

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***RANUNCULUS CONSTANTINOPOLITANUS* (DC.) BİTKİSİ**
ÜZERİNDE KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI

Farmakognozi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Kimyager Deniz Kilimcigöldelioğlu

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuğçe Fafal

İZMİR

2017



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

***RANUNCULUS CONSTANTINOPOLITANUS* (DC.) BİTKİSİ
ÜZERİNDE KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI**

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Kimyager Deniz Kilimcigöldelioğlu

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tuğçe Fafal**

İZMİR

2017

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

İmza

Başkan: ...Doç. Dr. Tuğçe Fafal.....

(Danışman)

Üye

: ...Prof. Dr. Nehir Somer.....

Üye

: ...Doç. Dr. Fatih Kalyoncu.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:14.11.2017.....

TEŞEKKÜR

Tez danıőmanım olarak bilgi ve yardımlarıyla bana yol gösteren, her türlü desteğini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Tuğçe Fafal'a,

Beni yüksek lisans yapmam için yreklendiren, bu süre içerisinde her türlü yardımı esirgemeyen ve ayrıca antioksidan aktivite tayini sırasında bilgilerini esirgemedен benimle paylaőan hocam Prof. Dr. Hüsniye Kayalar'a,

Her konudaki yardımlarından dolayı Farmakognozi Anabilim Dalı Baőkanımız Prof. Dr. Nehir Somer'e,

Antimikrobiyal aktivite tayinlerindeki yardımları için, E.. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ğretim yesi Yard.Doç.Dr. F. Ferda YILMAZ 'a,

Teorik ve pratik derslerde verdikleri değerli bilgiler için Farmakognozi Anabilim Dalının saygıdeğer ğretim üyelerine,

Çalıőmalarıma mali destek sağlayan Ege Üniversitesi Araştırma Fonuna (14/EZC/035),

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme en içten sevgi ve teőekkürlerimle.

İZMİR, 2017

Kim. Deniz KİLİMCİGöLDELİOğLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLO DİZİNİ.....	VII
ŞEKİL DİZİNİ.....	IVIII
RESİM DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
BÖLÜM I.....	3
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER.....	3
1.1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
1.2 GENEL BİLGİLER.....	6
1.3 <i>RANUNCULUS</i> TÜRLERİNİN HALK ARASINDAKİ KULLANILIŞLARI.....	10
1.4 <i>RANUNCULUS</i> TÜRLERİ İLE YAPILAN KİMYASAL ARAŞTIRMALAR VE AKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....	122
1.5 FLAVONOİTLER.....	166
Flavonoitlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	19
Flavonoitlerin Antioksidan Özellikleri.....	20
Flavonoitlerin Antimikrobiyal Özellikleri:.....	222
Flavonoitlerin Sitotoksik Özellikleri.....	222
Flavonoitlerin Antienflamatuvar Özellikleri.....	233
Flavonoitlerin Antiviral Özellikleri.....	24
Flavonoitlerin Antitrombotik Özellikleri.....	24
Flavonoitlerin Antiallerjik Özellikleri.....	25
Flavonoitlerin Aterosklerosis ve Kroner Kalp Hastalıklarından Koruma Özellikleri.....	26
2. GENEL BİLGİLER.....	26
A. BİTKİ HAKKINDA BOTANİK BİLGİLER.....	26
A.1 <i>Ranunculus</i> Türlerinin Sistematik Yeri.....	26
A.2 Ranunculaceae Familyasının Özellikleri.....	27
A.3 <i>Ranunculus</i> L. Cinsinin Özellikleri.....	27
A.4 <i>Ranunculus constantinopolitanus</i> DC.....	28
Sinonim isimleri:.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR.....	28
A. MATERYAL.....	28
B. DENEYLER.....	31
2. KİMYASAL BÖLÜM.....	31
A. KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI.....	31
1. TEORİK KISIM.....	31
2. PRATİK KISIM.....	31
2.1 MATERYAL VE METOD.....	31
2.1.1. Kurutmada kayıpTayini.....	32
2.1.2. Total Kül Miktar Tayini.....	32
2.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini.....	32
2.1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini.....	33
B. FİTOKİMYASAL ANALİZLER.....	33
B.1. TEORİK KISIM.....	33
B.2. PRATİK KISIM.....	33

B.2.1. MATERYAL VE METOD.....	33
B.2.1.1. Metanol Ekstresinin Hazırlanışı.....	34
B.2.1.2. Etil asetat Ekstresinin Hazırlanışı.....	34
B.2.1.3. n-hegzan Ekstresinin Hazırlanışı.....	34
B.2.1.4 . Su ekstresinin Hazırlanışı.....	344
B.2.1.5. Etanol ekstresinin Hazırlanışı.....	3534
B.2.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	35
B.2.2.1. Steroidlerin teşhisi.....	35
B.2.2.2. Tanenlerin Teşhisi.....	35
B.2.2.3. Flavonoitlerin Teşhisi (Siyanidin Reaksiyonu).....	35
B.2.2.4. Alkaloid Teşhisi.....	35
B.2.2.5. Saponozitlerin Teşhisi.....	35
B.2.2.6. Kumarinlerin teşhisi.....	36
B.2.2.7 Şeker ve indirgen şekerlerin tayini.....	36
B.2.2.8 Nişastanın teşhisi.....	36
B.2.2.9 Triterpenoidlerin teşhisi.....	36
B.2.2.9 Antrakinonların teşhisi (Bornträger reaksiyonu).....	36
5. BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNLERİ.....	37
A. SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ.....	37
1. TEORİK KISIM.....	37
2. PRATİK KISIM.....	38
2.1. MATERYAL VE METOD.....	38
2.1.1. Brine shrimp (<i>Artemia salina</i> Leach.) Larvalarının Hazırlanışı ..	38
2.1.2. Brine shrimp (<i>Artemia salina</i> Leach.) Metodu.....	38
B. WST-1 HÜCRE PROLİFERASYONU YÖNTEMİ İLE SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ.....	39
1. TEORİK KISIM.....	39
2. PRATİK KISIM.....	40
2.1 Materyal metot.....	41
C. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TAYİNİ.....	42
1. TEORİK KISIM.....	42
2. PRATİK KISIM.....	43
2.1. MATERYAL VE METOD.....	43
2.1.1 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	43
2.1.1.1. Test Mikroorganizmaları:.....	43
2.1.1.1.1. Disk Difüzyon Metodu:.....	44
2.1.1.1.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyon (MBK/MFK)'un Belirlenmesi:.....	44
D. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ.....	46
1. TEORİK KISIM.....	46
2. PRATİK KISIM.....	46
2.1 MATERYAL VE METOD.....	46
2.1.1. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi:.....	46
2.1.2. Toplam Fenolik Madde Analizi.....	47
2.1.3. Toplam Flavonoid Analizi.....	48
BÖLÜM II.....	48
BULGULAR.....	48
A. BOTANİK BÖLÜM.....	48
A.1. MAKROSKOBİK BULGULAR.....	48

A.2. MİKROSKOBİK BULGULAR.....	49
A.2.1 Gövdeye Ait İncelemeler ve Bulgular.....	49
A.2.2 Köke Ait İncelemeler ve Bulgular	53
A.2.3 Yapağa Ait İncelemeler ve Bulgular.....	54
A.2.4 Toz Drog Üzerinde Gerçekleştirilen Mikroskopik İncelemeye Ait Bulgular	55
C. KİMYASAL BÖLÜM.....	58
1. KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR... 58	
2. FİTOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI.....	59
D. R. <i>CONSTANTINOPOLITANUS</i> DC. ÜZERİNE BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNLERİNİN SONUÇLARI.....	60
1. Sitotoksik Aktivite Tayinine Ait Bulgular	60
2. WST-1 Hücre Proliferasyonu Yöntemi İle Sitotoksik Aktivite Tayinine Ait Bulgular.....	60
2. Antimikrobiyal Aktivite Tayinine Ait Bulgular.....	61
3. Antioksidan Aktiviteye Ait Bulgular	63
3.1. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesine Ait Bulgular	63
3.2. Toplam Fenolik Madde Analizine Ait Bulgular	65
3.3. Toplam Flavonoid Analizine Ait Bulgular	66
BÖLÜM III	67
TARTIŞMA.....	67
1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR	67
a. Yapağa Ait Bulgular.....	68
b. Gövdeye Ait Bulgular.....	68
c. Köke Ait Bulgular.....	69
2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ARAŞTIRMALARI	69
3. BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNİ ARAŞTIRMALARI	70
BÖLÜM IV	74
SONUÇ VE ÖNERİLER	74
BÖLÜM V	76
YARARLANILAN KAYNAKLAR 76	
ÖZGEÇMİŞ.....	89

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. % Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları.....	58
Tablo 2. % Total Kül Miktar Tayini Sonuçları.....	58
Tablo 3. % Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları.....	58
Tablo 4. % Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Sonuçları..	59
Tablo 5. Herba <i>Ranunculus constantinopolitanus</i> 'dan Hazırlanan Metanol, Etil asetat, N-hegzan, Su Ekstrelerinin Fitokimyasal Analiz Sonuçları.....	59
Tablo 6. Droğumuzun Sitotoksik Aktivite Tayini Sonuçları.....	60
Tablo 7. <i>R. constantinopolitanus</i> DC. ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri	62
Tablo 8. <i>R. constantinopolitanus</i> DC.'tan Hazırlanan ekstrelerin % DPPH inhibisyon ve EC ₅₀ Değerleri.....	64
Tablo 9. <i>R. constantinopolitanus</i> 'tan Hazırlanan Ekstrelerin (1 mg/ml) Toplam Fenolik Madde Miktarına Ait Sonuçlar.....	66
Tablo 10. <i>R. constantinopolitanus</i> 'tan Hazırlanan Ekstrelerin (1 mg/ml) Toplam Flavonoid Madde Miktarına Ait Sonuçlar.....	67

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. 2-Fenil Benzopiran.....	17
Şekil 2. Flavonoit İskeletleri.....	17
Şekil 3. Apigenol, Viteksin ve İzoviteksinin yapısı.....	19
Şekil 4. Örnek olarak kersetinin antiinflamatuvar aktivitesine ilişkin yapı.....	23
Şekil 5. Yüksek inhibisyon etki gösteren flavonoitlere ait IC ₅₀ değerlerinin yapı-aktivite ilişkisi.....	25
Şekil 6. . Tetrazolium WST-1 tuzunun {4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat} formazona dönüşümü	40
Şekil 7 DPPH'ın kimyasal reaksiyonunun şematik gösterimi	47
Şekil 8. DPPH Radikal Yakalama Aktivitesine Ait α -Tokoferol Kalibrasyon Eğrisi.....	63
Şekil 9. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi.....	65
Şekil 10. Kersetin Kalibrasyon Eğrisi.....	66

RESİM DİZİNİ

Resim 1. <i>R. constantinopolitanus</i> DC. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü.....	29
Resim 2. <i>R. constaninopolitanus</i> DC. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü.....	29
Resim 3. <i>R.constantinopolitanus</i> DC. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü.....	30
Resim 4. Gövde Enine Kesiti.....	50
Resim 5. Gövde Enine Kesiti.....	50
Resim 6. Gövde Yüzeyel Kesiti.....	51
Resim 7. Gövde Yüzeyel Kesiti.....	51
Resim 8: Gövde Yüzeyel Kesiti.....	52
Resim 9: Gövde Yüzeyel Kesiti.....	52
Resim 10: Kök Enine Kesiti.....	53
Resim 11: Kök Enine Kesiti.....	54
Resim 12: Yaprak Enine Kesiti.....	55
Resim 13: Toz Drogda Stoma ve Örtü Tüyü.....	56
Resim 14: Toz Drogda İletim Demeti ve Örtü Tüyü.....	56
Resim 15: Toz Drogda Örtü Tüyü ve Tüy Tabanı.....	57
Resim 16: Toz Drogda Yaprak Epidermisi ve Tüy Tabanı.....	57

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye’de yabani olarak yetişen bir *Ranunculus* türü olan *Ranunculus constantinopolitanus* DC. bitkisi farmakognozik açıdan incelenmiştir.

Botanik çalışmalarda, bitki tayininde yararlanabilecek ve muhtemel monografilerde yer alabilecek anatomik ve mikroskopik özellikleri araştırılmıştır.

Kalite kontrol çalışmasının yapıldığı araştırmalarda, çiçekli vejetasyon döneminde toplanan bitkiden elde edilen drog üzerinde Avrupa Farmakopesi’nde yer alan yöntemler esas alınmıştır. Bu amaçla, kurutmada kayıp, total kül, hidroklorik asitte çözünmeyen kül ve sülfat külü deneyleri yapılmış ve sonuçları % değer olarak verilmiştir. Ayrıca, droğumuzdan hazırladığımız ekstrelelere fitokimyasal tarama yapılmıştır.

Droğun biyolojik aktivitesinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler gerçekleştirilmiştir. Droğun sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi için, brine shrimp ve WST-1 hücre proliferasyonu yöntemleri yanında, antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle; antioksidan aktivitesi DPPH radikali yakalama yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca toplam fenolik madde analizi ile toplam flavonoid madde analizi de yapılmıştır.

ABSTRACT

In this study, *Ranunculus constantinopolitanus* DC. which is wild-growing *Ranunculus* species in Turkey, has been thoroughly investigated by pharmacognostical approaches.

In botanical investigations carried out on the plant, anatomical and microscopical features, which may be used in a prospective monograph about this plant drug were investigated.

In this course of the quality control studies have been conducted according to European Pharmacopeia, loss in drying, total ash, acid-soluble ash and sulphated ash of drug were determined, and the results were reported as percentage values. In addition, the phytochemical screening was investigated extracts prepared from our plant.

To determine the biological activity of the drug has been studied by using different methods. The cytotoxicity of the drug was evaluated by brine shrimp and WST-1 cell proliferation lethality bioassays; the antimicrobial activity of the drug was determined by using disc diffusion method and microdilution method; the antioxidant activity of the drug was determined by DPPH method. Moreover, analysis of total phenolic substance and total flavonoid substances were studied.

BÖLÜM I

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1 GİRİŞ VE AMAÇ

Ranunculaceae familyası yaklaşık 50 cins ve 2000 tür içermekte olup *Ranunculus* türleri ülkemizde 85 tür ile temsil edilmektedir. Bunlardan 15 tanesi endemiktir (1). Ranunculaceae familyasında bulunan bitkilerin çoğu cildi tahriş edici özellikler taşır ve *Ranunculus* türleri “düğün çiçeği, yağ çanağı, katır nalı” adlarıyla da bilinen bir veya çok yıllık otsu bitkilerdir (2). Bu genusa ait bitkiler ülkemizde halk arasında kabızlık, romatizma, hemoroid, ödem ve sarılık tedavisinde kullanılmaktadır (3-5).

Ranunculus ficaria L. türünün taze kökleri kabız ve yara iyi edici etkiye sahiptir (3). Bu tür saponin (fikarin), fenolik glikozit ve uçucu yağ taşır. Ortaçağdan beri hemoroide karşı kullanılır. Dahilen infüzyon, tentür veya hülasa, haricen ise hülasa şeklinde kavak merhemi ile birlikte kullanılır (6). *R. Laetus* Wall türü Afganistan, Pakistan, Hindistan ve Himalayalar 'da çok yaygın şekilde bulunur ve halk arasında yaprakları ve çiçekleri, konjonktivit gibi göz hastalıklarına karşı kullanılır (7-9). Bitki flavonoidler, kumarin türevleri, triterpenler ve β -sitositerol-3-O- β -D glikozit içerir (7). *R. bulbosus* L. (yumrulu düğünçiçeği) Karadeniz bölgesi çayırlarına yayılmış olan bir türdür ve Ankara civarından alınan örneklerde %0.55 anemonin içerdiği belirlenmiştir (6). Yapraklar kersetin, kemferol flavonoidleri içerir (10). Geleneksel olarak bütün halde gut, artrit ve nevralsi ağrılarında kullanılır. Tüm bitki ve özellikle bitki özü buruk tatlıdır ve ağrı kesici, antispazmodik, diyaforetik ve rubefasiyan olarak kullanılır (7). *R. sceleratus* L. (bataklık düğün çiçeği) çok rutubetli yerler ile bataklıklarda görülür. Zehirli olarak tanınmış bir türdür. Ankara civarından toplanmış numunelerde ortalama % 0.78 anemonin tespit edilmiştir.

Haricen kızartıcı ve kan toplayıcı olarak kullanılır. *R. sceleratus* L.'un en önemli sekonder metabolitleri flavonoidler, β -sitosterol ve lakton glikozitleri (ranunkulin) gibi steroidleri içerir (7-11). *R. repens* L. birkaç yıllık otsu bir bitkidir ve genellikle sürünücüdür. *R. repens* % 0.80 alkaloid, % 0.39 flavonoid, %0.5 saponin, %0.01 tanen ve %0.004 fenolik bileşik içerir (12). Flavon glikozitleri, *p*-hidroksi sinnamik asit, β -sitosterol, anemonin, karotenler içerdiği rapor edilmiştir (7,12). Yapraklar, kersetin ve kemferol flavonoidleri, viteksin ve izoviteksin flavonları içerir. Petaller ise, kersetin ve gossipetin-8 metil eter adlı flavonoidleri içerir ve çiçeğe sarı rengini verir (10). Geleneksel olarak hemoroid tedavisinde kullanılır (7-9). *R. Chinensis* var. *chinensis* flavonoidler (kersetin ve kemferol), alkaloidler, triterpen saponinler, protoanemonin ve ranunkulin gibi laktonlar önceden yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bitki geleneksel olarak bütün halde diyare ve parazitlere karşı kullanılır (7). Çin halk tıbbında ise akut ve kronik hepatit ve peritonel ödem tedavisinde kullanılır (13).

