif ve iki yalancı -pozitif elde edilmiştir.⁷⁴

Anabilim dalımızda yapılan bir tez çalışması kapsamında *C. baytopiorum* türünün farklı kısımlarından elde edilen metanol ekstraktları üzerinde MTT yöntemi ile K 562 (Kronik miyeloid lösemi hücre serisi) ve HL 60 (Promyeloid lösemi hücre serisi) hücre serilerine karşı sitotoksik aktivite araştırması yapılarak, bitkinin tüm kısımlarının yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.⁷⁵

2.3.3. *In vivo* Çalışmalar

Sıçanlarla yapılan çalışmada, kolşisin Tamm-Horsfall proteininin idrar yoluyla atılmasını azalttığı ve yapısını değiştirerek Bence-Jones proteini ile kompleks oluşturmasını bloke ettiği gözlenmiştir.⁷⁶ Myelom hastalarındaki akut böbrek yetmezliklerinin sebebi bu agregasyondur. Bu umut vaat edici deneysel sonuçlara rağmen, 6 sağlıklı gönüllüdeki serum ve üriner dışındaki Tamm-Horsfall protein seviyeleri 6 günlük kolşisin uygulamasına rağmen etkilenmemiştir.⁷⁷

Kolşisin ve silimarinin karaciğer üzerine etkilerini araştırmak amacıyla karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlara kolşisin veya silimarin tedavisi uygulanmış, çalışma sonucunda her ikisinde kronik karaciğer hasarına karşı benzer hepatoprotektif etkileri olduğu tespit edilmiştir.⁵⁰

CCl₄ ile siroz yapılan sıçanlara 12 ay süresince kolşisin verilmiş ve tüm sıçanlarda siroz doku oluşumunda azalma görülmüştür.²⁸

2.3.4. Klinik Çalışmalar

Kolşisin'in gut tedavisinde kullanılışı 1987 yılında 43 hasta üzerinde yapılmış çift-kör plasebo kontrollü bir çalışma ile onaylanmıştır. 18-30 saat arasında Kolşisin alan hasta grubunda plasebo alan hastalara oranla şikayetlerde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. 24 saat içerisinde Kolşisin kullanan birçok hastada şikayetler geçmeden diyare meydana gelmiştir. Yine de Kolşisin diğer anti-enflamatuvar ilaçlarla kıyaslandığında daha az yan etkiye sahiptir.⁷⁸

Kronik gut artriti olan allopurinol tedavisine başlamış hastalar iki gruba ayrılmış, bir gruba günde iki defa 0.6 mg kolşisin diğer gruba plasebo verilerek 3 ay

süren randomize çift-kör çalışma yapılmıştır. Allopurinol tedavisine ek olarak Kolşisin alan grupta akut gut krizlerinin sıklığının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir.⁷⁹

Çift-kör yapılan bir çalışmada, 10 seçilmiş FMF hastasına Kolşisin ve plasebo uygulanması ile FMF hastalarında Kolşisin tedavisinin etkilerini değerlendirmek amaçlanmıştır. 6 ay periyodunda bir gruba 0.6 mg Kolşisin, diğer gruba ise plasebo günde 3 kez oral yoldan verilmiştir. Kronik kolşisin tedavisi FMF'in acı veren febril nöbetlerini baskılama amacıyla uygulanmaktadır. Plasebo alan gruptaki 9 hastada 59 atak gözlenirken Kolşisin alan grupta bu sayı sadece 2 hastada 5 atak olarak meydana gelmiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak kayda değerdir ($P<0.002$) ve sürekli Kolşisin tedavisinin atakları önlemede etkin olduğunu göstermektedir.⁸⁰

FMF hastası çocuklarda uzun süreli kolşisin tedavisi üzerine yapılan bir çalışmada, 16 yaşından küçük FMF hastası 350 çocuk, 6-13 yıl boyunca sürekli olarak takip edilmiştir. Bu çocuklar oral olarak günde 1-2 mg profilaktik Kolşisin tedavisi görmüştür. Çalışma sonunda çocuklarda febril atakların %64'ü tamamen, %31'i ise kısmen remisyona uğramıştır. Kronik artrit atakları fiilen ortadan kalkmıştır. Kolşisin alan çocukların hiçbirisinde amiloidoz gelişmemiştir. Yan etkiler ise kayda değer değildir, hiçbirisi tedavinin kalıcı olarak kesilmesini gerektirmemiştir. Çocukların büyümeleri, gelişmeleri ve bunu müteakip cinsel gelişimlerinde herhangi bir sorun olmamıştır. Bu sonuçlar FMF'li çocuklarda erken teşhisin Kolşisin tedavisi ile beraber hayat kurtarıcı olduğunu göstermiştir.⁸¹

Kolşisin kullanan ve kullanmayan FMF hastaları ile eşlerinin hamilelik sonuçlarının karşılıklı değerlendirilmesini amaçlayan bir çalışmada, 53 Kolşisin tedavisi gören toplam 60 FMF hastasının eşleri hamilelikleri süresince izlenmiştir. Kontrol grubu olarak ise bu sırada 230 sağlıklı erkekle evli olan sağlıklı kadınlar gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, FMF'in ve FMF hastalarında Kolşisin tedavisinin, konjenital malformasyonu veya abortusların sıklığını arttırmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile FMF hastası olan ve Kolşisin tedavisi alan erkeklerin tedavilerini hamilelik için bırakmalarına gerek olmadığı saptanmıştır.⁸²

Behçet hastalığında Kolşisin'in etkinliğini belirlemek amacıyla, 12 hastaya 2 yıl boyunca günde 1 mg Kolşisin verilmiştir. İlaçların alımından 8-9 ay sonrasında gözde oluşan semptomların 7 hastada ortadan kaybolduğu, hastaların büyük çoğunluğunda ise aftların ve eklem ağrılarının azaldığı bildirilmiştir.⁸³ 157 Behçet hastası ile yapılmış

kontrol grubu olmayan bir çalışmada, hastalara 1 yıl boyunca her gün 1 mg Kolşisin verilmiş, 104 hastada gözde oluşan semptomların belirgin ölçüde azaldığı, oküler gelişim gözlenmiştir.²⁸

84 Behçet hastası (45 erkek/39 kadın) ile yapılan çift-kör plasebo kontrollü bir çalışmada, hastalara plasebo ve kolşisin (1-2 mg/gün vücut ağırlığına göre) verilmiştir. 24 ay süren çalışmada kadın ve erkek hastalar ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Kolşisin kullanan gruplarda, kadın hastalarda genital ülser, eritema nodosum lezyonları ve artritli eklemlerin ortalama sayısında azalma görülürken erkek hastalarda artritli eklemlerin ortalama sayısında azalma gözlenmiştir. Advers etkiler her iki grupta da benzer nitelikte tespit edilmiştir. Kolşisin'in özellikle kadın hastalarda Behçet hastalığının bazı semptomlarının tedavisi edilmesinde faydalı olabileceği gözlenmiştir.¹³

Perikardit tanısı konulmuş Kolşisin tedavisi alan 51 hasta (36 erkek-15 kadın) 10 yıl boyunca izlenmiş, bu hastalarda perikardit tekrarlanmasının büyük ölçüde azaldığı, hastaların şikayetlerinde azalmanın meydana geldiği saptanmıştır. Gastrointestinal yan etkiler dışında başka bir yan etki veya advers etki gözlenmemiştir. Kolşisin'in perikarditin önlenmesindeki mekanizmasının tam belirlenememesine rağmen özellikle idiyopatik perikarditin tedavisinde etkili olduğu saptanmıştır.⁵³

Çok-merkezli, çift-kör bir çalışmada akut perikarditi olan 240 yetişkin hasta 120'şer rastgele iki gruba ayrılmış, bir grup Kolşisin (0.5 mg/gün BID >70 kg, 0.5 mg/gün günde 1 kez <70kg) diğer grup ise plasebo ile buna ek olarak aspirin ve ibuprofen içeren konvansiyonel antienflamatuar tedaviye tabi tutulmuşlardır. Kolşisin grubunda 20 hastada belirgin iyileşme gözlenirken (%16.7), diğer grupta 45 hastada (%37.5) gözlenmiştir. Kolşisin 72 saatte semptomların görülme sürekliliğini ve tekrarlama sayılarını, hastaneye yatırılma sayılarını düşürmüştür. Kolşisin aynı zamanda remisyon oranını da 1 hafta içinde yükseltmiştir. Yan etki sayıları iki grupta da aynı seviyede gözlenmiştir. Çalışma sonunda, akut perikarditli hastalarda Kolşisinin konvansiyonel antienflamatuar tedaviye ek olarak kullanılması perikarditin sürekli ve tekrarlayan ataklarını gözle görülür biçimde azalttığı saptanmıştır.⁸⁴

Sistemik sklerozun kolşisin ile tedavisindeki ilk yayın 1967 yılında yapılmıştır. Housset trimetil kolşisinik asidi kullanarak sklerodermal plaklı 3 hastada 15 gün sonunda, yeni başlamış akrosklerozu olan 9 hastada 1 ay sonucunda deri infiltrasyonunu gözle görülür derecede azaltmayı başarmıştır.²⁸

14 hastanın 6 ay boyunca plaseboya karşı günde 1 mg kolşisin aldığı çift-kör, randomize cross-over deneyde 9 hasta tedavi altında klinik kriterlere göre iyileşme göstermiştir. Bu iyileşme ileriki dönemde de devam etmiştir. Histolojik değerlendirmede 6 hastada cilt kollajen içeriğinin azaldığı gözlenmiştir. Serumdaki prolin konsantrasyonu düşmüş, hidroksipirolin konsantrasyonu artmış, bu da kollajen yıkımının hızlandığına işaret etmiştir.²⁸

22 psoriazisli hasta 2-4 ay boyunca günde 0.02 mg/kg/gün Kolşisin ile oral yoldan tedavi edilmiştir. Lezyonun baskın özelliği ince papüller ve ince plaklardan oluşan 9 hastadan 8'inde iyileşme gözlenmiştir. Diğer kalın plak tipi, kronik, stabil lezyonlu hastalarda daha yetersiz sonuçlar elde edilmiştir. Buna rağmen pullanmada, eritemde, yayılmada ve kaşıntıda azalma tüm hastalarda gözlenmiştir. Artraljiden muzdarip 8 hastanın her birinde eklem ağrılarında kayda değer azalma gözlenmiştir. 5 kronik stabil plaklı hastada, Goeckerman metodu veya metotreksat ile cilt temizliği yapıldıktan sonra oral kolşisin tedavisine başlanmıştır. Bunların 4'ü 8-9 ay boyunca kolşisin almaya devam etmiştir ve bu süreç boyunca hastalık ciltte gözlenmemiştir.⁵⁴

Psoriazisli hastalarla yapılan bir çalışmada günde bir sefer %1 lik kolşisinin hidrofilik merhem formunun 6-12 hafta boyunca uygulanması ciltteki plaklarda (özellikle gövde) kayda değer iyileşme sağlamıştır. 0.25% ve 0.50% lik konsantrasyonlarda da etkili olduğu gözlenmiştir. Topikal uygulanan Kolşisin, diğer tedavi seçenekleri başarısız olduğu takdirde lokalize kalın plaklı psoriaziste faydalı bir seçenek olabilmektedir.⁵⁵

Bazı antienflamatuvar ajanların diyabet tedavisinde etkisinin araştırıldığı bir çalışmada insüline bağımlı olmayan diyabet hastaları günde 3 defa 0,5 mg Kolşisin ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonucunda hastalarda hem açlık hem tokluk kan şekeri seviyesinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Tedavi esnasında herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. Bu çalışma ile Kolşisin'in diyabet tedavisinde kullanıp kullanılmayacağı tartışılmıştır.⁸⁵

İnsüline bağımlı olmayan 12 diyabet hastası ile yapılan bir çalışmada , hastalara önce 15 gün plasebo uygulanmış ardından 15 gün boyunca günde 1,5 mg dozda Kolşisin verilmiştir. Herhangi özel bir diyet uygulaması olmayan hastaların, kan şeker seviyelerinde düşme görülmüştür. Kan şeker seviyesindeki bu düşmenin, prostaglandin seviyesinin azalması ya da immün sistemin düzene girmesi ile ilgili olabileceği

düşünülmüştür. Çalışma sonucunda Kolşisin'in insülin sekresyonunu üzerindeki etkilerinin saptanması için daha detaylı çalışmalara gereksinim olduğu belirtilmektedir.²⁸

Antienflamatuar etkili ajanların Alzheimer hastalığında etkisinin araştırıldığı bir pilot çalışmada 20 Alzheimer hastasına, 11 hafta süresince günde iki defa 200 mg hidrosiklorokin ve 12 hafta süresince 200 mg hidrosiklorokin 0,6 mg kolşisin ile birlikte günde iki defa verilmiştir. Hastalar yan etkiler ve davranış açısından gözlenmiştir. İki grupta da belirgin bir yan etki gözlenmemiş ancak hidrosiklorokin ve kolşisini birarada kullanan gruptaki iki hastada diyare meydana geldiği görülmüştür. Çalışma sonucunda bu iki ajanın Alzheimer hastaları tarafından iyi tolere edilebildiği saptanmıştır.⁸⁶

Yaş aralığı 25-89 olan 16 kronik idiyopatik konstipasyon hastası ile yapılan plasebo kontrollü çift kör bir çalışmada hastalara 4 hafta boyunca günde 3 defa 0,6 mg kolşisin verilmiştir. Hastaların barsak hareketlerinin günlük sayısı ve günlük bulantı karın ağrısı, şişkinlik sayıları kaydedilmiştir. Plasebo ve Kolşisin alan her iki grup arasında şişkinlik ve bulantı sayıları arasında kayda değer bir fark görülmemiştir. Kolşisin alan grupta, plasebo alan gruba nazaran karın ağrıları daha sık gözlenmiş, ancak tedavinin son haftasında karın ağrılarının azaldığı kaydedilmiştir. Çalışma sonunda Kolşisin alan hasta grubunun bağırsak hareketliliğinin arttığı ve kolon geçişinin hızlandığı tespit edilmiştir.⁸⁷

1952 ve 1955 yılında yapılan 2 yayın bugün bize Hodgkin'de kolşisin kullanımı hakkında yol göstermektedir. Başarısız tedavi denemeleri sonucunda (kortizon, radyoterapi, azotlu hardal) ilerlemiş 2 vakada 3 gün boyunca 3 mg kolşisin her gün I.V. yoldan uygulanmıştır. Hastaların genel durumlarında düzelme, adenopatilerde geçici olarak gerileme ve ateş ve ağrının ortadan kalkması gözlenmiştir.²⁸

14 refrakter kronik lenfositik lösemili hastaya her hafta intravenöz kolşisin verilmiştir. Doz başlangıçta 2-3 mg ile başlanıp, tümör regresyonu veya yan etki azalması görülene dek 1 mg/hafta olarak artırılmıştır. 2 hastada adenopati ve splenomegali gerilemiştir ve 7 hastada hastalık stabilize olmuştur. Farklı sonuçlar ve sık gözüken yan etkiler bu bağlamda kolşisinin kullanımını sınırlı kılmıştır.²⁸

2.3.5. Kolşisin'in Etki Mekanizması

Kolşisin birçok etki mekanizmasına sahiptir. Bunlardan bir kısmı aydınlatılmış olsa da halen bu kompleks mekanizmalar üzerine olan araştırmalar devam etmektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde tam olarak etkisinin nasıl gösterdiği açıklanamamasına rağmen başarıyla kullanılmaktadır.⁷⁵

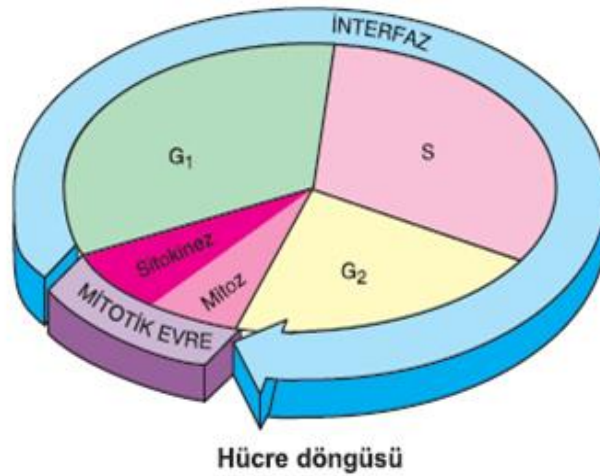
Genel olarak yapılan çalışmalarda Kolşisin'in tübülün-mikrotübül dengesini bozduğu ileri sürülmektedir. Kolşisin hücre bölünmesi sırasında tübülün inhibisyonu sonucunda mitozu bloke eder.^{10,88}

Hücre yaşam döngüsü

Çoğu hücrede, hücre bölünmesi dört farklı aşamadan meydana gelmektedir. Bu evreler sırası ile G1, S, G2 ve M olarak adlandırılmaktadır, ek olarak gerekli hücre dışı sinyalleri almadıkları için bölünmeyen hücrelerin bulunduğu faz ise G0 (hareketsiz faz) olarak adlandırılmaktadır. G1, S ve G2 evrelerinde mitoz için gerekli hazırlıklar yapılır, M ise bölünmenin gerçekleştiği evredir.⁸⁹

Mitoz bölünme evrelerinde hücrede gerçekleşen değişimler

G1 evresi Metabolizma açısından aktif olan hücre, hacimce büyür. S evresi Deoksiribonükleik asitin kopyalanması, replikasyonu gerçekleşir. G2 evresi Mitoz için gerekli olan proteinler sentezlenir ve hücre büyümesi gerçekleşir. M evresi hücrenin bölünerek iki eş yavru hücre oluşturduğu evredir.⁸⁹

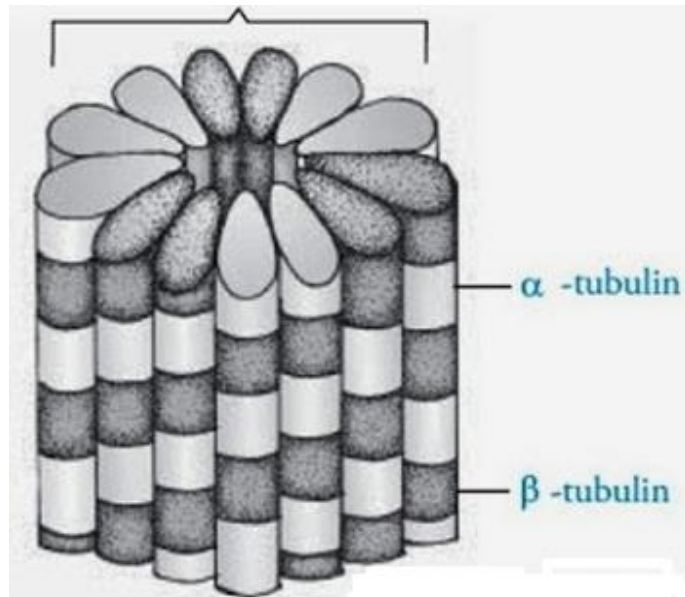


Şekil 2-18: Hücre döngüsü

Tübülün, mikrotübüllerin esas yapısal bileşeni olup mikrotübüllere bağlı proteinlerle bir araya gelerek mikrotübülleri oluşturur. Polar karakterde olan mikrotübüller, hücre ile ilgili birçok önemli fonksiyonda (mitozda kromozom ayrılması, hücre şeklinin korunması, hareket ve organellerin hücre içi taşınması gibi) rol oynar. Mitoz bölünme süresince kromozomlar bu mikrotübüllerin sayesinde bölünür. Serbest tübülün, bir $\alpha\beta$ dimeri olarak bulunur.⁹⁰

Kolşisin mitoz sırasında tübüline bağlanarak bunların polimerizasyonunu ve mikrotübüllerde toplanmasını engeller. Bunun sonucunda mikrotübüllerin sayısı azalır ve tübülün mRNA'sının sentezi durmuş olur. Böylece Kolşisin, mitozu metafaz safhasında durdurarak hücrenin ölümüne sebep olur. Bu etkisi sebebiyle Kolşisin üzerinde antikanser ajan olarak pek çok araştırma yapılmış ve bu araştırmalar sonunda Kolşisinin tümör seçiciliğinin olmadığı görülmüştür. Kolşisin türevleri olan diğer tropolon alkaloitleri üzerinde de araştırmalar devam etmiştir. Kolşisin gibi etki gösteren ancak toksisitesi daha az olan Demekolsin, kronik miyeloid lösemi ve malign lenfomada kullanılmaktadır.^{11,91}

Antimitotik etki gösteren antikanser ajanların tübülünlere bağlanma bölgeleri farklılık göstermektedir. Kolşisinin bağlanma bölgesi α/β ara yüzeyine yakındır. Vinca alkaloitleri kolşisine benzer bölgeden bağlanırken, Taksanların tübülünle etkileşimleri ise başka bir bölgeden β yüzünden bağlanarak olmaktadır.⁸⁸



Şekil 2-19: Mikrotübüllerin görünümü

Kolşisin ayrıca lökositler üzerine de etki etmektedir. Lökositler kemotaksizi üzerinde güçlü inhibitör etki yapar, sitokin üretimini düzenler. Antienflamatuar etkisinin bu etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.²⁹

2.4. Kanser ve Tedavisinde Kullanılan Doğal Kaynaklı Maddeler

2.4.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite

İlaç geliştirme çalışmalarında yeni moleküller için yapılan çalışmaların başında sitotoksosite çalışmaları gelmektedir. Molekülün toksisitesinin belirlenmesi ilaca dönüşmesindeki en önemli aşamalardan biridir.

Hücre kültürü yöntemi ile hem hayvan deneylerinin azaltılması; hem de sistemlere yönelik özel etkilerin moleküler düzeyde anlaşılması sağlanmaktadır. Bu sebeple günümüzde hücre kültürü çalışmaları sıklıkla tercih edilmektedir.⁹² Genellikle hücre canlılığı 96 kuyucuklu mikrolaklara ekilen hücre kültürlerinin, geliştirilen protokollerle, kolorimetrik yöntemler yardımıyla ELISA mikrolak okuyucu ile ölçülmektedir.

Hücre kültürü yöntemlerinde uygulanan maddenin sitotoksik olup olmadığı, hücresel tutunmaya engel olması, hücrenin membran bütünlüğünü bozması, hücre çoğalma hızını azaltması ya da hücre ölümü ile değerlendirilir. Hücre canlılığı maddenin sitotoksitesisi ile ters orantılıdır.⁹³ Sitotoksiteyi uygulanan maddenin veya maddelerin kimyasal yapısı, uygulanma süresi ve hücreyi öldürme mekanizması önemli ölçüde etkiler. Kanser tedavisinde primer nekroza neden olan maddeler tedavide fazla tercih edilmezken, apoptozise neden olan maddeler tedavide daha fazla tercih edilir.⁹⁴

Maddelerin sitotoksitelerinin ölçülebilmesi için çeşitli testler geliştirilmiştir. MTT, LDH, XTT, SRB, ATP, WST-1 bu testlerden yaygın olarak kullanılanlardır. MTT, XTT ve WST-1 testlerinde hücre içinde var olan mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesini ölçülmesi ile hücre canlılığı tespit edilir.

Hücre içerisindeki ATP miktarının ölçülmesi ile hücre proliferasyonu tayin edilebilir, proliferen hücrelerde ATP biyoyışımındaki (bioluminesans) artış, yeni DNA zinciri sentezleyen proliferen hücreler tarafından kullanılan ³H timidin miktarı ile korelasyon göstermektedir. Işımanın (luminesans) düzeyi ölçüldüğünde, bu düzey hücredeki ATP miktarı ile paralellik gösterecektir.⁸⁹

LDH yöntemi, hücre lizisi ya da hücre membranının hasar görmesi sonucunda açığa çıkan laktat dehidrojenaz (LDH) enziminin aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır.⁹⁵ SRB yönteminde ise hücre içi protein miktarının ölçülmesi esasına dayalı bir sitotoksosite yöntemidir.⁹⁶

2.4.2. Kanserli Hücre Yapısı

Hücre döngüsünü düzenleyen sistemlerin pek çok bileşeninin kanserle bağlantısı olduğundan kanser, bir hücre döngüsü düzensizlik hastalığı olarak da tanımlanabilir.⁹⁷

Normal gelişme ve yetişkinlik dönemi boyunca karmaşık genetik kontrol sistemleri büyüme sinyallerini, büyüme engelleyici sinyalleri ve ölüm sinyallerine yanıt olarak hücre oluşumu ve hücre ölümü arasındaki dengeyi düzenler. Bazı yetişkin dokularında, hücre çoğalması sürekli meydana gelirken (bağırsak epitel hücreleri, beyaz kan hücreleri, deri hücreleri) bazı yetişkin dokularında hücre çoğalması meydana gelmez ve hücreler organizmanın tüm yaşam süresi boyunca işlevsel kalabilir. Bu normal büyüme oranlarını kontrol altında tutan mekanizmalarda ortaya çıkan sorunlar aşırı hücre bölünmesine sebep olabilir ve böylece aşırı çoğalan hücrelerle kanser meydana gelir.⁹⁰

Karsinogenez süresince altı temel hücresel özellik değişir.

- Büyüme sinyalleri bakımından kendi kendine yeterlilik
- Sürekli anjiyogenez
- Dokunun istilası ve metastaz
- Sınırsız replikasyon potansiyeli
- Apoptozdan kaçma
- Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık

Tümörlerin benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olarak isimlendirilen 2 çeşidi bulunmaktadır⁹⁸. Benign tümörler iyi huylu tümörlerdir, kaynaklandıkları normal hücrelere çok benzemekte ve normal hücrelere oranla fonksiyonel yeteneğinin daha fazla kalması olarak tanımlanan iyi diferansiye hücrelerden meydana gelmektedir. Bu çeşit tümörlerde mutasyon az görülmektedir. Bu hücreler genellikle yavaş büyürler ve metastaz yapmazlar.

Malign tümörler ise, kötü huylu tümörler olarak adlandırılırlar, iyi diferansiye hücrelerden, tamamen diferansiyasyon kaybı olan hücreler arasında değişim gösteren parankim hücre diferansiyasyonu ile tanımlanmaktadır. Genellikle mutasyonlar fazla görülmektedir ve metastaz yaygındır. Kanseri olarak tanımlananlar genellikle malign tümörlerdir^{90,98}.

2.4.3. Kanserde Kolşisin

Mikrotübül sistemi, hücrelerin mitoz bölünmesinde önemli olması nedeni ile anti-kanser terapötik ajanların geliştirilmesinde hedef olarak kullanılmaktadır⁹⁹. Bu anti-mitotik ajanlar, mikrotübül oluşumunu engelleyen (vinka alkaloidleri, kolşisin vs.) ve teşvik eden (taksoidler ve epotilon) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kolşisin mikrotübül oluşumunu engelleyen anti-mitotik bir ajan olmasına rağmen, çok toksik olması nedeni ile onkolojide kullanılması tercih edilmemektedir.¹⁰⁰ Fakat *Colchicum* türlerinden elde edilen bazı alkaloidler kanser tedavisinde kullanılabilmektedir. Örneğin, kronik miyeloid lösemi, deri kanseri ve malign lenfoma tedavisinde demekolsin kullanılmaktadır. Ayrıca topolon alkaloidlerinden *N*-deasetilkolşisin ve trimetil kolşisinik asit de kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Kolşisin bazı durumlarda kanser tedavisinde etkili olabilmektedir. Gutlu hastalarda kanser tedavisi için radyoterapi ile beraber kolşisin de verilmiştir ve olumlu etki gözlenmiştir. Meme kanseri olan hastalarda radyoterapi ve cerrahi girişim uygulanmıştır. Ardından kolşisin uygulaması yapılmıştır ve kolşisin almamış olan hastalara oranla daha iyi durumda oldukları izlenmiştir.^{28,75,91}

2.4.4. Kanseri

Kanser toplumda kardiyovasküler sistem hastalıklarının ardından gelen en önemli ölüm sebeplerindendir. Dünya’da her yıl 100.000 kişiden 100-350’si kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde yıllık ölümlerin yaklaşık 5’te biri kanser nedeniyledir. Çoğalan hücrenin kaynağına, tipine ve oluştuğu organa göre kanserin çeşitli şekilleri vardır.

Kanser tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi tedavide en çok kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem olan kemoterapi, hastalığın yayılmasını önlemek açısından umut vericidir. Çünkü kemoterapötik ilaçlar, yeni hücre oluşturmak üzere bölünen hücrelere etki eder. Antineoplastik ilaçlarla tedavinin ana ilkesi hastanın

normal hücrelerine zarar vermeksizin tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse yok etmektir. Burada önemli olan nokta, antineoplastik ajanların kanserli hücreleri öldürürken aynı zamanda normal hücrelere de zarar verip vermemesidir. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan selektiviteleri, antibiyotiklerin bakteri hücresine karşı olan selektivitelerinden daha azdır. Kanserli hücreler ile sağlıklı hücreler arasında çok küçük farklar vardır. Biyolojik ve kimyasal yapıları çok benzer olan bu hücreler, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma mekanizmalarının bozunması ile ayrılırlar. Bu antineoplastik ajanlar, vücutta patolojik bir şekilde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi hızlı çoğalan normal hücreleri de (embriyo ve fetüs hücreleri, bağırsak ve ağız mukozası epiteli, kemik iliği hücreleri gibi) yok edebilirler. Kemoterapötik ilaçlarla tedavide belirli periyotlarda tedaviye ara verilir ve böylece normal hücrelerin kendini yenilemesi sağlanır ve bu şekilde pratikte kemoterapinin güvenilirliği sağlanmış olur.^{11,75}

Kanser hücreleri ve normal hücreler arasındaki her fark araştırmacıları, bu farklılıklara yönelik özel ilaçlar keşfetmeye yöneltmiştir. Kanser hücrelerini öldürmeye yönelik tedaviler geliştirmek ya da en azından kanser hücrelerinin kontrolsüz üremesini durdurmayı sağlayan maddelerin bulunması amaçlanmaktadır.

2.4.5. Kanser Tedavisinde Kullanılan Doğal Kaynaklı Maddeler

Kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların bulunmasına yönelik çalışmalarda bitkilerin oldukça önemli bir rolü vardır. Bugün kanser tedavisinde kullanılan maddelerin yarısından fazlası doğal maddelerden veya doğal maddeler örnek alınarak sentezlenmiş maddelerden oluşmaktadır.¹⁰¹

Bitkilerden elde edilen ve kanser tedavisinde sık kullanılan maddeler aşağıda Tablo 2-10’da verilmiştir.

Tablo 2-10: Kanser tedavisinde kullanılan doğal maddeler

Maddeler	Elde edildiği bitki	Etki Mekanizması	Etkili Olduğu Kanser Hücresi
Taksol	<i>Taxus brevifolia</i> , <i>Taxus bacata</i>	Antimitotik	Akciğer, Meme, Ovaryum, Prostat Kanseri
Vinkristin, Vinblastin	<i>Catharanthus roseus</i>	Antimitotik	Lösemi, Mesane Kanseri, Testiküler Kanser, Hodgkin
Kolşisin	<i>Colchicum autumnale</i> <i>Gloriosa superba</i>	Antimitotik	Lösemi, Hodgkin, Cilt Kanseri
Podofillotoksin’den hareketle sentezlenen: etoposid ve teniposid	<i>Podophyllum peltatum</i> <i>Podophyllum emodi</i>	Antimitotik, DNA topoizomaz II enzim inhibisyonu	Lösemi, Akciğer ve Testis Kanseri
Kamptotesin	<i>Camptotheca acuminata</i>	DNA topoizomaz enzimini inhibisyonu	Ovaryum, Kolon ve Rektum Kanseri
Steganacin	<i>Steganotaenia araliace</i>	Antimitotik	Lösemi
Kombrestatin A 4	<i>Combretum caffrum</i>	Tubulin mekanizmasına etki	Faz II çalışma aşamasında
Kürkümin	<i>Curcuma longa</i>	Bilinmiyor	Kolon ve Rektum Kanseri Faz II çalışma aşamasında

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Colchicum micranthum Tuzla Akfırat Köy yolundan 05.10.2014 (ISTE 103638) ve 10.05.2015 (ISTE 106891) tarihlerinde olmak üzere farklı tarihlerde toplanmıştır.

Colchicum chalcedonicum Maltepe Süreyya Paşa Hastanesi C blok bahçesinden tohumlu olduğu dönemde 05.04.2014 (ISTE 103636) tarihinde ve çiçekli olduğu dönemde 26.09.2014 (ISTE 103637) tarihinde toplandı. Kurutulmuş bitki örnekleri İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır.

Her iki türün de toprakaltı ve topraküstü kısımları birbirinden ayrıldı ve önce oda ısısında, sonra 60 °C ye ısıtılmış havalı etüvde kurutuldu, ardından ince toz edildi. Sonbaharda ve ilkbaharda toplanmış olan yumrular ayrı ayrı çalışıldı. *Colchicum chalcedonicum* türünün tohumları yeterli miktarda toplanabilirken, *Colchicum micranthum* türünden yeterince tohum bulunamadığından bu türün tohumları üzerinde çalışma yapılamamıştır.

3.2. Genel Metodlar

3.2.1. Fitokimyasal Ön Denemeler

5 g kaba toz edilmiş materyal üzerine 100 ml sıcak su konuldu ve karışım 5 dk sıcak su banyosunda tutuldu, soğuduktan sonra süzüldü. Hazırlanan infüzyonda flavon, antrasen, saponin, alkaloit ve tanen türevleri arandı.

3.2.1.1. Alkaloit Aranması

1 g toz edilmiş numune, 10 ml % 3'lük H₂SO₄ çözeltisiyle bir müddet ısıtılarak tüketildi. Soğuduktan sonra süzüldü. Süzüntü 5 ml % 10'luk amonyak çözeltisiyle kalevilendirildi ve ayırma hunisinde 10 ml eterle tüketildi. Eterli çözelti su banyosu üzerinde yoğunlaştırıldı. Bakiye 10 ml % 3'lük H₂SO₄ ile çözüldü. Bu asitli çözeltide alkaloit teşhisi özel belirteçlerle yapıldı.

- Bouchardat Belirteci : Esmer- kırmızı çökelek
- Dragendorff Belirteci : Turuncu-kırmızı çökelek
- Mayer Belirteci : Süt rengi çökelek

oluşup oluşmadığı gözlendi.