Ranunculus türlerinin halk arasında romatizma tedavisinde ve çeşitli dermatolojik hastalıklarda kullanılması sonucu fitodermatite sebep olduğu pek çok vaka rapor edilmiştir (14-17). *Ranunculus* türleri, geleneksel olarak Amerikan Kızılderilileri tarafından hemoroitte, soğuğa karşı ve antiinflamatuvar etkileri nedeniyle kullanılır (12).

R. constantinopolitanus DC., ülkemizde romatizmal eklem ağrılarını rahatlatmak ve antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılır (18). *R. constantipolitanus* DC., Ankara'da 'evlimemed otu' adıyla bilinir ve yaprakları ağrı dindirici ve iltihap akıtıcı olarak kullanılır. Bu amaçla yaprakları suyu çikana kadar dövülür ve fındık kabuğunun içinde ağırlı bölgeye 2 saat konarak iltihabın akıtılması sağlanır (18). *R. constantinopolitanus* DC. toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstre GC-

MS ile incelendiğinde palmitik asit, stearik asit, linoleik asit ve oleik asit içerdiği saptanmıştır (19).

Bu çalışmada *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinin çiçekli dönemde 05.05.2005 tarihinde İzmir, Karagöl mevkiinden toplanan toprak üstü kısımlarından hazırlanan drog örneğinin ilk defa tarafımızdan kapsamlı olarak incelenmesi sebebiyle kalite kontrol ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda öncelikle, droğun anatomik ve mikroskopik incelemelerinin yapılması ve droğa ait karakteristik özelliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İkinci olarak, droğun kalitesinin belirlenmesinde Avrupa Farmakopesindeki yöntemler esas alınarak kurutmada kayıp, total kül, sülfat külü ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini ve fitokimyasal analiz denemeleri kalite kontrol amacıyla uygulanmıştır.

Yaptığımız son çalışmada ise amaç, droğun çeşitli biyolojik aktivite özelliklerini saptamaktır. Sitotoksik aktivite tayini Brine Shrimp ve WST-1 hücre proliferasyonu yöntemleriyle, antimikrobiyal aktivite tayini Disk Difüzyon ve Mikrodilüsyon yöntemleriyle, antioksidan aktivite tayini ise DPPH (2-2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) eşdeğeri total antioksidan kapasite yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, droğumuzun total fenolik ve total flavonoit madde tayini, fitokimyasal taraması ile içerik maddelerinin araştırması da yapılmıştır.

Tezimiz kapsamında, *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinin çiçekli dönemde toplanmış toprak üstü kısımları ilk defa tarafımızdan kapsamlı olarak incelenmiş ve drog ile ilgili, ileride hazırlanabilecek bir monografin hazırlanmasında büyük katkısı olacağı düşünülmektedir.

1.2 GENEL BİLGİLER

Ranunculus türleri yaygın olarak Kuzey ve Güney Amerika'dan Yeni Zelanda'ya ve Akdeniz'e kadar yayılış göstermektedir. *Ranunculus*, Latince olarak 'küçük kurbağa' manasına gelir ve bu isim pek çok türün su kenarında kurbağalı bölgelerde bulunması sebebiyle bu türe verilmiştir (20). Pek çok *Ranunculus* türü, ılıman arktik/ yarı arktik bölgelerde, yaygın şekilde bulunurlar. Ayrıca ormanlar, kuru ve nemli çayırlar, nemli topraklar, göller, nehirler ve yüksek dağlık tepelerde geniş yayılım gösterirler. Otsu, tek yıllık veya çoğunlukla çok yıllık, birleşik veya bütün yapraklı haldedirler. Çeşitli morfolojik adaptasyonlar ve çeşitli üreme stratejileri (vejetatif üreme, eşeysiz üreme gibi) ile türün farklı bölge ve yüksekliklerde kolonize olma yeteneği için önemli faktörlerdir (21).

Ranunculus türlerinin tüm çeşitleri taze iken tüketildiğinde zehirlidir ve zehirlenmenin semptomları ise, aşırı salyalanma, kanlı ishal ve koliktir. *Ranunculus* türlerinin çoğunluğu çok yıllık otsudur, canlı beyaz veya sarı çiçeklidir ve pek çok kültürde süs amacıyla kullanılan bir bitkidir (20).

Ranunculus genusundaki türler çok farklı habitatlarda yaşadıklarından çok çeşitli morfolojik adaptasyonlara sahiptirler. *R. acris* L. dik bir sapa sahiptir ve bu sap kısmen verimli şekilde çimenlerle yarışmasını sağlar. Bununla birlikte sürünücü düşünçiceği olan *R. repens* L. kendini destekleyici gövdeye sahiptir ve *R. acris* 'in boyuna gelir. Su düşün çiçekleri su altında ve su üstünde, suyun akış hızının durgundan şiddetliye kadar değiştiği bölgelerde yetişebilir. *R. peltatus* Schrank durgun veya yavaş akan akarsularda yetişir ve yaprakları su yüzeyinde yetişebilir. Bunun tersine, *R. fluitans* Lam. tipik olarak hızlı akan akarsularda yetişebilir (22).

Pek çok *Ranunculus* türü ranunkulin içerir. Ranunkulin, yüksek reaktif glikozilhidrat formundadır ve toksik lakton olan protoanemonin *Ranunculus*'ların

toksitesinden sorumlu bileşiklerdir. Glikozit olan ranunkulin, toksik protoanemoninin prekürsörüdür (23,24). *Ranunculus* türlerindeki ranunkulin içeriği normalde kuru metaryalde 1 gr'ında 10 mg civarında bulunur. Ama *R. cymbalaria* Pursh.'da kuru metaryalde yaklaşık 20 mg civarında bulunabilir (24). *R. repens*'den izole edilen ranunkulin ve iki yeni glikozit olan ranunkozit ve ranunkulozit izole edilmiştir (23).

Bitkideki mekanik hasar sonucunda toksik olmayan ranunkulin β - glikozidaz enzimi ile hidrolize olur. Bu enzim vakuolde depolanır. Ranunkulinin β - glikozidaz enzimi ile hidrolizi sonucu stabil olmayan toksik lakton protoanemonin oluşur ve protoanemonin kendiliğinden anemonine dönüşür (24).

Ranunculus hirtellus Royle türlerinin anemonin, flavon glikozitleri ve ranunkozitler içerdiği rapor edilmiştir (25). *Ranunculus* ailesine ait bütün bitkilerin iritan özelliklerinin nedeni bir glikozit olan ranunkulindir. Bitki parçalandığında ilk olarak mekanik etki ile bütünlüğü bozulup sonra enzimatik etki ile heterozit parçalanıp içinden uçucu, güçlü ve iritan protoanemonin oluşur. Bu da polimerize olarak anemonine dönüşerek ciltte tahriş yapar (14).

Lakton yapıdaki protoanemonin (5-metilen-2-oksohidrofuran) *Ranunculus* türlerinin vezikan özelliğinden sorumlu iritan etkili bileşendir. Bu yağ, taze bitki dokularının maserasyonu sırasında otoliz ile ortaya çıkar. Protoanemonin hızlıca polimerleşir ve zararsız bir madde olan anemonine dönüşür. Eğer yüksek miktarda alınırsa ağızda ve boğazda yanmaya, hipersalivasyona, kusmaya, karında kramplara, diyareye ve nörolojik semptomlara sebep olur (26). Deriye uygulandığında ise, eritem ve dermatit oluşturur. Bitkinin her tür çiftlik hayvanı tarafından yenmesi durumunda sindirim bölgelerinde iritasyon ile karın ağrısı ve diyareyi de içeren

gastrik ağrılara neden olur (15,27). Protoanemonin ayrıca antifungal ve antibiyotik özellikler içerir (15, 28).

Protoanemoninin otolitik salımının enzimatik yolla olduğu ve büyük ihtimalle β -glikozidaz ile serbestlendiği öne sürülmüştür. β -D-glikozidi olan ranunkulin farklı *Ranunculus* türlerinden elde edilmiş ve sonra protoanemoninden elde edilen zayıf alkali (sodyum asetat) glikozidin tedavi edici etkisinden dolayı olduğunu gösterilmiştir (28).

Protoanemonin dimerizasyonla irritan olmayan anemonine dönüşür. *Ranunculus* türlerinin fungusit, antimikrobiyal ve antimutojenik etkileri protoanemoninin ve β -laktonların varlığından kaynaklanır (29).

R. constantinopolitanus DC. (Arapça yaygın adıyla Hawdhan fa'ri) *Ranunculus* genusuna ait bir türdür (18). *R. constantinopolitanus* DC. da Türkiye 'de romatizmal eklem ağrılarını rahatlatmak ve antiinflamatuvar etkisi nedeniyle kullanılır (18). *Ranunculus* türlerinin halk arasında romatizma tedavisinde ve çeşitli dermatolojik hastalıklarda kullanılması sonucu fitodermatite sebep olduğu pek çok vaka rapor edilmiştir (14-17).

R. constantipolitanus DC., Ankara'da 'evlimemed otu' adıyla bilinir ve yaprakları ağrı dindirici ve iltihap akıtıcı amaçla kullanılır. Bu amaçla yaprakları suyu çıkana kadar dövülür ve fındık kabuğunun içinde ağırlı bölgeye 2 saat konarak iltihabın akıtılması sağlanır (22).

Fostok ve arkadaşlarının Lübnan'da yaptıkları bir çalışmada *R. constantinopolitanus*' un topraküstü kısımlarının antiinflamatuvar aktivitesini araştırmak amacıyla interlökin (IL)-6 seviyesini enflamasyonun işareti olarak seçilmiş ve farelerin endotoksin (ET) ile uyarılmış meme epitel SCp2 hücreleri üzerindeki antiinflamatuvar etkisi incelenmiştir. Bunun sonucunda, metanol

ekstresinin SCp2 hücrelerine karşı farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50 veya 100 g/ml) IL-6 seviyesini düşürerek antienflamatuvar etkide olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresinden elde edilen fraksiyonun yağ asitleri metil esterlerine dönüştürülerek GC-MS ile incelendiğinde karışımın sırasıyla palmitik asit, stearik asit, linoleik asit ve oleik asit içerdiği tanımlanmıştır. Balık yağının içerdiği ω -3 yağ asitleri pentaenoik asit (EPA) ve heksaenoik asit (DHA) içeriğinin endotoksinin ET ile uyarılmış IL-6 seviyelerini azaltma miktarı metanol ekstresi ile karşılaştırıldığında, metanol ekstresinin kısa süreli uygulamada IL-6 seviyesini düşürmede daha etkili olduğu fakat uzun süreli uygulamada balık yağının daha etkili olduğu görülmüştür (19).

Akkol ve arkadaşları Türkiye’de yaptıkları bir çalışmada *R. constantinopolitanus*’ un yara iyileştirici ve antienflamatuvar etkilerini araştırmak amacıyla fareler üzerinde hazırladıkları *in vivo* yaralanma modelleri sonucunda *R. constantinopolitanus*’un metanol ekstresinin iyileşmede önemli bir etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca yine metanol ekstresinin iyileşme üzerinde önemli bir parametre olan iyileşen dokudaki hidrokspirolin içeriğinde önemli bir artışa sebep olduğu ve yara iyileşmesi üzerindeki esas etken olan antienflamatuvar aktivite üzerine de olumlu bir etkisinin olduğu yapılan denemelerde belirlenmiştir. Bu sonuçlar bitkinin Türkiye’deki etnobotanik kullanımlarını destekler niteliktedir. Etki, *R. constantinopolitanus*’un içerdiği fenoler, terpenoitler ve flavonoitlerden kaynaklanmaktadır (31). *Ranunculus*’larda yapılan önceki çalışmalarda kersetin ve kemferol gibi flavonoitlerin pek çok türde bulunduğu tespit edilmiştir (10).

1.3 *RANUNCULUS* TÜRLERİNİN HALK ARASINDAKİ KULLANILIŞLARI

R. bulbosus L. (yumrulu düğünçiçeği) Karadeniz bölgesi çayırlarına yayılmış olan, az çok tüylü ve kök kısmı yumrular halinde bulunan bir türdür. Ankara civarından alınan örneklerde % 0.55 anemonin taşıdığı belirlenmiştir (6). Bitki Mart-Nisan ayları arasında çiçeklenir ve geleneksel olarak bütün halde gut, artrit ve nevroz ağrılarında kullanılır. Bitki buruk tatlıdır ve ağrı kesici, antispazmodik, diaforetik ve rubefasiyan olarak kullanılır (7).

R. sceleratus L. (bataklık düğün çiçeği) Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika'da yaygındır. Mart-Nisan ayları arasında çiçeklenir. Tüm bitki geleneksel Çin tıbbında kan akışını arttırıcı olarak, soğuk algınlığında, şişliği hafifletmede, karaciğer ve safra kesesi koruyucu olarak kullanılır (7).

Dioscorides bu türün dikkat çekici etkisini referans almış, insanlar tarafından yendiğinde ağız kasları üzerinde etkisi olduğunu, dudakları dışarı ve yukarı çekildiğinde gülümsemeyle karıştırılabilen bir yüz buruşmasına sebep olacağını yazmıştır (11). *R. sceleratus* L.'un en önemli sekonder metabolitleri flavonoidler, β -sitosterol ve lakton glikozitleri (başlıca ranunkulin)'dir (11,7). Protoanemonin yapraklar kuruduğu, ezildiği veya zedelendiğinde dimerleşir ve anemonin meydana gelir. Anemonin vezikül oluşturucu bir ajandır ve düğün çiçeklerinin toksisitesinden sorumlu başlıca bileşiktir. Taze halde bitkinin bütün kısımları zehirlidir ama ısı uygulandığında veya kurutulduğunda toksinler yok olur (11). Bitkinin yaprak ekstraktlarının etkisi, protoanemoninin kristal yapısındaki anemonine dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu kimyasalların çok küçük derişimlerde bile güçlü fungusit etkisi vardır ama anemoninin aktif fungusit özellikte olması için daha yüksek

konsantrasyonda kullanılması gereklidir (33). *In vitro* olarak da toprak üstü kısımları antiinflamatuvar ve antibakteriyal etkili olduğu da gösterilmiştir (7).

R. ficaria L. türünün taze kökleri Radix Ficaria adıyla bilinir ve sarı çiçekli, 10-20 cm yükseklikte, yaprakları kalp biçiminde ve saplı, kökleri parmak gibi etli olan çok yıllık bir otsu bitkidir. Kuzey, Batı ve Güney Anadolu'da yaygındır. Etken maddesi doymamış lakton türevleridir (ranunkulin ve protoanemonin). Bu maddeler yakıcı olduklarından taze drog tahriş edicidir. Kabız ve yara iyi edici etkiye sahiptir (3). *R. ficaria* L. var. *calthaefolius* Guss (*Ficaria calthacfolia*) (Basurotu) 10-40 cm yüksekliğinde, tüysüz kökleri yumru şeklinde, yaprakları parlak yeşil, kalp şeklinde tam kenarlı ve saplıdır. Ortaçağdan beri hemoroide karşı kullanılır. Dahilen füzyon, tentür veya hülasa, haricen ise hülasesı kavak merhemi ile verilir (6).

Aslam ve arkadaşlarına göre, *R. laetus* Wall. Ex Hook. f. Q Thoms. türü Afganistan, Pakistan, Hindistan ve Himalayalar 'da çok yaygın şekilde bulunur ve halk arasında yaprakları ve çiçekleri şişkinlik, konjonktivit ve göz hastalıklarına karşı kullanılır (7).

R. repens L. geleneksel olarak hemoroide karşı kullanılır (7).

R. chinensis Bunye geleneksel olarak bütün halde diyare ve parazitlere karşı kullanılır (7), Çin halk tıbbında ise hepatit ve ödem tedavisinde kullanılır (10).

R. ternatus kökleri Çin tıbbında tüberküloz tedavisinde kullanılır (34,35). *R. ternatus*'un farmakolojik ve kimyasal yapısına bakıldığında, tüberküloz bakterisi üzerinde doz-etki ilişkisi olduğu belirlenmiş ve GC-MS ile incelendiğinde çoklu organik asitlerinin varlığı gösterilmiş ve bu organik asitlerin droğun antitüberküloz etkisinden sorumlu olduğu bulunmuştur (36).

R. serbicus Vis. birkaç yıllık, ılıman bölgelerde ve bataklıklarda yetişen bir bitkidir. Yunanistan, Balkanlar ve İtalya'nın Güney kısımlarındaki nemli çayırlarda

yetiştir. Bitki içerdiği alkaloidlerden dolayı farklı ülkelerde halk tıbbında kullanılır (37). *R.serbicus*'un köklerinden kuaterner alkaloidlerinden berberin, palmitin, kolumbamin ve aporfin tip alkaloidlerden magnoflorin izole edilmiştir (37,38).

R.hirtellus Boyle. Afganistan, Pakistan, Kuzey Hindistan ve Himalayalar'da yaygındır. Kökleri geleneksel olarak ateş düşürücü, soğutucu ve antihelmantik olarak kullanılır (8,9).

R. arvensis (tarla düğün çiçeği) Avrupa'dan Sibirya'ya, Kuzey Batı Asya'dan Hindistan ve Himalayalara kadar geniş şekilde yaygınlık gösterir ve Mart-Nisan aylarında çiçeklenir. Flavonoit, fenol, alkaloid ve saponin yönünden zengindir (7) ve ranunkulin glikozidi içerir (15). Geleneksel olarak yaprakları kesintili ateş, astım ve gut ağrılarında kullanılır (7).

1.4 RANUNCULUS TÜRLERİ İLE YAPILAN KİMYASAL ARAŞTIRMALAR VE AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

R.scleratus L. (bataklık düğün çiçeği) yaklaşık 50 cm boyunda, 1-2 senelik bir türdür. Çok rutubetli yerler ile bataklıklarda yetişir. Zehirli olarak tanınmış bir türdür. Ankara civarından toplanmış numunelerde ortalama % 0.78 anemonin tespit edilmiştir. Haricen kızartıcı ve kan toplayıcı olarak kullanılır (6). Yetiştirilmesi için nemli ve ıslak toprak gerektirir ve suda yetişebilir. Bitki ağrı dindirici, antispazmodik, diaforetik, emanogog ve rubefasiyandır. Bitki yaralanıp cilde uygulandığında ciltte kabarıklık oluşturur ve kolayca iyileştirilemeyen bir ağrı yaratır. Yaprak ve kökler haricen antiromatik olarak kullanılır. Tohumlar toniktir ve soğuk algınlığı, genel zayıflık ve romatizmada kullanılır. Yaprak ekstresi ise, fungusit olarak kullanılır (39).

R. bulbosus'un etil asetat ekstresinden heksadekanoik asit, β -sitositerol, anemonin, protoanemonin laktonları izole edilmiştir (5,7). Yapraklar kersetin ve kemferol

flavonoitleri içerir. Çiçekler ise gossipetin 8-metileter içerir ve sarı renklidir (10). *In vitro* olarak tüm bitkinin antifungal aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (7). Ayrıca bitki protoanemonin gibi laktonlarca zengindir ve antimikrobiyal özellikleri bilinir (40). İçerdiği anemonin sebebiyle seçilmiş dermofitler ve mayalara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (41). Romatizma tedavisinde, nevroalji ağrılarında, rubefasiyan, antispazmodik ve diyaforetikdir (3,5).

Karagöz ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; *R. ficaria* L.'nin kök yumrularından hazırlanan su ekstresinin Vero hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve insan influenza tip-2 virüsüne (PIV-2) karşı antiviral etkileri araştırıldığında, antiviral aktivite göstermemesine karşın *R. ficaria*'nın Vero hücrelerine karşı *Trachystemon orientalis*, *Stellaria*, *Centaurea amasiensis*, *Aristolochia pontica*'nın su ekstrelerine kıyasla en yüksek sitotoksik etkide olduğunu göstermişlerdir (41).

R. repens L. birkaç yıllık otsu bir bitkidir ve genellikle sürünücüdür. K. Afrika, Çin, Japonya ve Avupa'nın pek çok bölgesinde yaygındır. *R. repens* % 0,80 alkaloid, % 0,39 flavonoit, % 0,5 saponin, % 0,01 tanen ve % 0,004 fenol içerir (42). Flavon glikozitleri, *p*-hidroksi sinamikasit, β -sitositerol, ranupenin, anemonin, karotenler ve ranunkozitler içerdiği rapor edilmiştir (7). Yapraklar; kersetin ve kemferol flavonolleri, viteksin ve izoviteksin flavonları içerir. Petaller ise; kersetin ve gossipetin-8 metil eter flavonolleri içerir ve çiçeğe sarı rengini verir (10). Khan ve arkadaşlarının Pakistan'da yürüttükleri bir çalışmada ise, *R. repens*'in metanol ekstresinin ksantin oksidaz enzimine karşı önemli inhibitör etkisi olduğu gösterilmiş ve kloroformda çözülebilen fraksiyonunda bu enzime karşı başlıca inhibitör etkisi etkisi saptanmıştır (42).

Bonora ve arkadaşlarının İtalya 'da yürüttükleri bir çalışmada, *R. sceleratus* L. Chagas hastalığına yol açan ve ardından kronikleşen bir enfeksiyona sebep olan

Trypanosoma cruzi parazitinin inhibisyonuna karşı aktivitesinin allopurinolden fazla olduğu ölçülmüştür. Böylece *R. sceleratus* L.' un yüksek antiparazidik etkisi olduğu ortaya konmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarda ise antiinflamatuvar ve antifungal etkileri gösterilmiştir (38).

Clarkson ve arkadaşları *R. multifidus* Forssk. bitkisinin tüm kısımlarını kullanarak hazırladıkları su ve metanol-diklorometan (1:1) ekstrelerinin *Plasmodium falciparum*'a karşı antiplazmodik etkisi araştırmış ve yüksek antiplazmodial aktiviteye sahip olduğu belirtmişlerdir (43).

R. chinensis Bunye'nin flavonoidler (kersetin ve kemferol), alkaloidler, triterpen saponinler, protoanemonin ve ranunkulin gibi laktonlar içerdiği saptanmıştır (7). Oresbiusin A, ternotosit B, β -hidroksi benzoik asit ve protokateşik asit izole edilmiştir (13).

R. ternatus Thumb. köklerinden 20 kadar bileşik izole edilmiş, yağ asitleri, glikozitler ve *Ranunculus* genusunda ilk kez olarak indol alkaloidlerinden ternatozit C ve D (34,7) stigmasterol, kampesterol, etil palmitat, miristik asit, palmitik asit, β -sitosterol kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır (44). Ayrıca ternatozit A ve B (35), bazı yağ asitleri ve esterleri, ternatozit A ve B, sternbin, metilparaben, 4-O-D-glukopiranozil, *p*-kumarik asit izole edilmiştir (45).

R. kotschy Boiss. karasal ve otsu bitkidir ve çayırlar, ormanlar ve kayalıklı tepelerde yetişir. Kuzeydoğu, Doğu ve Merkez Anadolu'da 300-2400 metrelerde yetişir (26). *R.kotschy* ranunkulin içerir ve ranunkulin fitodermatite sebep olur (26,46).

R.muricatus L. Atlantik, Kuzey Avrupa, Batı ve Kuzey Asya'dan Pakistan ve Hindistan'a kadar yayılmıştır ve Mart-Nisan ayları çiçeklenir (7). *R. muricatus*'un kimyasal bileşenlerine bakıldığında stigmasterol-4-en-3,6-dien, stigmasterol,

anemonin, saponin (essin) ve protokateşik asit türevleri içerir (7,47). *R. muricatus* ranunkulin glikoziti içerir (36) ve bitkinin tamamı oldukça zehirlidir ve bitkiden hazırlanan dekoksasyon ateş ve astımda kullanılır (7).

R. japonicus Thunb. türü skoporon, trisin, protokateşik asit, luteolin, anemonin, skopoletin, 5-hidroksi-6,7-dimetil flavon, ternatozit, 5-hidroksi-7,8-dimetil flavon içerir. *In vitro* olarak farelerde analjezik ve antienflamatuvar aktivitesi olduğu gösterilmiştir (7).

Lorimer ve arkadaşlarının Yeni Zelanda'da yürüttükleri bir çalışmada, *R. pinguis* Hook.'un sitotoksik ve antimikrobiyal etkisini incelediklerinde, P-388 (Murine leukaemia) hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermişler ve yapılan kimyasal tarama sonucunda da bu sitotoksik aktivitenin suda çözünebilir bileşenler sonucunda oluştuğunu göstermişler ve Ranunculaceae familyasının karakteristiği olan ranunkulin varlığı sebebiyle bu sitotoksik aktivitenin görüldüğünü belirtmişlerdir (48).

R. sceleratus L.'un yapısında bulunan anemonin antipiretik olarak bilinir ve protoanemoninle birlikte bu türde sedatif etkiye sahiptir (11).

Mares tarafından yürütülen bir çalışmada, *R. bulbosus* Linn.'un bir bileşeni olan protoanemonin, dermofitler ve mayaların giderilmesinde antifungal ajan olarak seçilerek test edildiğinde en duyarlı dermofit *Epidermophyton floccosum* ve en duyarlı maya ise *Rhodotorula glutinis* olduğu belirlenmiştir. Protoanemonin ve diğer sitotoksik doymamış laktonlar arasındaki yapısal benzerlikler sistein aminoasidi tarafından ters çevrilmesi antifungal etki için muhtemel mekanizmadır (49).

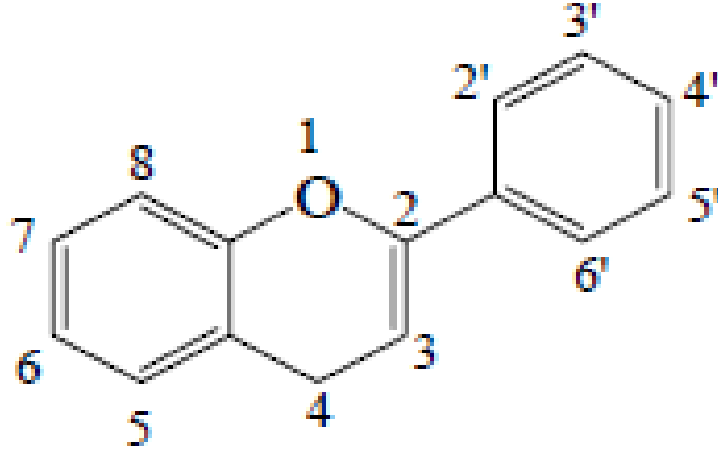
Didry ve arkadaşları, *R. bulbosus*'un toprak üstü kısımlarından izole edilen protoanemoninin antimikrobiyal özelliklerini incelemiş ve protoanemoninin antimikrobiyal doğal bir bileşik olduğunu öne sürmüşlerdir. 22 antibiyotik-

protoanemonin karışımının aerobik bakterilere karşı etkisi incelendiğinde, 20 kombinasyonun *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur (50).

1.5 FLAVONOİTLER

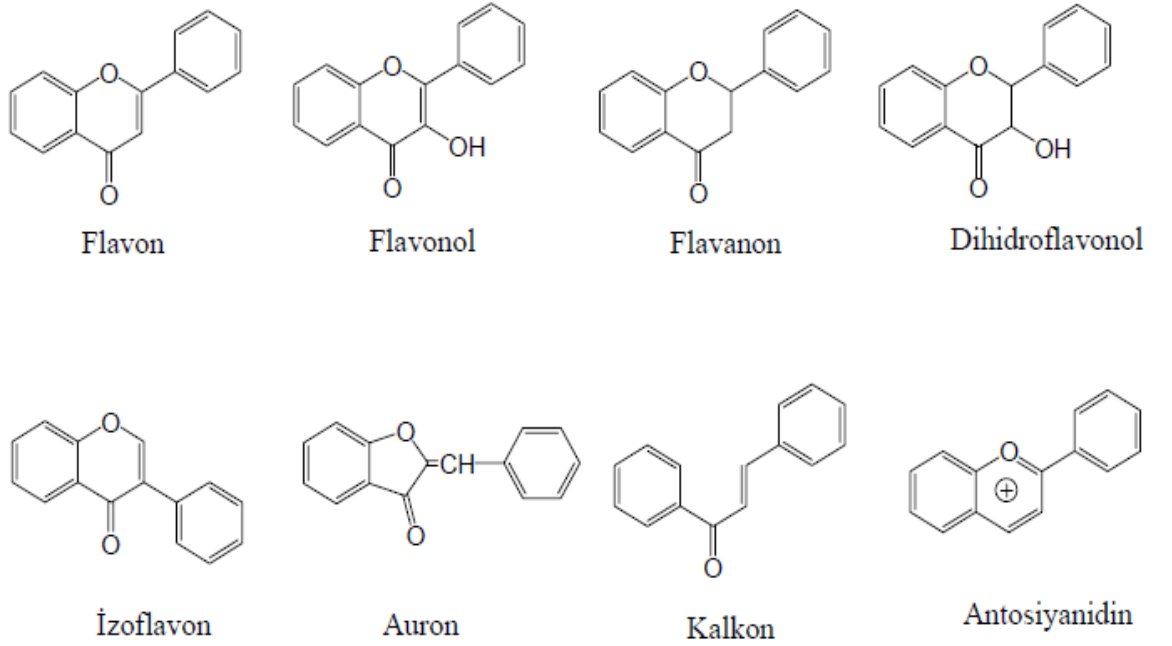
Flavonoitler, sarı renkli olmaları nedeniyle Latince 'sarı' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoit' adını almışlardır. Flavonoitler meyve, sebze, çeşitli yararlı biyokimyasallar ve antioksidan etkiye sahip bazı içeceklerde bulunan aromatik pigment bileşikleridir (52). Flavonoitler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar flavonoitlerin antioksidan özelliklerinin yanında antienflamatuvar, antiviral, antialerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir. Sayıları 4000 ' in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoitler; çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Bazıları ise, örneğin rutin, diosmin ve hesperidozit gibi, P vitamini aktivitesi gösterirler. Yani, kapiler permabilitiyi azaltır ve kapiler direnci arttırırlar. Bu aktivite 3' ve 4' konumundaki serbest iki fenol hidrojen transportörü olarak rol oynamaları sonucu ortaya çıkmaktadır. Flavonoitler hücre içinde kimyasal haberci, fizyolojik düzenleyici veya hücre döngüsünün inhibitörleri olarak görev alırlar. Flavonoitler aglikon veya glikozitler şeklinde bulunmakta olup, flavonoit glikozitler bağırsağa girmeden önce şeker kısmından ayrılmakta iken, aglikonlar hücre membranlarından serbestçe geçebilmektedir. Emilen flavonoitler karaciğere taşınmakta ve çok çeşitli metabolik reaksiyonlara maruz kalarak glukuronitler, sülfatlar ve metillenmiş türevleri gibi çeşitli konjugasyon formlarına dönüşmektedir. Bazı çalışmalarda, flavonoitlerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden bu konjugatların sorumlu olduğu ortaya konmaktadır (53).

Flavonoitler 2-fenil benzopiran yapısındadır.



Şekil 1: 2-Fenil Benzopiran

Flavonoitler, bitkilerin fotosentezle oluşturdukları ve hayati gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, amino asitler gibi birincil metabolitlerden türerler (54). Karbon iskeleti C₆-C₃-C₆ şeklinde olan flavonoitlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur (54,55). Flavonoit iskeletleri Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: Flavonoit İskeletleri

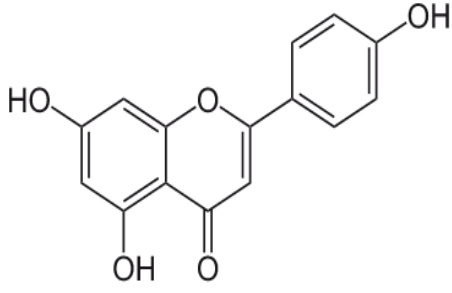
Flavonozitler, flavonoitlerin heterozitleridir. Flavonoitler ise kromon türevi maddelerdir. Kromon (benzo- γ -piron) dur ve bitkilerde şimdiye kadar serbest olarak rastlanmamıştır. Fakat fenil kromon çekirdeğinin hidroksilli türevleri olan flavonoitler bitkiler aleminde yayılmış olan sarı pigmentlerdir. Bunlar en çok heterozit halde bulunur ve flavonozit adıyla bilinirler.

Doğal olarak pek çok flavonoit bulunmaktadır. Bu maddeler, fenil grubunun kromon halkasındaki bazı değişiklikler ile esas halkadaki bazı değişiklikler ve gerek esas halkadaki, gerekse süstitüe halkadaki fenol gruplarının sayısı ve konumunu ve bunların metil esterlerinin bulunması ile birbirinden ayrılmaktadır. Aynı aglikonu taşıyan heterozitler ozların cinsi ve halkadaki yeri bakımından farklar göstermektedir.

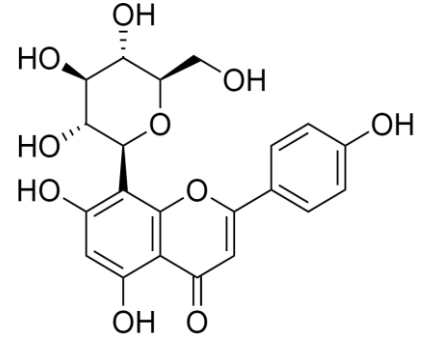
Bitkilerdeki pek çok bileşiği oluşturan bu maddeler, hidroksil grubu ne kadar fazla ve ortamın pH'sı ne kadar yüksekse, o kadar koyu renklidir.

Flavonların kendisi bitkilerde çok ender bulunur, fakat hidroksilli türevleri oldukça yaygındır. Bu hidroksilli türevler, kromon halkasındaki iki veya daha fazla –OH grubu taşırlar.

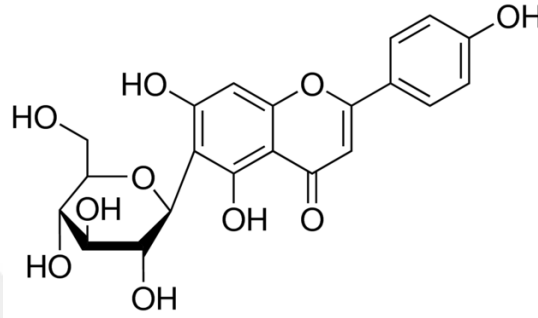
Flavonların monohidroksilli türevlerine ender olarak rastlanmaktadır. Çoğunlukla iki, üç, dört veya beş –OH'lı türevleri yaygındır (55). Flavonların hidroksilli türevleri bitkilerde oldukça yaygındır. Bu hidroksilli türevler, kromon halkasında iki veya daha fazla –OH grubu taşırlar. 3. konumunda –OH taşıyanlar flavonol ve dihidroflavonol grubunu oluştururlar. Apigenol (5,7,4'-trihidroksi flavon) flavon yapısındadır ve pek çok *Ranunculus* türünde bulunan viteksin ve izoviteksin apigenol yapısındaki flavonlardır (12).