3.2.1.2. Flavon Türevlerinin Aranması

5 ml infüzyon üzerine 5 ml hidroklorik asitli etanol (Shibata belirteci: 1k derişik hidroklorik asit + 1k su + 1k etanol) ve birkaç parça magnezyum talaşı ilave edildi. Pembe, turuncu veya mor bir rengin meydana gelip gelmediğı gözlemlendi. (Shibata Reaksiyonu= Siyanidin Reaksiyonu)

3.2.1.3. Antrasen Türevlerinin Aranması

10 ml infüzyon üzerine 5 damla derişik sülfürik asit ilave edildi. Karışım 15 dakika sıcak su banyosunda tutuldu ve bu şekilde glikozitler hidroliz edildi. Karışım soğuduktan sonra 5 ml tolüen ile çalkalandı. Tolüenli tabaka bir pipet yardımı ile başka bir tübe aktarıldı ve üzerine 3 ml % 10' luk amonyak çözeltisi ilave edildi. Pembe-kırmızı bir rengin meydana gelip gelmediğı gözlemlendi.

3.2.1.4. Saponin Aranması

10 ml infüzyon bir deney tübüne konuldu. Tüp baş parmak ile sıkıca kapatılıp yatay olarak 30 saniye kuvvetle çalkalandı ve 15 dakika dinlenmeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüpte en az 1 cm yüksekliğinde kalıcı köpük oluşup oluşmadığına bakıldı.

3.2.1.5. Tanen Bileşiklerinin Aranması

10 ml infüzyon üzerine 2 ml tuzlu jelatin çözeltisi (sodyum klorür ile doyurulmuş % 1' lik jelatin çözeltisi) ilave edildi. Krem renkli bir çökeltinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

Gallik ve kateşik tanenin ayrılması : 5 ml infüzyon üzerine 3 damla % 5' lik demir-III-klorür çözeltisi ilave edildi. Mavi siyah (gallik tanen) veya esmer zeytin yeşili (kateşik tanen) rengin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

Gallik ve Kateşik Tanenlerin Birlikte Bulundukları Durumlarda Ayrılması: 10ml infüzyon üzerine 5 ml klorhidrik asitli formol (Stiasny Belirteci) (%30 formol 100ml + derişik klorhidrik asit 50 ml) konulmuş ve karışım 80 °C civarında ısıtılmış su banyosunda 30 dk. bekletilmiştir. Parçalar halinde bir çökelek (kateşik tanen) oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Karışım tamamen soğuduktan sonra berrak olarak süzölmüştür. Süzöntüden 3 ml alınıp sodyum asetat ilavesiyle doyurulmuştur. Doymuş çözelti üzerine 3 damla seyreltik demir-III-klorür çözeltisi ilave edilip mavi-siyah bir renk veya çökeltinin (gallik tanen) oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

3.2.2. Ekstraksiyon Metodu

İnce toz haline getirilen kurutulmuş bitkisel materyal toprakaltı (yumru), topraküstü kısım (çiçek-çiçek sapı) ve tohum olmak üzere kısımlarına ayrılmıştır. Her iki bitkiden ayrılan bitkinin farklı kısımları ayrı ayrı Soxhlet cihazında metanol ile tüketilmiştir. Ancak tohumlar metanol ile tüketilmeden önce, yağlı maddelerinden kurtarılacak amacıyla Soxhlet cihazında petrol eteri ile tüketilmiştir. Elde edilen metanol ekstraktları alçak baskıda rotavaporu, 35-40°C de yoğunlaştırıldı.

Elde edilen metanol ekstraktlarına ait kodlar aşağıdaki Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Metanol ekstraktlarına ait kodlar

<u><i>Colchicum chalconicum</i></u>	<u><i>Colchicum micranthum</i></u>
Yumru (İlkbahar).....Chal.Yi.	Yumru (İlkbahar).....Mic.Yi.
Yumru (Sonbahar).....Chal.Ys.	Yumru(Sonbahar).....Mic.Ys.
Tohum.....Chal.T.	-
Çiçek.....Chal.Ç.	Çiçek.....Mic.Ç.

3.2.3. Alkaloid Tüketilmesi Metodu

Hazırlanan metanol ekstresi su ile alındı ve süzöldü. Süzöntünün pH’sı % 3’lük H₂SO₄ ile pH=3-4’ e ayarlandı ve ayırma hunisinde kloroformla tüketildi (Kloroformla tüketme işlemleri Dragendorff Belirteci ile kontrol edilerek sonlandırıldı). Kloroformlu kısım susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarıldıktan sonra süzöldü ve alçak baskıda 35-40 °C de yoğunlaştırıldı. Böylece **nötral-fenolik ekstre (A ekstresi)** elde edildi.

Sulu asitli kısmın pH sı % 10’luk NH₄OH çözeltisi ile pH=8-9’a ayarlandı ve ayırma huniinde yeniden kloroformla tüketildi. Kloroformlu kısmın sodyum sülfat ile suyu alındı, süzöldü ve alçak baskıda 35-40°C’de yoğunlaştırıldı. **Bazik ekstre (B ekstresi)** elde edildi.

Kalan sulu bazik kısım nötralleştirildi ve bu defa kloroform:metanol (4:1) ile tüketildi. Kloroform:metanol (4:1) kısmı sodyum sülfat ile muamele edilip süzüldü, 35-40 °C de alçak baskıda yoğunlaştırıldı. Bu tüketme sonucunda ise **glikozidik ekstre (C ekstresi)** elde edildi.

Çalışma süresince elde edilen tüm ekstreler mümkün olduğunca ışıktan korundu.

Her iki bitkinin farklı kısımlarından elde edilen bu alkaloid ekstrelerinden miktarlarının daha fazla olması sebebiyle yalnızca A ekstreleri üzerinde izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen A ekstrelerine verilen kodlar:

Colchicum micranthum

- Yumru (İlkbahar).....Mic.Yi.-A
- Yumru (Sonbahar).....Mic.Ys.-A
- Çiçek.....Mic.Ç.-A

Colchicum chalcedonicum

- Yumru (İlkbahar).....Chal.Yi.-A
- Yumru (Sonbahar).....Chal.Ys.-A
- Tohum.....Chal.T.-A
- Çiçek.....Chal.Ç.-A

3.2.4. Kromatografik Metodlar

3.2.4.1. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Hazır Plaklar: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 0.5554)

İzolasyon çalışmalarında kullanılan çözücü sistemleri ve oranları aşağıdaki Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan Çözücü Sistemleri ve Oranları

No	Çözücü Sistemi	Çözücü Oranları
1	Toluen:Etilasetat:Dietilamin:Metanol	50:40:10:8
2	Kloroform:Aseton: Dietilamin	5:4:1
3	Kloroform:Aseton: %25 NH ₄ OH	50:50:1
4	Kloroform:Aseton:Dietilamin:Metanol	11:8:2:3
5	Toluen:Etilasetat:Dietilamin	5:4:1
6	Kloroform:Etilasetat:Etanol	2:7:1
7	Etilasetat:İzopropanol:%25NH ₄ OH	85:15:5
8	Toluen:Kloroform:Metanol	7:2:1
9	Kloroform: Aseton:Dietilamin	8:2:1

Kullanılan Belirteçler:

Carr-Price Belirteci: 25 g antimon triklorür, 75 g kloroform içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

Dragendorff Belirteci:

Çözelti A: 0.85 g bazik bizmut nitrat ın 10 ml asetik asit ve 40 ml sudaki çözeltisi

Çözelti B: 8 g potasyum iyodürün 20 ml sudaki çözeltisi

Stok Çözelti: A ve B çözeltilerinden eşit hacimde alınarak karıştırıldı. 10 ml stok çözelti, 20 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml distile su ile karıştırıldı.

3.2.4.2. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Hazır Plaklar: Kieselgel 60 F254 (Merck 0.5554)

PLC Silikajel 60 F254 0,5 mm (Merck 0.5744)

Uygulanması: Tablo 3-2’de yer alan çözücü sistemlerinden en uygun olan çözücü sistemi seçilerek preparatif İTK yapıldı. Sürüklemeye işlemi tamamlandı plak tanktan çıkartıldı ve çeker ocak altında kurutuldu. Oluşan bantlar UV ışık altında incelendi. Bantların yerinin tam olarak belirlenememesi durumunda plak boyunca ince bir kısma alkaloit belirteçleri püskürtüldü.

Plaktan kazınarak alınan bantlar Pasteur pipetlerinden veya 2 cm çapında kısa sütunlara konularak kloroform-metanol karışımının değişen oranları ile elüe edildi. Elüatlar, filtre kağıdından veya pamuktan süzüldü, alçak baskıda kuruluğa kadar uçuruldu, kalan bakiye uygun bir çözücü veya çözücü karışımında çözüldü, tekrar süzülerek ufak şişelere aktarıldı.

Çözücüler plaklarda yaklaşık olarak 12-18 cm arasında yükseltildi ve oda sıcaklığında çalışıldı. Maddeler kloroformdaki çözeltileri halinde ve optimum konsantrasyonda tatbik edildi.

3.2.4.3. Sütun Kromatografisi

Yaş usülde silikajel sütun hazırlandı. Adsorban olarak Kieselgel 60, 0,063-0,200mm 70-230mesh., ASTM (Merck) kullanıldı.

Silikajel kloroform ile karıştırılıp süspansiyon haline getirildi. Bu süspansiyon, altına kloroform ile ıslatılmış pamuk konulmuş ve içinde 2 cm yüksekliğinde kloroform bulunan cam sütuna içinde hiç hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek döküldü. Süspansiyonun sütuna aktarılması sırasında, sütunun musluğu eşit aralıklarla damlar durumunda tutuldu ve silikajelin iyice yerleşmesi için bir gece bekletildi. Ekstre kloroformda çözündürülerek kolona tatbik edildi. Kolonun kurumamasına özen gösterilerek ve mümkün olduğunca ışıktan korunarak çalışıldı. Polariteyi arttırarak elüsyona devam edildi. En sonunda kolon %100 metanol ile yıkandı.

3.2.4.4. KFE (Katı Faz Ekstraksiyonu)

1970’li yılların ortalarında kullanılmaya başlayan katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction, SPE) çeşitli tutucu maddelerin (adsorban) küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolonlarına doldurularak vakum yardımıyla yapılan hızlı bir ekstraksiyon yöntemidir.

Tez çalışmamızda 10 gr ve 70 gr’lık Phenomenex Strata SI-1 kartuşlar kullanılmıştır. Kartuşlar çalışmaya başlamadan önce çözücü sistemi ile şartlandırıldı. Çözücü sisteminde çözündürülen ekstre kartuşlara tatbik edildi ve ardından vakum pompası çalıştırıldı. Polariteyi arttırarak elüsyona devam edildi. En sonunda kartuşlar %100 metanol ile yıkandı.

3.2.4.5. Preparatif Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

Preparatif YBSK yöntemi bileşiklerin izolasyonunda ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Tez çalışmamızda katı faz ekstraksiyonu sonucunda elde edilen fraksiyonlardaki maddeleri saflaştırmak amacıyla preparatif YBSK cihazından yararlanılmıştır.

İzokratik yöntemle çalışılmıştır. Çalışılan cihazın ve kullanılan yöntemin bilgileri aşağıda verilmiştir.

- **Mobil Faz:** Asetonitril: Su (25: 75 V/V)
- **Kullanılan kolon:** C18 21.20 mm X 250 mm 5 µm
- **Dedektör:** Waters 2489 UV/Visible dedektör
- **Dalga boyu:** 254 nm
- **Akış hızı (ml/dk.):** 10 ml/dk
- **Aletin özellikleri:** Waters 2555 Quaternary Gradient Module
- **Kullanılan program:** Water prep system in Watertaskproject

3.2.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini

C. micranthum ve *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türlerinin farklı kısımlarından hazırlanan metanol ekstrelerinde YBSK yöntemi kullanılarak kolşisin miktar tayini yapılmıştır.

Daha önce yapılan yayınlar ve anabilim dalımızda yapılan çalışmalar doğrultusunda YBSK analizinde asetonitril ve % 1 asetik asit/su çözücülerinin kullanılmasına karar verildi. En iyi ayırımı sağlayan gradient metod geliştirilerek miktar tayini yapılmıştır. Analizde kullanılan metod Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: *Colchicum* türleri için YBSK’da kullanılan gradient yöntem

Zaman (dk.)	Asetonitril (% V/V)	Asetik asit/Su (% V/V)	Akış Hızı (ml/dk.)
0.0	10	90	1
25.0	60	40	1
30.0	60	40	1
35.0	10	90	1
40.0	10	90	1

YBSK’da kullanılan cihazın ve çalışma koşullarının bilgileri aşağıda verilmiştir.

- **Mobil Faz:** Asetonitril ve Asetik asit/Su (1:100 V/V) karışımı kullanılmıştır.
- **Örnek Hacmi:** 10 µl
- **Kolon sıcaklığı:** 40 °C
- **Analiz Süresi:** 40 dk.
- **Kullanılan kolon:** C18 4,6 mm X 250 mm silika kolon 5 µm
- **Dedektör:** UV/ Visible dedektör
- **Dalga boyu:** 352 nm
- **Aletin özellikleri:** Agilent Technologies 1200 serisi
- **Kullanılan program:** Chemstation for LC-systems program

Hem analitik YBSK hem de preparatif YBSK çalışmalarında kullanılan tüm çözücüler YBSK için uygun saflıktadır.

3.2.5.1. Ekstrelerin ve Örnek Çözeltilerin Hazırlanması

Her iki türün yumru ve çiçek kısımlarından 5 g, *C.chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'un tohum kısmından 3 g drogdan hareketle oda ısısında ve ışıktan korunarak ultrasonik banyoda metanol ile 24 saat bekletildi. Elde edilen metanol ekstresi alçak baskıda rotavaporda, 35-45 °C'de yoğunlaştırıldı. Yoğunlaştırılan ekstreler bir gece -80 °C'de bekletilerek donduruldu ve ertesi gün liyofilize edildi. Liyofilize edilen ekstreler renkli şişelerde -20 °C'de muhafaza edildi.

Liyofilize edilen metanol ekstreleri, metanol:su (1:1 V/V) karışımında çözündürülüp 0,45µm'lik filtrelerden süzülerek analiz öncesinde taze olarak hazırlandı. Her iki türün yumru ve çiçek ekstrelerinden 5mg/ml konsantrasyonda, *C.chalcedonicum* subsp.*chalcedonicum*'un tohum ekstresinden 2 mg/ml konsantrasyonda örnek çözeltiler hazırlandı.

Liyofilize edilen metanol ekstrelerinden bir kısmı ayrılarak sitotoksisite testleri için kullanıldı.

3.2.5.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Kolşisin (Sigma: C9754) standart olarak kullanıldı. Metanol: Su (1:1 V/V) karışımında çözüldükten sonra 0,45µm'lik filtrelerden süzüldü. Stok çözeltiden hareketle 0,02, 0,01, 0,0045, 0,003, 0,00225 ve 0,0015 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanarak viallere alındı. Standart çözeltiler enjeksiyondan önce taze olarak hazırlandı.

3.2.5.3. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerin YBSK analizi sonrasında o konsantrasyonlara karşılık gelen alanların hesaplanmasıyla konsantrasyon- alan doğrusal eğrisi hazırlanmıştır.

3.2.6. Spektral Yöntemler

3.2.6.1. Nükleer Magnetik Rezonans Spektrumu (NMR)

¹ H NMR spektrumları Varian Mercury 400 MHz ve Bruker 400 ve 500 MHz NMR cihazlarında alınmıştır. Alınan spektrumların sinyallerinin değerlendirilmesi için gereken kimyasal kayma değerlerinin, J değerlerinin ve integrallerinin hesaplanması amacıyla TopSpin programı kullanılmıştır. Bileşiklerin moleküler formüllerinin çizilmesinde ChemDraw programı kullanılmıştır.

3.2.6.2. Kütle (Mass) Spektrumu

Kütle spektrumları Waters Micromass ZQ ESI (+) cihazında alındı.

3.2.7. Sitotoksik Aktivite Testlerinde Kullanılan Yöntemler

Çalışmada A 549 (Akciğer karsinomu) hücre dizisi kullanıldı. Hücrelerin bulunduğu vasat 48 saatlik aralıklarda yenilendi. Yaklaşık olarak % 80'lik konfluent duruma gelince tripsin/EDTA kullanılarak pasaj yapıldı. Bu çalışmalar 96 kuyucuklu kollojen kaplı (1 µg kollajen /cm²) plaklarda ve Thermo Scientific Class II kabinlerde gerçekleştirildi. Pasaj numaraları 16 ve 20 olan hücre serileri kullanılmıştır.

Hücre Kültürü için gerekli besiyerinin hazırlanması

FBS (Fetal bovine serum), Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) (düşük glukozlu) besiyeri ve antibiyotik 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dk. bekletildi ve çözünmeleri sağlandı. Ardından steril ortamda % 10 FBS ve % 1 antibiyotik içeren DMEM 50 ml'lik falkonlara hazırlandı.

Hücrelerin açılması

Sıvı azottan soğuğa dayanıklı cryo tüpler içinde saklanan 1 ml olarak dondurulmuş hücre dizisi alındı ve 37 °C'lik su banyosunda 1-2 dk süre ile çözünmeleri sağlandı. 15 ml falkonlara 9 ml medium konuldu ve çözülmüş olan 1 ml hücre 9 ml medium üzerine eklendi ve 3000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra 5 ml serolojik pipet ile ya da steril pasteur pipeti ile hücre pelletine 1 ml medium eklenerek bir kaç defa pipetasyon yapıldı. Hücre süspansiyonu T 25 veya T75 flasklara konularak 9-14 ml serumlu medyum içerisine ekilerek inkübasyona bırakıldılar. Mikroskopta bakılıp 37 °C'lik CO₂ etüve koyuldu.

Hücre Kültürünün Devamlılığının Sağlanması (Pasajlama)

Hücrelerin konfluent durumu mikroskop kullanılarak kontrol edildi. Hücreler yaklaşık olarak % 80'lik konfluent duruma gelince ya pasajlandılar ya da sitotoksosite testleri için kullanıldılar. Pasajlama işleminde T25 flastaki besiyeri döküldü. Hücresel atıkların ve serum artıklarının uzaklaşması için flaska 4 ml PBS eklenerek 2-3 dakika beklendi. Bu işlem 2 kere yapıldı. Ardından 3 ml tripsin eklenerek hücrelerin tutundukları yüzeyden kalkması sağlandı. 5 dk. 37 °C CO₂ inkübatörde bekletildi ve hücrelerin kalktığı görüldüğünde 2 ml medium konularak tripsin'in aktivitesi sonlandırıldı. Hücre süspansiyonu 15 ml falkonlara konularak 3000 rpm 3 dakika santrifüj yapıldı. Hücre pelletine 1 ml medium eklenerek bir kaç defa pipetasyon yapıldı. T75 flaska 14 ml medium konuldu ve üzerine 1ml hücre süspansiyonu ekildi.

Hücre Dondurma

Hücre dizilerinin devamlılığını sağlamak ve meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belirli aralıklarla dondurarak saklandı. Bunun için pasajlamada yapılan işlemler yapıldı. 1 ml DMSO içeren medium koyarak hücreler soğuğa dayanıklı kryo tüplere aktarıldı. İlk olarak -80 °C'de bir gece bekletildi, ertesi gün sıvı azota konuldu.

Sitotoksik Aktivite İçin Ekstrelerin Hazırlanması

Oda sıcaklığında kurutulan metanol ekstraktları liyofilize edilip (Labconco, Freeze Dry System LYPH-LOCK6) desikatörde bekletildikten sonra 10'ar mg tartılarak 1'er ml dimetilsülfoksitte (DMSO, Sigma D- 5879) çözüldü ve hücreler için hazırlanan medium ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonlar (500, 100, 50, 10, 1 µg/ml) hazırlandı.

Hücrelerin 96 Kuyucuklu Mikroplaklara Aktarılması

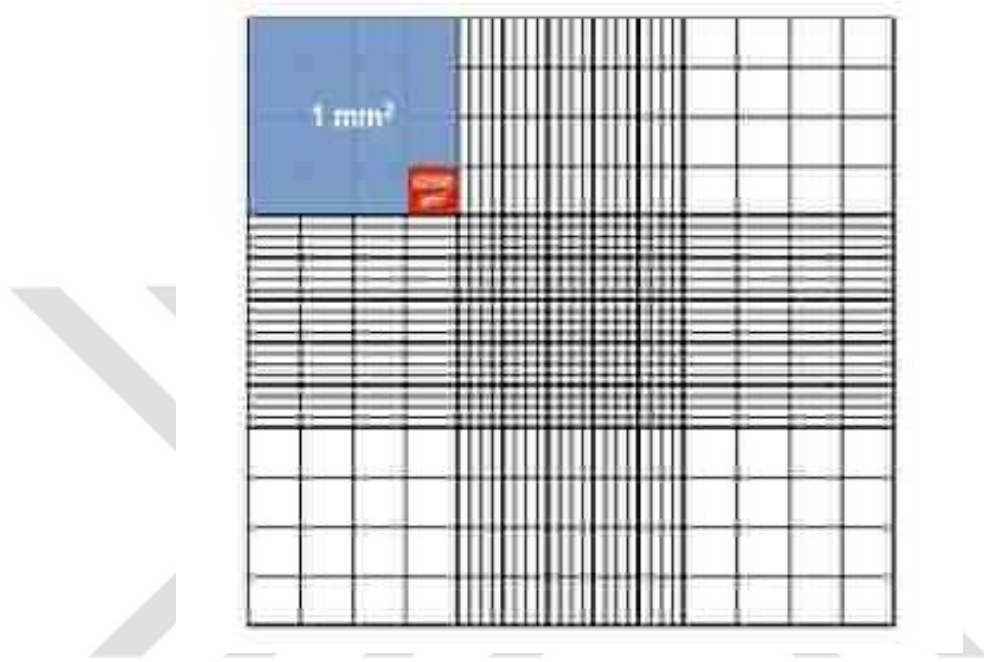
Hücreler mikroplaktaki her bir kuyucukta homojen hücre yoğunluğu olmasına dikkat edilerek, her bir kuyucuğa 20×10^3 hücre olacak şekilde 200µl medyum içinde ekildi. Mikroplak 24 saat 37 °C CO₂ inkübatörde bekletildi.

Hücre sayımı

Bu amaçla her bir flastan 1ml alınıp hemasitometre (Thoma lamı) kullanılarak mikroskop altında sayım yapıldı. Hemasitometre 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip olup 4x16 küçük kareden oluşmaktadır.

Hücre sayısı aşağıdaki verilen formül ile hesaplanmaktadır.

Hücre sayısı/ml = Ortalama sayım sonucu X 10^4 X Seyreltme Faktörü



Şekil 3-1: Mikroskopta Thoma lamı görüntüsü

3.2.7.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Tayini

MTT yöntemi hücre yasayabilirliğini ölçen sıklıkla kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemde sarı renkli tetrazolyum tuzu (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür) özel bir çözücü ile çözündürülür. MTT yöntemi Mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri MTT'nin tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen mor-mavi renkli formazan kristallerini oluştururlar.¹⁰² Sonuçta elde edilen mor-mavi solüsyon spektrofotometrik olarak ölçülür. Mavi formazan tuzu formunun miktarı hücre sayısındaki artma veya azalma ile bağlantılı olarak değişmeye neden olur ve spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen değer test edilen materyalin sitoksisitesini belirler.^{103, 104, 105}

Bu çalışmada bu yöntemi ilk kez tanımlayan Plumb'ın yaptığı protokol kullanılmıştır.¹⁰⁶

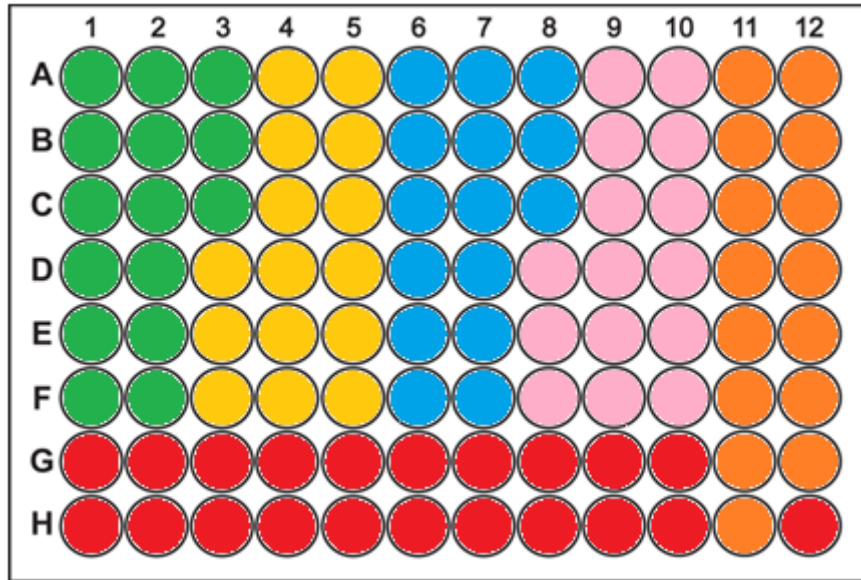
MTT Yönteminin Uygulanması

5 farklı konsantrasyondaki her bir metanol ekstresi 96 kuyucuklu mikropalaklara, her bir konsantrasyondan 3 kuyucuk olacak şekilde 200µl medyum içinde uygulandı. Şekildeki gibi hazırlanan mikropalaklar 48 saat 37 °C CO₂ inkübatörde bekletildi. Bu sürenin sonunda mikropalaklardaki medyumlar atılarak kuyucuklar üç kere 200µl PBS ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 200µl medyum ve 50µl MTT çözeltisi konuldu. Alüminyum folyoya sarıp 37 °C CO₂ inkübatörde 4 saat bekletildi. 4 saatin sonunda mikropalak inkübatörden çıkartıldı. Medyum ve MTT karışımını kuyucuklardan uzaklaştırdık. Daha sonra her bir kuyucuğa 200 µl DMSO ilave ettik. Bunun ardından 25 µl Sorensen's glycine buffer solüsyonu eklendi ve mikropalaka spektroskopik ölçüm için ELIZA Reader'a götürüldü. 570 nm'de ölçüm alındı.

MTT çözeltisinin hazırlanması: 10 mg MTT tartıldı ve 5 ml PBS ilave edilerek çözündürüldü. Kullanana kadar çözelti alüminyum folyo ile sarılarak bekletildi.

Sitotoksisite indeksi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$SI = 1 - (OA_{\text{deney}} / OA_{\text{kontrol}}) \times 100$$



Şekil 3-2: 96 kuyucuklu mikropalakdaki MTT deney düzeneği

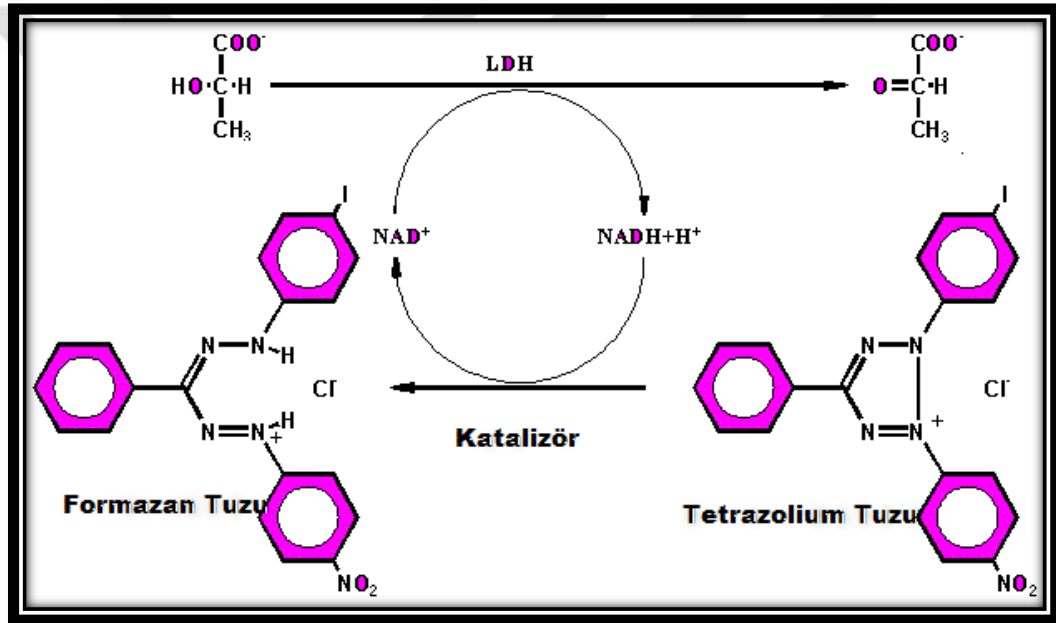
Negatif Kontrol: Her kuyuda 200 µl medyum + hücre (2 X10⁴)

Test Materyali: Bitkilerin farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstresi + 200 µl medyum + hücre (2 X10⁴)

Kırmızı renkte gösterilen kısımlara negatif kontrol, diğer renklerle gösterilenlere ise ekstreler eklenmiştir.

3.2.7.2. LDH Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Tayini

LDH yöntemi hücre ölüm yöntemleri arasında çok yaygın kullanılan, enzim salınması esasına dayanan bir yöntemdir. Bütün canlı hücrelerde sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrojenaz (LDH) bulunur. LDH, nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) NAD^+ 'ye oksidasyonu sağlayarak, piruvatı laktata indirger. Hücre lizisi ya da hücre membranının hasar görmesi durumunda bu enzim hücre dışına çıkar. Kültür ortamına geçen LDH enziminin aktivitesinin kolorimetrik olarak ölçülmesi ile test edilen materyalin, hücre canlılığı ve membran bütünlüğü üzerine etkisi hakkında bilgi edinilir. Enzim aktivitesindeki artış hücre ölümüyle doğru orantılıdır. LDH yöntemi hızlı, güvenilir ve oldukça hassas bir yöntemdir.



Şekil 3-3: Laktat Dehidrojenaz (LDH) Enziminin Aktivite Şeması

LDH Yönteminin Uygulanması

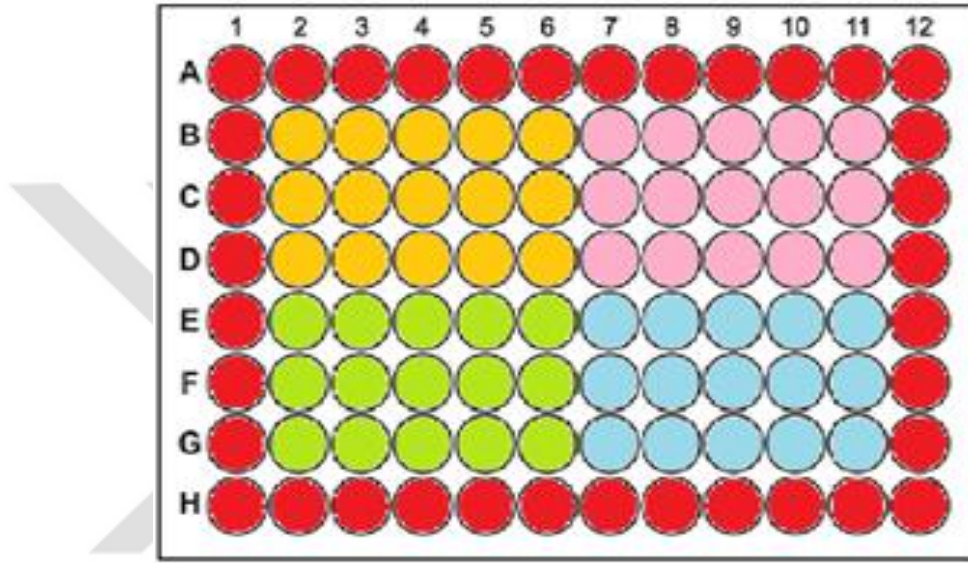
5 farklı konsantrasyondaki her bir metanol ekstresi 96 kuyucuklu mikrolaplara, her bir konsantrasyondan 3 kuyucuk olacak şekilde 200µl medyum içinde uygulandı. Şekildeki gibi hazırlanan mikrolaplar 48 saat 37 °C CO_2 inkübatörde bekletildi.

Reaksiyon Solüsyonunun Hazırlanması: Katalizör (1 vial) 1 ml dd su ile 10 dk. boyunca iyice karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon 4 °C'de saklandı. Boya solüsyonu -20 °C'de saklandı. LDH testi yapılacağı zaman 250 µl katalizör 11.25 ml boya solüsyonu ile karıştırılarak kuyucuklara aktarıldı.

48 saat sonunda her bir kuyudan 100 µl süpernatant dikkatlice aynı sırada başka bir mikroyuvarla aktarıldı. Hemen ardından hazırlanan katalizör ve boya karışımından 100 µl kuyulara ilave edildi. Alüminyum folyo ile mikroyuvarlak sarıldı ve oda sıcaklığında yarım saat bekletildi. Ardından ELIZA Reader'da 490 nm'de ölçüm alındı.

Sitotoksosite indeksi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$SI = (OA_{\text{deney}} - OA_{\text{negatif kontrol}}) / (OA_{\text{pozitif kontrol}} - OA_{\text{negatif kontrol}}) \times 100$$



Şekil 3-4: 96 kuyucuklu mikroyuvarlakadaki LDH deney düzeneği

Negatif Kontrol: Her kuyuda 200 µl medyum + hücre (2×10^4)

Pozitif Kontrol: %1 Triton X-100 200 µl medyum + hücre (2×10^4)

Test Materyali: Bitkilerin farklı konsantrasyonlardaki metanol ekstresi + 200 µl medyum + hücre (2×10^4) kırmızı renkte gösterilen kısımlara pozitif ve negatif kontrol, diğer renklerle gösterilenlere ise ekstreler eklenmiştir.

LDH testinde BioVision (Katalog No: K311-400) marka sitotoksosite kiti kullanıldı.

MTT ve LDH sitotoksosite yöntemleri sonucunda hesaplanan sitotoksik indeks değerlerinin istatistiksel hesaplamaları için GraphPad Prism programı kullanıldı.