Apigenol



Viteksin (apigenin-8-C- glikozit)



İzoviteksin (apigenin-6-C-glikozit, 6-glukosilapigenin)

Şekil 3: Apigenol, Viteksin ve İzoviteksinin Yapısı

Flavonoitler, *Ranunculus* türlerinde kullanılan taksonomik markerlardır. *Ranunculus* larda bulunan flavonlar, flavonoller, O- ve C-heterozitlerinin bulunması, türler arası ilişkilerin belirlenmesine ve *Ranunculus* kromozomuna sahip türlerin taksonomik olarak değerlendirilmesine olanak sağlar (56).

Flavonoitler; fenolik asitler, stilbenler, tanenler, lignanlar ve ligninler gibi bitkisel fenoller özellikle yapraklar, çiçekli dallar, sap ve kabuk gibi odunsu kısımlarda bulunur. Bunlar bitkinin normal gelişiminde bulunup enfeksiyon ve yaralanmaya karşı koruma sağlar (57).

Flavonoitlerin Biyolojik Aktiviteleri

Flavonoitler dünya üzerindeki yaşamın başladığı zamanlardan bu yana insanlar tarafından tüketilmektedir ve insan sağlığı üzerine geniş kapsamlı biyolojik özelliklerinin yanı sıra hastalık riskinin azaltılması üzerine tamamlayıcı etkiye

sahiptirler (58). Son zamanlarda tıbbi bitkilerin terapötik potansiyelleri üzerine ilgi artışı bulunmakta olup, bu potansiyel bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklanmakta ve flavonoidler de bu grubun içinde önemli bir yer edinmektedir (59). Bunlara örnek olarak antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik, antiinflamatuvar, antiviral, antitrombotik, antialerjik, ateroskleroz ve kronik kalp hastalıklarından koruyucu etkisi gösterilebilir.

Flavonoidlerin Antioksidan Özellikleri

Flavonoidler, lipofilik antioksidanlardır fakat yine lipofilik bir antioksidan olan α -tokoferol (Vitamin E)'e göre daha hidrofilitirler. α -tokoferolün kroman halkası membran fosfolipitlerinin ester karbonil gruplarıyla hidrojen bağı yaparak membranda lokalize olurken daha hidrofilik olan flavonoidler ise membranın polar yüzüne yakın şekilde lokalize olmaktadır. Böylece sulu hidroksil radikallerini kolayca yakalayarak lipid peroksid radikallerine α -tokoferolden daha hızlı şekilde etki etmektedir. Flavonoid alımı bu şekilde α -tokoferol tüketimini engellemektedir. Yine lipofilik bir antioksidan olan askorbik asit (Vitamin C), membranın polar yüzüne lokalize olarak antioksidan aktivite göstermektedir (58).

Antioksidanlar etkilerini; serbest radikal oluşumunu engelleyerek (başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki, oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyon azaltıcı etki, katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki) ve oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirerek (toplayıcı etki, bastırıcı etki, onarıcı etki, zincir kırıcı etki) olmak üzere iki şekilde gösterirler (60). Antioksidanların vücuttaki aktivitesi, ortamdaki oksijen miktarı, sıcaklık, konsantrasyon miktarı ve substrat çeşidi gibi özelliklere bağlı olarak değişkenlik gösterir (61).

Grup olarak flavonoidler güçlü antioksidan kapasite gösterirler. Flavonoidlerin antioksidan aktivitelerinin mekanizması serbest oksijen radikallerinin veya uyarılmış

oksijen türlerinin direkt süpürücü veya söndürücü etki oluşturması sonucuyla görülür (62,63).

Ru ve arkadaşları Mısır'da yaptıkları bir çalışmada *Nicotiana tabacum* L. yapraklarındaki flavonoidlerin ve polisakkaritlerinin DPPH serbest radikalleri süpürücü etkisinin yüksek konsantrasyonda askorbik aside paralel olduğunu ve ABTS⁺ radikallerine karşı süpürücü etkisinin de yine yüksek konsantrasyonda askorbik aside eşit olduğunu göstermişlerdir (64). Bu sonuçlar, ABTS⁺ 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotirazolin-6-sülfonik asit) ve DPPH (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil) radikallerine karşı antioksidan aktivitenin konsantrasyon, kimyasal yapı ve antioksidanların polimerizasyon derecesiyle ilgili olduğunu göstermiştir (64, 65).

Zelinska ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, flavon C-glikozitleri olan orientin, homoorientin, viteksin, izoviteksin ve kersetinin yapı aktivite ilişkisini incelemişler ve TEAC yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteyi araştırmışlardır. Sonuçta kersetin, homoorientin ve orientinin antioksidan aktivitesinin viteksin ve izoviteksinden yüksek olduğunu belirlemişler ve bu durumun bileşiklerin, B halkasındaki bağımsız serbest hidroksil grubunun ve A halkasındaki C-6 ve C-8 pozisyonlarındaki glukozun bu bileşiklerin antioksidan özellikleri üzerine etkili olduğu belirtmişlerdir (30).

An ve arkadaşlarının fareler üzerinde hücre yaşlanmasını inceledikleri bir çalışmada, 8 hafta boyunca 40, 20 ve 10 mg/kg dozlarda orientin, viteksin ve pozitif kontrol amacıyla E vitamini (α - tokoferol) verilen bir çalışmada, orientin ve viteksinin benzer kimyasal yapıya sahip olmalarından kaynaklı olarak *in vivo* olarak antioksidan aktivitelerinin 40 mg/kg dozda α - tokoferole eşit olduğunu ve viteksin ve orientinin farelerde hücre yaşlanması düzeylerinin iyileştirilmesinde ve genel

medikal düzeyin iyileştirilmesinde antioksidan etkisi bilinen α - tokoferol kadar fazla olduğunu belirtmişlerdir (66).

Campas ve arkadaşları Portekiz ve Yeni Zelanda’da yürüttükleri bir çalışmada, bal arıları tarafından toplanan bitki polenlerinin DPPH radikal süpürücü aktivitelerini ve fenolik profillerini HPLC ile incelemişler. *R. sardous* Crantz’ın yüksek flavonoit ve fenolik asit türevlerini içerdiğini ve yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir (56).

Flavonoitlerin Antimikrobiyal Özellikleri:

Terzioğlu ve arkadaşları Trabzon’dan toplanan *R. constantinopolitanus* ve *R. arvensis* ‘in uçucu yağlarını izole edip yapısını aydınlatmışlardır ve uçucu yağın *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* ve maya *C. albicans*’ a karşı orta düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini saptamışlardır (67).

Flavonoitlerin Sitotoksik Özellikleri

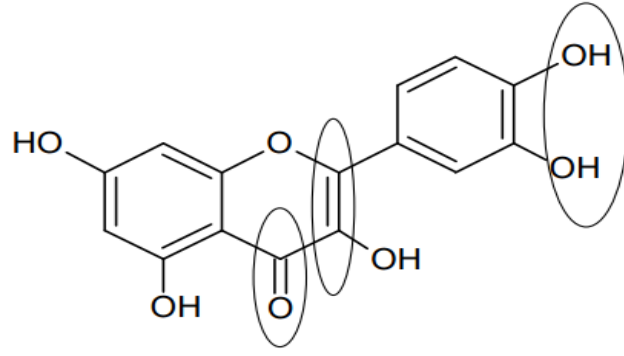
Ishige ve arkadaşlarının flavonoitlerin hücre ölümündeki potansiyel etkisinin mekanizmasını incelemek için fare hipokampus hücre serisi HT-22 üzerindeki oksidatif zararı için model olarak kullanmışlardır. Bu sistemde glutasyon reaktif oksijen türevi (ROT) olarak davranır ve Ca^{+2} akışını azaltarak nöronal hücre ölümüne sebep olur. Sonuç olarak, pek çok flavonoitin HT-22 hücrelerini ve temel nöronları glutamat toksisitesinin sebep olduğu zarara karşı koruyucu olduğu görülmüş. Bunu üç ayrı mekanizmayla, hücre içindeki glutasyonu azaltarak, doğrudan reaktif oksijen türlerinin seviyesini düşürerek ve yüksek ROT seviyesine rağmen Ca^{+2} akışını sağladığını göstermişlerdir. Bu veriler, oksidatif zarara karşı flavonoitler tarafından sağlanan koruyucu mekanizmanın her bir molekül için spesifik olduğunu göstermiştir (68).

Zhou ve arkadaşları tarafından yürüttükleri bir çalışmada, viteksinin hepatosellüler karsinom (HCC) üzerine etkisini incelediler. HCC tedavisi için cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dışında efektif bir tedavisi bulunmamakta, bu nedenle terapötik ajanların belirlenmesi için viteksin denenmiştir. Sonuç olarak, *Vitex negundo* tohumlarından elde edilen viteksin, düşük toksisiteye sahip antikanser aktivite göstermiştir (69).

Fafal tarafından yapılan bir çalışmada, Brine shrimp yöntemiyle üç farklı *Ranunculus* türünün sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. *R. pedatus* Waldst.&Kit. subsp. *pedatus* türünün *n*-hegzan, etil asetat, metanol ve su ekstraktları, *R. constantinopolitanus* DC.' un *n*-hegzan, etilasetat ve su ekstraktları ile *R. isthmicus* Boiss. subsp. *tenuifolius*' un *n*-hegzan, etanol ve su ekstraktları sitotoksik aktivite göstermiştir (84).

Flavonoidlerin Antienflamatuvar Aktiviteleri

In vivo ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalarda pek çok flavonoidin antienflamatuvar aktivitesi olduğu belirtilmiştir. Genel olarak flavonoidlerin antienflamatuvar aktivite gösterebilmesi için; C halkasında (Δ^2) doymamışlık olmalı, hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu (örneğin B halkasındaki kateşol grubu), C-4'teki kateşol grubu ve molekülün glikozillenmemiş olması antienflamatuvar aktivite göstermesinin sebebi olarak gösterilebilir. Fakat bu yapısal özellikleri bulundurmamasına rağmen örneğin flavonoid aglikonu kemferol da inflamasyon enzimlerinin etki aşamaları sırasında antienflamatuvar aktivite gösterir (31).



Şekil 4: Örnek olarak kersetinin antienflamatuvar aktivitesine ilişkin yapı (C halkasında bulunan doymamışlık, B halkasındaki hidroksil gruplarının yapı ve pozisyonu, C-4 grubundaki karbonil grubu ve non-glikozilasyonu)

Chen ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, *Morus nigra* meyvelerinin total flavonoid içeriğinin farelerde ksilenin indüklediği kulak ödemi ve karagenin indüklediği pençe ödemi yöntemleri kullanılarak steroidal olmayan bir antienflamatuvar olan aspirine ve steroidal bir antienflamatuvar olan deksametazon'a karşı izlenmiştir. Kontrol olarak 20 mg/kg tuzlu su çözeltisi, aspirin 75 mg/20ml/kg ve deksametazon 3 mg/20ml/kg şeklinde farklı dozlarda (50, 100 ve 200 mg/20ml/kg) total flavonoid içeriğinin antienflamatuvar etkileri 5 gün süresince karşılaştırılmış ve total flavonoid verilen grupta doza bağlı olarak antienlamavar etki gözlenmiştir (71).

Flavonoidlerin Antiviral Özellikleri

Kersetin ve luteolin gibi flavonoidlerin *Herpes simplex* (HIV-1) virüsünün replikasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada C-5', C-7', C-3' ve C-4' 'te bulunan serbest hidroksil grupları ve buna ek olarak C-3' ' te bulunan hidroksil gruplarının süstitüsüyonu sebebiyle viral etkinin azaldığı veya tamamen ortadan kalktığı gösterilmiştir (72).

Flavonoitlerin Antitrombotik Özellikleri

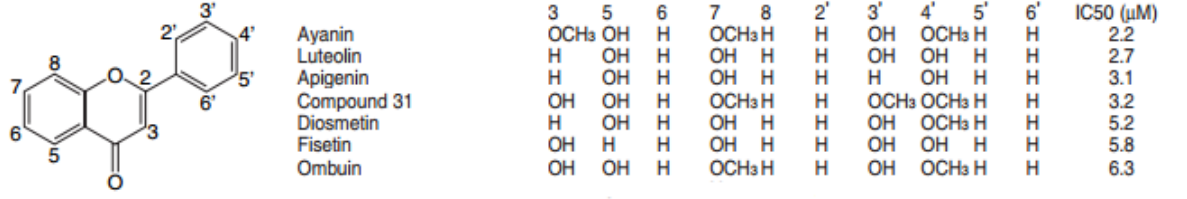
Yapılan bir çalışmada bazı flavonollerin (kersetin ve rutin) ve flavonların (siyanidol ve mesiadonol) antitrombotik aktivitesi *in vivo* olarak ve ayrıca bunların platelet endotelyumu ile etkileşimi *in vitro* olarak incelenmiştir. Sonuç olarak, flavonların antitrombotik etkide olmadığı fakat flavonollerin antitrombotik aktivite gösterdiğini, bunun nedeninin ise flavonollerin seçici olarak trombosit duvarına bağlanması ve serbest radikal süpürücü etkisi dolayısı ile de biyosentezi, endotel prostasiklinin ve endotelden türetilen faktörün etkilerini yeniden başlatması olduğu bildirilmiştir (73).

Flavonoitlerin Antiallerjik Özellikleri

Flavonoitler antiallerjik etki gösteren sebze, meyve ve çaylarda bulunmaktadır. Flavonoitler ayrıca histamin salınımı göstererek basofiller yoluyla IL-4, IL-30 ve CD40 ligand ekspresyonunu sağlarlar.

IL-4 üretimini sağlayan flavonoitlerin temel yapılarını incelemek ve diğer aktif bileşenleri belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada 45 tür flavon, flavonol ve bunların ilgili bileşikleri görüntülenmiştir. Saflaştırılan basofiller, flavonoitlerin çeşitli konsantrasyonlarında (1-30 μ M arası) ön inkübasyona tabi tutulmuş ve ardından anti-IgE (omalizumab) antikoru ve IL-3 ile 12 saat stimüle edilmiştir. IL-4'ün bulunduğu tortunun ölçümü yapıldığında ise ayanin, luteolin, apigenin ve bileşik 31 olarak adlandırılan bir bileşin IC₅₀ değerlerinin 2.2-3.2 μ M arasında değişen güçlü bir inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Bileşiklerin yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde ise, maksimum inhibitör etkinin 7' ve 4' konumunda bulunan hidroksillenmeden kaynaklandığı ve ayrıca 3' ve 5' pozisyonunda bulunan -OH'in varlığının gerekli olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak 3' konumunda bulunan glikozillenmenin aktiviteyi arttırdığı saptanmıştır

(74).



Şekil 5. Yüksek inhibisyon etki gösteren flavonoidlere ait IC₅₀ değerlerinin yapı-aktivite ilişkisi

Flavonoitlerin Aterosklerosis ve Koroner Kalp Hastalıklarından Koruma Özellikleri

Literatürde, yüksek yağlı bir diyetle beslenmesine rağmen düşük koroner ateroskleroz riski 'Fransız paradoksu' adı ile anılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu ilişkinin düzenli olarak tüketilen kırmızı şaraptan kaynaklandığı öne sürülmüştür. Kırmızı şarabın içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin varlığına bağlı olarak serumdaki düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu azalttığını ve bununla birlikte yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyesini azalttığı saptanmıştır (75).

Flavonoidler serbest radikalleri yakalayarak siklogenaz ve liposiklojenaz enzimlerini inhibe ederek lipid peroksidasyonunu önler. Böylece aterosklerotik plakların büyümesini engeller (76).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Ranunculus constantinopolitanus* DC. bitkisinin kalite kontrol özelliklerini belirlemek amacıyla, anatomik ve mikroskopik incelemeler ile kurutmada kayıp, bütün kül, sülfat külü miktar tayini çalışmaları yapılması amaçlanmıştır. Ayrıca çalışma konumuz olan bitkiden hazırladığımız etanol, etilasetat, n-hegzan, metanol ve su ekstraktları ile *Brine Shrimp* letalite ve

WST-1 yöntemleri ile sitotoksik, antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmaları ile fitokimyasal tarama çalışmaları yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

A. BİTKİ HAKKINDA BOTANİK BİLGİLER

A.1. *Ranunculus* Türlerinin Sistemik Yeri

Çalışmamıza konu olan *Ranunculus constaninopolitanus* DC. bitkisinin ve ait olduğu Ranunculaceae familyasının tanımına ait olarak verilen bilgiler “Flora of Turkey”den hiçbir katkıda bulunmaksızın, dilimize çevrilmek suretiyle derlenmiştir (1).

Ranunculus türleri, *Magnoliophyta* bölümünün, *Magnoliopsida* sınıfında yer almaktadır. Türlerin içinde bulunduğu takım *Ranunculales*, familyası Ranunculaceae’dir.