Ayrıca hücrelerin % 50'sini inhibisyon sağlayan konsantrasyonu (İK) hesaplamak için grafiklerdeki % 50 sitotoksosite indeksine en yakın ekstre konsantrasyonları baz alınarak orantı ile İK₅₀ değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. *Colchicum micranthum* Üzerinde Fitokimyasal Ön Deneme Bulguları

Toprakaltı ve topraküstü kısımları birbirinden ayrılan ve önce oda ısısında, sonra 60 °C ye ısıtılmış havalı etüvde kurutulup, ardından ince toz edilen bitkinin çeşitli kısımlarına ait materyaller üzerinde yapılan fitokimyasal ön deneme sonuçları Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: *C. micranthum* bitkisine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları

		Toprakaltı (Yumru)	Topraküstü (Çiçek)
Alkaloit		+	+
Flavon		-	+
Tanen	Gallik	+	-
	Kateşik	+	+
Antrasen		-	-
Saponin		+	-

4.2. *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* Üzerinde Fitokimyasal Ön Deneme Bulguları

Toprakaltı ve topraküstü kısımları birbirinden ayrılan ve önce oda ısısında, sonra 60 °C ye ısıtılmış havalı etüvde kurutulup, ardından ince toz edilen bitkinin çeşitli kısımlarına ait materyaller üzerinde yapılan fitokimyasal ön deneme sonuçları Tablo 4-2’de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* bitkisine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları

		Tohum	Toprak altı (Yumru)	Toprak üstü (Çiçek)
Alkaloit		+	+	+
Flavon		-	-	+
Tanen	Gallik	-	-	-
	Kateşik	-	+	-
Antrasen		-	-	-
Saponin		-	+	-

4.3. Alkaloitlerin Ayrılması ve Saflaştırılması:

Her iki türün toprak altı ve toprak üstü kısımlarından elde edilen A ekstreleri ayrı ayrı çalışıldı. Alkaloitler; Sütun Kromatografisi, Katı Faz Ekstraksiyonu ve Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi yöntemlerinden uygun olanları yardımı ile ayrıldı ve gerekli olduğu durumda saflaştırma işlemi yine preparatif İTK ve Preparatif YBSK yöntemleri kullanılarak yapıldı.

Ekstrelerden izole edilen alkaloitlerin miktar ve saflık açısından uygun olanlarının ^1H NMR ve Mass Spektrumları yardımıyla yapıları aydınlatıldı. Elde edilen diğer alkaloitler, şahit maddeler ve yapıları aydınlatılan alkaloitler ile çeşitli çözücü sistemlerinde İTK yöntemi ile karşılaştırıldı. Bu şekilde her iki türün de farklı kısımlarından elde edilen alkaloitler belirlendi.

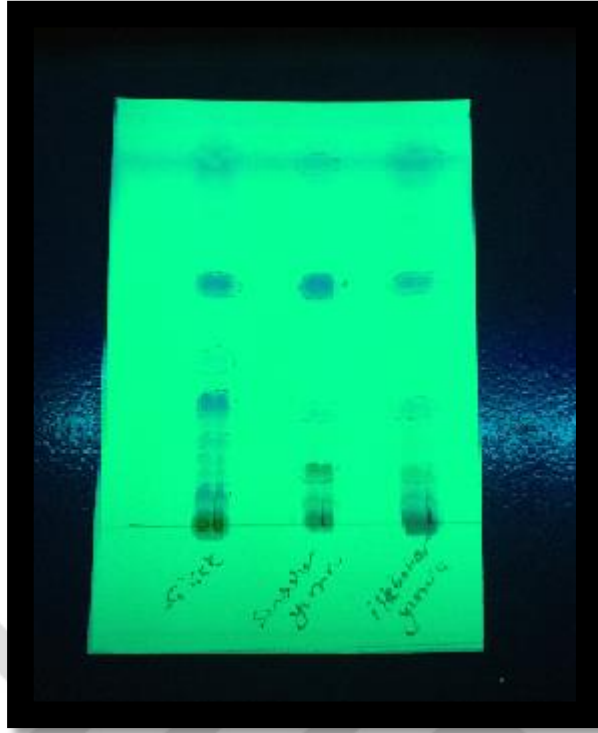
4.3.1. *C. micranthum* Alkaloitlerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması:

C. micranthum türünün farklı kısımlarına ait kurutulup toz edilmiş materyalleri metodlar kısmında anlatıldığı şekilde tüketildi. Tüketme sonucunda elde edilen nötral-fenolik ekstre (A), bazik ekstre (B) ve glikozidik ekstre (C) miktarları Tablo4-3'te verilmiştir.

Tablo 4-3: *C. micranthum* bitkisine ait ekstre miktarları

<i>Colchicum micranthum</i>				
	Drog miktarı	Ekstre Miktarı		
		<u>A Ekstresi</u>	<u>B Ekstresi</u>	<u>C Ekstresi</u>
Çiçek	95 gr	0.6028 gr	38.50 mg	20.5 mg
Sonbahar Yumru	120 gr	1.6924gr	34.3 mg	19.7 mg

C. micranthum türünün farklı kısımlarına ait olan A ekstrelerinin 4 nolu çözücü sistemindeki İTK karşılaştırmaları aşağıda Şekil 4-1 verilmiştir.



Şekil 4-1: *C. micranthum* A ekstralarının UV'deki İTK görüntüsü

C. micranthum'un sonbaharda toplanan yumrularının ilkbaharda toplananlardan miktarca daha fazla olması nedeniyle izolasyon çalışmaları sonbahar yumruları üzerinde yapılmıştır.

4.3.1.1. *C. micranthum* Sonbahar Yumur A Ekstresi (Mic.Ys.-A)

1.5 gr Mic.Ys.-A ekstresi KFE yöntemi ile fraksiyonlara ayrıldı. Toplanan fraksiyonlar farklı çözücü sistemlerinde İTK kontrolleri yapıldıktan sonra benzer olan fraksiyonlar birleştirildi.

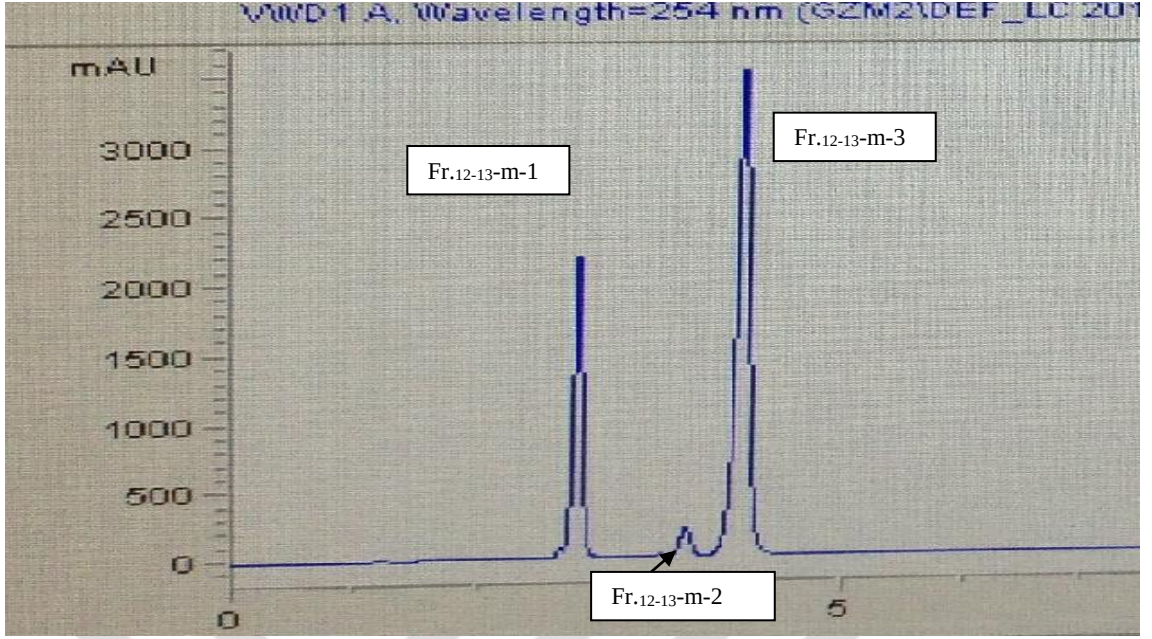
KFE'de kullanılan çözücü sistemleri, oranları ve birleştirilen benzer fraksiyonlar Tablo 4-4'te verilmiştir.

Tablo 4-4: KFE’de kullanılan çözücü sistemleri ve oranları

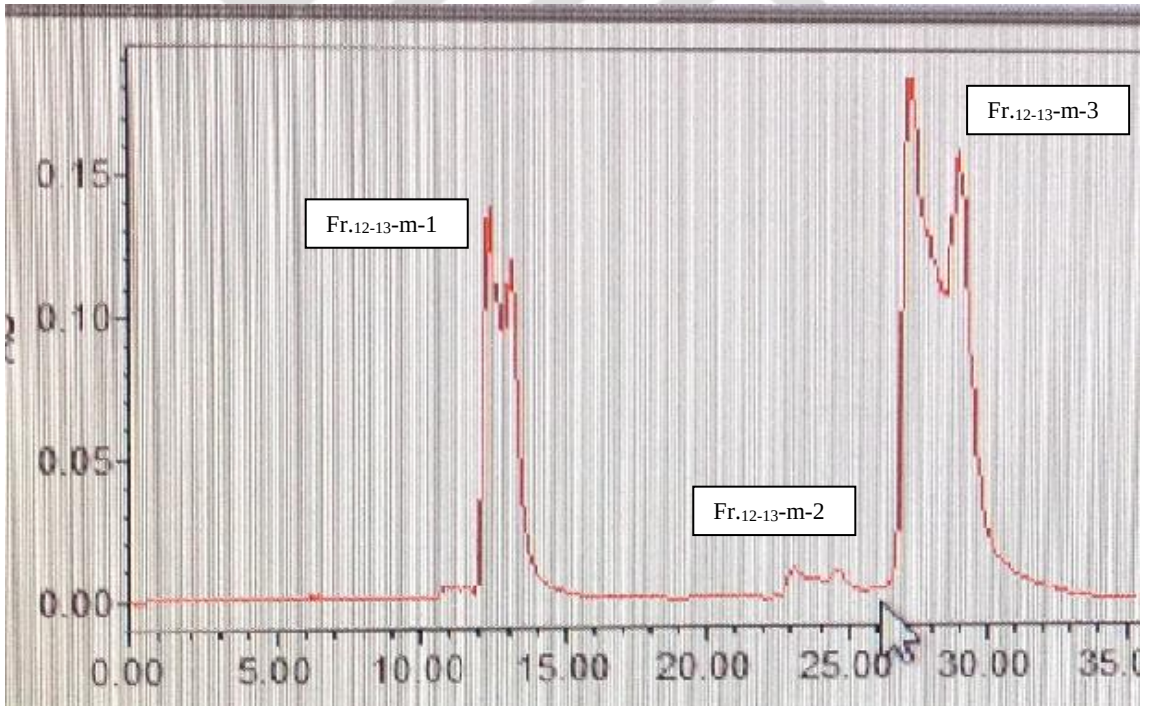
Birleştirilen Fraksiyonlar (Fr)	Çözücüler
1-8	Hekzan (%100)
	Hekzan:Kloroform (9:1)
	Hekzan:Kloroform (8:2)
	Hekzan:Kloroform (7:3)
	Hekzan:Kloroform (6:4)
	Hekzan:Kloroform (5:5)
	Hekzan:Kloroform (4:6)
	Hekzan:Kloroform (3:7)
	Hekzan:Kloroform (2:8)
	Hekzan:Kloroform (1:9)
9-10	
11	Kloroform (%100)
12-13	Kloroform:Metanol (95:5)
14-17	Kloroform:Metanol (9:1)
	Kloroform:Metanol (8:2)
	Kloroform:Metanol (5:5)
	Kloroform:Metanol (%100)

Birleştirilen fraksiyonlardan Carr-Price belirteci ile leke veren Fr.12-13 (460 mg) üzerinde izolasyon çalışmaları yapıldı.

Fr.12-13’ten 100 mg ayrılarak preparatif YBSK cihazında metodlar kısmında anlatılan izokratik yöntem ile Fr._{12-13-m-1} (5 mg), Fr._{12-13-m-2} (1,5 mg) ve Fr._{12-13-m-3} (8,5 mg) kodlu maddeler elde edildi. Fr.12-13’e ait YBSK ve preparatif YBSK kromatogramları aşağıda Şekil 4-2 ve Şekil 4-3’te gösterilmiştir.



Şekil 4-2: : Fr.12-13'e ait YBSK Kromatogramı



Şekil 4-3: Fr.12-13'e ait Preparatif YBSK Kromatogramı

Yapılan ^1H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile, Fr.12-13-m-1 kodlu maddenin “2-Demetilkolşisin”, Fr.12-13-m-2 kodlu maddenin “Kolşifolin” ve Fr.12-13-m-3 kodlu maddenin “Kolşisin” olduğu belirlenmiştir.

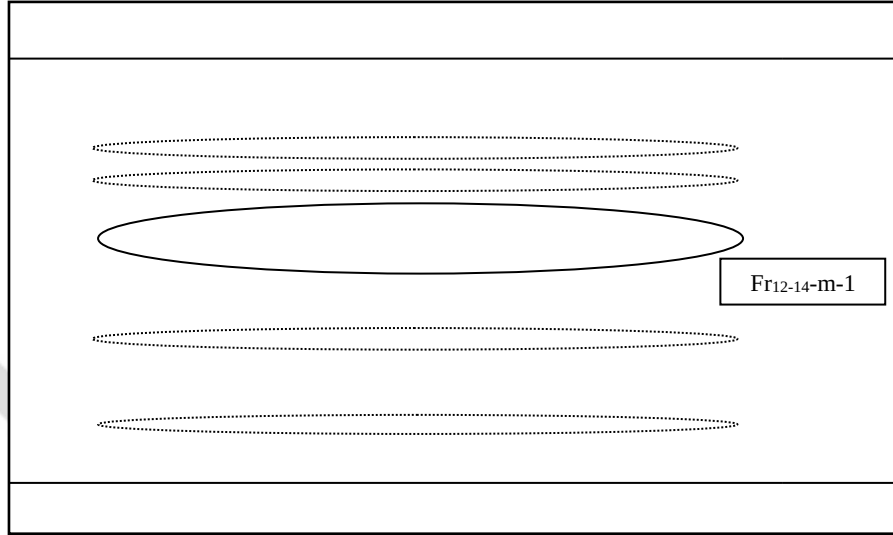
4.3.1.2. *C. micranthum* Çiçek A Ekstresi (Mic.Ç.-A)

500 mg Mic.Ç.-A ekstresi KFE yöntemi ile fraksiyonlara ayrıldı. Toplanan fraksiyonlar farklı çözücü sistemlerinde İTK kontrolleri yapıldıktan sonra benzer olan fraksiyonlar birleştirildi. KFE’de kullanılan çözücü sistemleri, oranları ve birleştirilen benzer fraksiyonlar Tablo 4-5’te verilmiştir.

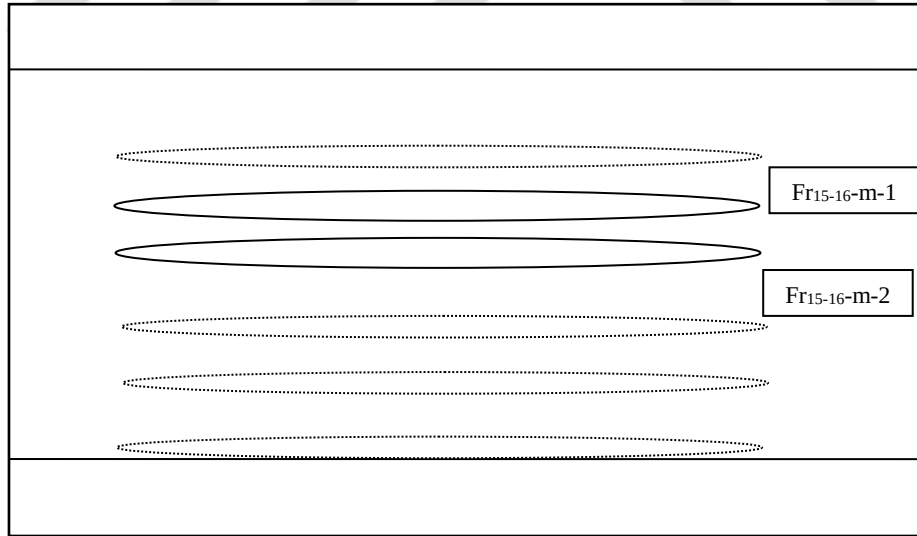
Tablo 4-5: KFE’de kullanılan çözücü sistemleri ve oranları

Birleştirilen Fraksiyonlar (Fr)	Çözücüler
1-7	Hekzan (%100)
	Hekzan:Kloroform (9:1)
	Hekzan:Kloroform (8:2)
	Hekzan:Kloroform (7:3)
	Hekzan:Kloroform (6:4)
	Hekzan:Kloroform (5:5)
	Hekzan:Kloroform (4:6)
8-10	Hekzan:Kloroform (3:7)
	Hekzan:Kloroform (2:8)
	Hekzan:Kloroform (1:9)
11	Kloroform (%100)
12-14	Kloroform:Metanol (98:2)
	Kloroform:Metanol (97:3)
	Kloroform:Metanol (96:4)
15-16	Kloroform:Metanol (95:5)
	Kloroform:Metanol (9:1)
	Kloroform:Metanol (8:2)
17-19	Kloroform:Metanol (5:5)
	Kloroform:Metanol (%100)

Birleştirilen fraksiyonlardan Carr-Price belirteci ile leke veren Fr₁₂₋₁₄ (50 mg) ve Fr₁₅₋₁₆ (170 mg) sırasıyla 2 ve 4 nolu çözücü sisteminde silikajel plakta preparatif İTK yapıldı. İTK'lara ait kromatogramlar Şekil 4-4 ve Şekil 4-5'te gösterilmiştir.



Şekil 4-4: Fr₁₂₋₁₄ 2 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı



Şekil 4-5: Fr₁₅₋₁₆ 4 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

Yapılan ¹H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile, Fr₁₂₋₁₄-m-1 (3,5 mg) kodlu maddenin “Kolşisin”, Fr₁₅₋₁₆-m-1 (1,4 mg) kodlu maddenin “N-deasetil-N-formilkolşisin” ve Fr₁₅₋₁₆-m-2 (1,5 mg) kodlu maddenin “Kolşifolin” olduğu belirlenmiştir.

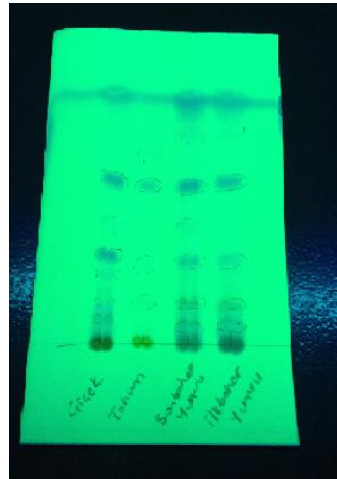
4.3.2. *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* Alkaloidlerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloidlerin Yapılarının Aydınlatılması:

C.chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* türünün farklı kısımlarına ait kurutulup toz edilmiş materyalleri metodlar kısmında anlatıldığı şekilde tüketildi. Tüketme sonucunda elde edilen nötral-fenolik ekstre (A), bazik ekstre (B) ve glikozidik ekstre (C) miktarları Tablo4-6’da verilmiştir.

Tablo 4-6: *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* bitkisine ait ekstre miktarları

<i>Colchicum chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i>				
	Drog miktarı	Ekstre Miktarı		
		A Ekstresi	B Ekstresi	C Ekstresi
Çiçek	20 gr	909.80 mg	72.4 mg	31.2 mg
Tohum	20 gr	261.9 mg	43.1 mg	16.0 mg
Sonbahar Yumru	285 gr	2.61 g	34 mg	39 mg

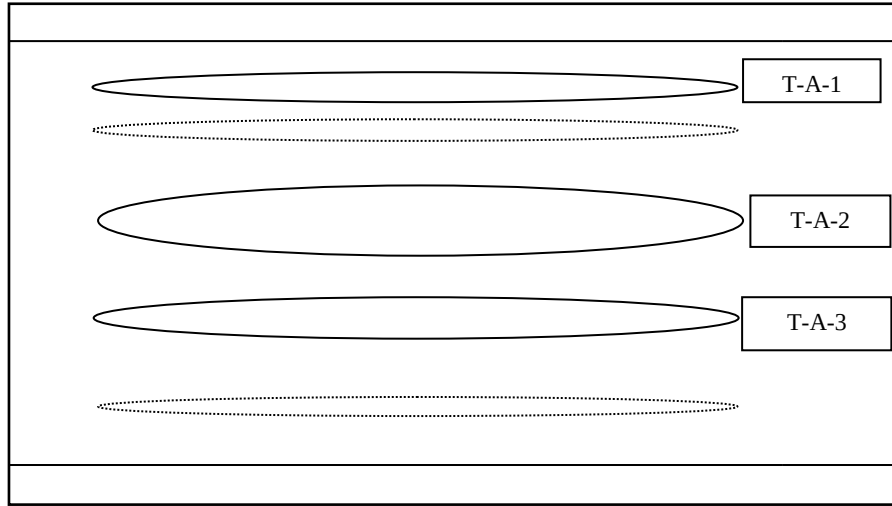
C. chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* türünün farklı kısımlarına ait olan A ekstrelerinin 4 nolu çözücü sistemindeki İTK karşılaştırmaları aşağıda Şekil 4-6’da verilmiştir.



Şekil 4-6: *C.chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* A ekstrelerinin UV’deki İTK görüntüsü

4.3.2.1. *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* Tohum A Ekstresi (Chal.T.-A)

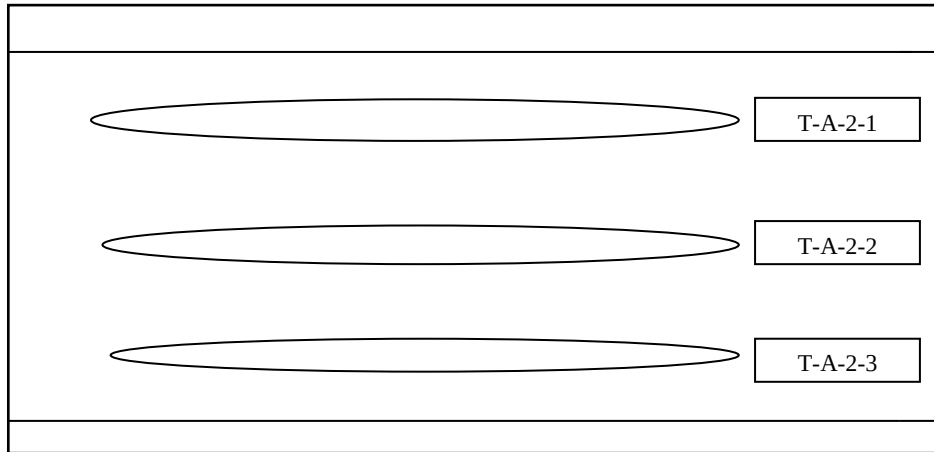
200 mg Chal.T.-A ekstresi 1 nolu çözücü sisteminde 0.5 mm cam plaklar kullanılarak preparatif İTK yapıldı. Üç bant alınarak bu bantların iki ayrı sistemde (2 ve 9 nolu çözücü sisteminde) İTK ile saflık kontrolleri yapılmıştır. 1 nolu çözücü sistemindeki kromatogram Şekil 4-7’de gösterilmiştir.



Şekil 4-7: Chal.T.-A'nın 1 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

İki ayrı sistemde İTK ile yapılan saflık kontrollerinde T-A-1 (3 mg) ve T-A-3 (5mg) kodlu bantların temiz olduğu ancak T-A-2 (23 mg) kodlu bantın karışım olduğu görülmüştür. Yapılan ^1H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile, T-A-1 kodlu maddenin “Demekolsin” ve T-A-3 kodlu maddenin “Kolşifolin” olduğu belirlenmiştir.

T-A-2 kodlu bant 2 nolu çözücü sisteminde silikajel plaklarda tekrar preparatif İTK yapıldı. T-A-2-1, T-A-2-2 ve T-A-2-3 nolu bantlar alınmıştır. T-A-2-1 kodlu maddenin kirli olması ve miktarının da az olması nedeniyle yapısı tayin edilememiştir. Yapılan ^1H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile, T-A-2-2 (5,5 mg) kodlu maddenin “Kolşisin”, T-A-2-3 (3 mg) kodlu maddenin “*N*-deasetil-*N*-formilkolşisin” olduğu belirlenmiştir. 2 nolu çözücü sistemindeki kromatogram Şekil 4-8’de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: T-A-2 nolu bantın 2 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

Tohumlardan elde edilen petrol eterli ekstre Carr-Price ve Dragendorff belirteçleri ile renk vermediğinden, bu ekstrede izolasyon çalışması yapılmamıştır.

4.3.2.2. *C.chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* Yumru Sonbahar Ekstresi (Chal.Ys.-A)

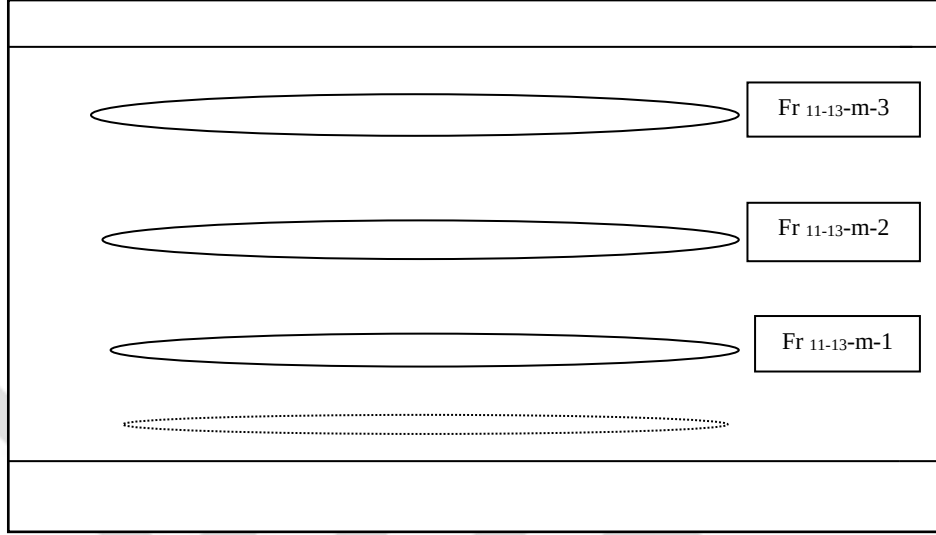
2,5 g Chal.Ys.-A ekstresi KFE yöntemi ile fraksiyonlara ayrıldı. Toplanan fraksiyonlar İTK kontrolleri yapıldıktan sonra benzer olan fraksiyonlar birleştirildi.

C.chalcedonicum subsp. *chalcedonicum*'un sonbaharda toplanan yumrularının ilkbaharda toplananlardan miktarca daha fazla olması nedeniyle izolasyon çalışmaları sonbahar yumruları üzerinde yapılmıştır. KFE'de kullanılan çözücü sistemleri, oranları ve birleştirilen benzer fraksiyonlar Tablo 4-7'de verilmiştir.

Tablo 4-7: KFE'de kullanılan çözücü sistemleri ve oranları

Birleştirilen Fraksiyonlar (Fr)	Çözücüler
1-5	Hekzan (%100)
	Hekzan:Kloroform (9:1)
	Hekzan:Kloroform (8:2)
	Hekzan:Kloroform (7:3)
	Hekzan:Kloroform (6:4)
6-10	Hekzan:Kloroform (5:5)
	Hekzan:Kloroform (4:6)
	Hekzan:Kloroform (3:7)
	Hekzan:Kloroform (2:8)
	Hekzan:Kloroform (1:9)
11-13	Kloroform (%100)
	Kloroform:Metanol (98:2)
	Kloroform:Metanol (95:5)
	Kloroform:Metanol (9:1)
	Kloroform:Metanol (8:2)
	Kloroform:Metanol (7:3)
	Kloroform:Metanol (6:4)
14-19	Kloroform:Metanol (5:5)
	Kloroform:Metanol (%100)

Birleştirilen fraksiyonlardan Carr-Price belirteci ile leke veren Fr₁₁₋₁₃ (165 mg) 4 nolu çözücü sisteminde silikajel plakta preparatif İTK yapıldı. 4 nolu çözücü sistemindeki kromatogram Şekil 4-9’da gösterilmiştir.



Şekil 4-9: Chal.Ys.-A’nın 4 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

Preparatiftten alınan üç bantın saflık kontrolleri iki farklı sistemde (2 ve 3 nolu çözücü sistemleri) yapılmıştır. Preparatiftten ayrılan 2 nolu banttan Fr_{11-13-m-2} (2,7 mg) kodlu madde elde edildi. ¹H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile bu maddenin “kolşifolin” olduğu belirlenmiştir.

Preparatiftten ayrılan 3 nolu banttan Fr_{11-13-m-3} (3,8 mg) kodlu madde elde edildi. ¹H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile bu maddenin “kolşisin” olduğu belirlenmiştir.

Preparatiftten ayrılan 1 nolu banttan Fr_{11-13-m-1} (11 mg) kodlu madde elde edildi. Bu madde İTK’da kirli gözüktüğünden 4 nolu çözücü sisteminde tekrar preparatif İTK yapılarak temizlendi. Elde edilen Fr_{11-13-m-1-p} (1,8 mg) kodlu maddenin yapılan ¹H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile “2-demetilkolşisin” olduğu saptanmıştır.

4.3.2.3. *C. chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum* Çiçek A Ekstresi (Chal.Ç.-A)

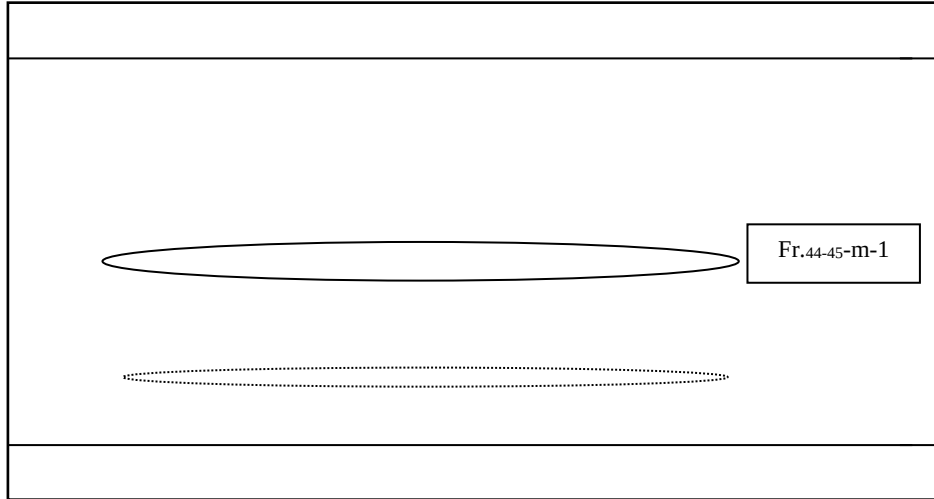
900 mg Chal.Ç.-A ekstresi silikajel ile hazırlanmış sütun kromatografisi yapıldı. Toplanan fraksiyonlar farklı çözücü sistemlerinde İTK kontrolleri yapıldıktan sonra benzer olan fraksiyonlar birleştirildi.

Sütun kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri, oranları ve birleştirilen benzer fraksiyonlar Tablo 4-8’de verilmiştir.

Tablo 4-8: Sütun kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri ve oranları

Birleştirilen Fraksiyonlar (Fr)	Çözücüler
1-10	Kloroform (%100)
11-20	Kloroform:Metanol (99:1)
	Kloroform:Metanol(98:2)
21-43	Kloroform:Metanol(97:3)
	Kloroform:Metanol (96:4)
44-45	Kloroform:Metanol (96:4)
47-50	Kloroform:Metanol (95:5)
51-53	
53-60	Kloroform:Metanol (9:1)
	Kloroform:Metanol (8:2)
	Kloroform:Metanol (7:3)
60-100	Kloroform:Metanol (6:4)
	Kloroform:Metanol (5:5)
	Kloroform:Metanol (%100)

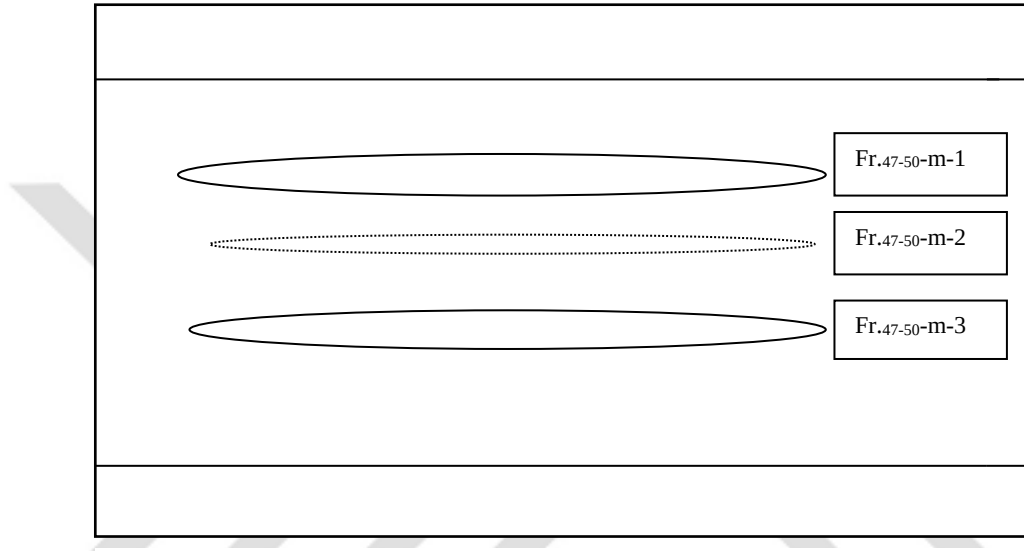
Birleştirilen fraksiyonlardan Fr.₄₄₋₄₅ 2 nolu çözücü sisteminde 0.5 mm silikajel cam plaklarda preparatif İTK yapıldı. 2 nolu çözücü sistemindeki kromatogram Şekil 4-10’da gösterilmiştir.



Şekil 4-10: Fr.₄₄₋₄₅ 2 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

Preparatiftan ayrılan 1 nolu banttı Fr.44-45-m-1 (2.2 mg) kodlu madde elde edildi. ^1H NMR ve kütle spektrumu analizleri ile bu maddenin ‘‘Kolşisin’’ olduğu saptanmıştır.

Birleştirilen fraksiyonlardan Fr.47-50 4 nolu çözücü sisteminde 0.5 mm silikajel cam plaklarda preparatif İTK yapıldı. 4 nolu çözücü sistemindeki kromatogram şekil 4-11’de gösterilmiştir.

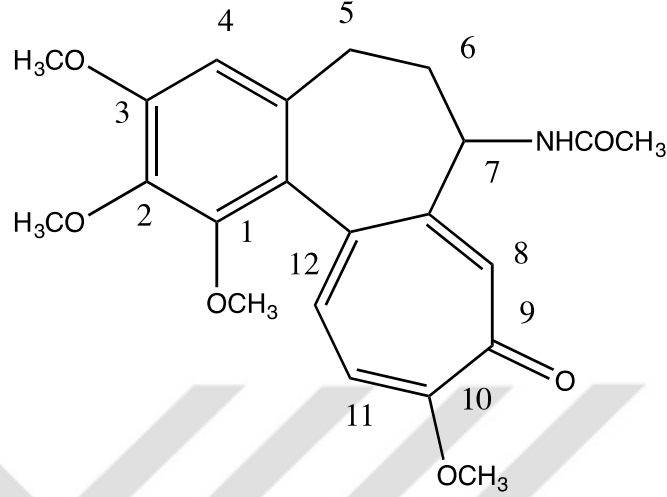


şekil 4-11: Fr.47-50 4 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yönteminde uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

Fr.47-50’den preparatif İTK yöntemiyle Fr.47-50-m-1 (1.2 mg), Fr.47-50-m-2 (0.8 mg) ve Fr.47-50-m-3 (1.6 mg) kodlu maddeler elde edilmiştir. Fr.47-50-m-1 kodlu maddenin ^1H NMR ile ‘‘4-Hidroksikolşisin’’ olduğu belirlenmiştir. Fr.47-50-m-3 kodlu maddenin ^1H NMR analizi ve şahit madde ile yapılan İTK kontrolleri sonucunda ‘‘Kolşifolin’’ olduğu saptanmıştır. Elde edilen Fr.47-50-m-2 kodlu maddenin miktarının az olması ve kirlilikler içermesinden dolayı yapısı aydınlatılamamıştır.

4.3.3. İzole Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması

4.3.3.1. Kolşisin



Şekil 4-12: Kolşisin

[N-5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo(a)heptalen-7-il-(S)-asetamit]

$C_{22}H_{25}NO_6$

Renk reaksiyonları: Carr-Price reaktifi ile parlak sarı renk

UV $_{254nm}$: Koyu mor renk

^1H NMR: 400 MHz $CDCl_3$

- δ 7,75–7,74 (1 H, geniş d; N- H), 7,56 (1 H, s; C-8 H), 7,33-7,35 (1 H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,86-6,88 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,53 (1H, s; C-4 H), 4,66 (1H, m; C-7 H), 4,00 (3H, s; C-10 OCH_3), 3,94 (3H, s; C-3 OCH_3) ve 3,90 (3H, s; C-2 OCH_3), 3,66 (3H, s; C-1 OCH_3), 2,54-2,49 (2 x 1H, m; C-5 H), 2,25-2,40 (2 x 1H, m; C-6 H), 1,99 (3H,s: N- $COCH_3$)

Kütle spektrumu:

- $(M+1)^+ = 400,46$

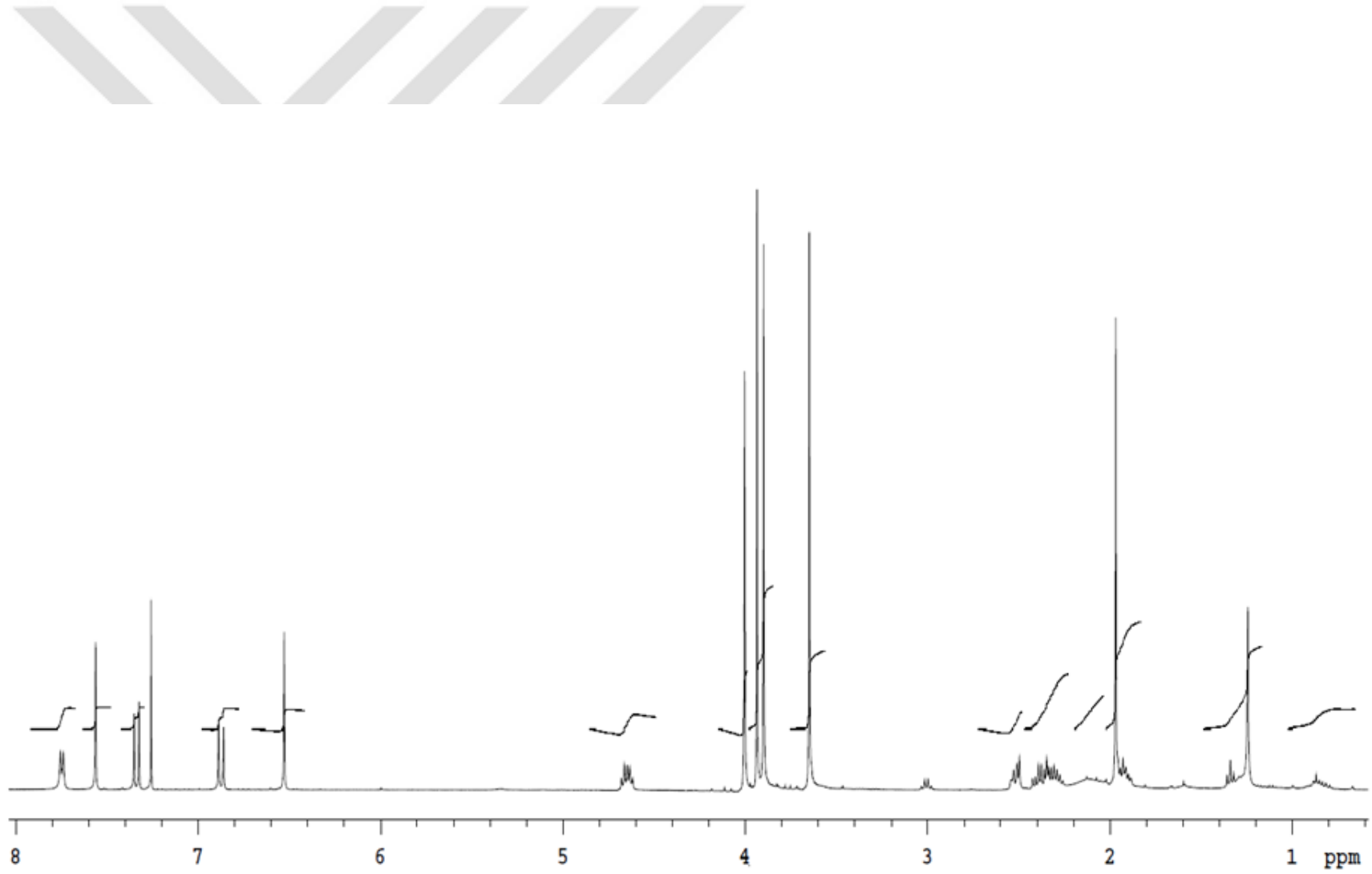
C. micranthum sonbahar yumru ve çiçek alkaloit A ekstresinden Fr_{12-13-m-3} ve Fr_{12-14-m-1}, *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* sonbahar yumru, çiçek ve tohum alkaloit A ekstresinden Fr_{11-13-m-3}, Fr_{12-14-m-1} ve T-A-2-2 kodlu maddelerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde aynı oldukları görülmüştür. Bu maddelerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde; 1, 2, 3, ve 10. karbonlara bağlı bulunan –OCH₃ pikleri 3,5-4,0 ppm arasında 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir. Genellikle 1. karbona bağlı –OCH₃ protonları en yukarı alanda, 10. karbona bağlı –OCH₃ protonları ise en aşağı alanda gözlenmektedir. 2.karbona bağlı bulunan –OCH₃ ise, 3. karbona bağlı bulunandan daha yukarı alanda yer alır. 1. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,66 ppm’de, 2.karbona bağlı bulunan –OCH₃ protonları 3,90 ppm’de, 3. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,94 ppm’de ve 10. karbona bağlı –OCH₃ protonları 4,00 ppm’de 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

Aromatik sahada 4, 8, 11 ve 12. karbona bağlı protonlar görülür. 4 ve 8 nolu karbona bağlı protonlar 1 protonluk singlet verirler. 8. karbonun protonunu belirten pik daha aşağı alanda gözlenir. 11 (6,86-6,88 ppm) ve 12 (7,33-7,35 ppm) nolu karbonlara bağlı protonlar ise J değeri 10 olan dubletler şeklinde gözlenirler. 11. Karbona ait dublet daha yukarı alanda gözlenir. Kolşisin ¹H NMR spektrumunda aromatik saha incelendiğinde, 4.karbona bağlı proton 6,53 ppm’de, 8.karbona bağlı proton ise 7,56 ppm’de singlet olarak gözlenmiştir. 7. karbona ait proton 4,65 ppm civarında multipler olarak gözlenir. Azot 7. karbona bağlıdır ve asetamid yapısındaki –CH₃’den dolayı 1,90-2,00 ppm’de 3 protonluk bir singlet görülür. Kolşisin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde 1,99 ppm’de asetamid yapısındaki –CH₃ grubunun 3 protonluk singlet verdiği gözlenmiştir. Azota bağlı proton 7,75–7,74 ppm’de geniş dublet olarak görülür. 5 ve 6. karbonlara ait protonlar multipler halinde gözlenir. 5.karbondaki protonlar 2,54-2,49 ppm’de, 6.karbona ait protonlar ise 2,25-2,40 ppm’de gözlenmiştir.

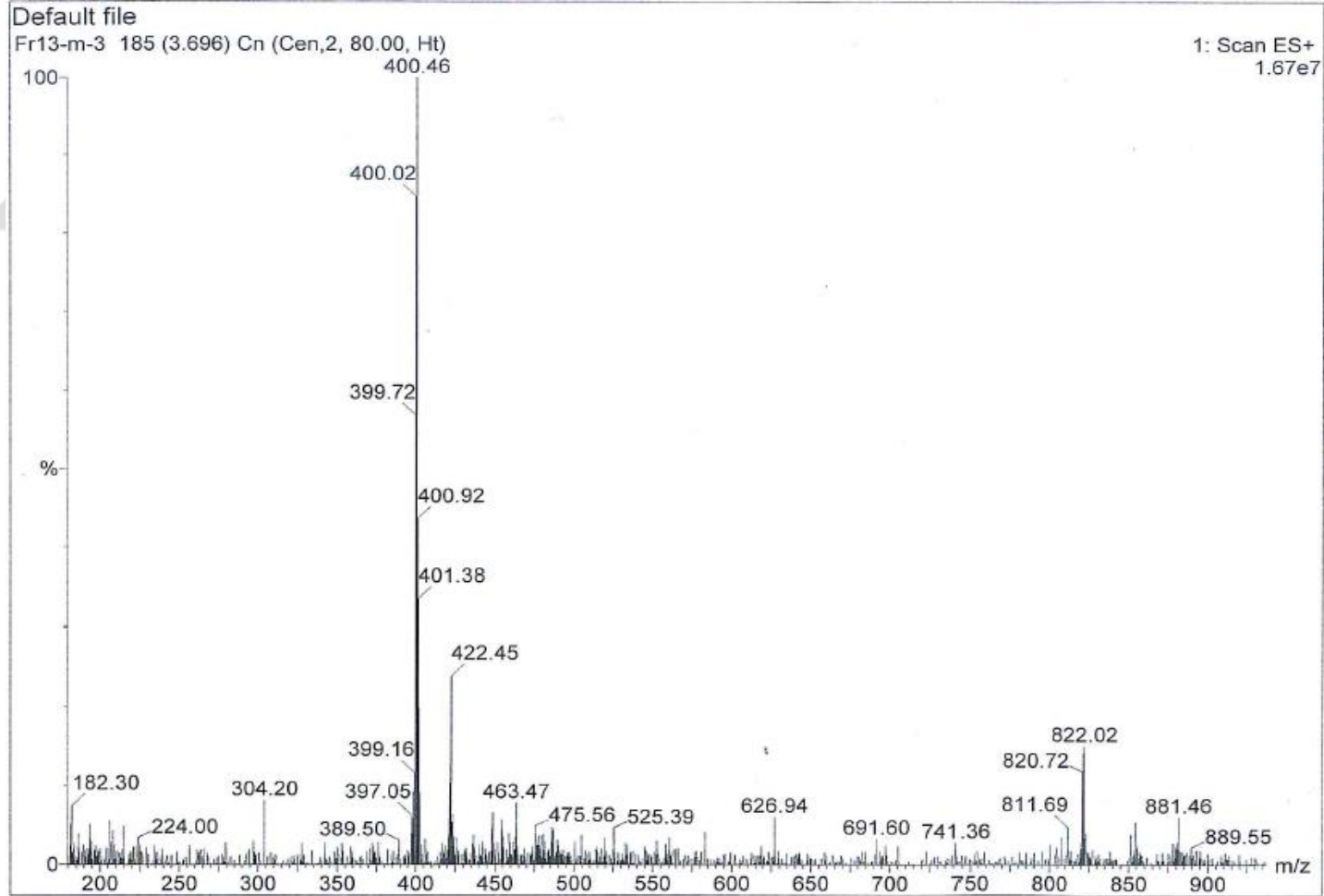
Elde edilen maddelerin (M+1)⁺ piki 400,46 olarak saptanmıştır.

Elde edilen bu alkaloitlerinin yapıları, referans madde ile R_f değerlerinin karşılaştırılması, ¹H NMR spektrumları ve Kütle spektrumlarının değerlendirilerek literatür bilgileri ile karşılaştırmaları sonucundabu maddelerin “Kolşisin” olduğu anlaşılmıştır.¹⁰⁷

Kolşisin’e ait (Fr_{11-13-m-3}) ¹H NMR spektrumu ve Kütle spektrumu Şekil 4-13 ve Şekil 4-14’de verilmiştir.

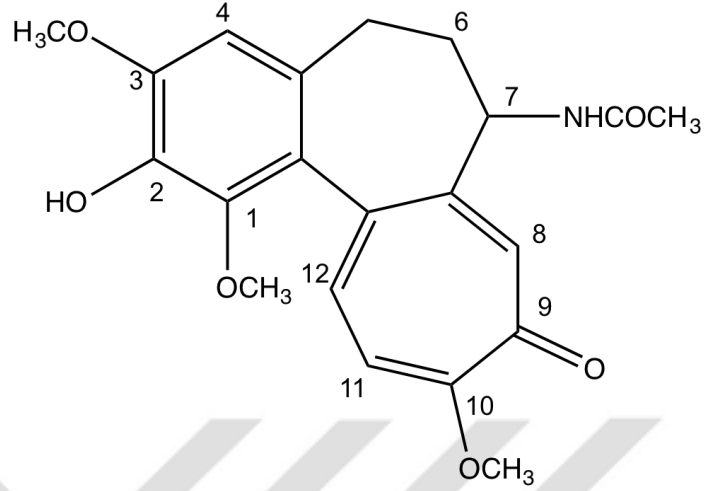


Şekil 4-13:Kolşisin'in ¹H NMR spektrumu (Fr₁₁₋₁₃-m-3 kodlu madde)



Şekil 4-14: Kolşisin'in kütle spektrumu (Fr₁₁₋₁₃-m-3 kodlu madde)

4.3.3.2. 2-Demetilkolşisin



Şekil 4-15: 2-Demetilkolşisin

[N-5,6,7,9-tetrahidro-2-hidroksi-1,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo(a)heptalen-7-il-(S)-asetamit]

$C_{21}H_{23}NO_6$

Renk reaksiyonları: Carr-Price reaktifi ile sarı renk

Gün ışığında silikajel plakta açık sarı renk

UV $_{254nm}$: Mor renk

^1H NMR: 500 MHz $CDCl_3$

- δ 7,01–6,99 (1 H, d; N- H), 7,41 (1 H, s; C-8 H), 7,24-7,22 (1 H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,79-6,77 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,52 (1H, s; C-4 H), 4,57 (1H, m; C-7 H), 3,94 (3H, s; C-10 OCH_3), 3,93 (3H, s; C-3 OCH_3), 3,57 (3H, s; C-1 OCH_3), 2,44-2,25 (2 x 1H, m; C-5 H), 2,17-1,78 (2 x 1H, m; C-6 H), 1,92 (3H,s: N- $COCH_3$)

Kütle spektrumu:

- $(M+1)^+ = 386,07$

C. micranthum sonbahar yumru alkaloit A ekstresinden Fr._{12-13-m-1} ve *C.chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* sonbahar yumru alkaloit ekstresinden Fr_{11-13-m-1-p} kodlu maddelerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde aynı oldukları görülmüştür.

Kolşisin'in ¹H NMR spektrumunda olduğu gibi –OCH₃ pikleri 3,5-4,0 ppm arasında 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir. Kolşisin'den farklı olarak 2-demetilkolşisin'de 2. karbona bağlı –OCH₃ pikleri görülmez. 2-demetilkolşisin ¹H NMR spektrumunda 3,5-4,0 ppm arasında 4 yerine 3 tane singlet gözükmemektedir.

Spektrumlar incelendiğinde 1. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,57 ppm'de, 3. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,93 ppm'de ve 10. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,94 ppm'de 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

Kolşisin ¹H NMR spektrumunda olduğu gibi aromatik sahada 4, 8, 11 ve 12. karbona bağlı protonlar görülür. 4.karbona bağlı proton 6,52 ppm'de, 8.karbona bağlı proton ise 7,41 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. 11 (6,79-6,77 ppm) ve 12 (7,24-7,22 ppm) nolu karbonlara bağlı protonlar ise J değeri 10 olan dubletler şeklinde gözlenmiştir.

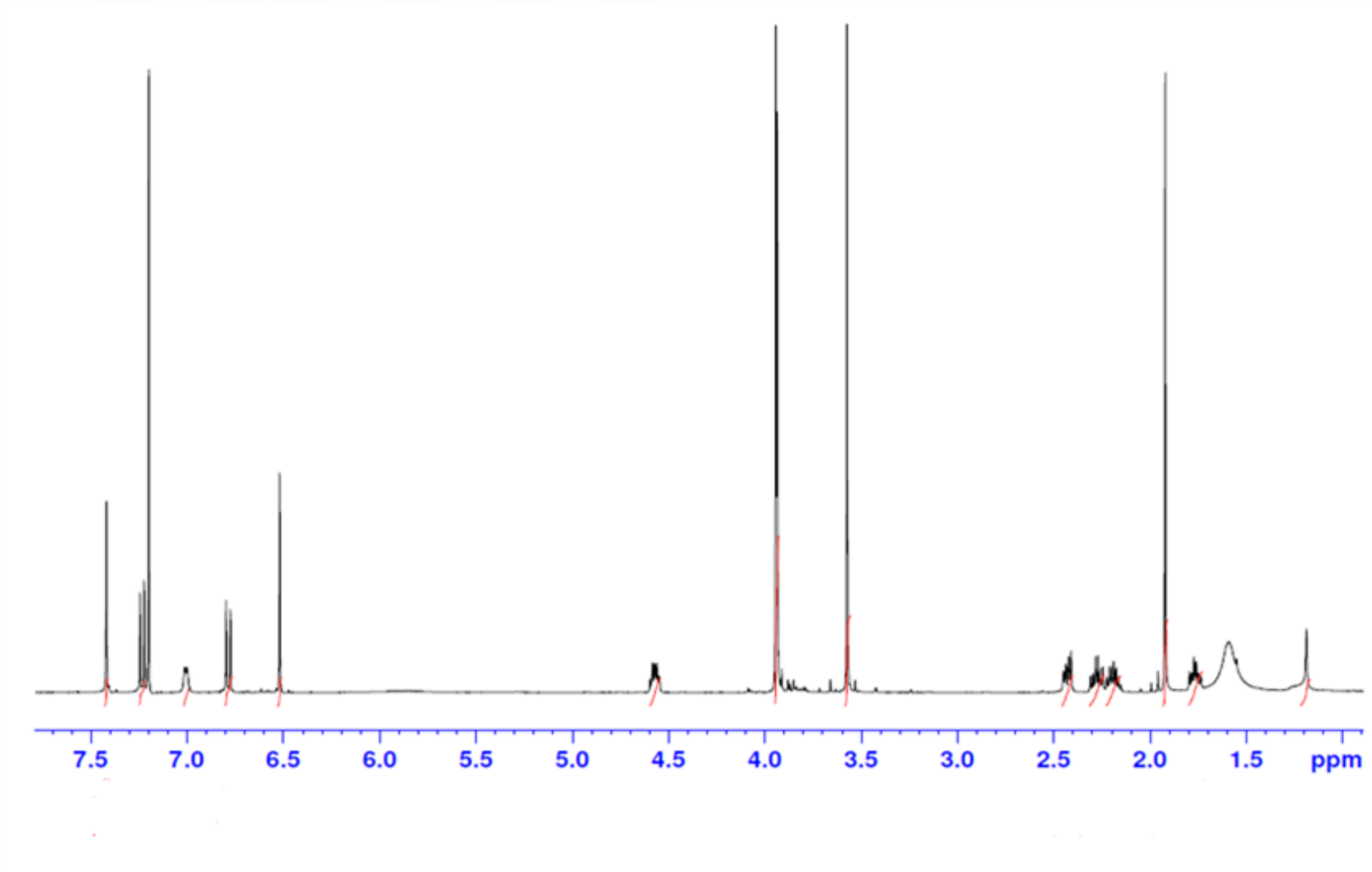
7. karbona ait proton 4,57 ppm civarında multiyet olarak gözlenir. Asetamid yapısındaki –CH₃ 1,92 ppm'de 3 protonluk bir singlet olarak görülmektedir. Azota bağlı proton 7,01–6,99 ppm'de geniş dublet olarak görülür.

5 ve 6. karbonlara ait protonlar multiyetler halinde gözlenir. 5.karbondaki protonlar 2,44-2,25 ppm'de, 6.karbona ait protonlar ise 2,17-1,78 ppm'de gözlenmiştir.

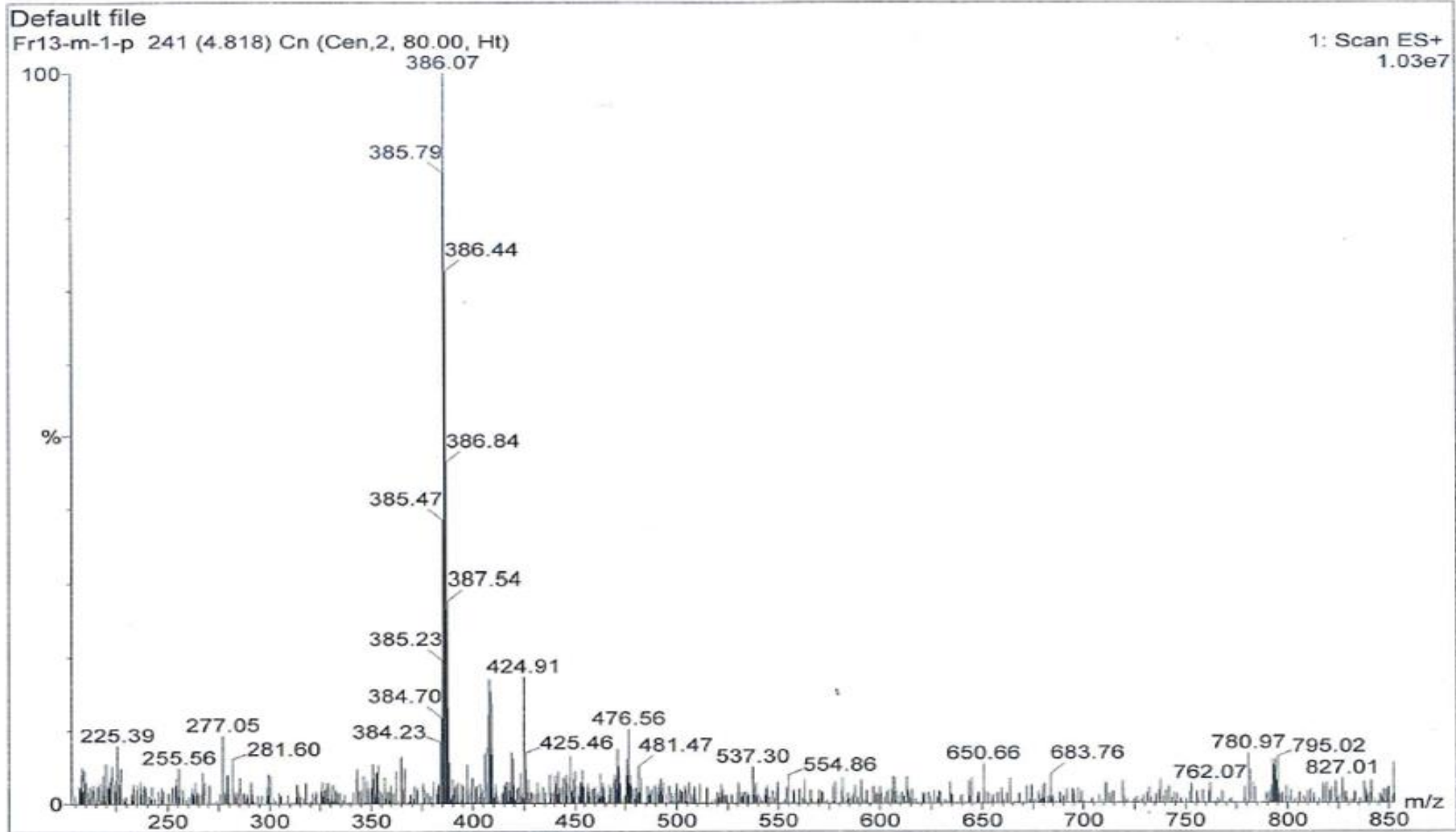
Elde edilen maddelerin kütle spektrumlarında (M+1)⁺ piki gözlenmiştir. Elde edilen maddelerin (M+1)⁺ piki 386,07 olarak saptanmıştır.

Elde edilen Fr._{12-13-m-1} ve Fr_{11-13-m-1} alkaloitlerinin yapıları, refeans madde ile Rf değerlerinin karşılaştırılması, ¹H NMR spektrumları ve kütle spektrumlarının değerlendirilerek literatür bilgileri ile karşılaştırılmaları sonucunda bu maddelerin “2-demetilkolşisin” olduğu anlaşılmıştır.⁶

2-demetilkolşisin'e ait (Fr._{12-13-m-1-p} kodlu madde) ¹H NMR spektrumu ve Kütle spektrumu Şekil 4-16 ve Şekil 4-17'de verilmiştir.

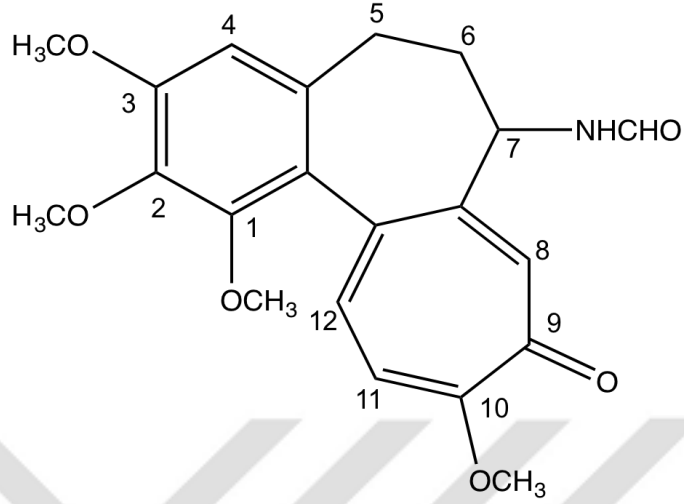


Şekil 4-16:2-demetilkolşisin'in ^1H NMR spektrumu (Fr.12-13-m-1 kodlu madde)



Şekil 4-17:2-demetilkolşisin'in kütle spektrumu (Fr.₁₂₋₁₃-m-1 kodlu madde)

4.3.3.3. *N*-deasetil-*N*-formilkolşisin



Şekil 4-18: *N*-deasetil-*N*-formilkolşisin

Kapalı Formülleri

N-[(7*S*)-5,6,7,9-Tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo[*a*]heptalen-7-il]formamit

$C_{21}H_{23}NO_6$

Renk reaksiyonları: Carr-Price reaktifi ile sarı renk

UV $_{254nm}$: Mor renk

^1H NMR: 400 MHz $CDCl_3$

- δ 8,11 (1 H s; N-CHO), 7,39 (1 H, s; C-8 H), 7,29-7,27 (1 H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,82-6,80 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,47 (1H, s; C-4 H), 4,60 (1H, m; C-7 H), 3,94 (3H, s; C-10 OCH_3), 3,87 (3H, s; C-3 OCH_3), 3,83 (3H, s; C-2 OCH_3), 3,57 (3H, s; C-1 OCH_3), 2,50-2,25 (2 x 1H, m; C-5 H), 2,17-1,78 (2 x 1H, m; C-6 H)

Kütle spektrumu:

- $(M+1)^+ = 386,45$

C. micranthum çiçek alkaloit A ekstresinden yapılan izolasyonda elde edilen Fr.15-16-m-1 kodlu madde ve *C. chalconicum* subsp. *chalconicum* tohum alkaloit A ekstresinden yapılan izolasyonda elde edilen T-A-2-3 kodlu maddenin ^1H NMR spektrumları aynıdır. Bu spektrumlar incelendiğinde Kolşisin'in ^1H NMR spektrumunda olduğu gibi $-\text{OCH}_3$ pikleri 3,5-4,0 ppm arasında 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

T-A-2-3 kodlu maddenin spektrumu incelendiğinde 1. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,57 ppm'de, 2. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,83 ppm'de, 3. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,87 ppm'de ve 10. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,94 ppm'de 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

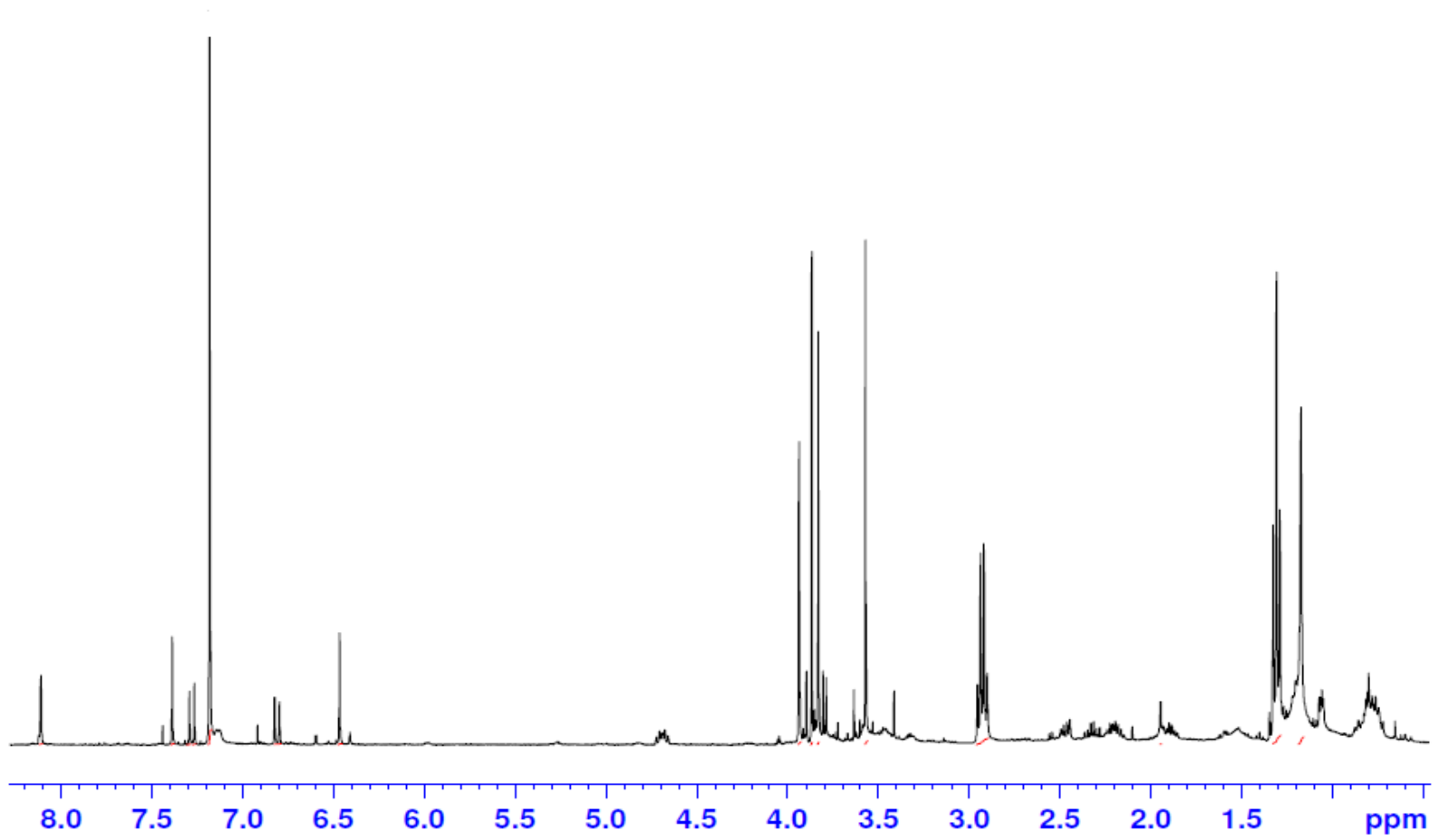
Kolşisin ^1H NMR spektrumunda olduğu gibi aromatik sahada 4, 8, 11 ve 12. karbona bağlı protonlar görülür. 4.karbona bağlı proton 6,47 ppm'de, 8.karbona bağlı proton ise 7,39 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. 11 (6,82-6,80 ppm) ve 12 (7,29-7,27 ppm) nolu karbonlara bağlı protonlar ise J değeri 10 olan dubletler şeklinde gözlenmiştir. T-A-2-3 kodlu maddenin spektrumunda Kolşisin'in spektrumundan farklı olarak 8,11 ppm'de 1 protona karşılık gelen singlet pik görülmektedir. *N*-deasetil-*N*-formil ve türevlerinde azota aldehit grubu bağlandığından, aldehitin protonu 8,10-8,15 ppm civarında 1 protona karşılık gelen singlet olarak gözükür. Asetil grubu olmadığından kolşisin türevlerinde 1,90- 2,00 ppm de gözlenen 3 protonluk singlet pik görülmez.