A.2. Ranunculaceae Familyasının Özellikleri

Bitkiler nadiren odunsu ve tırmanıcıdırlar. Yapraklar genellikle alternat ve ekstipulat, hepsi bazal, nadiren karşıt veya stipulattır. Çiçekler hermafrodit, hipogin, aktinomorfik veya zigomorfiktir. Periant uniseriat veya biseriat, parçalar genellikle serbest, halka şekilli çiçeklerin iç kısmı çoğunlukla tüsüzdür. Stamenler genellikle çok sayıda, spiral biçiminde sıralanmış, merkeze yakın, anterler dışa dönüktür. Ginakeum apokarp, nadiren sinkarp veya 1 karpellidir. Meyve akenin tepesinde tek veya kesecikli, nadiren 1 kesecikli veya bakkattır.

A.3. *Ranunculus* L. Cinsinin Özellikleri

Tek veya çok yıllık, sapı yapraklı, çoğunlukla acı otlardır. Karasal veya suculdurlar. Çiçekler bileşik salkımlı veya tek başına, sarı, kırmızı veya beyaz

renklidir. Yapraklar alternat, sıklıkla da radikaldir. Periant (çanak ve taç yapraklar) biserial, dış kısımlar sepaller, iç kısımlar petallerdir. Sepaller genellikle 3 veya 5, genellikle olgunlaştığında dökülen meyvelerin içindedir. Petaller genellikle 5 veya daha fazla sayıda, nektar taşıyan bir çukur tarafına doğru dayanır ve sıklıkla bir kabuk tarafından korunur. Stamenler genellikle çok sayıdadırlar. Karpeller azdan çoğa doğrudur. Akenler azdan çoğa doğru devamlı olarak pürüzsüz bir şekildedir (Gaga gibi).

A.4 *Ranunculus constantinopolitanus* DC.

Sinonim isimleri:

R. lanuginosus L. var. *constantinopolitanus* DC; *R. constantinopolitanus* var. *palaestinus* (Boiss.) Boiss.; *R. anemonefolius* DC. var. *balansae* Boiss.; *R. tauricus* Freyn in Bull Herb.Boiss. ; *R. fibrillosus* C. Koch. var. *parviflorus*; *R. fibrillosus* auct. non C. Koch.

Kalın, çok yıllık, 20-75cm. Stamenler genellikle yaprak sapı gibi yoğun tüylü, üste doğru dallanmış ve üç parçalı yaprak taşıyan, 2 veya daha çok çiçeklidir. Radikal yapraklar altta kordat, üç parçalı, boydan boya 3-10 cm genişliğinde, parçalar genişçe kama şekilli ve üst üste binerek daralan kama şeklinde ayrılmış, çok kısa, kenarları çentikli-dişli veya yarılmış-dentat loblu tüylüdür. Ana çiçek sapı düz yuvarlaktır. Sepaller yukarı doğru bükülmüştür. Petaller 5-10 cm. Çiçek tablası düzdür. Akenler yarı dairesel, güçlü sıkışmış, 3-4 mm, yaprak damarlı; gaga şeklindedir, 1- 15 mm.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR

A. MATERYAL

Araştırma materyalimiz olan *Ranunculus constantinopolitanus* DC. bitkisinin toprak üstü kısmı, 05.05.2005 tarihinde bitki çiçekli haldeyken İzmir ilinin Karşıyaka ilçesinin Yamanlar Dağı Karagöl mevkiinden toplanmıştır.

Bitkiye ait herbaryum örnekleri, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Herbaryumu'nda 1349 numarası ile kayıtlıdır .



Resim 1. *R.constantinopolitanus* DC. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü



Resim 2. *R. constantinopolitanus* DC. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü



Resim 3. *R. constantinopolitanus* DC. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü

70°lik etanol içinde saklanan bitkinin yapraklı kısmı anatomik ve mikroskopik incelemeler için kullanılmıştır.

Bitki materyali öncelikle gölgede ve oda sıcaklığında kurutularak drog örnekleri hazırlanmıştır.

Temizleme işlemi sırasında kabaca gözle görülebilen kum, taş gibi kirlilikler temizlendikten sonra, kurumuş, lekelenmiş ve bozulmuş kısımlarından ayıklanarak temizlendikten sonra küçük parçalara bölünerek gölgede ve oda sıcaklığında sık sık karıştırmak suretiyle kurutularak drog örnekleri hazırlanmıştır.

B. DENEYLER

Toz materyalin mikroskopik olarak incelenmesi için gerekli olan materyal, safsızlıklardan kurtarılan bitki örneğinden alınan bitkisel materyalin, tunç havanda mekanik olarak orta incelikte toz haline getirilmesi suretiyle hazırlanmıştır.

Anatomik çalışmalarda, yukarıda bahsedilen alkol materyalinden yararlanılmıştır. Alkol materyalinde bulunan yaprak örneğinden enine kesitler alınmıştır. Bu kesitler Sartur ve Kloralhidrat reaktifleri (77) içinde hazırlanan mikroskopik inceleme preparatları halinde, Carl Zeiss Jena marka araştırma mikroskopunda anatomik yapılar açısından incelenmiştir.

Bu incelemeler sırasında, bitkinin toprak üstü kısmına ait sabit karakteristik özelliklerinin fotoğrafları, Carl Zeiss Jena marka araştırma mikroskobu üzerine bağlanmış Carl Zeiss Jena marka mikroskop görüntüleyici yardımıyla fotoğrafları çekilmiştir.

4. KİMYASAL BÖLÜM

A. KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARI

1. TEORİK KISIM

Yaptığımız çalışmalarda, *Ranunculus constantinopolitanus*'un Avrupa Farmakopesi, Alman Farmakopesi, Amerikan Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi adaptasyonu ve Türk Farmakopesinde yer almadığı tespit edilmiştir (78-81). Bu sebeple, ileride yazılabilecek monograflar için bir ön çalışma olması amacıyla droğa kurutmada kayıp tayini, total kül miktar tayini, sülfat külü miktar tayini ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini kalite kontrol denemeleri uygulanmıştır.

2. PRATİK KISIM

2.1 MATERYAL VE METOT

R. constantinopolitanus DC. bitkisinin toprak üstü kısımları, gölgede ve oda sıcaklığında, sık sık karıştırılmak suretiyle kurutulduktan sonra, Retsch GmbH SK 1 marka değirmende toz edilmiştir (elek çapı= 1 mm).

2.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Cam tartım kabı sabit vezne getirildikten sonra içine 1 g civarında toz drog kondu ve tam tartım alındı. 105 °C'ye ayarlanmış etüvde 1 saat ısıtıldı ve soğuması için desikatöre alındı. Soğutulmasının ardından tartıldı. Aynı şekilde bu işleme, son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan az oluncaya kadar devam edildi. Sonuçlar değerlendirilerek içerdiği yüzde kurutmada kayıp miktarı hesaplandı.

2.1.2. Total Kül Miktar Tayini

Sabit vezne getirilen bir porselen kroze içinde, 1 g civarında toz drog tam olarak tartılır. Elektrikli ısıtıcı üzerinde droğun tamamen yanması sağlandı. Kömürleşme gerçekleşince, 600 °C sıcaklıktaki Heraeus marka yakma fırınında 1 saat yakılır. Sonra desikatöre alınıp 1 saat oda sıcaklığında soğutularak tartıldı. Aynı işleme, son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan az oluncaya kadar devam edilir. Sonuçlar değerlendirilerek, droğun içerdiği yüzde total kül miktarı hesaplandı.

2.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

Sabit vezne getirilen bir porselen kroze içinde, 1 g civarında toz drog tartılıp ve üzerine 2 ml % 10'luk sülfürik asit çözeltisinden damla damla ilave edildi. Kroze, su banyosu üzerinde tutularak, droğun sülfürik asitle tamamen temas etmesi sağlandı. Ardından açık alevde beyaz bir kül bırakıncaya kadar yakıldı. Sonra 600 °C sıcaklıktaki Heraeus marka yakma fırınında 1 saat yakıldı. 1 saat oda sıcaklığında desikatörde bekletilerek soğutulduktan sonra, üzerine birkaç damla % 10'luk sülfürik asit çözeltisinden ilave edilerek, yine 1 saat yakma fırınında tutuldu. Desikatörde 1 saat soğutulduktan sonra, krozeyle birkaç damla % 15.8'lik amonyum karbonat çözeltisi ilave edildi. Bu işlemden sonra, son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan az oluncaya kadar, kroze 1'er saat yakma fırınında tutuldu. 1'er saat de desikatörde soğutulduktan sonra tartıldı. Alınan sonuçların değerlendirilmesiyle, droğun içerdiği yüzde sülfat külü miktarı hesaplandı.

2.1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden sabit ağırlığa getirilmiş olan porselen kroze içerisine drog 1 g civarında tartıldı. Sonra sıcaklığı 600 °C olan Heraeus marka yakma fırınına konulur ve drog yaklaşık bir saat süreyle yakıldı. Bu süre sonunda kroze desikatöre alınıp soğutuldu ve tartıldı. Yakma, soğutma ve tartma işlemlerine, külü içeren krozenin ağırlığı sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. Krozelere belirli miktarlarda distile su ve hidroklorik asit konuldu. Saat camı ile kapatılarak kaynatıldı. Soğuduktan sonra kül bırakmayan süzgeç kağıdından süzülerek nötr olana kadar sıcak distile su ile yıkandı, kurutuldu, külleşinceye kadar 600 °C'lik yakma fırınında yakıldı ve desikatöre alınıp soğutuldu. Sabit vezne gelinceye kadar işleme devam edildi.

B. FİTOKİMYASAL ANALİZLER

B.1. TEORİK KISIM

Yapılan fitokimyasal analiz denemeleri için hazırlanan n-hegzan, etilasetat, etanol, metanol ve su ekstreleri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

B.2. PRATİK KISIM

B.2.1. MATERYAL VE METOD

R. constantinopolitanus DC. bitkisinin topraküstü kısımları toplanarak gölgede ve oda sıcaklığında, ara sıra karıştırılmak suretiyle kurutuldu. Toz edilen drogtan n-hegzan, etilasetat, etanol, metanol ve su ekstreleri hazırlandı.

B.2.1.1. Metanol Ekstresinin Hazırlanışı

Toz edilmiş drogdan 20 g tartılarak üzerine 200 ml metanol ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda 5 saat katı-sıvı ekstraksiyona bırakıldı. Süre sonunda drogla muamele olan çözücü süzüldü. Kalan bakiye üzerine tekrar 200 ml metanol ilave edilip manyetik karıştırıcıda ekstraksiyon işlemine 8 saat daha devam edildi. Çözücünün süzülmesinden sonra, kalan bakiye üzerine 200 ml metanol ilave edilip, son kez 8 saat daha manyetik karıştırıcıda bırakıldı. Tekrar süzme işleminden sonra metanollü ekstreler birleştirildi. Organik solvan alçak basınç altında kuruluğa kadar uçuruldu. Böylece droğun metanol ekstresi hazırlandı.

B.2.1.2. Etil asetat Ekstresinin Hazırlanışı

Droğun metanol ekstresinin hazırlandığı şekilde hazırlanmıştır.

B.2.1.3 n-hegzan Ekstresinin Hazırlanışı

Droğun metanol ekstresinin hazırlandığı şekilde hazırlanmıştır.

B.2.1.4 Su ekstresinin Hazırlanışı

20 g toz drog üzerine 200 ml kaynar distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda 5 saat katı-sıvı ekstraksiyona bırakıldı. Süre sonunda drogla muamele olan çözücü süzüldü. Kalan bakiye üzerine tekrar 200 ml su ilave edilip manyetik

karıştırıcıda ekstraksiyon işlemine 8 saat daha devam edildi. Tekrar süzme işleminden sonra sulu ekstreler birleştirildi. Organik solvan alçak basınç altında kuruluğa kadar uçuruldu. Böylece droğun distile su ekstresi hazırlandı.

B.2.1.5. Etanol ekstresinin Hazırlanışı

Droğun metanol ekstresinin hazırlandığı şekilde hazırlanmıştır.

B.2.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

B.2.2.1. Steroidlerin teşhisi

Ham ekstre üzerine 2 ml kloroform eklenip üzerine derişik H_2SO_4 tüpün kenarından sızdırılır. Alttaki kloroformlu tabakada oluşan kırmızı renk steroidlerin varlığını gösterir. Başka bir testte ise, ham ekstre üzerine 2 ml kloroform ile karıştırılıp üzerine 2 ml derişik H_2SO_4 ve 2 ml asetik asit bu karışımın üzerine ilave edildiğinde oluşan yeşilimsi renk steroidlerin varlığını gösterir (82).

B.2.2.2. Tanenlerin Teşhisi

20 mg ekstre, 10 ml suda çözündürülür, üzerine 1-2 damla % 5'lik $FeCl_3$ çözeltisi ilave edilir. Oluşan mavi renkli çökelti tanen varlığını gösterir (83).

B.2.2.3. Flavonoitlerin Teşhisi (Siyanidin Reaksiyonu)

30 mg ekstre üzerine, 3 ml etanol ve 0.2 mg magnezyum tozu ilave edildikten sonra derişik HCl damla damla ilave edilir. Flavon glikozitleri varlığında numunede turuncu-mor arasında değişen bir renklenme gözlenir (82).

B.2.2.4. Alkaloit Teşhisi

20 mg ekstre, 5 ml 1 N sülfürik asit ile 1 dk çalkalanır. Süzöldükten sonra iki ayrı tübe 1'er ml alınır. *Mayer ve **Dragendorf reaktifleri ile muamele edilir.

Mayer reaktifi ile beyaz renkte ve Dragendorf reaktifi ile turuncu renkte çökelti oluşması alkaloit varlığını gösterir (83).

B.2.2.5. Saponozitlerin Teşhisi

Köpürme testi: Ekstre 20 ml distile su ile dilüe edilip dereceli bir silindirin içinde 15 dakika çalkalanır. 1 cm köpük oluşumu saponinlerin varlığını gösterir (82).

B.2.2.6. Kumarinlerin teşhisi

5 ml etanol çözeltisi buharlaştırılarak kalan tortunun üzerine 1-2 ml sıcak distile su ilave edilip çözelti ikiye ayrılır. Hacmin yarısı şahit çözelti olarak ayrılır. Diğer yarısına ise 0,5 ml %10 NH₄OH çözeltisi ilave edilir. Her iki kısım da filtre kağıdına damlatılarak UV ışığı altında incelenir. Yoğun floresans renk kumarin varlığını gösterir (83).

B.2.2.7. Şeker ve indirgen şekerlerin tayini

Ekstre 5 ml distile suda çözülür ve süzülür. Elde edilen süzüntü Molish, Benedict ve Fehling testleri için kullanılır.

a) Molish testi: Süzüntü bir test tüpüne alınıp üzerine 2 damla α -naftol çözeltisi damlatılır. Oluşan menekşe renkli halka karbonhidratların varlığını gösterir.

b) Benedict testi: Süzüntü ***Benedict reaktifi ile muamele edilir ve yavaşça ısıtılır. Oluşan turuncu-kırmızı çökelti indirgen şeker varlığına işaret eder.

c) Fehling testi: Süzüntü dilüe HCl ile hidrolize edilip alkali ile nötralize edilir ve ****Fehling A ve B çözeltileri ile ısıtılır. Oluşan kırmızı çökelti indirgen şekerin varlığını gösterir (82).

B.2.2.8. Nişastanın teşhisi

1 mg ekstre, 1 ml su ile bir dakika boyunca kaynatılır. Soğumasının ardından süzülür. Süzüntünün üzerine 1 damla % 1'lik iyot çözeltisi ilavesi ile meydana gelen koyu mavi renk nişasta varlığını gösterir (83).

B.2.2.9. Triterpenoidlerin teşhisi

Kuru ekstre 2 ml kloroform ile çözülüp kuruluğa kadar buharlaştırılır. Bunun üzerine 2 ml derişik H₂SO₄ eklenip 2 dakika boyunca ısıtılır. Oluşacak grimsi renk terpenoidlerin varlığını gösterir (82).

B.2.2.10. Antrakinonların teşhisi (Bornträger reaksiyonu)

50 mg toz drog 25 ml 2N HCl ile 15 dakika ısıtılıp soğutulduktan sonra ayırma hunisine alınıp 20 ml eter ile çalkalanır. Antrakinonların hidrolizi sonucunda eter tabakasında bulunan alkali hidroksitler 10 ml %10 (A/H) amonyak çözeltisi ilave edilip çalkalanır. Sulu tabaka pembe-kırmızı renk verir (83).

5. BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNLERİ

A. SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ

1. TEORİK KISIM

Ranunculus constantinopolitanus DC. 'un toprak üstü kısımlarından hazırladığımız etanol, metanol, etil asetat, n-hegzan ve su ekstreleri ile Brine Shrimp (*Artemia salina*) metodu uygulanarak droğun sitotoksitesini araştırılmıştır.

Yaptığımız literatür çalışmasında yapılan bir çalışmada, çeşitli *Ranunculus* türlerinin Brine shrimp yöntemiyle sitotoksitesini araştırılmış ve *R. pedatus* Waldst. & Kit. subsp. *pedatus* 'un n-hegzan, etil asetat, metanol ve su ekstrelerinin sitotoksik etki gösterdiğini, bunun da ekstrelerin içerdiği viteksin, izoviteksin, ursolik asit ve berberinden kaynaklandığını bildirilmiştir (69).

* **Mayer Reaktifi:** 1.35 g HgCl₂, 5 g KI, 100 ml H₂O (69).