7. karbona ait proton 4,60 ppm civarında multipler olarak gözlenmiştir. 5 ve 6. karbonlara ait protonlar multipler halinde gözlenir. 5.karbondaki protonlar 2,50-2,25 ppm'de, 6.karbona ait protonlar ise 2,17-1,80 ppm'de gözlenmiştir.

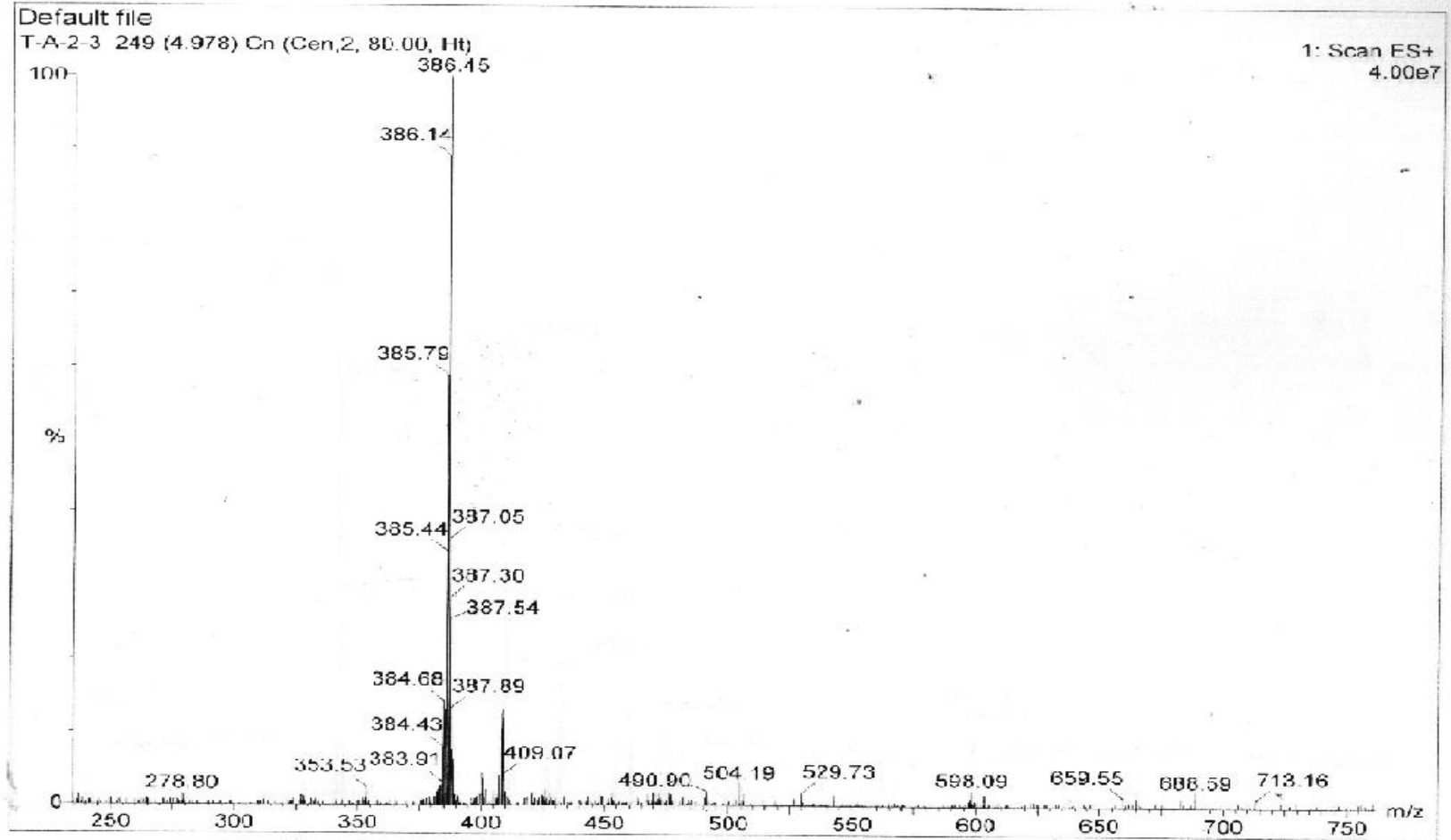
Elde edilen maddelerin kütle spektrumlarında $(\text{M}+1)^+$ piki gözlenmiştir. Elde edilen maddenin $(\text{M}+1)^+$ piki 386,45 olarak saptanmıştır.

Elde edilen Fr.15-16-m-1 ve T-A-2-3 kodlu maddelerin yapısı, ^1H NMR spektrumları ve kütle spektrumlarının değerlendirilerek aydınlatılmıştır. Bunlara ek olarak literatür bilgileri ile karşılaştırılmaları sonucunda bu maddelerin “*N*-deasetil-*N*-formilkolşisin” olduğu anlaşılmıştır.⁶

N-deasetil-*N*-formilkolşisin'e ait (T-A-2-3 kodlu madde) ^1H NMR spektrumu ve Kütle spektrumu Şekil 4-19'de ve Şekil 4-20'de verilmiştir.

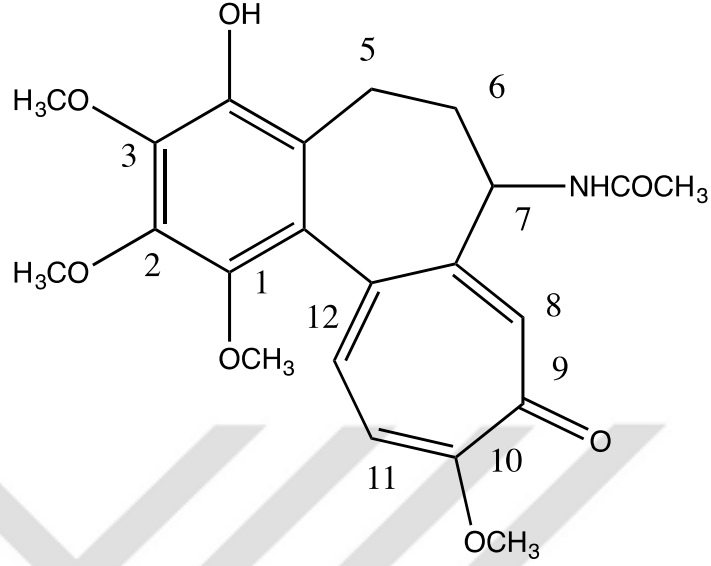


Şekil 4-19 :*N*-Deasetil-*N*-FormilKolşisin'in ^1H NMR spektrumu (T-A-2-3 kodlu madde)



Şekil 4-20: *N*-Deasetil-*N*-FormilKolşisin'in kütle spektrumu (T-A-2-3 kodlu madde)

4.3.3.4. 4-Hidroksikolşisin



Şekil 4-21: 4-Hidroksikolşisin

Kapalı Formülleri

Renk reaksiyonları: Carr-Price reaktifi ile açık sarı renk

UV $_{254\text{nm}}$: Açık mor renk

$^1\text{H NMR}$: 500 MHz CDCl_3

- δ 7,42 (1 H, s; C-8 H), 7,27-7,25 (1 H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,82-6,80 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 4,60 (1H, m; C-7 H), 3,95 (3H, s; C-10 OCH_3), 3,92 (3H, s; C-3 OCH_3), 3,90 (3H, s; C-2 OCH_3), 3,55 (3H, s; C-1 OCH_3), 2,50-2,30 (2 x 1H, m; C-5 H), 2,25-1,95 (2 x 1H, m; C-6 H), 1,99 (3H,s: N- COCH_3)

C. chalcedonicum çiçek alkaloid A ekstresinden yapılan izolasyonda elde edilen Fr.47-50-m-1 kodlu maddenin ^1H NMR spektrumunda, Kolşisin'in ^1H NMR spektrumunda olduğu gibi $-\text{OCH}_3$ pikleri 3,5-4,0 ppm arasında 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

Fr.47-50-m-1 kodlu maddenin spektrumu incelendiğinde 1. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,55 ppm'de, 2. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,90 ppm'de, 3. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,92 ppm'de ve 10. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,95 ppm'de 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

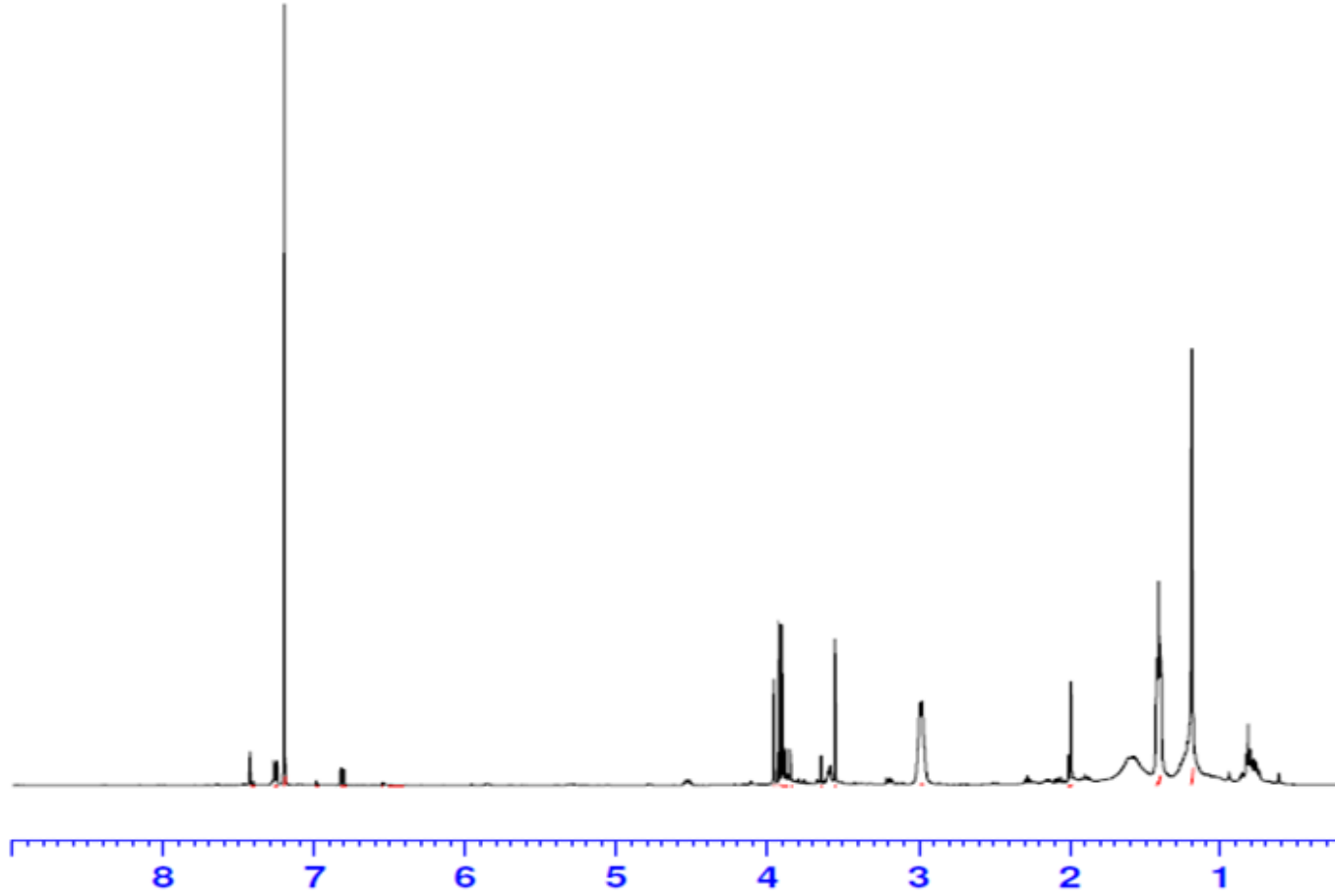
Kolşisin ^1H NMR spektrumunda olduğu gibi aromatik sahada 4, 8, 11 ve 12. karbona bağlı protonlar görülür. 8.karbona bağlı proton ise 7,42 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. 11 (6,82-6,80 ppm) ve 12 (7,27-7,25 ppm) nolu karbonlara bağlı protonlar ise J değeri 10 olan dubletler şeklinde gözlenmiştir. Fr.47-50-m-1 kodlu maddenin spektrumunda Kolşisin'in spektrumundan farklı olarak 6 ppm civarında 1 protona karşılık gelen singlet pik görülmemektedir.

7. karbona ait proton 4,60 ppm civarında multipler olarak gözlenmiştir. 5 ve 6. karbonlara ait protonlar multipler halinde gözlenir. 5.karbonadaki protonlar 2,50-2,30 ppm'de, 6.karbona ait protonlar ise 2,25-1,95 ppm'de gözlenmiştir. Asetamid yapısındaki $-\text{CH}_3$ 1,99 ppm'de 3 protonluk bir singlet olarak görülmektedir.

Elde edilen maddenin miktarı yeterli olmadığından kütle spektrumu çekilememiştir.

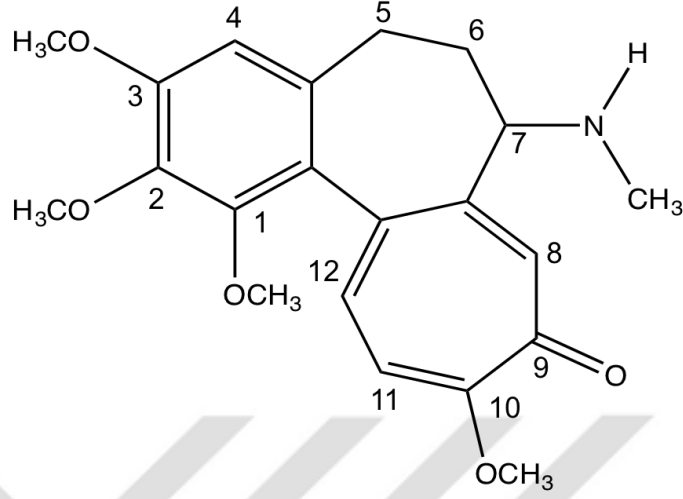
C.chalcedonicum çiçek kısmından elde edilen Fr.47-50-m-1 kodlu maddenin yapısı, ^1H NMR spektrumu değerlendirilerek ve NMR değerlerinin literatür bilgileri ile karşılaştırılmasıyla bu maddelerin "4-hidroksikolşisin" olduğu anlaşılmıştır.⁶

4-hidroksikolşisin'e ait (Fr.47-50-m-1) ^1H NMR spektrumu Şekil 4-22'de verilmiştir.



Şekil 4-22:4-hidroksikolşisin'nin ^1H NMR spektrumu (Fr.47-50-m-1 kodlu madde)

4.3.3.5. Demekolsin



Şekil 4-23: Demekolsin

Kapalı Formülleri

(S)-1,2,3,10-Tetrametoksi-7-metilamino-6,7-dihidro-5H-benzo[a]heptalen-9-on

$C_{21}H_{25}NO_5$

Diğer isimleri: N-Deasetil-N-metilkolşisin, Kolşemid

Renk reaksiyonları: Carr-Price reaktifi ile parlak sarı renk

UV $_{254nm}$: Koyu mor renk

^1H NMR: 400 MHz $CDCl_3$

- δ 7,63 (1 H, s; C-8 H), 7,20-7,18 (1 H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,76-6,74 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,48 (1H, s; C-4 H), 3,20 (1H, m; C-7 H), 3,95 (3H, s; C-10 OCH_3), 3,87 (3H, s; C-3 OCH_3), 3,85 (3H, s; C-2 OCH_3), 3,54 (3H, s; C-1 OCH_3), 2,50-2,30 (2 x 1H, m; C-5 H), 2,00-1,65 (2 x 1H, m; C-6 H), 2,16 (3H,s; N- CH_3)

Kütle spektrumu:

- $(M+1)^+ = 372,47$

C. chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* tohum alkaloid A ekstresinden T-A-1 kodlu maddenin ^1H NMR spektrumu incelendiğinde $-\text{OCH}_3$ pikleri 3,5-4,0 ppm arasında 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir..

Spektrum incelendiğinde 1. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,54 ppm'de, 2. karbona bağlı bulunan $-\text{OCH}_3$ protonları 3,85 ppm'de, 3. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,87 ppm'de ve 10. karbona bağlı $-\text{OCH}_3$ protonları 3,95 ppm'de 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

Kolşisin ^1H NMR spektrumunda olduğu gibi aromatik sahada 4, 8, 11 ve 12. karbona bağlı protonlar görülür. 4.karbona bağlı proton 6,48 ppm'de, 8.karbona bağlı proton ise Kolşisin'e göre biraz daha aşağı alana kayarak 7,63 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. 11 (6,76-6,74 ppm) ve 12 (7,20-7,18 ppm) nolu karbonlara bağlı protonlar ise J değeri 10 olan dubletler şeklinde gözlenmiştir.

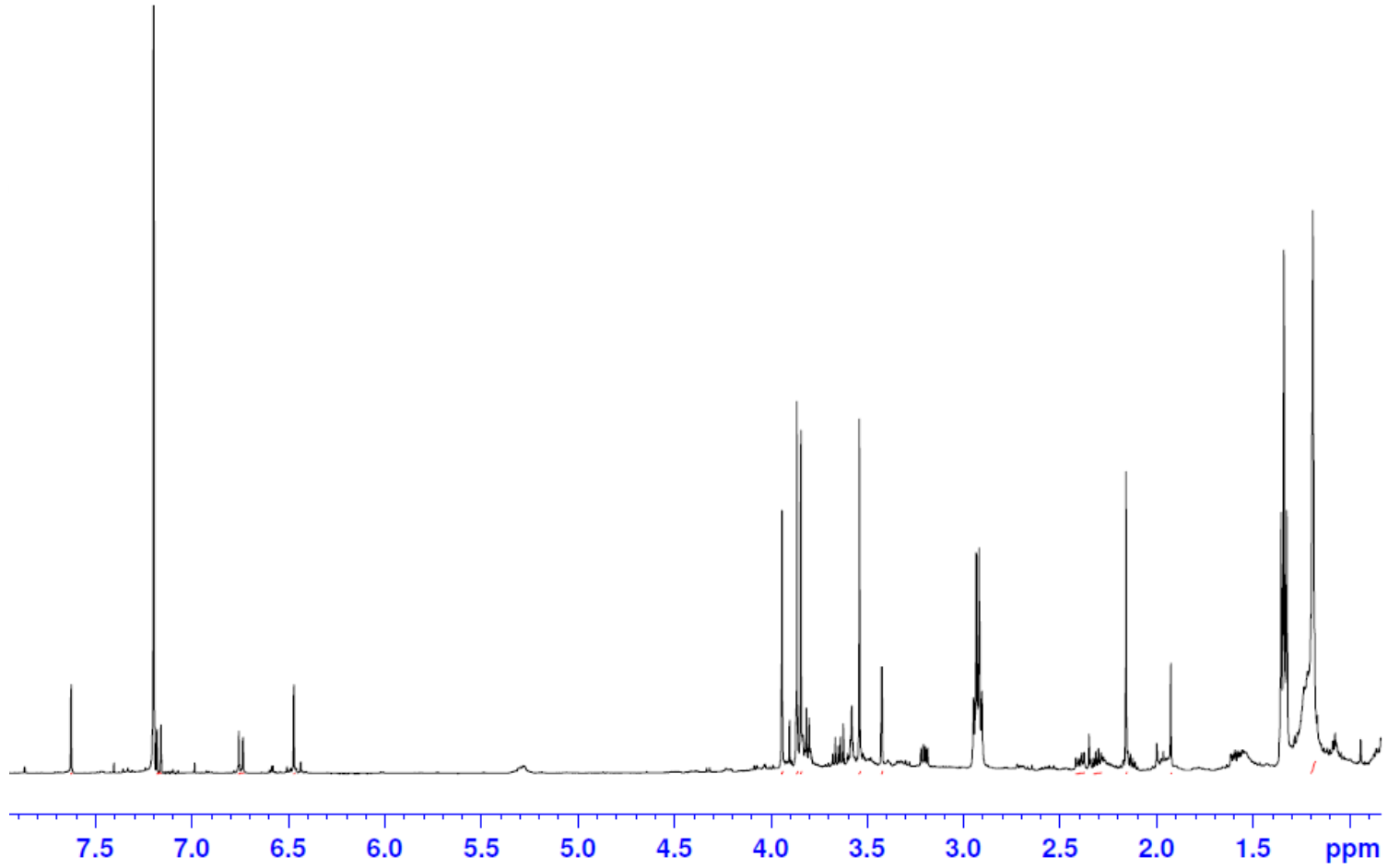
Kolşisin ^1H NMR spektrumundan farklı olarak 7. karbona ait proton 3,20 ppm civarında multipler olarak gözlenir. Spektrum incelendiğinde yine Kolşisin ^1H NMR spektrumundan farklı olarak $-\text{CH}_3$ direk olarak azota bağlı olduğundan aşağı alana kayar ve 2,16 ppm'de 3 protonluk bir singlet olarak görülür.

5 ve 6. karbonlara ait protonlar multipler halinde gözlenir. 5.karbondaki protonlar 2,50-2,30 ppm'de, 6.karbona ait protonlar ise 2,00-1,65 ppm'de gözlenmiştir.

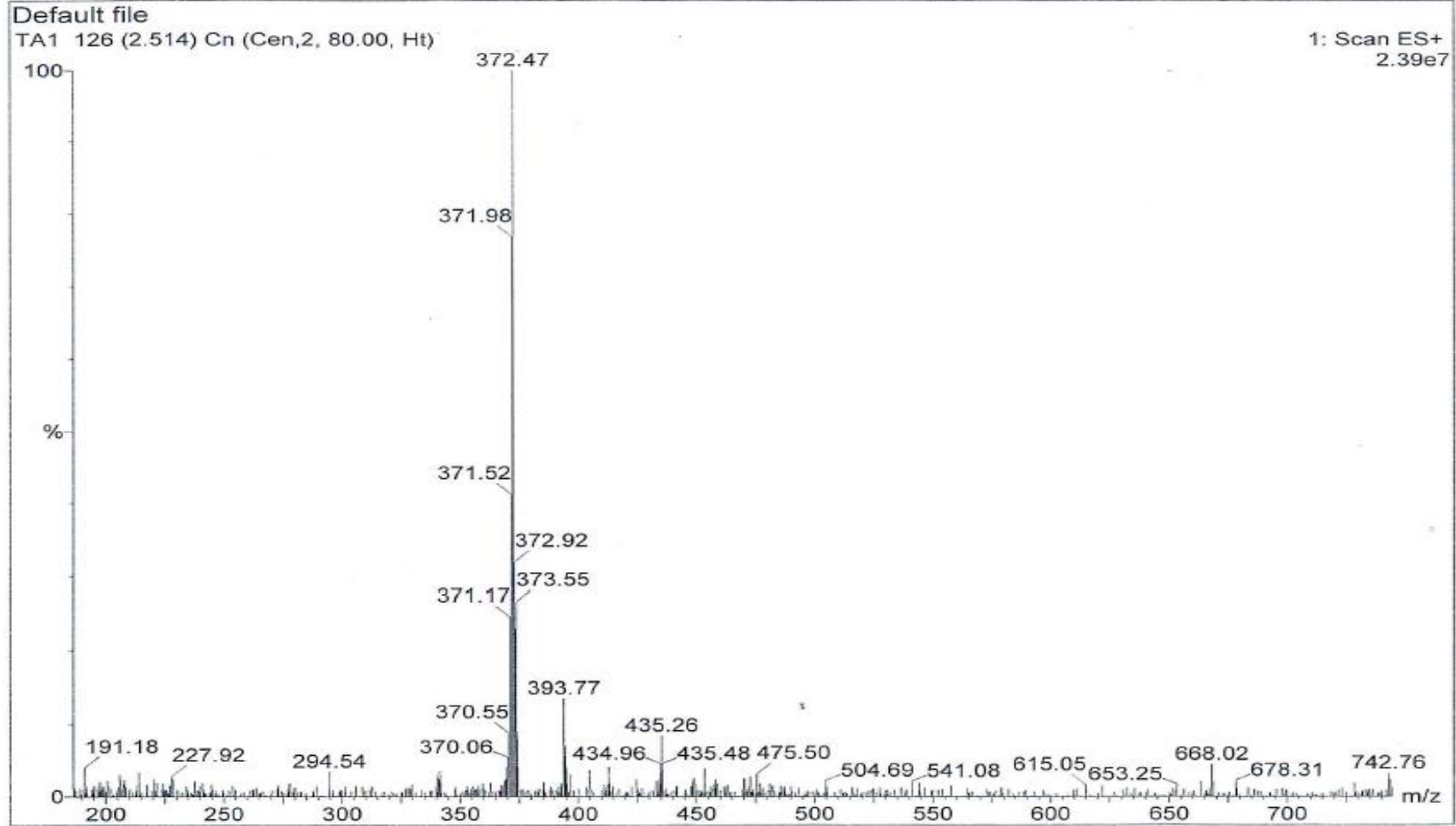
Elde edilen maddelerin kütle spektrumlarında $(\text{M}+1)^+$ piki gözlenmiştir. Elde edilen maddelerin $(\text{M}+1)^+$ piki 372,47 olarak saptanmıştır.

Elde edilen T-A-1 kodlu maddenin yapısı, referans madde ile R_f değerlerinin karşılaştırılması, ^1H NMR spektrumları ve kütle spektrumlarının değerlendirilerek literatür bilgileri ile karşılaştırılmaları sonucunda bu maddenin "Demekolsin" olduğu anlaşılmıştır.⁶

Demekolsin'e ait (T-A-1 kodlu madde) ^1H NMR spektrumu ve Kütle spektrumu Şekil 4-24'de ve şekil 4-25'de verilmiştir.

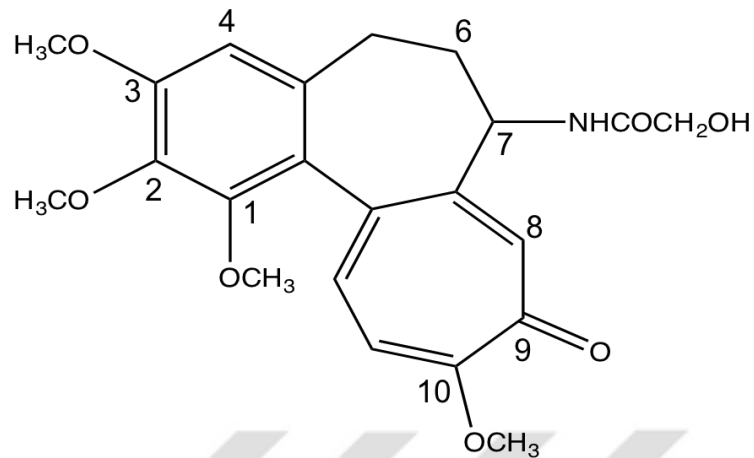


Şekil 4-24: Demekolsin'in ^1H NMR spektrumu (T-A-1 kodlu madde)



Şekil 4-25: Demekolsin'in kütle spektrumu (T-A-1 kodlu madde)

4.3.3.6. Kolşifolin



Şekil 4-26: Kolşifolin

Kapalı Formülleri

2-hidroksi-N-(1,2,3,10-tetrametoksi-9-okso-6,7-dihidro-5H-benzo[a]heptalen-7-yl)asetamit

$C_{22}H_{25}NO_7$

Renk reaksiyonları: Carr-Price reaktifi ile parlak sarı renk

UV $_{254nm}$: Koyu mor renk

^1H NMR: 400 MHz $CDCl_3$

- δ 7,67–7,65 (1 H, geniş d; N- H), 7,55 (1 H, s; C-8 H), 7,35-7,33 (1 H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,89-6,87 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,55 (1H, s; C-4 H), 4,70 (1H, m; C-7 H), 4,18-4,14, 4,04-4,00 (A-B-kuartet, NCO-CH₂OH) 3,99 (3H, s; C-10 OCH₃), 3,93 (3H, s; C-3 OCH₃), 3,90 (3H, s; C-2 OCH₃), 3,64 (3H, s; C-1 OCH₃), 2,57-2,25 (2 x 1H, m; C-5 H), 2,03-1,94 (2 x 1H, m; C-6 H)

Kütle spektrumu:

- $(M+1)^+ = 416,37$

C. micranthum sonbahar yumru ve çiçek kısmından elde edilen alkaloit A ekstrelerinden Fr._{12-13-m-2} ve Fr._{15-16-m-2} kodlu maddeler ile *C. chalconicum* subsp.*chalconicum* sonbahar yumru, çiçek ve tohum alkaloit A ekstrelerinden Fr._{11-13-m-2}, Fr._{47-50-m-2} ve T-A-3 kodlu maddelerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde aynı oldukları görülmüştür.

Bu maddelerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde; 1. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,64 ppm’de, 2. karbona bağlı bulunan –OCH₃ protonları 3,90 ppm’de, 3. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,93 ppm’de ve 10. karbona bağlı –OCH₃ protonları 3,99 ppm’de 3 H değerinde singlet olarak görülmektedir.

Kolşisin ¹H NMR spektrumunda olduğu gibi aromatik sahada 4, 8, 11 ve 12. karbona bağlı protonlar görülür. 4. karbona bağlı proton 6,55 ppm’de, 8.karbona bağlı proton ise 7,55 ppm’de singlet olarak gözlenmiştir. 11 (6,89-6,87 ppm) ve 12 (7,35-7,33 ppm) nolu karbonlara bağlı protonlar ise J değeri 10 olan dubletler şeklinde gözlenmiştir.

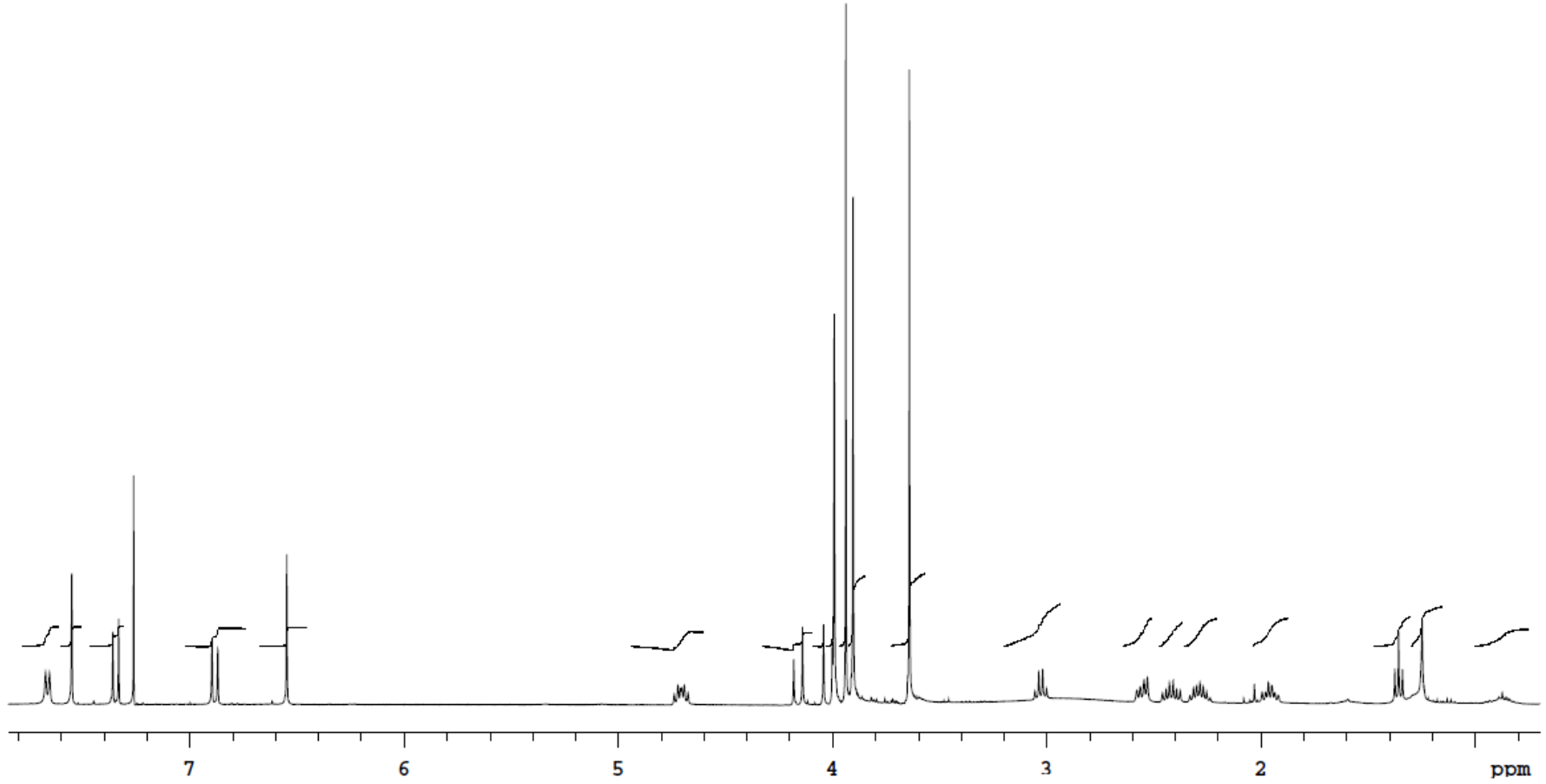
7. karbona ait proton biraz daha aşağı alana kayarak 4,70 ppm civarında multipler olarak gözlenir. Asetamid yapısındaki –CH₂OH’dan dolayı metoksil piklerinin görüldüğü sahada 4,18-4,14, 4,04-4,00 (A-B-kuartet) pikler görülmektedir. Azota bağlı proton 7,67–7,65 ppm’de geniş dublet olarak görülür.

5 ve 6. karbonlara ait protonlar multipler halinde gözlenir. 5. karbondaki protonlar 2,57-2,25 ppm’de, 6. karbona ait protonlar ise 2,03-1,94 ppm’de gözlenmiştir.