** **Dragendorf Reaktifi:** 5 g Bi₂(CO₃)₃, 10 ml derişik HCl, 25 g KI, H₂O q.s.p. 100 ml (69).

*****Benedict reaktifi:** 173g Na₃C₆H₅O₇.2H₂O , 100 G Na₂CO₃, 17,3 g Cu SO₄.5H₂O

******Fehling A :** 150 g CuSO₄.5H₂O, 5 ml H₂SO₄

Fehling B: 150 g KNaC₄H₄O₆, 300 ml %33 NaOH (83).

2. PRATİK KISIM

2.1. MATERYAL VE METOD

Ranunculus constantinopolitanus DC. bitkisinin topraküstü kısımları toplanarak, gölgede, oda sıcaklığında, ara sıra karıştırılmak suretiyle kurutuldu ve toz edildi. Droktan etanol, etilasetat, n-hegzan, metanol ve su ekstreleri hazırlandı. Bu ekstrelere *Artemia salina* (Brine-shrimp) sitotoksik aktivite metodu uygulandı.

2.1.1. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach.) Larvalarının Hazırlanışı

3.8 g deniz tuzu 100 ml distile suda çözülüp tanka kondu. İçine Brine shrimp (*Artemia salina* Leach.) yumurtaları eklendi. Devamlı ışık altında bırakılan yumurtalar 48 saat içinde çıktı (69,85).

2.1.2. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach.) Metodu

1. 3.8 g deniz tuzu (Sigma-9883), 100 ml distile suda çözüldü.
2. Tuzlu su tanka konur ve üzerine Brine Shrimp yumurtaları eklendi.
3. Devamlı ışık altında bırakılan yumurtalardan, 2 gün içinde larvalar çıktı.
4. Maddelerden; 1000, 100, 10 ppm olmak üzere 3 ayrı konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı.

1000 ppm'lik çözelti hazırlamak için, 20 mg madde 2 ml çözücüsünde çözüldürüldü. 3 ayrı flakona 0.5'er ml konur. 100 ppm konsantrasyonda çözelti hazırlamak için, geriye kalan 0.5 ml'den alınan 0.2 ml çözelti çözücüsü ile 2 ml'ye tamamlandı ve bundan alınan 0.5 ml'lik miktarlar 3 ayrı flakona kondu. 10 ppm'lik çözelti hazırlamak için de geriye kalan çözültiden 0.2 ml alınarak, çözücüsü ile 2 ml'ye tamamlandı ve 3 ayrı flakon 0.5'er ml kondu. Kontrol amacıyla 1 flakona da sadece 0.5 ml çözücü kondu. Çözücüler uçuruldu.

1. 48 saat sonra Brine Shrimp larvaları yumurtadan çıkıp, hazır hale gelince her flakona 5 ml % 3.8'lik deniz tuzu çözeltisi eklendi ve 10 larva sayılarak kondu.

2. 24 saat sonunda, yaşayan Brine Shrimp larvaları sayılır ve kaydedildi.

3. Veriler bilgisayar yardımıyla değerlendirilerek LC₅₀ değerleri hesaplandı.

Artemia salina metodunu uygulamak için; droğumuzun etanol, etilasetat, n-hegzan ekstreleri ve suyu uçurulan infüzyonundan 20'şer mg tartılıp, 2 ml kendi çözücülerinde çözüldürüldü. Maddelerden; 1000, 100, 10 ppm'lik konsantrasyonlarda çözülteler hazırlandı. Her konsantrasyon için, 3 ayrı flakona 0.5'er ml çözelti konuldu. Kontrol amacıyla her çözücüden birer flakona 0.5'er ml konuldu. Çözücüler uçuruldu. Larvalar hazır olunca yine her bir flakona 5'er ml deniz tuzu çözeltisi ilave edilip, 10'ar tane larva sayılıp, eklendi. 24 saat sonunda yaşayan Brine Shrimp larvaları sayılarak, veriler bilgisayarda değerlendirildi, LC₅₀ değerleri hesaplandı (106,107). (Tablo 6).

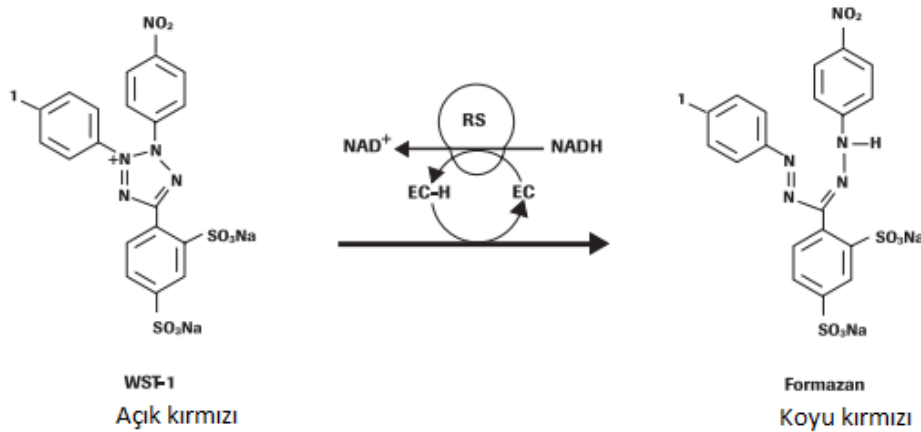
B. WST-1 HÜCRE PROLİFERASYONU YÖNTEMİ İLE SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ

1. TEORİK KISIM

De-Li ve arkadaşlarının *R. ternati* 'den elde edilen polisakkarit ekstralarının göğüs kanser hücreleri üzerindeki aktivitesini incelemek amacıyla yürüttükleri bir çalışmada MTT yöntemi ile MCF-7 göğüs kanseri hücre serileri kullanmışlardır. *R. ternati* polisakkaritlerini içeren ekstraların kör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre apoptozuna sebep olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, droğun göğüs kanser hücrelerine karşı oldukça azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (88).

2. PRATİK KISIM

WST-1 yöntemi, üretici olan Roche yönergelerine göre çalışılmıştır. (Cell proliferation reagent WST-1 (VERSION August 2006. Cat no. 11 644 807 001) WST-1 yöntemi kalorimetrik bir yöntemdir ve bu yöntem WST-1 tetrazolium tuzunun, hücrenin mitokondrial dehidrogenazları tarafından (solunum zincirinin bir parçası olan) bölünmesi temeline dayanan bir yöntemdir.



Şekil 6. Tetrazolium WST-1 tuzunun {4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate} formazona dönüşümü. (EC: elektron çiftleme reaktifi RS: mitokondrial süksinat-tetrazolium indirgeyici sistem)

WST-1 reaktifi ışığa duyarlı, hücre metabolizması ile de sıcaklığa duyarlıdır. Işığı azaltıp sıcaklığı 37°C civarında tutmak gerekir. Sarı-turuncu renkli olan WST-1 reaktifi, formazonda çözünebilir kararlı, 450 nm'de Elisa (mikrotest) kullanarak ölçülmüştür. Droğumuzdan hazırlanan metanol, etanol, etil asetat, n-hegzan ve su ekstraktları için WST-1 yöntemi kullanılarak hücre proliferasyonu aktivitesi incelenir (87).

Hücre yaşayabilirliğini belirlemede kullanılan boyama testleri, yaşayan hücrelerin bozulmamış hücre membranlarının dışından bazı boyalarla örneğin tripan mavisi, eosin veya propidium gibi boyalar ile boyanması prensibine dayanan bir yöntemdir. Ölü hücreler bu boyamayı yapmaz. Bu testte hücre süspansiyonu ile basitçe karıştırılıp görsel olarak hücrenin yaşayıp yaşamadığının belirlenmesinde kullanılır. Yaşayan hücreler açık renkli bir sitoplazmaya sahip olacak, yaşamayan hücreler ise mavi renkli sitoplazmaya sahip olacaktır. %0,4 steril filtreli tripan mavisinin 50 µl 1:10 (v/v) karışımı HBSS (Hanks Buffered salt solution)'de oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir. Kültürlerdeki mavi (ölü) hücreler 40 kat büyütme ile gözlenir (88).

2.1 Materyal ve Metod

Çalışmada, PC3 (androjene bağımlı olmayan prostat kanseri hücreleri), HeLa (insan servikal karsinoma), Vero (yeşil maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek epiteliel hücreleri) ve MRC5 (insan embriyonik akciğer fibroblastı) hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler ATCC (Tunisian Cancer Control Assosiation)'den temin edilmiştir. Hücreler L-glutamin (2 mmol/L) ve % 10 fetal sıgır serum (FBS) ilave edilen DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) veya EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyerinde 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübatörde çoğaltılmıştır. Kullanılan hücre kültürü çözeltileri metaryeller LONZA (Lonza BioPharma Ltd.,

Switzerland) firmasından, plastik malzemeler ise Corning firmasından alınmıştır. WST-1 Cell proliferasyon reaktifi Roche Diagnostics'ten satın alınmıştır. Biyolojik çalışmalarda, santrifüj cihazı (Kuboto), vorteks cihazı (Boeco), laminar hava akımlı kabin (ESCO), CO₂ inkübatörü (Thermo), inverted mikroskop (Leica), sayım lamı (Hausser) ve mikropilaka okuyucu (molekular devices) kullanılmıştır.

Sitotoksosite testi için, tripan mavisi ile Neubaer lamında sayılarak her bir kutucuğa ortalama 5×10^3 hücre olacak şekilde ayarlandı. 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına, her kuyucuk içerisinde 190 µl hücre süspansiyonu konuldu. Hücrelerin kuyucukların tabanına yapışabilmesi için 24 saat beklenildikten sonra reaktif maddeler final konsantrasyonu 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml olacak ve DMSO (dimetil sülfoksit) yüzdesi % 0.2 olacak şekilde eklendi. Negatif kontrol olarak reaktif madde içermeyen DMSO kullanıldı. 72 saat sonra her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 içeren 100 µl taze besiyeri eklenerek iki saat inkübe edildi. Daha sonra plakaların absorbansları 440 nm dalga boyunda ve 650 nm referans aralığında Elisa okuyucu (spektrofotometre) kullanılarak ölçüldü. WST-1 suda çözünen bir tetrazolyum tuzu olup çalışma prensibi, bu tetrazolyum tuzunun canlı hücre mitokondrielerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalanarak formazan tuzun dönüşmesine ve formazan tuzundan kaynaklanan turuncu renk reaksiyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Boyanın yoğunluğu, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır.

Plakadaki hücrelerin % canlılığı aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\% \text{ Viabilite} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Kontrol absorbansı}) \times 100$$

C. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TAYİNİ

1. TEORİK KISIM

Pek çok *Ranunculus* türünde olduğu gibi, *R.constantinopolitanus*' ta lakton yapısındaki protoanemonin içerir ve taze haldeyken toksik etki gösterir (23,24). Halk arasında hemoroid tedavisinde (40), iltihap giderici, ağrı kesici (22) ve romatizma tedavisinde (14-16) kullanılır.

Terzioğlu ve arkadaşları *R.constantinopolitanus* ve *R. arvensis*'in uçucu yağının antibakteriyel aktivitesini incelemişler ve *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus* ve *C. albicans* 'a karşı antimikrobiyal etkisi olduğunu göstermişlerdir (67).

Kaya ve arkadaşları *R. marginatus* var. *trachycarpus* ve *R. sprunerianus*'un antibakteriyel aktivitelerini incelemiş hegzan, etil asetat, metanol ve su ekstralarının disk difüzyon yöntemiyle test edilen bütün bakterilere (*Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 29998) karşı aktivite gösterdiği belirlenmişlerdir (90).

2. PRATİK KISIM

R.constantinopolitanus bitkisinin toprak üstü kısımları tarihinde İzmir ili Karşıyaka ilçesi, Karagöl mevkiinden toplandı. Temizlenip uygun büyüklükte parçalanarak, sık sık karıştırılmak suretiyle, gölgede, oda sıcaklığında kurutulup ardından drog toz edildi.

Bu drog tozlarından hazırlanan etanol, etil asetat, n-hegzan, metanol ve su ekstraları 4 mg/ml olacak şekilde kendi çözücüsünde çözüldü, sonra Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (89,91) önerileri doğrultusunda Disk Difüzyon ve Mikrodilüsyon Metodu uygulanarak antimikrobiyal aktiviteleri araştırıldı.

2.1. MATERYAL VE METOD

2.1.1. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

2.1.1.1. Test Mikroorganizmaları:

Çalışmada test mikroorganizmaları olarak Gram-pozitif bakterilerden; *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-p, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Gram-negatif bakterilerden; *Escherichia coli* ATCC 29998, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ve ayrıca bir adet maya; *Candida albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır. Mikroorganizmalar -80 °C' de %10 gliserinli Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Oxoid) besiyeri içerisinde saklandı. Kullanılmadan önce bakteriler ve mayalar sırasıyla, Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck) içerisinde 35°C' de 24 saat ve Saboraud Dextrose Broth (SDB) (Merck) içerisinde 35 °C' de 48 saat inkübe edilerek aktifleştirildi.

2.1.1.1.1. Disk Difüzyon Metodu

Bakteri suşları ve maya suşu aktifleştirildikten sonra serum fizyolojik solüsyonu içerisinde 0,5 McFarland (bakteri: 1×10^7 - 1×10^8 koloni oluşturan birim (kob/ml); maya: 1×10^5 - 1×10^6 (kob/ml)) standart yoğunluğuna ayarlanmış ve buradan 0,1'er ml alınarak firma önerileri doğrultusunda hazırlanıp otoklavda steril edildikten sonra petrilere katılaştırılmış Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck) veya Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Merck) besiyerinin yüzeyine steril eküvyon yardımı ile inokule edildi. Daha sonra 20 µl ekstre solüsyonuyla doyurulmuş 6 mm çapındaki steril filtre kağıt diskler (Oxoid) (80 µg ekstre/disk) inokule edilmiş MHA ve SDA petrilere yüzeyine yerleştirildi. Bakteriler için (89) 35 °C'de 18-24 saat, maya için (91) 35 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra, inhibisyon zon çapları mm olarak ölçüldü. Ayrıca, çalışmada kullanılan çözücülerin antimikrobiyal aktiviteye

katkısının olup olmadığı ekstre ilave edilmeden aynı miktar çözücü kullanılarak test edildi. Tüm denemeler 3 tekrarlı olarak uygulandı.

Testin doğruluğu ve ekstrelerin etkinliği Ampisilin (10µg- Oxoid), Siprofloksasin (5µg- Becton Dickinson) ve Flukonazol (25µg- Oxoid) diskleri kullanılarak değerlendirildi.

2.1.1.1.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyon (MBK/MFK)'un Belirlenmesi

Ekstrelerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)'ları mikrodilüsyon metodu ile belirlendi. Bakteri suşları ve maya suşu aktifleştirildikten sonra serum fizyolojik solüsyonu içerisinde 0,5 McFarland (bakteri: 1×10^7 - 1×10^8 koloni oluşturan birim (kob/ml); maya: 1×10^5 - 1×10^6 (kob/ml)) standart yoğunluğuna ayarlanmış ve buradan 0,1'er ml alınarak Mueller Hinton Broth (MHB) ve Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyerinde 100 kat dilüe edilmiştir. Steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikropalaklar içerisinde 50 µl MHB dağıtıldıktan sonra, stok ekstre çözeltisinden (4096 µg/ml) 50 µl alınarak ilk kuyucuklara ilave edildi. Daha sonra ilk kuyucuklarda 100 µl olan besiyeri-ekstre karışımından 50 µl'si alınıp yan kuyucuklara aktararak ekstrelerin 16-2048 µg/ml aralığında 50 µl hacimde çift katlı dilüsyonları hazırlandı. Son olarak mikroorganizma süspansiyonları eşit hacimde tüm kuyucuklara eklendikten sonra bakteriler 35 °C'de 18-24 saat, maya ise 35 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Mikropalak üzerinde üreme kontrolü, besiyeri kontrolü ve çözücü kontrollerine de yer verildi. Süre sonunda gözle görülebilir üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak ifade edildi. Ayrıca bulanıklık görülmeyen tüplerden 10 µl alınarak uygun besiyerine ekimler yapılarak büyüme olup olmadığı da kontrol edilmiştir. Negatif çıkan ya da sadece 1 koloni geliştiği görülen kuyucuklardaki ekstre

konsantrasyonu ise MBK/MFK olarak değerlendirilmiştir. Denemeler üç tekrarlı olarak yürütölmüştür. Standart antimikrobiyaller olan Ampisilin (Sigma-Aldrich), Siprofloksasin (Koçak Farma) ve Flukonazol (Sigma-Aldrich) kullanılarak testin doğruluğu ve ekstrelerin etkinliği değerlendirildi.

D. ANTIÖKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

1. TEORİK KISIM

Droğumuzdan hazırlanan ekstrelerimiz için, total antioksidan kapasite ölçümleri DPPH (2-2'-difenil-1-pikril hidrazil) radikali yakalama yöntemi ile gerçekleştirildi. Ayrıca bu ekstredeki toplam fenolik madde ve toplam flavonoit madde analizleri de yapıldı.

2. PRATİK KISIM

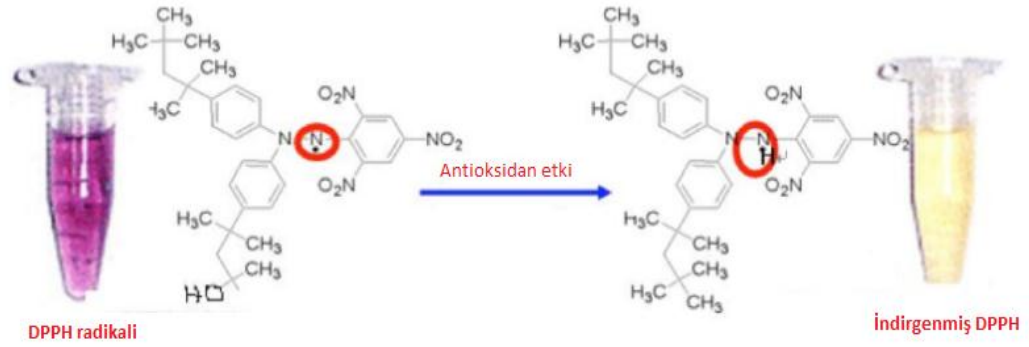
2.1. MATERYAL VE METOD

R. constantinopolitanus DC. bitkisinin toprak üstü kısımları toplanarak, gölgede, oda sıcaklığında, ara sıra karıştırılmak suretiyle kurutuldu ve toz edildi. Droğun n-hegzan, etil asetat, etanol, metanol ve su ekstreleri hazırlanarak antioksidan aktivitesi incelendi.

2.1.1. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi

Hazırlanan n-hegzan, etil asetat, metanol, etanol ve su ekstrelerinin total antioksidan kapasite ölçümleri M. A. Esmaili ve arkadaşlarının uyguladığı metoda göre yapıldı (92). Bu yöntemeye göre, belli bir konsantrasyon aralığındaki (250 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml, 750 mg/ml, 1000 mg/ml konsantrasyonlarında) uygun oranda seyreltilmiş örnek ekstraktların, belli bir konsantrasyon aralığındaki (10 µg/1

ml, 15 µg/1 ml, 20 µg/1 ml, 25 µg/1 ml, 40 µg/1 ml, 50 µg/1 ml, 60 µg/1 ml, 75 µg/1 ml, 100µg/1 ml) uygun oranda seyreltilmiş α-tokoferol üzerine, 4 ml 0.004 mM'lık DPPH çözeltisi eklendikten sonra, 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta yarım saat bekletildi.



Şekil 7. DPPH'nin kimyasal reaksiyonunun şematik gösterimi

<http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html> (93)

Bu süre sonunda absorbanans değerleri, UV-Vis Unicam Spektrofotometresinde 517 nm'de metanole karşı ölçüldü. DPPH ($y=0,966x+3,285$, $R^2=0,994$) kalibrasyon eğrisi çizildi. Örneklerinin EC_{50} değerleri DPPH kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplanıp örneklerin antioksidan aktiviteleri, α-tokoferole eşdeğer olarak hesaplandı. Yapılan tüm deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı.

I = İnhibisyon

$A_{boş}$ = Kontrol bileşenin absorbanansı

$A_{örnek}$ = Test bileşenin absorbanansı

I (%) = $[(A_{boş} - A_{örnek}) / A_{boş}] \times 100$ formülü kullanılarak % DPPH inhibisyon

değeri hesaplanarak α-tokoferol değerleri ile karşılaştırıldı.

2.1.2 Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik madde analizi yaygın bir metot olan Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapıldı. Deneyde Singleton ve Rossi (1965) 'nin uyguladığı Folin-Ciocalteu metoduna göre fenolik madde tayini yapıldı. Bu yöntemle göre uygun oranlarda seyreltilmiş 100 µl (0.1 ml) ekstrakt çözeltisine 2.8 ml deiyonize su ilave edilip 2 ml % 2'lik Na₂(CO)₃ eklendi ve son olarak 0.1 ml % 50'lik Folin Ciocalteu reaktifi eklenerek karıştırıldı. 25°C'de karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra 750 nm'de suya karşı absorbansı ölçüldü. Toplam fenol içeriği, gallik asit kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gallik asit eşdeğeri olarak verildi. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalaması alındı (94).

2.1.3 Toplam Flavonoid Analizi:

Toplam flavonoit konsantrasyonu ise kolorimetrik olarak UV spektrofotometre ile hesaplandı. Bu yöntemle göre uygun oranlarda seyreltilmiş 500 µl (0.5 ml) ekstrakt çözeltisine, 1.5 ml % 95 'lik etanol ilave edildi, sonra 100 µl (0.1 ml) AlCl₃ eklendi ve son olarak da 2.8 ml deiyonize su koyularak 40 dk inkübasyona bırakıldı. Karışımın absorbansı 415 nm'de etanole karşı ölçüldü, standart flavonoit olarak kersetin kullanıldı. Deneyler 3 kez tekrar edilerek gerçekleştirildi ve sonuçların ortalamaları alındı (95,96).

BÖLÜM II

BULGULAR

A. BOTANİK BÖLÜM

A.1. MAKROSKOBİK BULGULAR

R. constantinopolitanus DC. 30-70 cm uzunluğundadır. Yapraklar parçalı, orta yeşil renkli, en fazla 10 cm uzunluğundadır. Çiçekler, salkıma benzer birleşik salkım (panikül) şeklinde, parlak sarı, yuvarlak şekilli 7 cm'e kadar olabilen bir

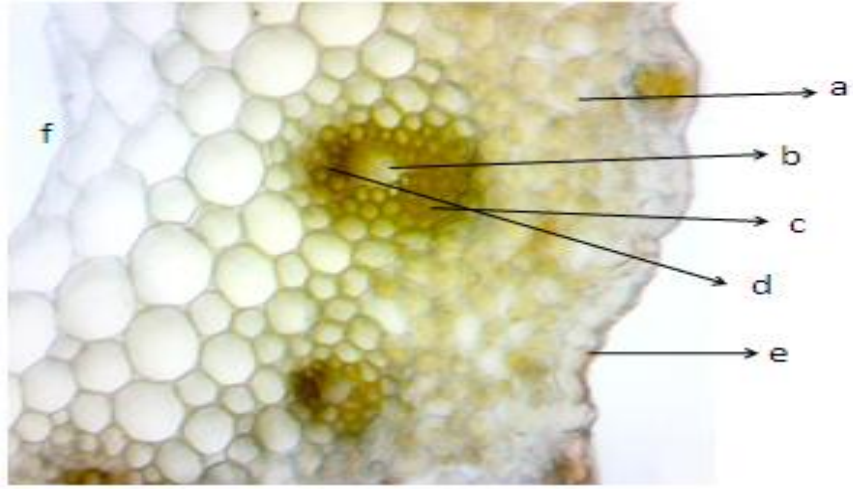
yapıdadır. Sepaller açık sarı renklidir. Çiçeklenme zamanı Nisan'la Haziran ayları arasındadır (97).

Ranunculus türleri hemikriptofit tip, çiçek tomurcuğu taşıyan sürgünleri tek bir vejetasyon süresi için canlı olup, uygun olmayan mevsimde kuruyarak ölen bitkilerdir (98). Tamamiyle otsu bir bitki olan *Ranunculus* 'larda iletim demetlerinin gövdede biraz dağınık dizilişi ve vasküler kambiyumu bulunmayışı bakımından monokotiledonlara benzer (99).

A.2. MİKROSKOBİK BULGULAR

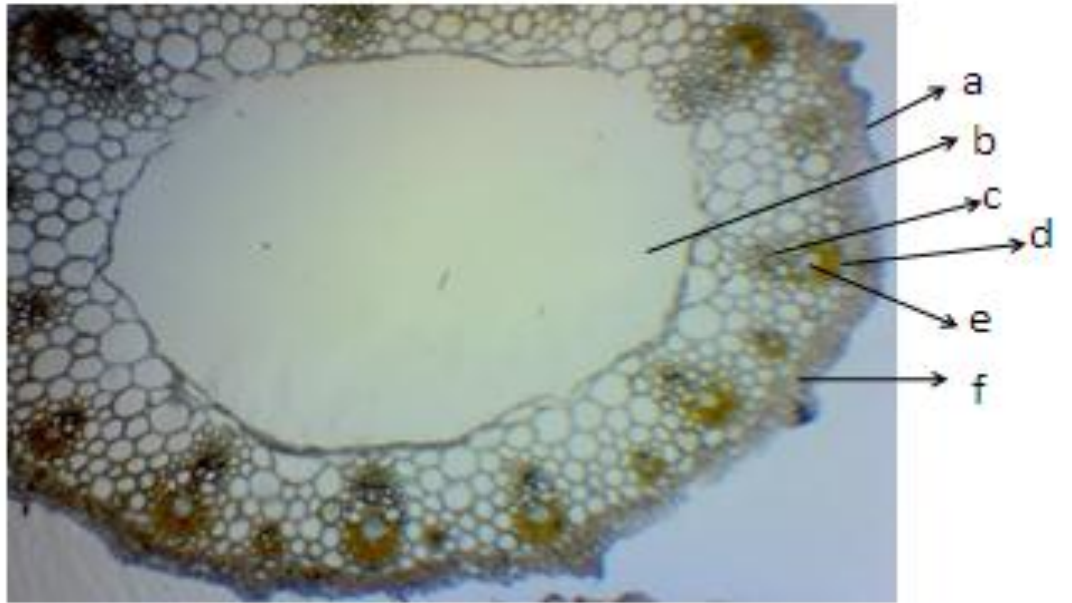
B.1 Gövdeye Ait İncelemeler ve Bulgular

Gövde enine kesiti genel olarak incelendiğinde, epidermis hücreleri bir kütikula tabakası ile örtülüdür. Hipodermis tabakası, kütikulanın altında bulunan epidermis hücrelerinin altında tek sıralı ve çeperleri kalınlaşmış halde bulunur. Hipodermis tabakasının altında bir sıra halinde bulunan ince çeperli ve kloroplast içeren parankimatik hücreler bulunur. İç kısma doğru ise, parankimatik hücrelerin çeperleri kalınlaşıp odunlaşarak kloroplastlarını kaybeden parankimatik hücrelerden, çapları dıştan içe doğru büyüyen ve çeperleri incelen parankimatik hücreler bulunmaktadır. Sklerankima demetleri ise, bu çeperleri incelen parankimatik hücrelerin içinde kapalı koleteral iletim demetleri ve bu iletim demetlerinin dış yüzeye bakan kısımlarında bulunur. Gövdenin öz kısmı, bu kısımda bulunan hücrelerin parçalanması sebebiyle boş olarak görülmektedir. Gövde epidermisi yüzeyinde epidermis hücrelerinin ince, uzun ve uçları sivri halde ve çeperlerinin ince ve stomalarının anomositik tipte olduğu görülmektedir. Gövde yüzeyel kesitinde ise tek hücreli ve çeperleri kalınlaşmış basit örtü tüyleri vardır.



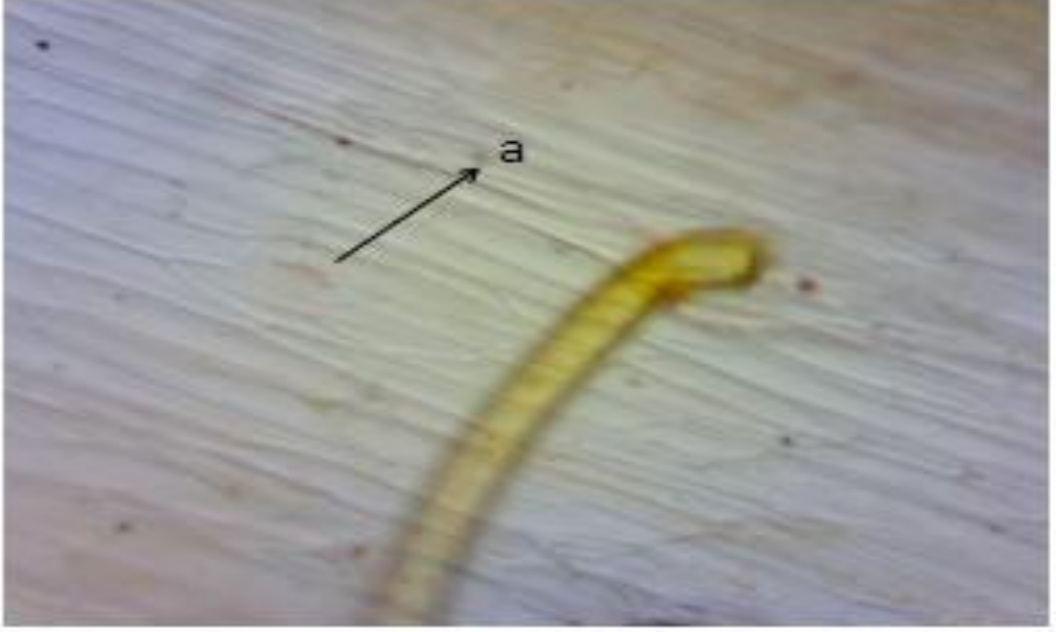
Resim 4. Gövde Enine Kesiti

a-parankimatik hücreler, b-floem, c- sklerankima demeti, d- ksilem, e-epidermis, f- öz boşluğu



Resim 5. Gövde Enine Kesiti

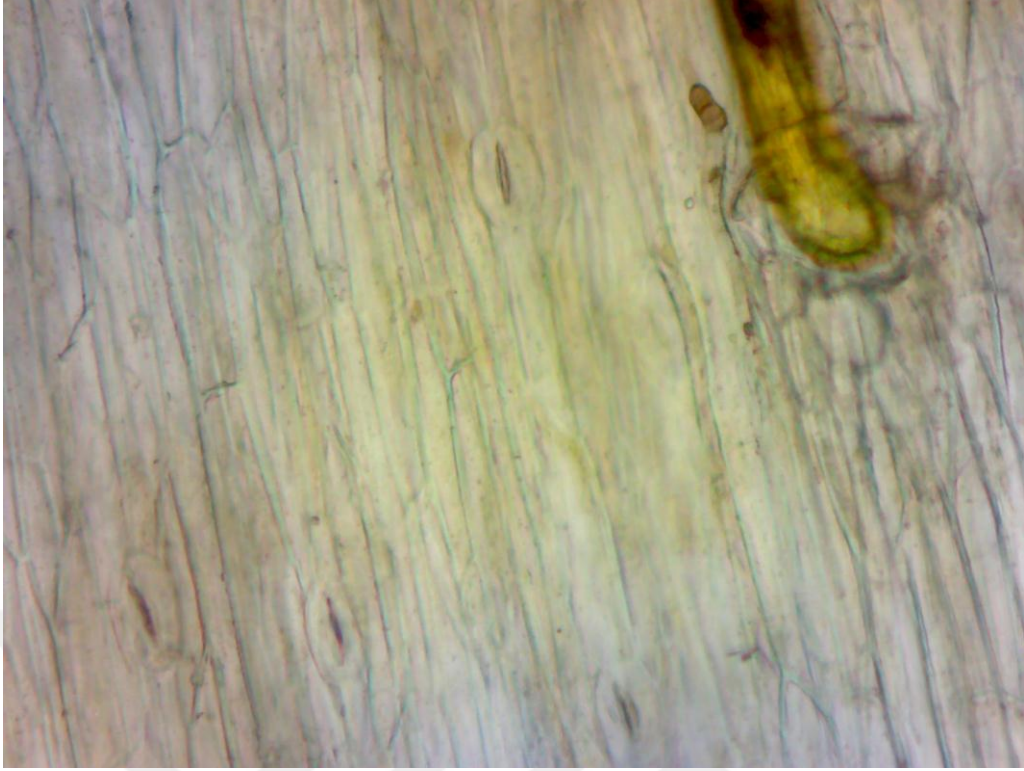
a-Epidermis, b-Öz Boşluğu, c-Ksilem, d-Sklerankima Demeti, e-Floem, f- Parankimatik Hücreler