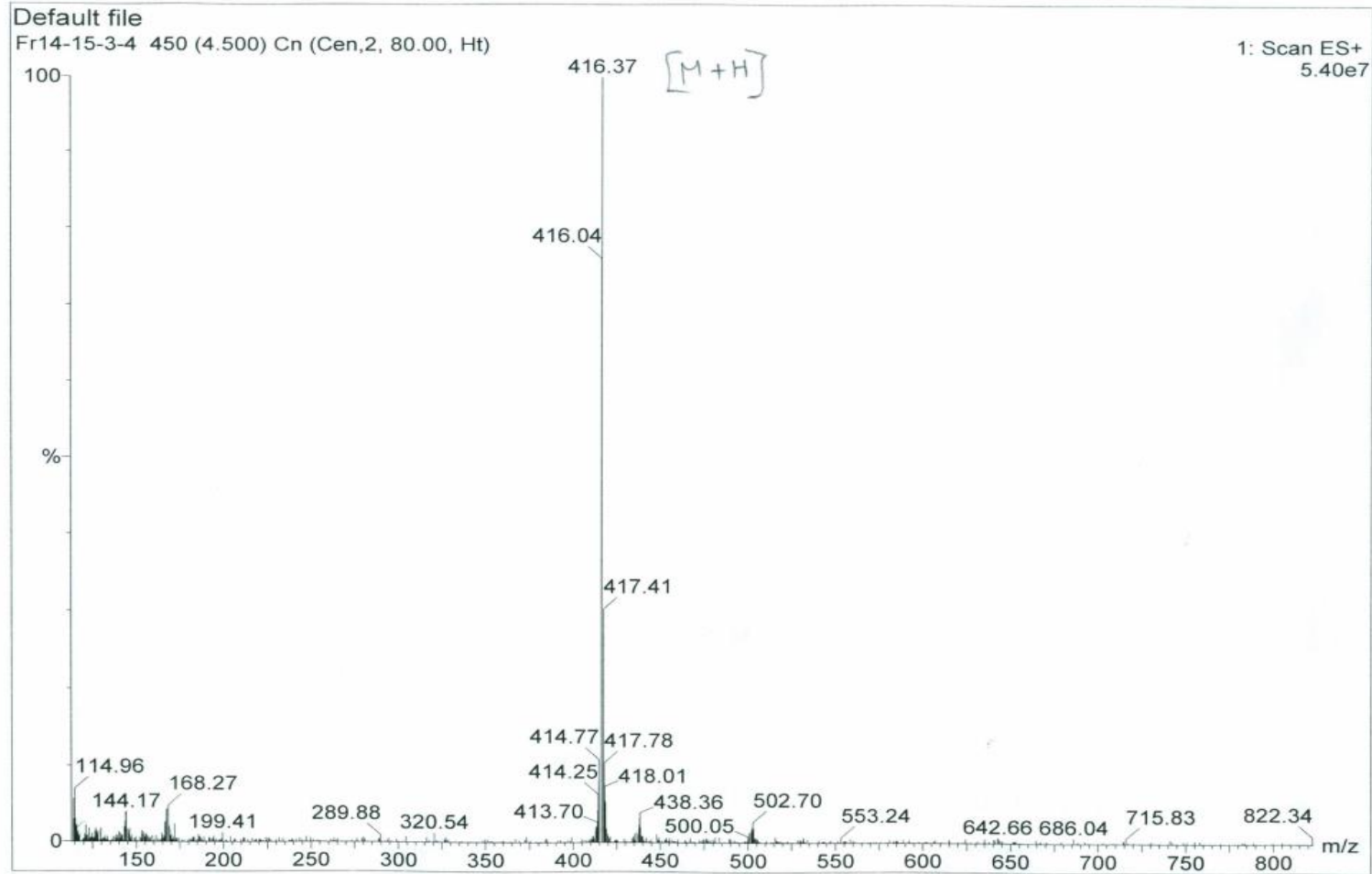
Elde edilen maddelerin kütle spektrumlarında (M+1)⁺ piki gözlenmiştir. Elde edilen maddelerin (M+1)⁺ piki 416,37 olarak saptanmıştır.

Elde edilen Fr._{12-13-m-2}, Fr._{15-16-m-2}, Fr._{11-13-m-2}, Fr._{47-50-m-2} ve T-A-3 alkaloitlerinin yapıları, refeans madde ile R_f değerlerinin karşılaştırılması, ¹H NMR spektrumları ve Kütle spektrumlarının değerlendirilerek literatür bilgileri ile karşılaştırılmaları sonucundabu maddelerin “Kolşifolin” olduğu anlaşılmıştır.⁶

Kolşifolin’e ait (Fr._{15-16-m-2}) ¹H NMR spektrumu ve Kütle spektrumu Şekil 4-27 ve Şekil 4-28’de verilmiştir.



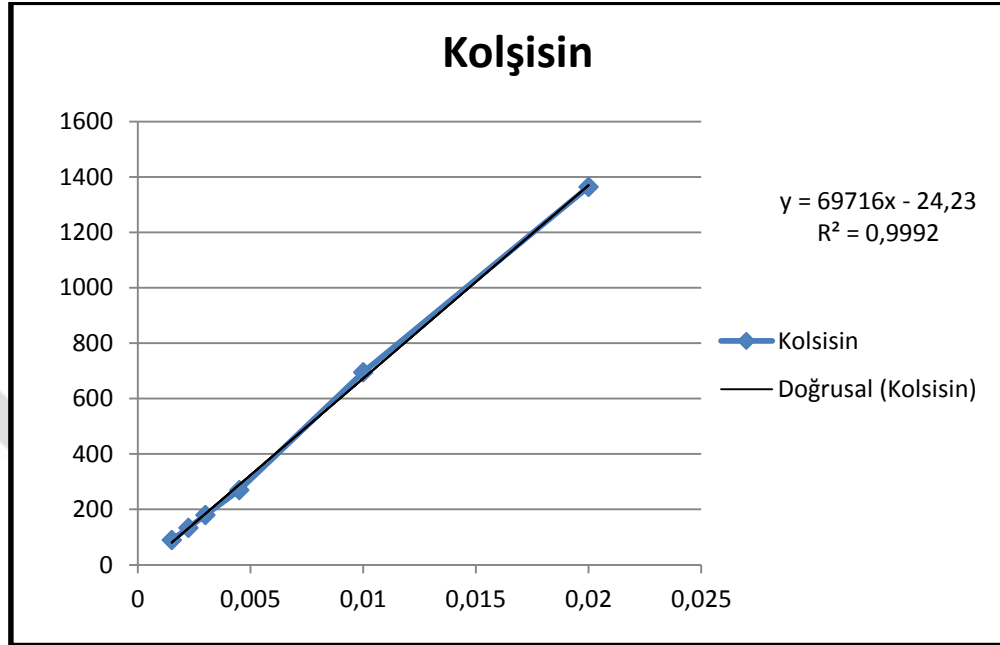
Şekil 4-27: Kolşifolin'in ^1H NMR spektrumu



Şekil 4-28: Kolşifolin'in kütle spektrumu

4.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Miktar Tayini Sonuçları

4.4.1. Kolşisin Ölçü Eğrisi



Şekil 4-29: Kolşisin'e ait ölçü eğrisi

Hesaplanan Doğru Denklemi:

$$Y = 69716X - 24,23$$

$$R^2 = 0,9992$$

Hazırlanan konsantrasyonlar:

0,02, 0,01, 0,0045, 0,003, 0,00225, 0,0015 mg/ml

4.4.2. Ekstrelerin Verim Hesabı Sonuçları

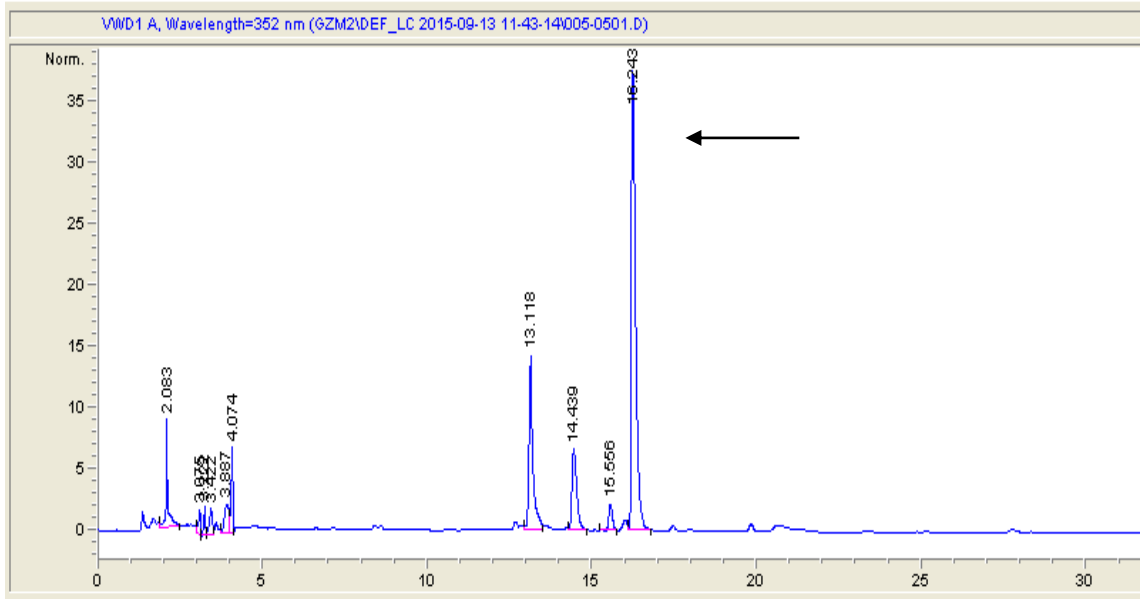
C. micranthum ve *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* ekstrelerinin verimleri aşağıdaki Tablo 4-9'da gösterilmiştir. Verim hesabı ile ekstredeki konsantrasyondan bitkideki konsantrasyon hesabına geçilmiştir.

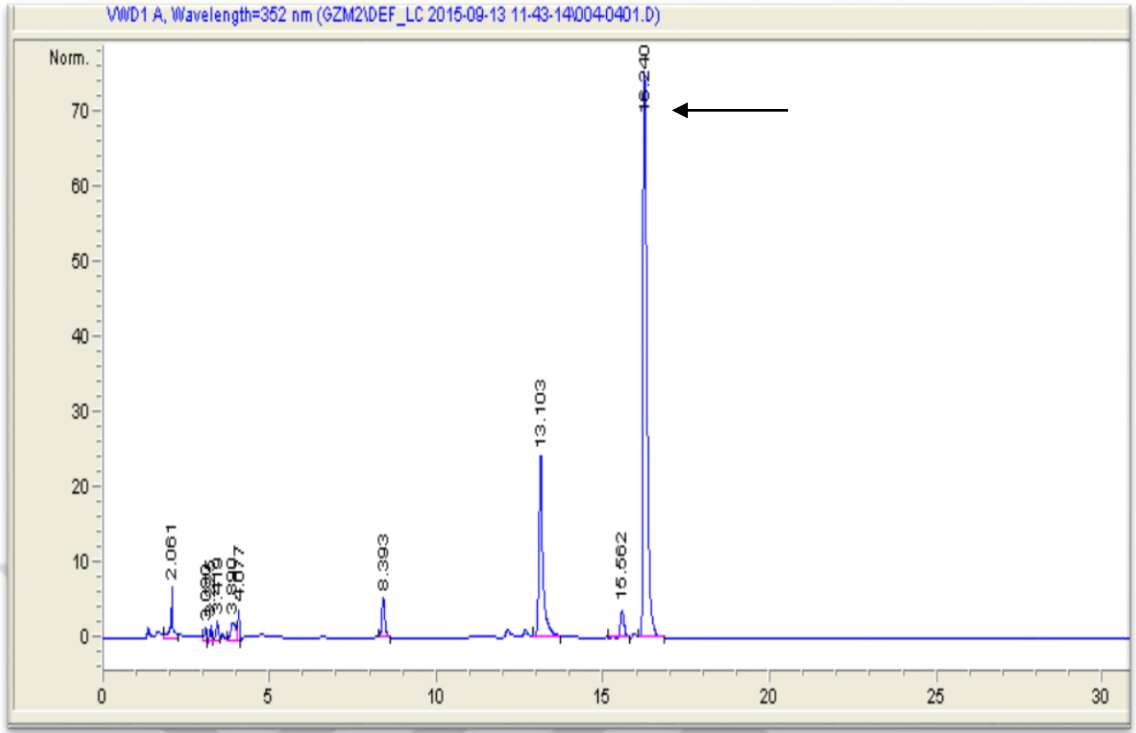
Tablo 4-9: Bitkilerin yüzde verim hesabı

Tür	Kısım	Verim (%)
<i>C. micranthum</i>	Sonbahar Yumru	14,21
	İlkbahar Yumru	13,94
	Çiçek	35,00
<i>C. chalconicum subsp. chalconicum</i>	Sonbahar Yumru	5,19
	İlkbahar Yumru	6,46
	Çiçek	40,00
	Tohum	28,32

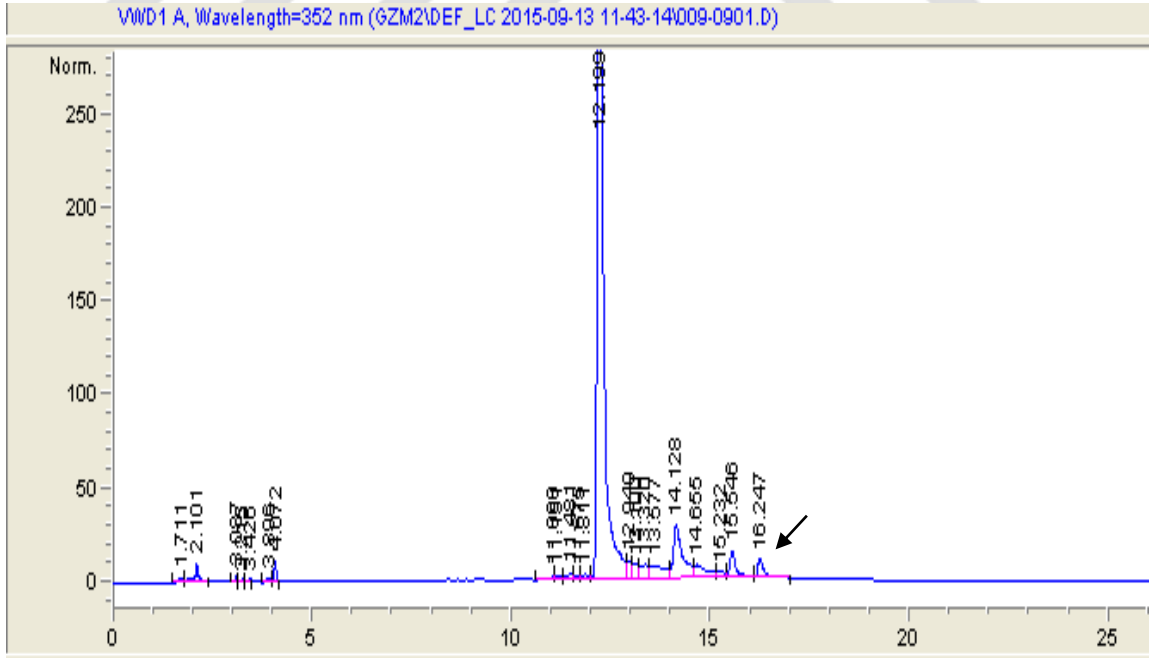
4.4.3. *C. micranthum* Ekstrelerinde Miktar Tayini Sonuçları

YBSK analizleri sonucunda *C. micranthum* bitkisinin farklı kısımlarına ait ekstrelerinden elde edilen kromatogramlar aşağıda verilmiştir. YBSK analizi sonucunda hesaplanan alanlar 4.4.1 bölümünde hesaplanan doğru denkleminde yerine konularak ekstrelerin kolşisin miktarı hesaplanmıştır.

Şekil 4-30: *C. micranthum* ilkbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı



Şekil 4-31: *C. micranthum* sonbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı



Şekil 4-32: *C. micranthum* çiçek metanol ekstresinin YBSK kromatogramı

C. micranthum türünün farklı kısımlarına ait ekstrelerin kolşisin miktarı aşağıdaki Tablo 4-9’da verilmiştir.

Tablo 4-10: *C.micranthum* ekstrelerine ait kolşisin miktarı (%)

Ekstre Kodları	EK (mg/ml)	e (%)	h (%)
Mic.Ys.	5	0,1831	0,0260
Mic.Yi.	5	0,1026	0,0143
Mic.Ç.	5	0,0400	0,014

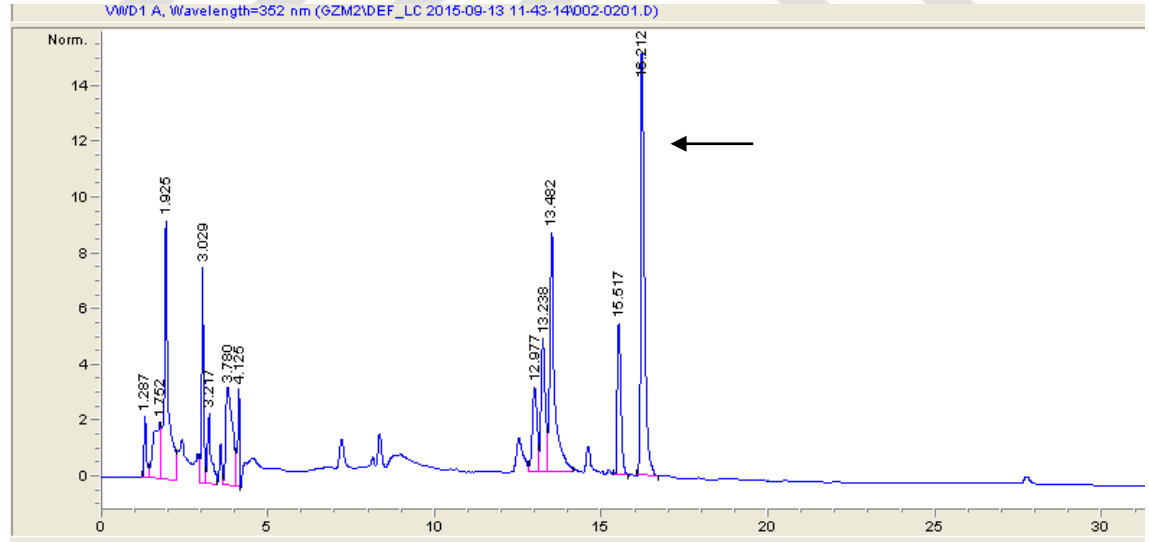
EK: Enjekte edilen ekstrenin konsantrasyonu

e: Ekstre içerisindeki standart madde miktarının % değeri ($e = (x / \text{Konsantrasyon}) * 100$)

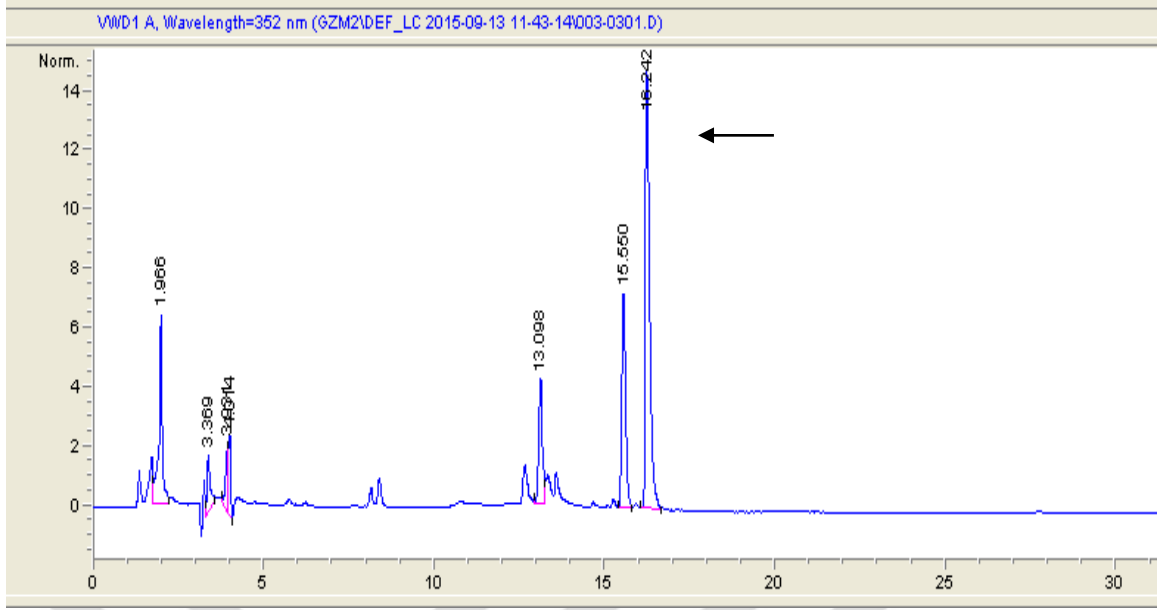
h: Bitki içerisindeki % standart madde miktarı (h=ekstre verimi * e / 100)

4.4.4. *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* Ekstrelerinde Miktar Tayini Sonuçları

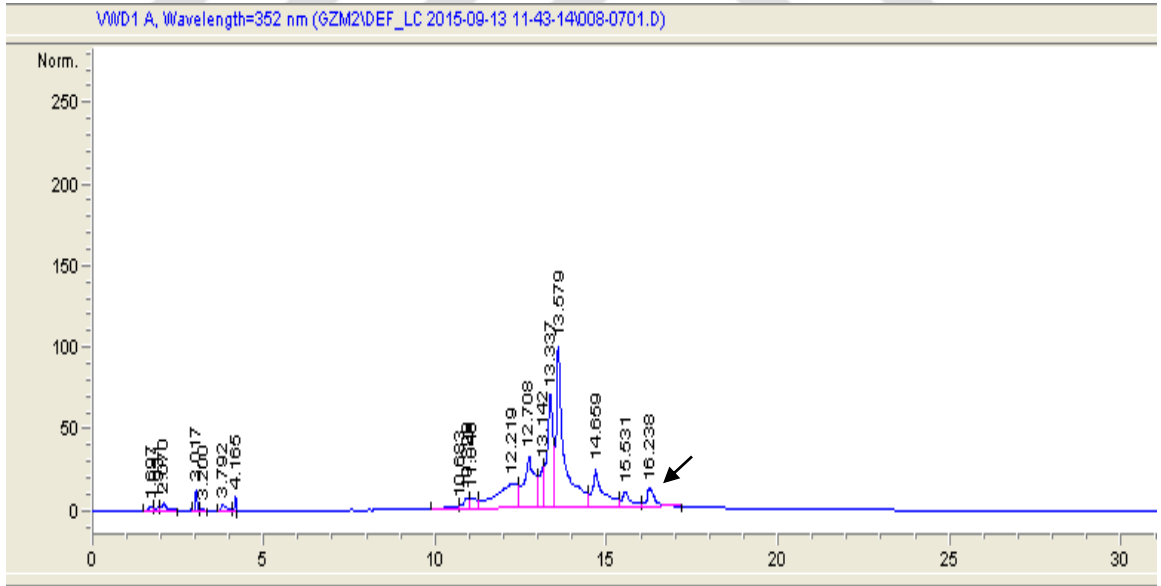
YBSK analizleri sonucunda *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* bitkisinin farklı kısımlarına ait ekstrelerinden elde edilen kromatogramlar aşağıda verilmiştir. YBSK analizi sonucunda hesaplanan alanlar 4.4.1 bölümünde hesaplanan doğru denkleminde yerine konularak ekstrelerin kolşisin miktarı hesaplanmıştır.



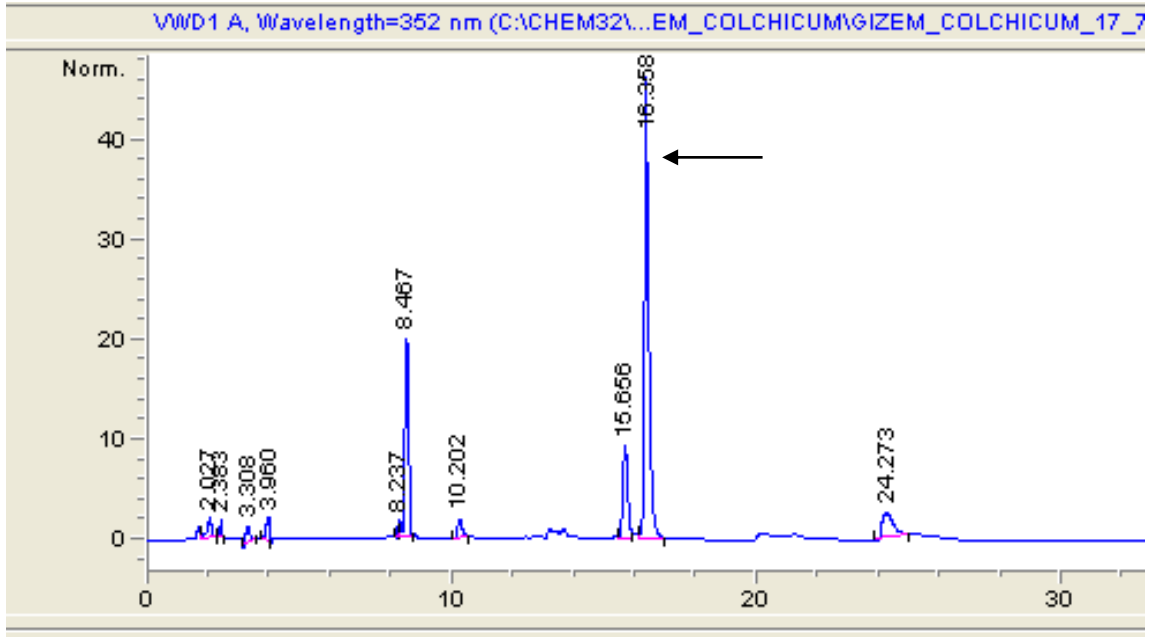
Şekil 4-33: *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* ilkbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı



Şekil 4-34: *C. chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum* sonbahar yumru metanol ekstresinin YBSK kromatogramı



Şekil 4-35: *C. chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum* çiçek metanol ekstresinin YBSK kromatogramı



Şekil 4-36: *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* tohum metanol ekstresinin YBSK kromatogramı

C. chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* türünün farklı kısımlarına ait ekstrelerin kolşisin miktarı aşağıdaki Tablo 4-11’de verilmiştir.

Tablo 4-11: *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* ekstrelerine ait kolşisin miktarı (%)

Ekstre Kodları	EK (mg/ml)	e (%)	h (%)
Chal.T.	2	0,1239	0,0351
Chal.Ys.	5	0,0410	0,0021
Chal.Yi.	5	0,0445	0,0028
Chal.Ç.	5	0,0625	0,0250

EK: Enjekte edilen ekstrenin konsantrasyonu

e: Ekstre içerisindeki standart madde miktarının % değeri ($e = (x / \text{Konsantrasyon}) * 100$)

h: Bitki içerisindeki % standart madde miktarı ($h = \text{ekstre verimi} * e / 100$)

4.5. Sitotoksik Aktivite Sonuçları

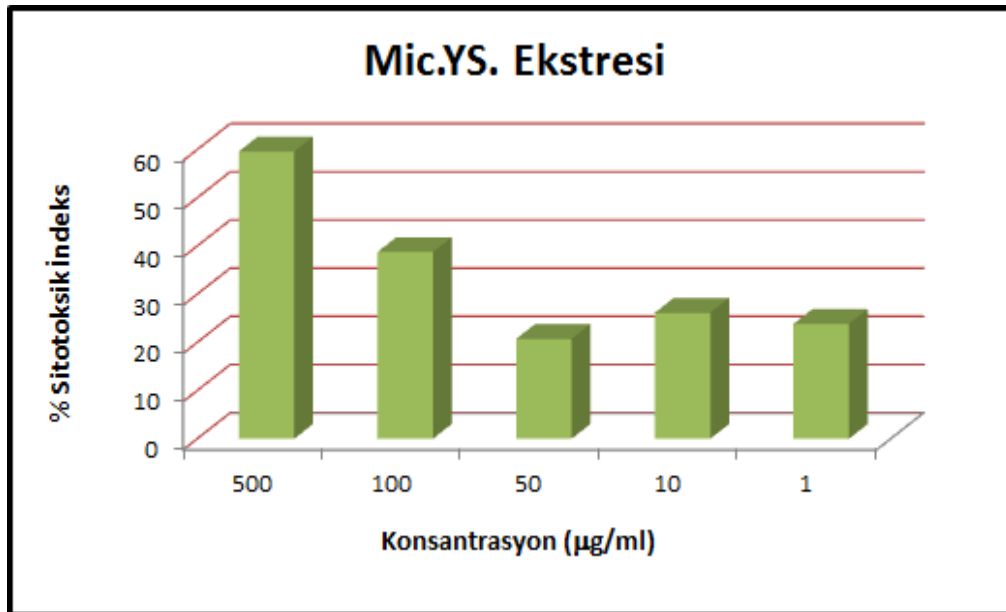
4.5.1. MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Sonuçları

C.micranthum ve *C. chalcedonicum* metanol ekstreleri ile “kolşisin” standartının MTT yöntemi ile A549 hücre serileri üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik aktivite ELISA pleyt okuyucuda 570 nm boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve metodlar kısmındaki sitotoksik indeks formülü ile ve standart sapmaları hesaplandı.

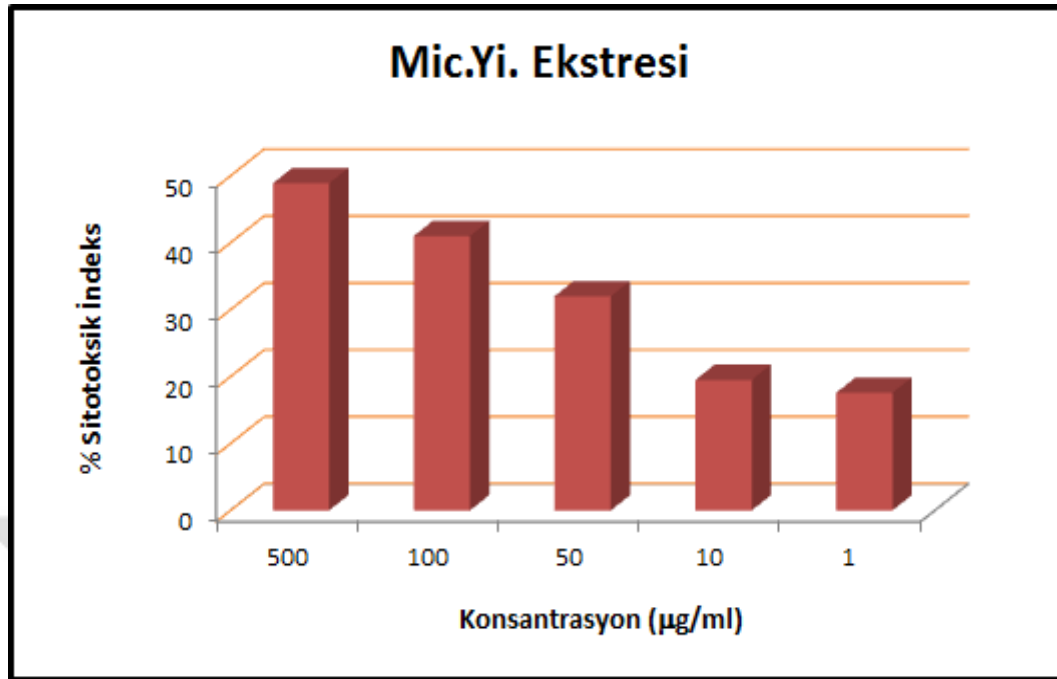
Aynı zamanda ekstrelerden alınan sonuçlar istatistiksel olarak Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi ile değerlendirildi. Bu değerlendirme ile ekstrelerin hangi konsantrasyonlarda kolşisinden istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler Tablo 4-13 ve Tablo 4-14 'te verilmiş ve farklılık gösteren ekstreler koyu renkli P değerleri ile gösterilmiştir.

4.5.1.1. *C. micranthum* Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları

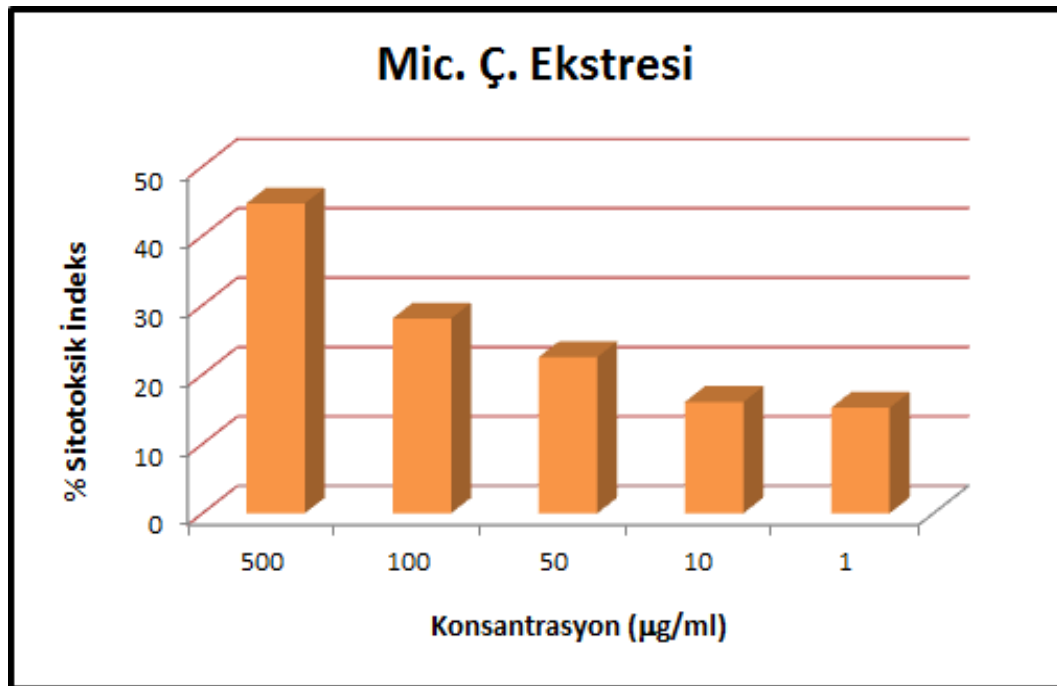
5 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5 ve 1 µg/ml) *C. micranthum* 'un çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstrelerinin MTT yöntemi ile A 549 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-37, Şekil 4-38 ve Şekil 4-39'da grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-37: Mic.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



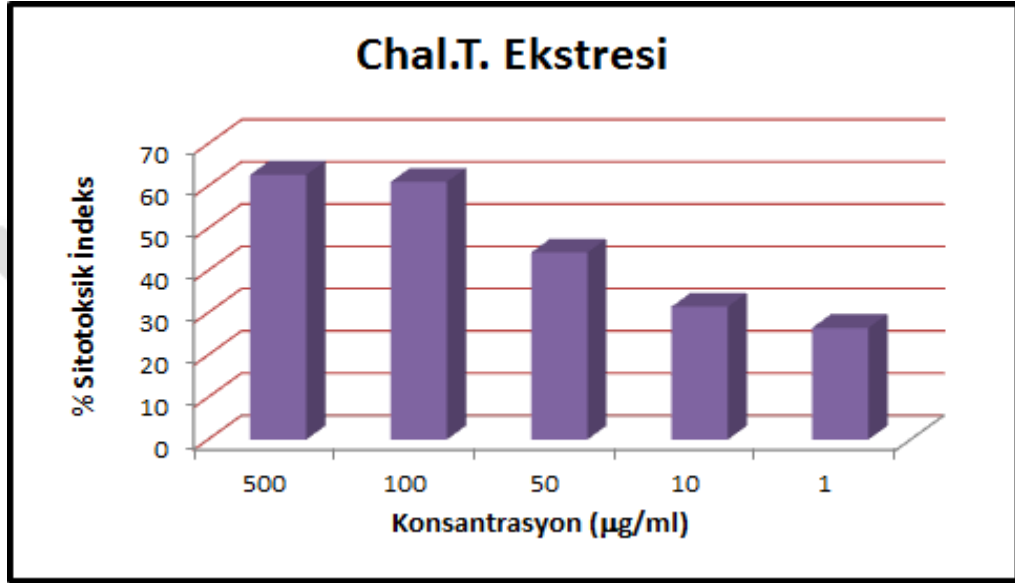
Şekil 4-38: Mic.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



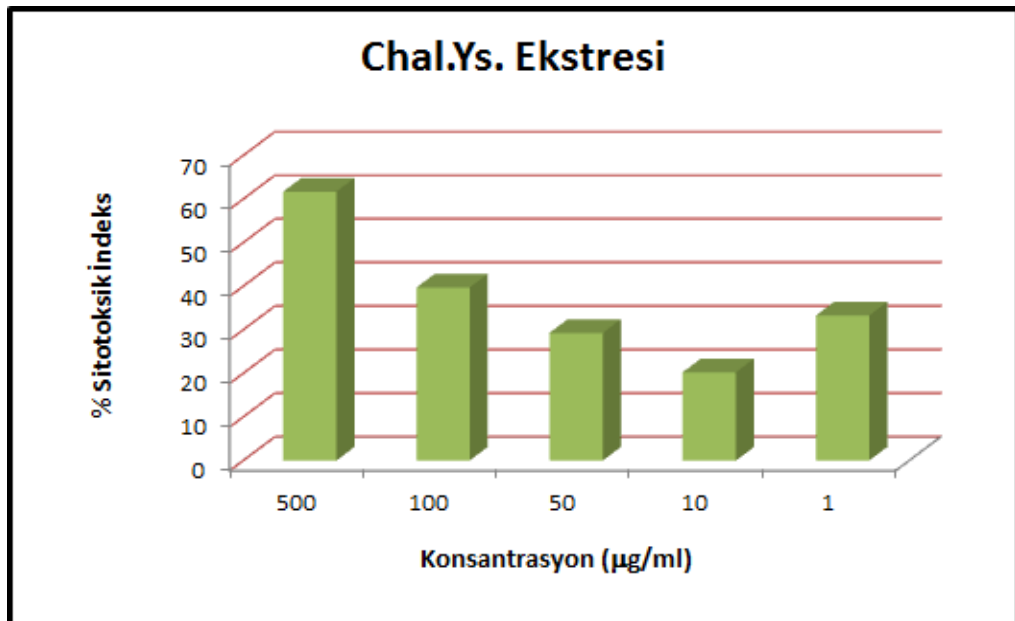
Şekil 4-39: Mic.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

4.5.1.2. *C. chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum* Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları

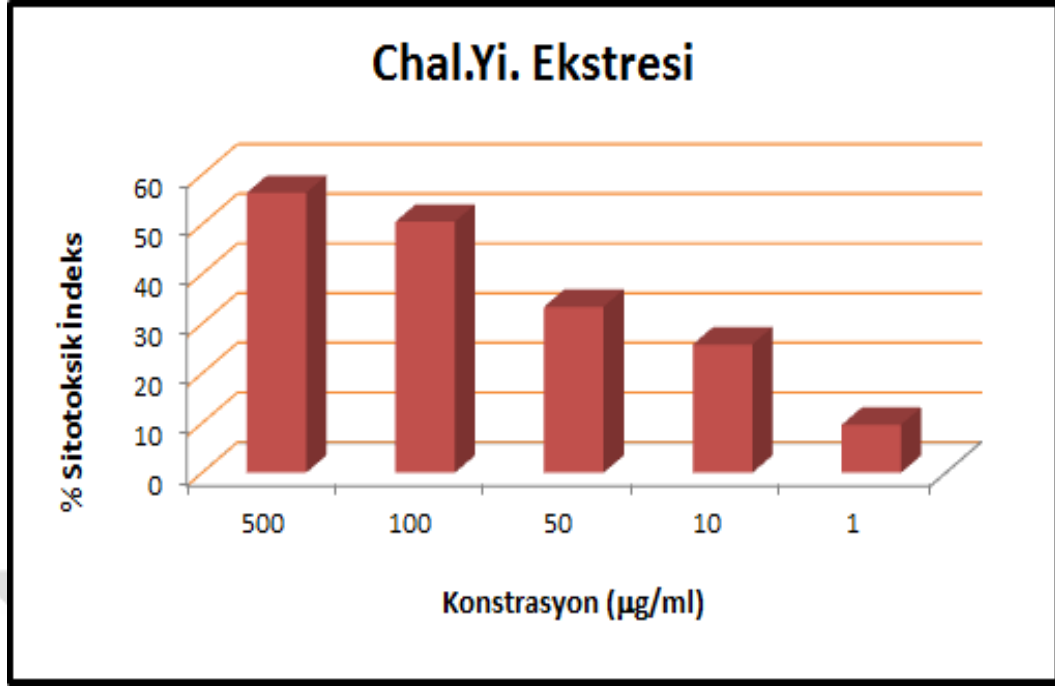
5 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5 ve 1 $\mu\text{g/ml}$) *C.chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum*’un tohum, çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstrelerinin MTT yöntemi ile A549 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-40, Şekil 4-41, Şekil 4-42 ve Şekil 4-43’te grafik olarak gösterilmiştir.



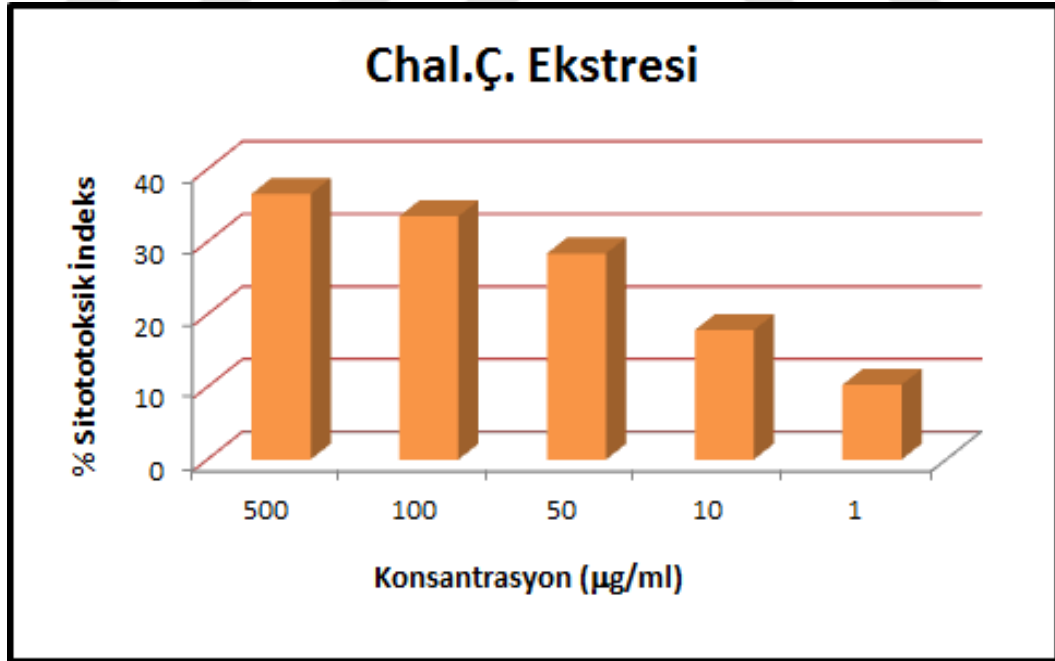
Şekil 4-40: Chal.T. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



Şekil 4-41: Chal.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



Şekil 4-42: Chal.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

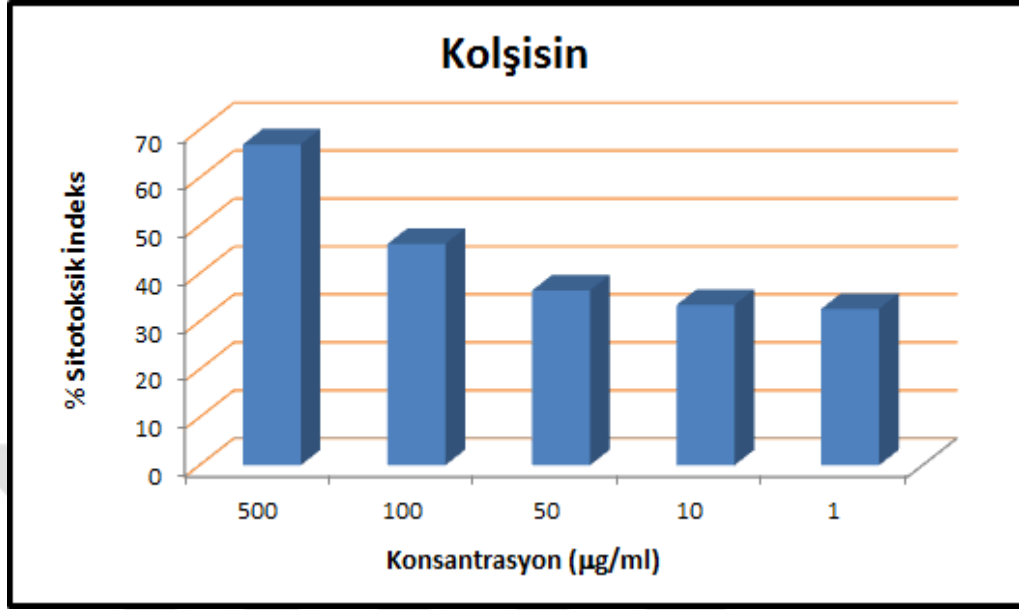


Şekil 4-43: Chal.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

4.5.1.3. Kolşisin'in Aktivite Sonuçları

5 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5 ve 1 µg/ml) kolşisin standartının

MTT yöntemi ile A549 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-44’de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-44: Kolşisin’in doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

Kolşisin standartı, *C. micranthum*’un çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstralarının ve *C. chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum*’un tohum, çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstralarının MTT yöntemi ile yapılan sitotoksikite çalışmasındaki IK_{50} değerleri hesaplanarak aşağıda Tablo 4-12’de gösterilmiştir.

Tablo 4-12: MTT yöntemi ile yapılan sitotoksikite çalışmasındaki IK_{50} değerleri

Ekstreler	IK_{50} (µg/ml)	Ekstreler	IK_{50} (µg/ml)
Kolşisin	108	Chal.T. Ekstre	56
Mic.Ys.Ekstre	424	Chal.Ys. Ekstre	126
Mic.Yi.Ekstre	> 500	Chal.Yi.Ekstre	99
Mic.Ç.Ekstre	> 500	Chal.Ç. Ekstre	> 500

Tablo 4-13: A 549 hücre serisi üzerinde MTT yöntemi ile yapılan *C.micranthum* ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Mic.Ys. Ekstre			Mic.Yi. Ekstre		
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri
500	59,61	3,04	$p > 0,05$	48,88	2,35	0,01 > p
100	38,75	1,57	$p > 0,05$	40,99	1,60	$p > 0,05$
50	20,72	0,64	$p > 0,05$	32,00	12,47	$p > 0,05$
10	26,16	3,59	$p > 0,05$	19,50	3,83	0,01 > p
1	23,84	1,77	$p > 0,05$	17,57	7,31	0,01 > p

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Mic.Ç. Ekstre			Kolşisin	
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma
500	44,68	7,29	0,01 > p	66,94	2,00
100	28,08	2,50	$p > 0,05$	46,20	16,40
50	22,52	1,45	$p > 0,05$	36,47	8,58
10	16,05	4,57	0,01 > p	33,46	2,76
1	15,21	1,95	0,01 > p	32,64	4,1

Tablo 4-14: A 549 hücre serisi üzerinde MTT yöntemi ile yapılan *C.chalcedonicum* subsp.*chalcedonicum* ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Chal.T. Ekstre			Chal.Ys. Ekstre		
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri
500	62,69	9,30	$p > 0,05$	61,71	2,89	$p > 0,05$
100	60,99	8,71	$p > 0,05$	39,69	3,10	$p > 0,05$
50	44,28	0,55	$p > 0,05$	29,30	1,56	$p > 0,05$
10	31,48	12,40	$p > 0,05$	20,26	7,74	$p > 0,05$
1	26,46	5,05	$p > 0,05$	33,28	7,66	$p > 0,05$

Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Chal.Yi. Ekstre			Chal.Ç. Ekstre		
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri
500	56,34	4,86	$p > 0,05$	36,62	2,51	0,001 > p
100	50,55	7,43	$p > 0,05$	33,52	1,17	$p > 0,05$
50	33,42	4,75	$p > 0,05$	28,41	4,66	$p > 0,05$
10	25,85	3,39	$p > 0,05$	17,85	4,31	$p > 0,05$
1	9,66	1,82	0,001 > p	10,31	5,06	0,001 > p

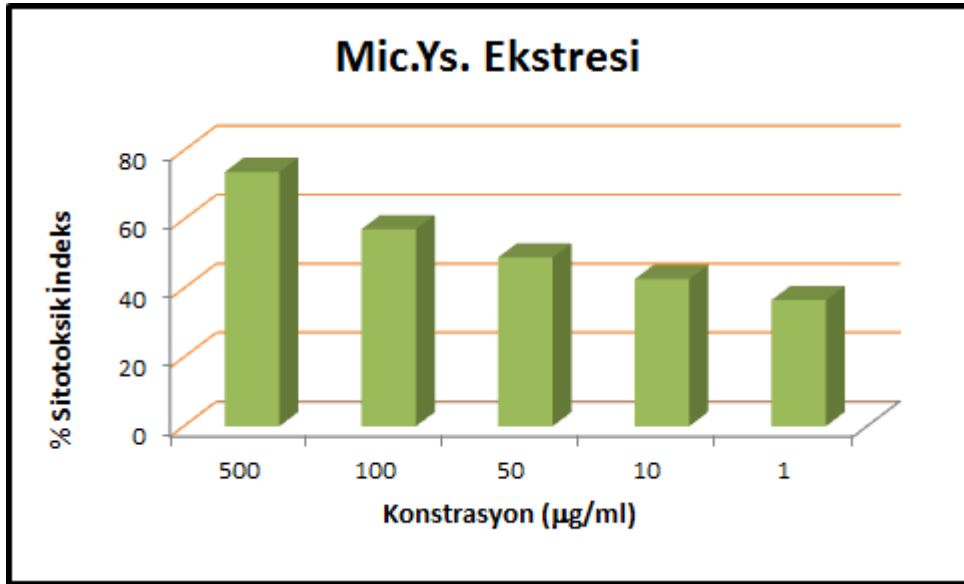
4.5.2. LDH Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Sonuçları

C.micranthum ve *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* metanol ekstreleri ile “kolşisin” standartının LDH yöntemi ile A 549 hücre serileri üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik aktivite ELISA pleyt okuyucuda 490 nm boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve metodlar kısmındaki sitotoksik indeks formülü ile ve standart sapmaları hesaplandı.

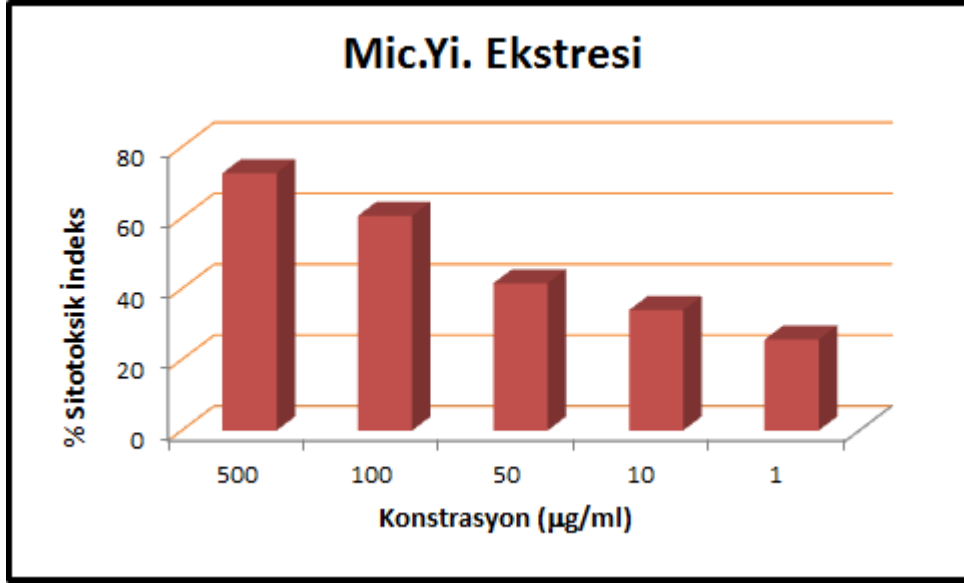
Aynı zamanda ekstrelerden alınan sonuçlar istatistiksel olarak Anova-Dunnett’s Multiple Comparison testi ile değerlendirildi. Bu değerlendirme ile ekstrelerin hangi konsantrasyonlarda kolşisinden istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler Tablo 4-16 ve Tablo 4-17’de verilmiş ve farklılık gösteren ekstreler koyu renkli p değerleri ile gösterilmiştir.

4.5.2.1. *C.micranthum* Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları

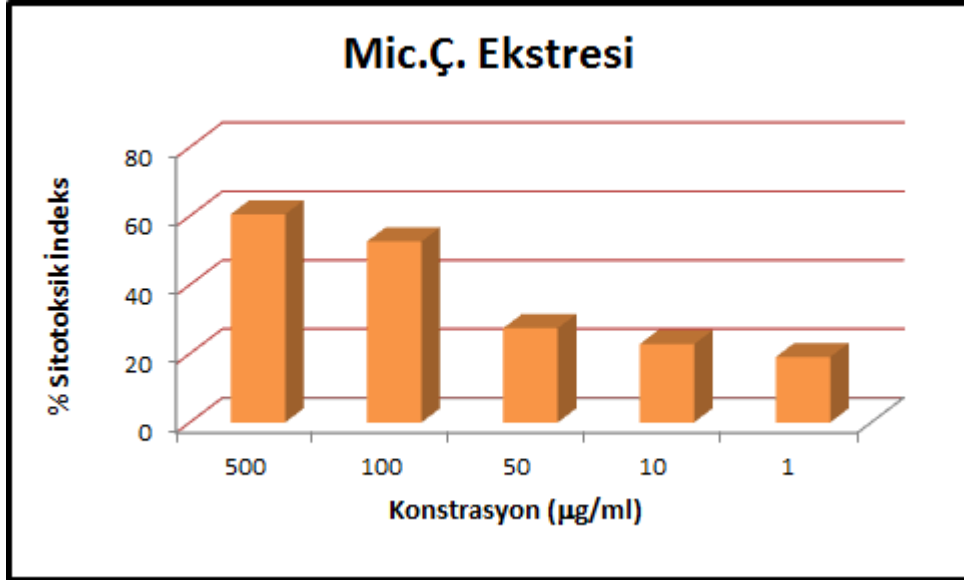
5 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5 ve 1 µg/ml) *C.micranthum*’un çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstreleri ile “kolşisin” standartının LDH yöntemi ile A549 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-45, Şekil 4-46 ve Şekil 4-47’de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-45: Mic.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



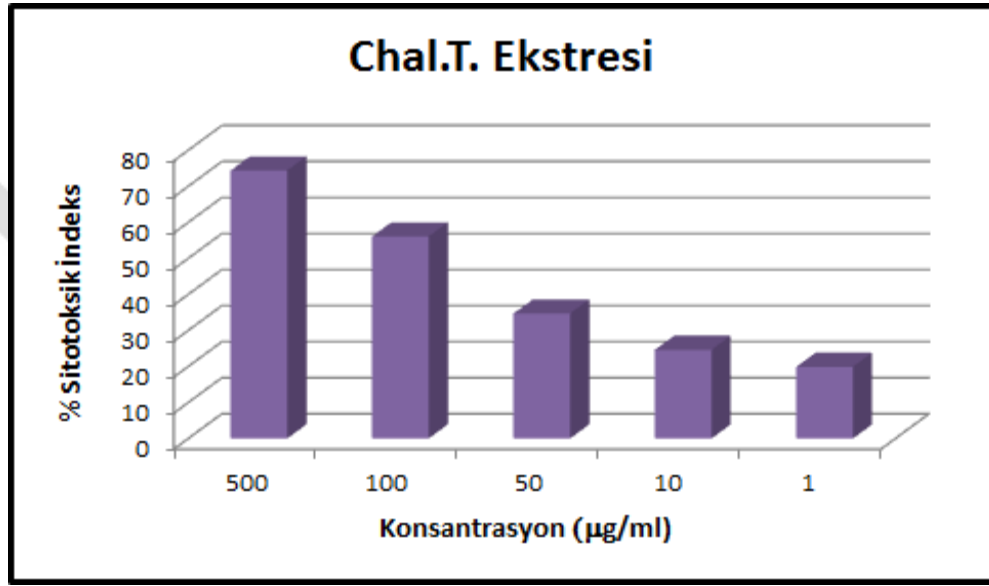
Şekil 4-46: Mic.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



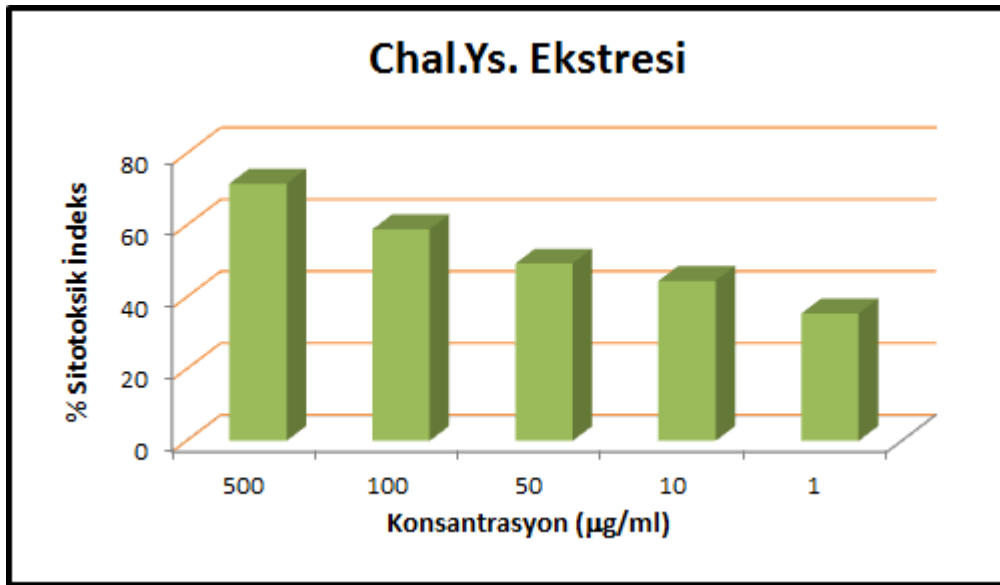
Şekil 4-47: Mic.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

4.5.2.2. *C.chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* Ekstrelerinde Aktivite Sonuçları

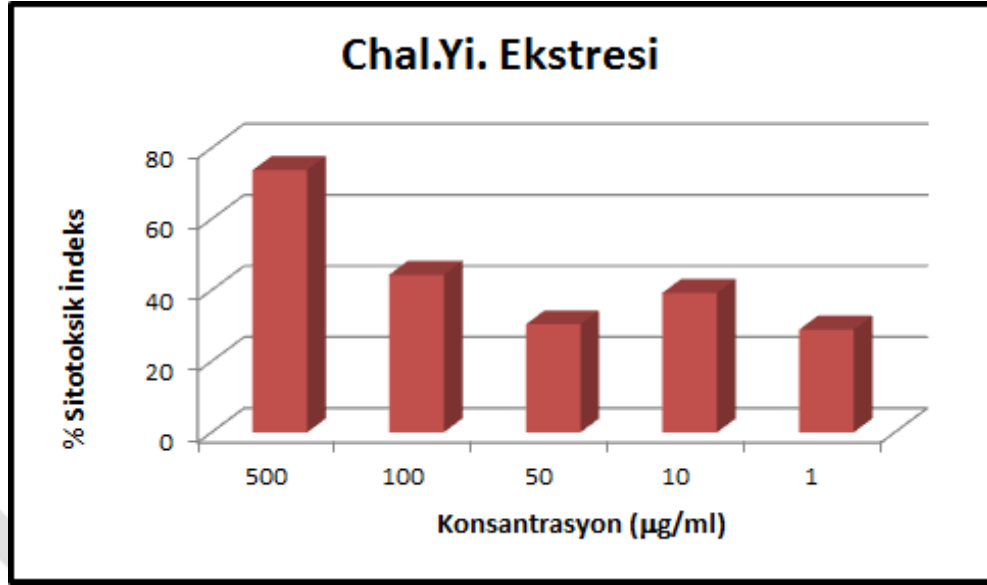
5 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5 ve 1 $\mu\text{g/ml}$) *C.chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* 'un tohum, çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstreleri ile “kolşisin” standartının LDH yöntemi ile A549 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-48, Şekil 4-49, Şekil 4-50 ve Şekil 4-51’de grafik olarak gösterilmiştir.



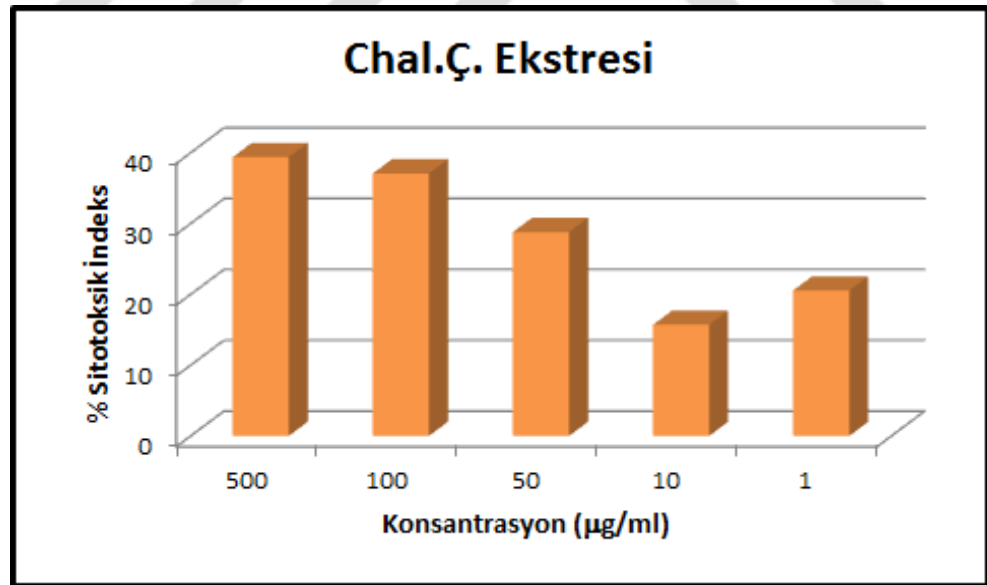
Şekil 4-48: Chal.T. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



Şekil 4-49: Chal.Ys. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



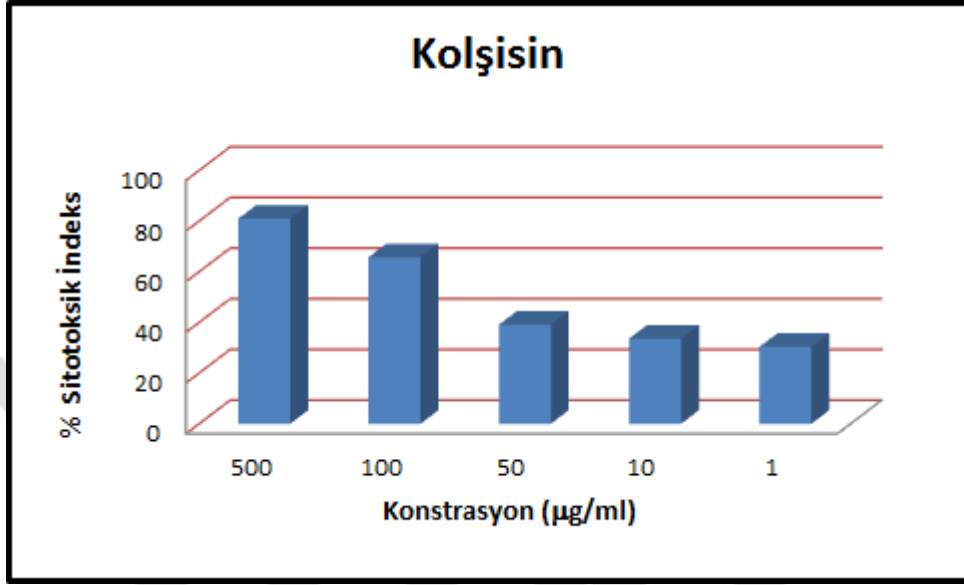
Şekil 4-50 : Chal.Yi. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği



Şekil 4-51: Chal.Ç. kodlu ekstrenin doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

4.5.2.3. Kolşisin'in Aktivite Sonuçları

5 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5 ve 1 µg/ml) kolşisin standartının LDH yöntemi ile A549 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-52'de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-52: Kolşisin'in doza bağımlı % sitotoksik indeks grafiği

Kolşisin standardı, *C. micranthum*'un çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstrelerinin ve *C. chalcidonicum* subsp. *chalcidonicum*'un tohum, çiçek, ilkbahar yumru ve sonbahar yumru metanol ekstrelerinin LDH yöntemi ile yapılan sitotoksikite çalışmasındaki IK_{50} değerleri hesaplanarak aşağıda Tablo 4-15'te gösterilmiştir.

Tablo 4-15: LDH yöntemi ile yapılan sitotoksikite çalışmasındaki IK_{50} değerleri

Ekstreler	IK_{50} (µg/ml)	Ekstreler	IK_{50} (µg/ml)
Kolşisin	64	Chal.T. Ekstre	89
Mic.Ys.Ekstre	51	Chal.Ys. Ekstre	51
Mic.Yi.Ekstre	83	Chal.Yi.Ekstre	113
Mic.Ç.Ekstre	95	Chal.Ç. Ekstre	> 500

Tablo 4-16: A 549 hücre serisi üzerinde LDH yöntemi ile yapılan *C.micranthum* ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri

<u>Konsantrasyon</u> <u>(µg/ml)</u>	Mic.Ys. Ekstre			Mic.Yi. Ekstre		
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri
500	73,79	12,52	p > 0,05	72,64	27,63	p > 0,05
100	57,17	28,86	p > 0,05	60,61	35,17	p > 0,05
50	48,97	27,70	p > 0,05	41,57	28,39	p > 0,05
10	42,68	21,67	p > 0,05	33,95	14,51	p > 0,05
1	36,55	6,34	p > 0,05	25,63	8,05	p > 0,05

<u>Konsantrasyon</u> <u>(µg/ml)</u>	Mic.Ç. Ekstre			Kolşisin	
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma
500	60,52	4,47	p > 0,05	80,92	9,59
100	52,61	12,21	p > 0,05	65,69	5,45
50	27,39	6,95	p > 0,05	39,04	26,45
10	22,72	16,06	p > 0,05	33,60	21,07
1	19,02	0,41	p > 0,05	30,32	12,41

Tablo 4-17: A 549 hücre serisi üzerinde LDH yöntemi ile yapılan *C.chalcedonicum* subsp.*chalcedonicum* ekstrelerinin 5 farklı konsantrasyondaki Sitotoksik indeks ortalamaları, Standart sapmalar ve Kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi saptanan P değerleri

<u>Konsantrasyon</u> <u>(µg/ml)</u>	Chal.T. Ekstre			Chal.Ys. Ekstre		
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri
500	74,38	2,97	p > 0,05	71,63	8,85	p > 0,05
100	56,07	0,48	0,05 > p	58,89	4,18	p > 0,05
50	34,68	17,47	p > 0,05	49,37	11,68	p > 0,05
10	24,61	1,11	p > 0,05	44,52	18,53	p > 0,05
1	19,89	3,02	p > 0,05	35,49	7,44	p > 0,05

<u>Konsantrasyon</u> <u>(µg/ml)</u>	Chal.Yi. Ekstre			Chal.Ç. Ekstre		
	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri	Sitotoksik indeks	Standart sapma	P değeri
500	73,78	4,32	p > 0,05	39,38	17,08	0,01 > p
100	44,34	3,81	0,01 > p	37,07	1,65	0,01 > p
50	30,40	6,92	p > 0,05	28,82	3,43	p > 0,05
10	39,26	2,26	p > 0,05	15,71	6,47	p > 0,05
1	28,90	1,02	p > 0,05	20,56	13,58	p > 0,05

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda İstanbul'da yetişen biri endemik iki *Colchicum* türü alkaloidleri ve biyolojik aktivitesi açısından araştırılmıştır. Bitkilerin çiçek, tohum ve yumruları (ilkbahar ve sonbahar) ayrı ayrı çalışılmış ve ayrıca kolşisin miktarları YBSK yöntemi ile tayin edilerek sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Colchicum chalcedonicum subsp. *chalcedonicum* Süreyyapaşa'dan ve endemik bir tür olan *Colchicum micranthum* ise Ömerli'den sonbahar ve ilkbahar aylarında toplanmıştır.

Her iki türün ayrılan kısımlarından metanol ekstraktları hazırlanarak sitotoksikite ve kolşisin miktar tayini bu ekstraktlar üzerinde yapılmıştır. Metanol ekstraktlarından hareketle alkaloid tüketilmesi yöntemi ile A (nötral-fenolik), B (bazik) ve C (glikozidik) olmak üzere üç farklı alkaloid ekstresi hazırlanmıştır. B ve C ekstraktlarının miktarlarının az olması nedeniyle izolasyon çalışmaları sadece A ekstraktları üzerinden yapılmıştır. İzole edilen alkaloidlerin miktarca uygun olanlarının ¹H NMR ve Kütle spektrumları (ESI/MS) yöntemleri ile yapıları aydınlatılmıştır.

Colchicum micranthum'un sonbahar yumru ve çiçek A ekstraktları üzerinde izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu ekstraktlardan Kolşisin, Kolşifolin, 2-Demetilkolşisin, *N*-deasetil-*N*-formilkolşisin alkaloidleri izole edilerek ¹H NMR ve Kütle spektrumları (ESI/MS) ile yapıları tayin edilmiştir.

Colchicum chalcedonicum subsp. *chalcedonicum*'un sonbahar yumru, tohum ve çiçek A ekstraktları üzerinde izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu ekstraktlardan Kolşisin, Demekolsin, Kolşifolin, 4-Hidroksikolşisin, *N*-deasetil-*N*-formilkolşisin, 2-Demetilkolşisin alkaloidleri izole edilerek ¹H NMR ve Kütle spektrumları (ESI/MS) yöntemleri ile yapıları tayin edilmiştir.

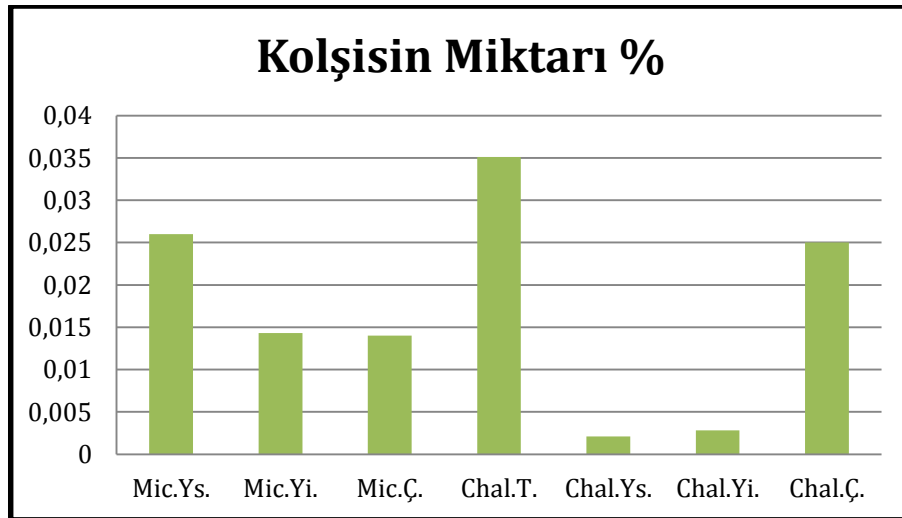
Her iki türün farklı kısımlarından elde edilen alkaloidlerin karşılaştırmalı tablosu aşağıda Tablo 5-1'de verilmiştir.

Tablo 5-1: *C. micranthum* ve *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türlerinden elde edilen alkaloidler

Türler	Kısımlar	Kolşisin	Demekolsin	N-deasetil-N-formilkolşisin	4-Hidroksikolşisin	Kolşifolin	2-Demetilkolşisin
<i>C.chalcedonicum</i> subsp. <i>chalcedonicum</i>	Tohum	+	+	+	-	+	-
	Yumru	+	-	-	-	+	+
	Çiçek	+	-	-	+	+	-
<i>C.micranthum</i>	Yumru	+	-	-	-	+	+
	Çiçek	+	-	+	-	+	-

Elde edilen maddeler değerlendirildiğinde her iki türün de *Colchicum* alkaloidleri çeşitliliği bakımından zayıf olduğu anlaşılmaktadır. Her iki türün de içerdiği alkaloidler büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Bitkilerin farklı kısımlarının hepsinden Kolşisin ve Kolşifolin elde edilmiştir. Bunun yanında Demekolsin alkaloidi sadece *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'un tohum ekstresinde, 4-Hidroksikolşisin alkaloidi ise sadece *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'un çiçek ekstresinden izole edilmiştir. Türlerin kısımları ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise çeşitliliğin en fazla *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'un tohum ekstresinde olduğu görülmektedir.

Türlerin farklı kısımlarından hazırlanan metanol ekstraktları üzerinden YBSK yöntemi ile Kolşisin miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Şekil 5-1'de görülmektedir. Kolşisin miktarının *C. micranthum* türünün kısımları arasında en yüksek olduğu örnek sonbahar yumrularıyken, *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türünün kısımları arasında en yüksek olduğu örnek tohumlarıdır.



Şekil 5-1: Türlerin Kolşisin Miktarı (% h)

Türkiye’de 50 kadar *Colchicum* türü yetişmektedir. Bu türlerden 18 tanesinin UV ile 9 tanesinin de YBSK yöntemi ile Kolşisin miktar tayini yapılmıştır. Sadece 2 tür üzerinde sitotoksik aktivite tayin edilmiştir. Yapılan bu çalışmalardan YBSK ile yapılan Kolşisin miktar tayini ve sitotoksik aktivite çalışmalarının sonuçları Tablo 5-2’de verilmiştir.

Tablo 5-2: Ülkemizde *Colchicum* türleri üzerinde yapılan çalışmalar

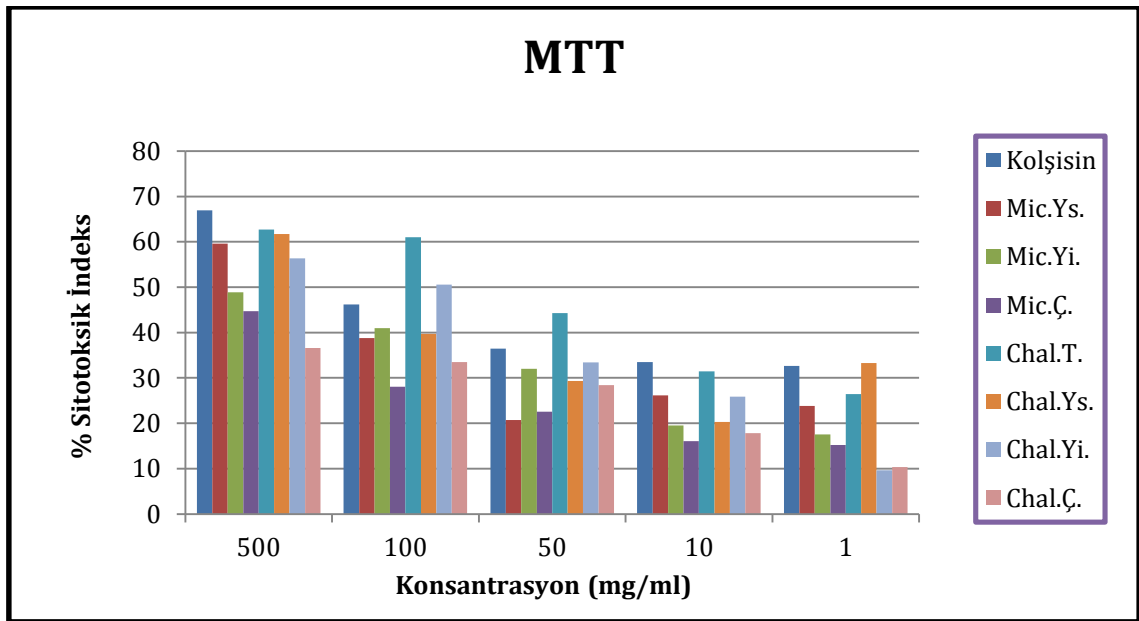
Türler	Kolşisin Miktar Tayini		Sitotoksik Aktivite		
	Tohum (% g)	Yumur (% g)	Hücre Hattı	Yöntem	Sitotoksik İndeks (%)
<i>C. umbrosum</i>	0.180-0.300	0,124		-	
<i>C. baytopiorum</i>	0.090	0.157	K562 HL60	Brine Shrimp Letalite Testi MTT	28,41 - 87,14
<i>C. bivonae</i>	0,164	0,131	K562 HL60	Brine Shrimp Letalite Testi MTT	7,32 - 73,05
<i>C. balansae</i>	0,052	0,043		-	
<i>C. bornmulleri</i>	0,073	0,168-0,248		-	
<i>C. cilicicum</i>	0,090	0,307-0,354		-	
<i>C. kotschy</i>	0,145	0,223		-	
<i>C. macrophyllum</i>	0,039	0,206		-	
<i>C. speciosum</i>	0,064	0,227		-	

Kolşisin miktarı bakımından daha önce çalışılan türler ile karşılaştırıldığında *C. micranthum* yumruları ortalama bir değere sahipken, *Colchicum chalconicum* subsp. *chalconicum*’un yumruları oldukça düşük değere sahiptir. Esas drog olarak

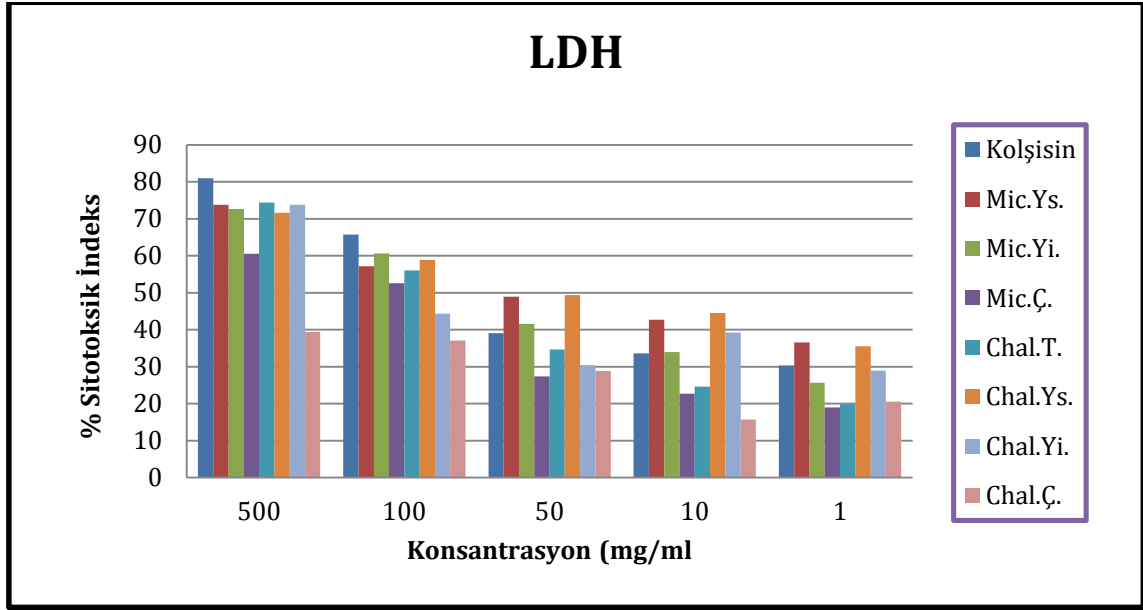
kabul edilen tohumların Kolşisin miktarı diğer türlerle kıyaslandığında, *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'un tohumlarındaki kolşisin miktarının ortalama bir miktara sahip olduğu görülmektedir. Yeterli miktarda örnek toplanamamasından dolayı *C. micranthum* tohumları üzerinde çalışma yapılamamıştır.

Colchicum türleri üzerinde içerdiği tropolon alkaloidleri sebebiyle, birçok sitotoksik aktivite çalışması yapılmaktadır. Bu çalışmada *Colchicum micranthum* ve *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türleri üzerinde sitotoksik aktivite çalışması ilk kez yapılmıştır.

Tez çalışmamızda her iki türün farklı kısımlarına ait metanol ekstraktlarının A 549 hücre serilerinde MTT ve LDH yöntemleri ile toksisitesi tayin edilmiştir. Her iki yöntem sonucunda bitkilerin farklı kısımlarının sitotoksik indeksi belirlenmiş, İK50 değerleri hesaplanmış ve elde edilen veriler kolşisin standartı ile Anova-Dunnett's Multiple Comparison testi yardımıyla karşılaştırılmıştır. MTT ve LDH Sitotoksik Aktivite sonuçları karşılaştırmalı olarak Şekil 5-2 ve Şekil 5-3'te görülmektedir.



Şekil 5-2: Türlerin MTT sonuçlarının karşılaştırılması



Şekil 5-3: Türlerin LDH sonuçlarının karşılaştırılması

MTT yöntemi sonucunda hesaplanan sitotoksik indeks değerleri kolşisin standartı ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan *C. micranthum* sonbahar yumru ekstresinin tüm konsantrasyonlarının kontrol olarak kullanılan kolşisin standartından anlamlı olarak büyük bir farklılık göstermediği ($P>0.05$), ilkbahar yumru ve çiçek ekstrelerinin ise 500, 10 ve 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon değerlerinde kolşisinden anlamlı olarak ($P<0.05$) daha düşük aktivite gösterdiği saptanmıştır. *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türünde ise, tohum ve sonbahar yumru ekstrelerinin tüm konsantrasyonlarının (500, 100, 50, 10 ve 1 $\mu\text{g/ml}$) sitotoksik aktivitesinin kolşisinden anlamlı olarak farklılık göstermediği ($P<0.05$), ilkbahar yumru ekstresinin 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda ve çiçek ekstresinin 500 ve 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında anlamlı ($P<0.05$) olarak kolşisinden daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

LDH yöntemi ile hesaplanan sitotoksik indeks değerleri kolşisin standartı ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan *C. micranthum*'dan elde edilen bütün ekstrelerin tüm konsantrasyonlarda kolşisin ile arasında anlamlı bir fark görülmediği ($P>0.05$) tespit edilmiştir. *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türünde ise, sonbahar yumru ekstresinin tüm konsantrasyonlarda kolşisin ile arasında anlamlı fark göstermediği ($P>0.05$), tohum ve ilkbahar yumru ekstrelerinin 100 mg/ml, çiçek ekstresinin 100 ve 1

$\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında anlamlı ($P<0.05$) olarak kolşisininden daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ekstrelerin hepsinin yüksek toksik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Kolşisin ile mukayaese edildiğinde yumru ve tohum ekstrelerinin kolşisin ile benzer sitotoksik aktiviteye sahip oldukları çiçek ekstrelerinin bazı konsantrasyonlarında ise kolşisininden anlamlı olarak daha düşük sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. En sitotoksik ekstrenin Chal.T. kodlu ekstre olduğu görülmüştür.

Biyolojik aktivite sonuçları, iki tür üzerinde yapılan kimyasal çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde alkaloit çeşitliliği bakımından zengin olan ve yüksek miktarda kolşisin içeren *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'un tohum ekstresinin en yüksek aktiviteyi göstermesi normaldir. Her iki türe ait çiçek ekstrelerinin düşük aktiviteye sahip olması, kolşisin miktarının düşük olması ve alkaloit çeşitliliğinin az olması ile açıklanabilir.

Bu tez çalışmasında İstanbul'da yetişen biri endemik iki *Colchicum* türü *C. micranthum* ve *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum* türü alkaloit içerikleri ve sitotoksik aktivitesi yönünden ilk kez araştırılmıştır ve bu türlerin kolşisin kaynağı olarak değerlendirilmesi incelenmiştir.

Her iki türün alkaloit içeriği bakımından benzer olduğu, endemik olan *C. micranthum* türünün yumrularının taşıdığı kolşisin miktarının *C. chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*'unkinlerden daha yüksek olduğu saptanmıştır. Her iki tür de A 549 hücre seri hattı üzerinde güçlü sitotoksik aktivite göstermiştir. Sonraki çalışmalarımızda Kolşisin dışında elde edilen diğer alkaloitlerin de sitotoksik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

İlaç hammaddesi olarak kullanım açısından her iki tür de ortalama bir değer göstermektedir. Ancak bu türler yaygın olmadığı için yetiştiği yerlerde yapılaşma olabileceği ihtimalinin de bulunması nedeniyle koruma altına alınması gerektiğini düşünmekteyiz.

Araştırmalarımız ilaç hammaddesi potansiyeli olarak değerlendirilebilecek, kolşisin içeriği yüksek ve yaygın olarak yetişen diğer *Colchicum* türleri üzerinde devam edecektir.

KAYNAKLAR

1. Körner A, Kohn S. Development and optimization of a stability indicating method on a monolithic reversed-phase column for Colchicum dry extract. *J. Chromatogr. A* 2005; **1089**, 148–157 .
2. Brossi A. R. Recent developments in colchicum alkaloids. *Trends Pharmacol. Sci.* 1983; **4**, 327–328.
3. Baytop T. *Türkiye de Bitkilerle Tedavi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
4. Güner A. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 2000.
5. Hartung EF. History of the Use of Colchicum and related Medicaments in Gout: With Suggestions for Further Research. *Ann. Rheum. Dis.* 1954; **13**, 190–200.
6. Capraro HG, Brossi, A. Tropolonic colchicum alkaloids. *The Alkaloids* 1984; **23**, 1–70.
7. Sapra S, Bhalla Y, Nandani, Sharma S, Singh G, Nepali K, ve ark. Colchicine and its various physicochemical and biological aspects. *Med. Chem. Res.* 2013; **22**, 531–547.
8. Graening T, Schmalz HG. Total syntheses of colchicine in comparison: a journey through 50 years of synthetic organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004; **43**, 3230–56.
9. Larsson S, Ronsted N. Reviewing Colchicaceae Alkaloids - Perspectives of Evolution on Medicinal Chemistry. *Curr. Top. Med. Chem.* 2014; **14**, 274–289.
10. Brossi A. Bioactive alkaloids. 4. Results of recent investigations with colchicine and physostigmine. *J. Med. Chem.* 1990; **33**, 2311–2319.
11. Kayaalp OS, editor. *Farmakolojiye Giriş, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 10th ed. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.; 2002.
12. Cifuentes M, Schilling B, Ravindra R, Winter J, Janik ME. Synthesis and biological evaluation of B-ring modified colchicine and isocolchicine analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006; **16**, 2761–4.

13. Yurdakul S, Mat C, Tüzün Y, Özyazgan Y, Hamuryudan V, Uysal Ö. ve ark. A double-blind trial of colchicine in Behçet's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001; **44**, 2686–2692.
14. Kuijk LM, Govers, AMAP, Hofhuis WJD, Frenkel J. Effective treatment of a colchicine-resistant familial Mediterranean fever patient with anakinra. *Ann. Rheum. Dis.* 2007; **66**, 1545–1546.
15. Kiraz S, Ertenli I, Arici M, Calgüneri M, Haznedaroğlu I, Çelik I. ve ark. Effects of colchicine on inflammatory cytokines and selectins in familial Mediterranean fever. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1998; **16**, 721–724.
16. Healey LA. Colchicine and gout. *Arthritis Rheum.* 1979; **22**, 103.
17. Al-Mahmoud MS, Alali FQ, Tawaha K, Qasaymeh RM. Phytochemical study and cytotoxicity evaluation of *Colchicum stevenii* Kunth (Colchicaceae): A Jordanian meadow saffron. *Nat. Prod. Res.* 2006; **20**, 153–160.
18. Moreland LW, Ball GV. Colchicine and gout. *Arthritis Rheum.* 1991; **34**, 782–786.
19. Sütlüpinar N. Türkiye'nin Sonbaharda Çiçek Açan Colchicum Türleri Üzerinde Araştırmalar. *Doğa, Bilim Derg. Temel Bilim* 1983; **7**, 355–359.
20. Muzaffar A, Brossi A, Hamel E. Partial Synthesis and Antitubulin Activity of Minor Colchicum Alkaloids: N-Acetoacetyl-deacetylcolchicine and 2-Demethylspeciosine (Speciocolchine). *J. Nat. Prod.* 1990; **53**, 1021–1024.
21. Muzaffar A, Brossi A. Chemistry of colchine. *Pharmacol. Ther.* 1991; **49**, 105–109.
22. Baytop T, Özcöbek G. *Colchicum chalcedonicum, micranthum, szovitsii* ve *turcicum* Alkaloitleri Üzerinde Araştırmalar. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University* 1970; **6**, 21–26.
23. Husek A, Sutlupinar N, Potesilova H, Dvorackova S, Hanus V, Sedmera P ve ark. Alkaloids and phenolics of three Merendera species. *Phytochemistry* 1989; **28**, 3217–3219.
24. Husek A, Sutlupinar N, Sedmera P, Voegelien F, Valka I, Simanek V. Alkaloids and phenolics of *Colchicum turcicum*. *Phytochemistry* 1990; **29**, 3058–3060.

25. Sütülpınar N, Husek A, Potesilova H, Dvorackova S, Hanus V, Sedmera P ve ark. Alkaloids and Phenolics of *Colchicum cilicicum*1,2. *Planta Med.* 1988; **54**, 243–245.
26. Davis PH. *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1984.
27. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. *Anadolu Üniversitesi Eczac. Fakültesi Yayınları* 1990; **65**, 335.
28. Le Hello C. The pharmacology and therapeutic aspects of Colchicine. *The Alkaloids* 2000; **53**: 288-352.
29. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. *Semin. Arthritis Rheum.* 1998; **28**, 48–59.
30. Kees S, Langevitz P, Zemer D, Padeh S, Pras M, Linveh A. Attacks of pericarditis as a manifestation of familial Mediterranean fever (FMF). *QJM* 1997; **90**, 643–647.
31. Sapra S, Bhalla Y, Nandani, Sharma S, Singh G, Nepali K, ve ark. Colchicine and its various physicochemical and biological aspects. *Med. Chem. Res.* 2013; **22**, 531–547.
32. Yurdakul S, Mat C, Tüzün Y, Özyazgan Y, Hamuryudan V, Uysal Ö. ve ark. A double-blind trial of colchicine in Behçet's syndrome. *Arthritis Rheum.* 2001; **44**, 2686–2692.
33. Short-term trial of etanercept in Behcet's disease: a double blind, placebo controlled study. *J. Rheumatol.* 2005; **32**, 98–105.
34. Rapado A, Castrillo JM. Purine Metabolism in Man. İçinde Müller M, Kaiser E, Seegmiller JE, editör. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer US; 1977. pp. 223–230.
35. Abbott RD, Brand FN, Kannel WB, Castelli WP. Gout and coronary heart disease: The framingham study. *J. Clin. Epidemiol.* 1988; **41**, 237–242.
36. Acar BÇ, Yalçınkaya F, Mesiha E. Ailevi akdeniz ateşi patogenezi. *Türkiye Klin. J. Pediatr.* 2006; **15**, 151–155.

37. Erdoğan Ö, Ayşe Ö. Ailevi Akdeniz Ateşi. *Turkiye Klin. J. Pediatr.* 2002; **11**, 160–170.
38. Koşan C, Sepetçigil O, Çayır A, Kaya A, Özkan B. Evaluation of Physical Growth in Patients with Familial Mediterranean Fever. *Evaluation* 2013; **21**, 25.
39. Levy M, Spino M, Read SE. Colchicine: A State-of-the-Art Review. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* 1991; **11**, 196–211.
40. Saatci U, Bakkaloglu A, Ozen S, Besbas N. Familial Mediterranean fever and amyloidosis in children. *Acta Paediatr.* 1993; **82**, 705–706.
41. Roldan R, Ruiz AM, Miranda MD, Collantes E. Anakinra: new therapeutic approach in children with Familial Mediterranean Fever resistant to colchicine. *Jt. Bone Spine* 2008; **75**, 504–505.
42. Sarı I, Birlik M, Kasifoğlu T. Familial Mediterranean fever: an updated review. *Eur J Rheum* 2014; **1**, 21–33.
43. Livneh A, Zemer D, Langevitz P, Laor A, Sohar E, Pras M, ve ark. Colchicine treatment of AA amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 1994; **37**, 1804–1811.
44. Kasapçopur Ö, Arısoy N. Ailesel Akdeniz Ateşi ve diğer otoenflamatuar hastalıklar. *Türk Pediatri Arşivi* 2006; **41**, 9–17.
45. Önder M, Gürer MA. Ülkemizde Behçet hastalığı epidemiyolojisi. *Turkiye Klin. J. Intern. Med. Sci.* 2007; **3**, 4–7.
46. Ercan A, Gür AR. Behçet Hastalığı. *Turkiye Klin. J. Med. Sci.* 2003; **23**, 261–268.
47. Masuda K, Urayama A, Kogure M, Nakajima A, Nakae K, Inaba G. Double-Masked Trial of Cyclosporin Versus Colchicine and Long-term Open Study of Cyclosporin in Behçet's Disease. *Lancet* 1989; **333**, 1093–1096.
48. Frank PJ. Scleroderma. *Dermatol. Online J.* 2001; **7**, 3–8.
49. Rambaldi A, Glud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001; **21**, 129–136.

50. Favari L, Pérez-Alvarez V. Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl₄-chronic liver damage in rats. *Arch. Med. Res.* 1996; **28**, 11–17.
51. Lee SJ, Kim YG, Kang KW, Kim CW, Kim SG. Effects of colchicine on liver functions of cirrhotic rats: beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF β 1 expression. *Chem. Biol. Interact.* 2004; **147**, 9–21.
52. Maisch B, Singh D. Adding colchicine to aspirin may prevent recurrence of acute pericarditis. *Evid. Based. Cardiovasc. Med.* 2006; **10**, 64–66.
53. Adler Y, Finkelstein Y, Guindo J, Rodriguez de la Serna A, Shoenfeld Y, Bayes-Genis A, et al. Colchicine treatment for recurrent pericarditis a decade of experience. *Circulation* 1998; **97**, 2183–2185.
54. Wahba A, Cohen H. Therapeutic trials with oral colchicine in psoriasis. *Acta Derm. Venereol.* 1980; **60**, 515–520.
55. Kaidbey KH, Petrozzi JW, Kligman AM. Topical colchicine therapy for recalcitrant psoriasis. *Arch. Dermatol.* 1975; **111**, 33–36.
56. Boo-Chai, K. Five-year results in 90 cases of breast cancer following combined treatment with colchicine derivatives, mastectomy and postoperative radiotherapy. 1981; *Plast. Reconstr. Surg.* **67**, 105.
57. Leonard BJ, Wilkinson JF. Desacetylmethylcolchicine in treatment of myeloid leukaemia. *Br. Med. J.* 1955; **1**, 874.
58. Hastie SB. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol. Ther.* 1991; **51**, 377–401.
59. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human ‘MDR1’ gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987; **84**, 3004–3008.
60. Wallace SL, Singer JZ, Duncan GJ, Wigley FM, Kuncel RW. Renal function predicts colchicine toxicity: guidelines for the prophylactic use of colchicine in gout. *J. Rheumatol.* 1991; **18**, 264–269.
61. Niel E, Scherrmann JM. Colchicine today. *Jt. Bone Spine* 2006; **73**, 672–678.

62. Rochdi M, Sabouraud A, Girre C, Venet R, Scherrmann JM. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of colchicine after iv and oral administration in healthy human volunteers and elderly subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1994; **46**, 351–354.
63. Ehrenfeld M, Levy M, Sharon P, Rachmilewitz D, Eliakim M. Gastrointestinal effects of long-term colchicine therapy in patients with recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). *Dig. Dis. Sci.* 1982; **27**, 723–727.
64. Sabouraud A, Chappey O, Dupin T, Scherrmann JM. Binding of colchicine and thiocolchicoside to human serum proteins and blood cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1994; **32**, 429–432.
65. Webb DI, Chodos RB, Mahar CQ, Faloon WW. Mechanism of vitamin B12 malabsorption in patients receiving colchicine. *N. Engl. J. Med.* 1968; **279**, 845–850.
66. Kim KY, Schumacher HR, Hunsche E, Wertheimer AI, Kong SX. A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout. *Clin. Ther.* 2003; **25**, 1593–1617.
67. Sullivan TP, King LE, Boyd AS. Colchicine in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998; **39**, 993–999.
68. Turner FR. The effects of colchicine on spermatogenesis in *Nitella*. *J. Cell Biol.* 1970; **46**, 220–234.
69. Winek CL, Wahba WW, Balzer TW. Drug and chemical blood-level data 2001. *Forensic Sci. Int.* 2001; **122**, 107–123.
70. Thomson AER, Dabrowska-Bernstein B. Inhibition by colchicine of human lymphocytotoxic function: Dependence on cell-bound drug level, spontaneous reversibility and antagonism by desacetylcolchicine (DAC). *Leuk. Res.* 1983; **7**, 175–192.
71. Wetherley-Mein G, Thomson AER, O'Connor TWE, Peel WE, Singh AK. Colchicine ultrasensitivity of lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1983; **54**, 111–120.

72. Schrek R, Stefani SS. Inhibition by ionophore A23187 of the cytotoxicity of vincristine, colchicine and X-rays to leukemic lymphocytes. *Oncology* 1976; **33**, 132–135.
73. Schrek R, Messmore HL, Knospe WH, Stefani SS. A Colchicine-Sensitivity Test for Leukaemic Lymphocytes. *Scand. J. Haematol.* 1976; **16**, 357–364.
74. Schrek R, Molnar Z, Stefani SS. Cytology and colchicine sensitivity of viable cells from lymph nodes with malignant lymphoma. *Cancer* 1978; **41**, 1845–1856.
75. Pırıldar S, Sütlüpnar N, Atasever B, Erdem-Kuruca S, Papouskova B, Simanek V. Chemical constituents of the different parts of *Colchicum baytopiorum* and their cytotoxic activities on K562 and HL60 cell lines. *Pharm. Biol.* 2010; **48**, 32–39.
76. Sanders PW. *Potential role of colchicine in the prevention of cast nephropathy from Bence Jones proteins*. Basel: Karger; 1993.
77. Cairns HS, Spencer S, Hilson AJW, Rudge CJ, Neild GH. 99mTc-DMSA imaging with tomography in renal transplant recipients with abnormal lower urinary tracts. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1994; **9**, 1157–1161.
78. Ahern MJ, Reid C, Gordon TP, McCredie M, Brooks PM, Jones M. Does Colchicine work? The results of the first controlled study in acute gout. *Aust. N. Z. J. Med.* 1987; **17**, 301–304.
79. Borstad GC, Bryant LR, Abel MP, Scroggie DA, Harris MD, Alloway JA. Colchicine for prophylaxis of acute flares when initiating allopurinol for chronic gouty arthritis. *J. Rheumatol.* 2004; **31**, 2429–2432.
80. Goldstein RC, Schwabe AD. Prophylactic Colchicine Therapy in Familial Mediterranean Fever: A Controlled, Double-Blind Study. *Ann. Intern. Med.* 1974; **81**, 792–794 (1974).
81. Zemer D, Livneh A, Danon YL, Pras M, Sohar E. Long-term colchicine treatment in children with familial mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 1991; **34**, 973–977.

82. Ben-Chetrit E, Berkun Y, Ben-Chetrit E, Ben-Chetrit A. The outcome of pregnancy in the wives of men with familial mediterranean fever treated with colchicine. *Semin. Arthritis Rheum.* 2004; **34**, 549–552.
83. Mizushima Y, Matsumura N, Mori M, Shimizu T, Fukushima B, Mimura Y, ve ark. Colchicine in Behçet's disease. *Lancet* 1977; **310**, 1037.
84. Imazio M, Brucato A, Cemin R, Ferrua S, Maggiolini S, Beqaraj F, ve ark. A randomized trial of colchicine for acute pericarditis. *N. Engl. J. Med.* 2013; **369**, 1522–1528.
85. Das UN. Colchicine in diabetes mellitus. *J. Assoc. Physicians India* 1993; **41**, 213.
86. Aisen PS, Marin DB, Brickman AM, Santoro J, Fusco M. Pilot tolerability studies of hydroxychloroquine and colchicine in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2001; **15**, 96–101.
87. Verne GN, Davis RH, Robinson ME, Gordon JM, Eaker EY, Sninsky CA. Treatment of chronic constipation with colchicine randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Gastroenterol.* 2003; **98**, 1112–1116.
Hadfield JA, Ducki S, Hirst N, McGown AT. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Res.* 2003; **5**, 309-325.
88. Terzioğlu G, Keskin AÜ, Demirel GY. Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits. *Turkish J. Immunol.* 2014; **1**, 74-89.
89. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A ve ark. *Molecular Cell Biology*. New York, NY: W. H. Freeman and Company; 2000.
90. Evans WC. *Trease and Evans' Pharmacognosy*. Londra: WB Saunders Ltd.; 2002.
91. Wang K, Shindoh H, Inoue T, Horii I. Advantages Of In Vitro Cytotoxicity Testing By Using Primary Rat Hepatocytes In Comparison With Established Cell Lines. *J. Toxicol. Sci.* 2002; **27**, 229–237.
92. Butler M. *Animal cell culture and technology*. Londra: Taylor & Francis; 2003.

93. Barile FA. *Introduction to In Vitro Cytotoxicology: Mechanisms and Methods*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994.
94. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 2006; **160**, 171–7.
95. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 2006; **1**, 1112–1116.
96. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 2004; **432**, 298–306.
97. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; **411**, 342–348.
98. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 2004; **4**, 253–265.
99. Combeau C, Provost J, Lancelin F, Tournoux Y, Prod'homme F, Herman F, ve ark. RPR112378 and RPR115781: two representatives of a new family of microtubule assembly inhibitors. *Mol. Pharmacol.* 2000; **57**, 553–563.
100. Polu P, Nayanabhirama U, Khan S. Herbal medicinal plants as an anticancer agents. *AP.* 2015; **4**, 37–45.
101. Kawahara H, Yamagami A, Nakamura Jr M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent. J.* 1968; **18**, 443–467.
102. Kildal KK, Ruyter IE. How different curing methods affect the degree of conversion of resin-based inlay/onlay materials. *Acta Odontol. Scand.* 1994; **52**, 315–322.
103. Reichl FX, Walther UI, Durner J, Kehe K, Hickel R, Kunzelmann KH, ve ark. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in lung cells. *Dent. Mater.* 2001; **17**, 95–101.
104. Kehe K, Reichl FX, Durner J, Walther U, Hickel R, Forth W. Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 2001; **22**, 317–322.

105. Plumb JA. Cell sensitivity assays: the MTT assay. İçinde Langdon SP, editör. *Cancer Cell Cult. Methods Protoc.* Totawa, NJ: Humana Press Inc.; 2004. pp. 165–169.
106. Meksuriyen D, Lin LJ, Cordell GA, Mukhopadhyay S, Banerjee SK. Nmr Studies of Colchicine and its Photoisomers, β -and λ -Lumicolchicines. *J. Nat. Prod.* 1988; **51**, 88–93.