Resim 6. Gövde Yüzeyel Kesiti a-stoma



Resim 7. Gövde Yüzeyel Kesiti



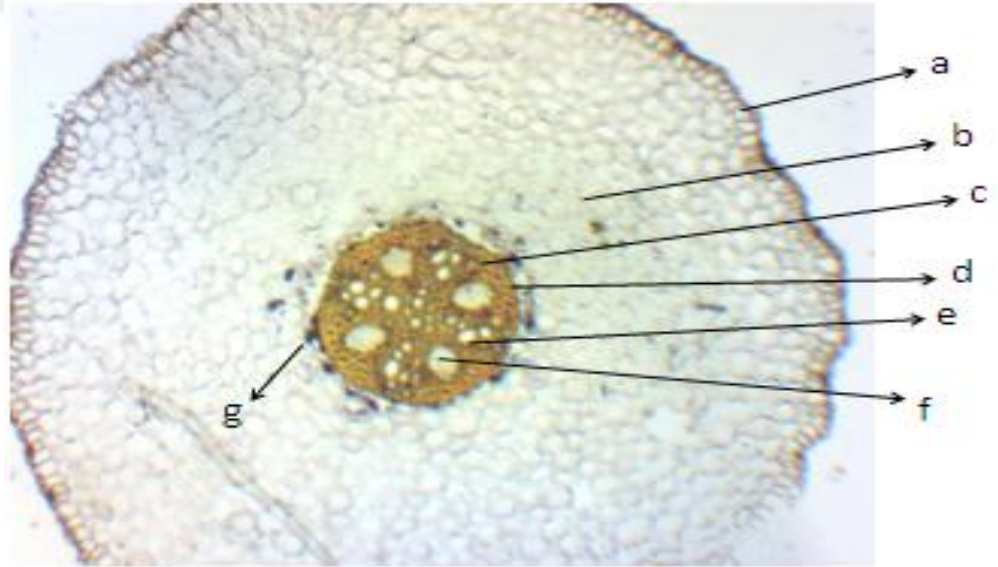
Resim 8. Gövde Yüzeyel Kesiti



Resim 9. Gövde Yüzeyel Kesiti

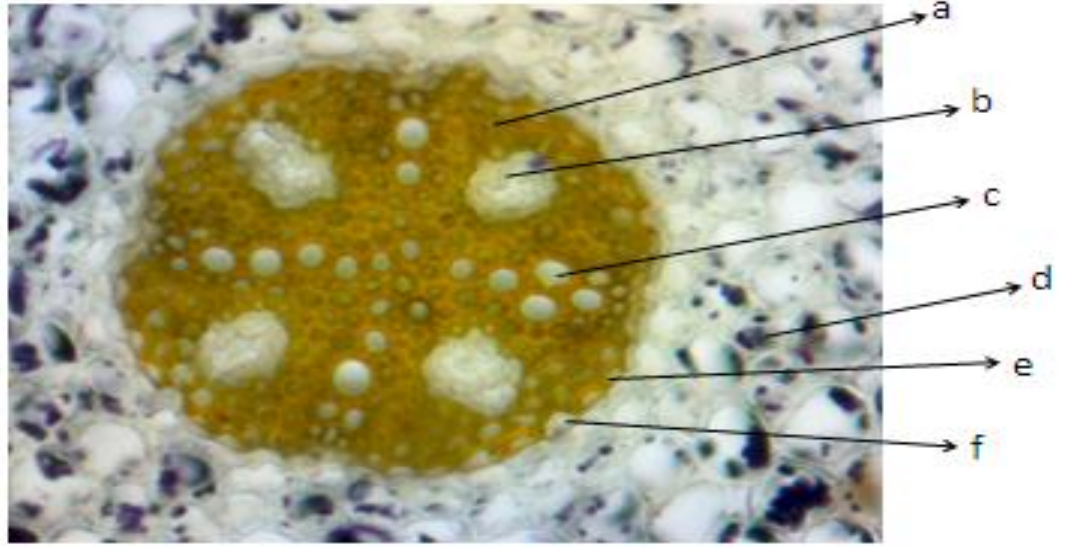
B.2 Köke Ait İncelemeler ve Bulgular

Ksilem kolları arasında bulunan floem ise, kalburlu boru ve arkadaş hücrelerinden oluşmuştur. Kökün merkez kısmı olgun primer vasküler hücrelerle doludur. *Ranunculus* türlerinde, öz örtüsü çok erken ölür ve yerini öz kabuğu alır ve geniş bir interfaskiküler alan oluştururlar. Kambiyum, floem ve ksilem arasında birkaç hücre oluşturur, bu hücrelerin bazıları sekonder trakeal elementler halinde farklılaşır, diğerleri ise parankimatik kalır. Ksilem kollarının dışındaki periskl hücreleri bölünür ve endodermiste sekonder çeperler gelişir (100) Endodermis hücrelerinin çeperleri ince geçit hücresi şeklinde bulunur ve endodermisin iç kısmında bulunan periskl hücrelerinin çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış durumdadır. Ksilem tetraak şeklindedir. *Ranunculus* türlerinde tetraak (dört kollu) kök bulunur. Tetraak kökte tek tabakalı periskl vaskular elementlerin dışında bulunur ve kaspari şeritli tek sıra endodermisle çevrilidir (101).



Resim 10. Kök Enine Kesiti

a-ekzodermis, b-kabuk parankiması, c-perisikl, d- endodermis, e-trake, f-floem, g-niştasta

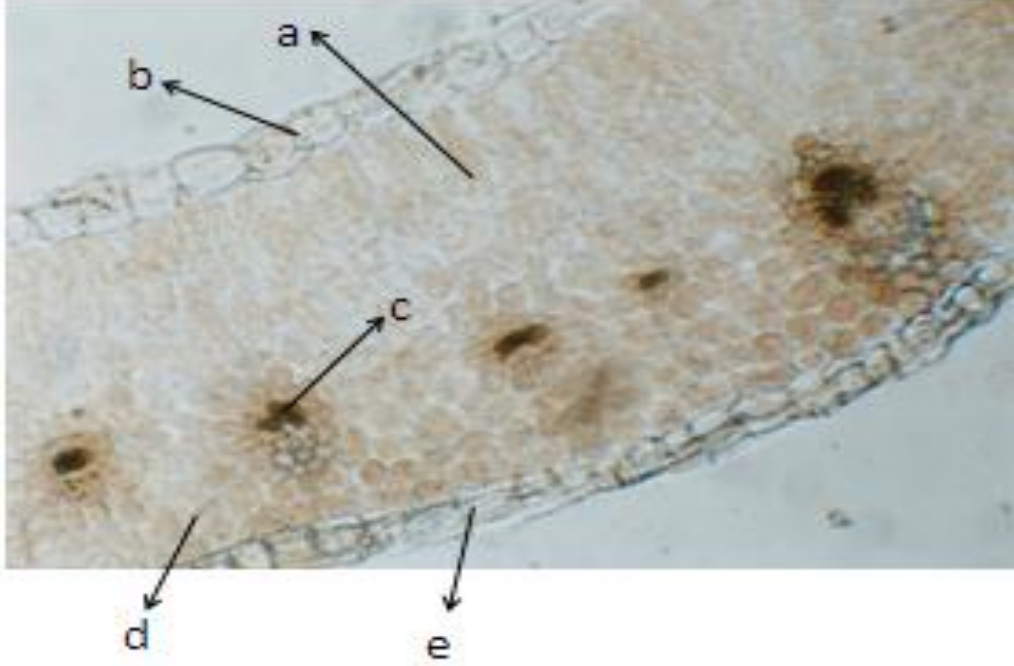


Resim 11. Kök Enine Kesiti

a-endodermis, b-floem, c-trake, d-nişasta, e-endodermis, f-geçit hücresi

B.3. Yaprğa Ait İncelemeler ve Bulgular

Yaprak dorsiventral yapıdadır ve 2 hücre sırası sıkışık palizat ve 4-5 hücre sırası da sıralı sünger parankiması içerir. Alt ve üst epidermiste yer alan hücrelerin dorsal çeperleri ventral çeperlerden daha kalındır, fakat lateral çeperlerinden incedir. Alt ve üst epidermiste bulunan stomalar mezofitiktir. Orta damarı çevreleyen damar parankiması hücreleri bol miktarda kloroplast içerir. Orta damarda koleteral iletim demetleri ile, alt epidermiste bulunan hücreler arasında 2-3 hücre sırasından oluşan çeperleri kalınlaşmış sklerenkima demetleri bulunmaktadır. İletim demetleri ile alt epidermis arasındaki hücrelerin çeperleri biraz kalınlaşmış haldedir ve tek sıralı 3-4 hücreden ibaret kollenkima bulunmaktadır.



Resim 12. Yaprak Enine Kesiti

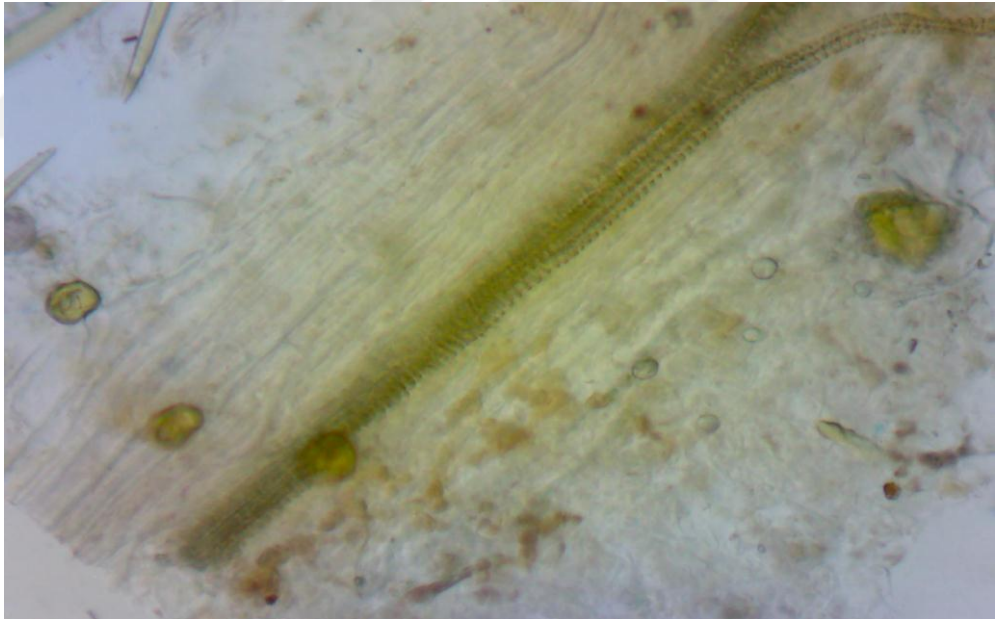
a-palisat parankiması, b-üst epidermis, c-iletim demetleri, d-sünger parankiması, e-alt epidermis

B.4. Toz Drog Üzerinde Gerçekleştirilen Mikroskobik İncelemeye Ait Bulgular

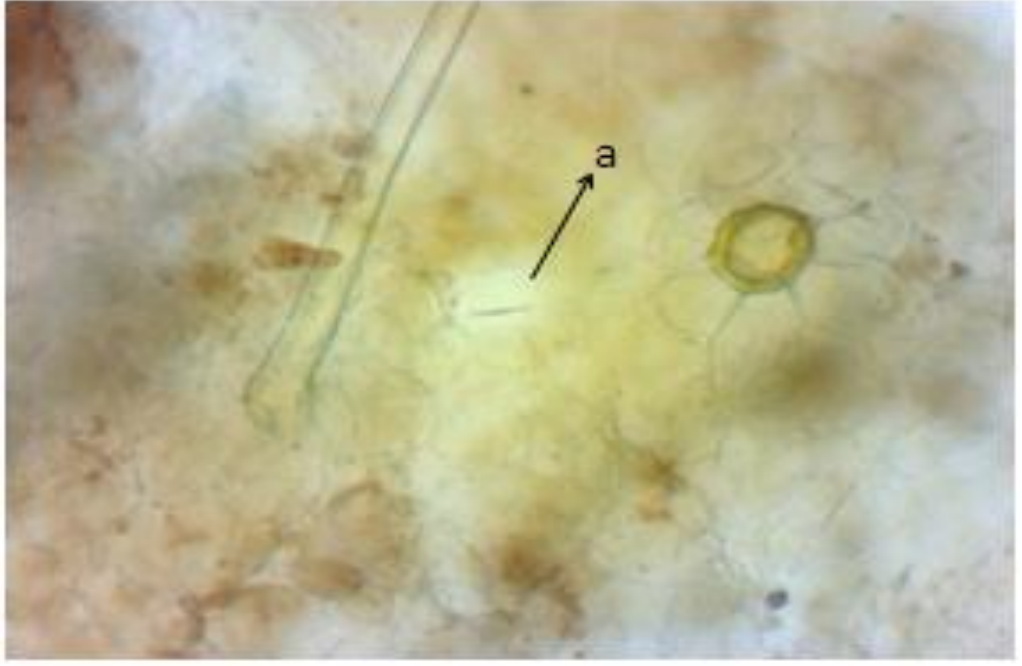
Toz drog incelendiğinde, tek hücreli basit örtü tüyleri, iletim demetleri, anomasitik tipte stoma taşıyan yaprak ve gövde epidermis hücreleri bulunmaktadır.



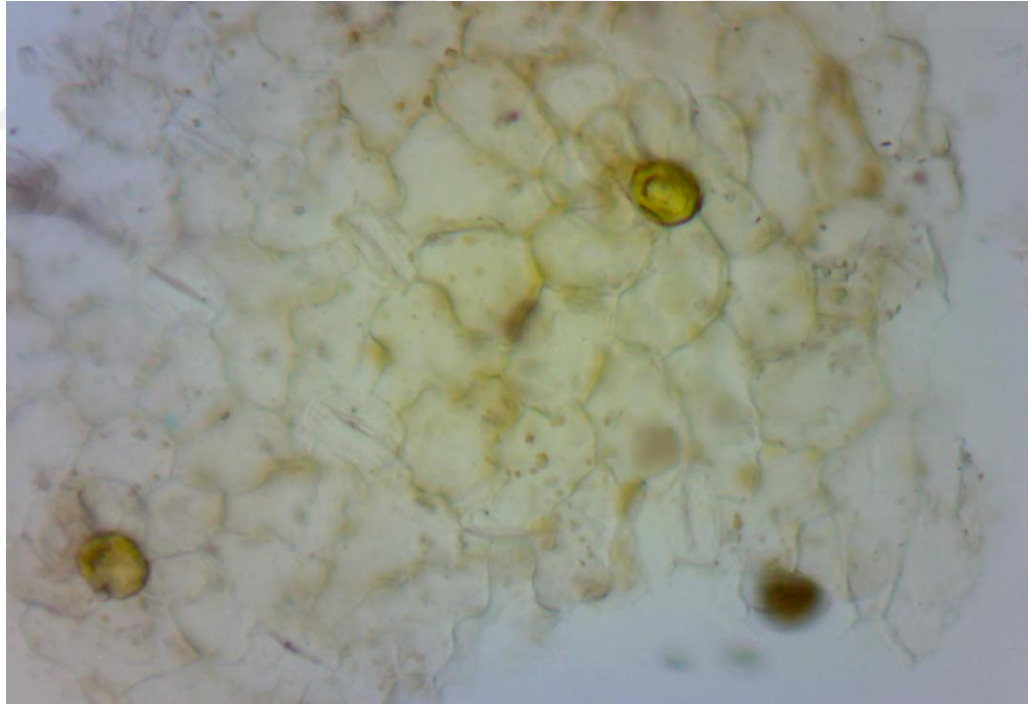
Resim 13. Toz Drogta Stoma ve Örtü Tüyü



Resim 14. Toz Drogda İletim Demeti ve Örtü Tüyü



Resim 15. Toz Drogt Örtü Tüyü ve Tüy Tabanı a-stoma



Resim 16. Toz Drogt Yaprak Epidermisi ve Tüy Tabanı

C. KİMYASAL BÖLÜM

1. KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

DAB 10 (Alman Farmakopesi)'da (78) verilen kalite kontrol yöntemleri esas alınarak toz drog numunesi üzerinde yapılan denemeler sonucunda 3 paralel deneme yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
1.0180	6.689
1.0034	7.285
1.0033	6.897
Ortalama % Kurutmada Kayıp Miktarı: $6.957 \pm 0,246$	

Tablo 1. % Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Toplam Kül Miktarı
1.027	14.522
1.004	15.357
1.024	14.995
Ortalama % Total Kül Miktarı: 14.958 ± 0.341	

Tablo 2. % Total Kül Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
1.0005	19.550
1.0003	18.444
1.0021	17.972
Ortalama % Sülfat Külü Miktarı: 18.655 ± 0.651	

Tablo 3. % Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% HCl de Çözünmeyen Kül Miktarı
1.0007	1.928
1.0025	1.865
1.0043	1.891
Ortalama % HCl de Çözünmeyen Kül Miktarı: 1.894± 0.0641	

Tablo 4. % Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Sonuçları

2. FİTOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

Ekstreler	%Verim(g)	St	Tri	A	S	T	Ant	F	Ş	İn Ş	K	N
Metanol	10,716	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
n-Hegzan	2,661	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Su	9,304	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Etil asetat	7,088	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tablo 5. Drogdan hazırlanan metanol, n-hegzan , etilasetat ve su ekstralarının fitokimyasal analiz sonuçları

St:Steroidler, Tri:Triterpenler, A:Alkaloidler, S:Saponinler, T:Taneninler, a:Antrakinin,
F:Flavonoitler, Ş:Şeker, İnd Ş:İ ndirgen şeker, K:Kumarin, N:Nişasta

D. R. CONSTANTINOPOLITANUS DC. ÜZERİNE BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNLERİNİN SONUÇLARI

1. SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİNE AİT BULGULAR

Hazırlanan etanol, etil asetat, n-hegzan, metanol ve su ekstralarının sitotoksik aktiviteleri Brine Shrimp (*Artemia salina*) metodu kullanılarak araştırılmış ve sonuçlar Tablo 6 'da verilmiştir.

Ekstreler	ppm	LC₅₀
Etanol	1000: 100: 10	-
Etil asetat	1000: 100: 10	-
N-hegzan	1000: 100: 10	-
Metanol	1000: 100: 10	-
Su	1000: 100: 10	-
Kolşisin		0.0009

Tablo 6. Drogumuzun sitotoksik aktivite tayini sonuçları

2. WST-1 HÜCRE PROLİFERASYONU YÖNTEMİ İLE SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİNE AİT BULGULAR

R. constantinopolitanus DC. bitkisinden hazırlanan etanol ve kloroform ekstraları WST-1 hücre proliferasyonu ile sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bitkinin etanol ekstresi 1,5 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml derişimlerde hazırlanmıştır. Kloroform ekstresi ise, 2 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 2 mg/ml, 2 mg/ml, 1,4 mg/ml derişimlerde hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstralar, DMSO (dimetil sülfoksit)'da çözülerek 125mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml ve 5 mg/ml olacak şekilde stok çözeltiler hazırlanıp, final konsantrasyonları ise 250 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 10 mg/ml olacak şekilde

ayarlanmıştır. Sonuç olarak ise, kullanılan etanol ve kloroform ekstrelerinin söz konusu hücrelerde herhangi bir sitotoksik etkisi incelenen dozlarda gözlenmemiştir.

3. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TAYİNİNE AİT BULGULAR

Antimikrobiyal aktivite deneyleri sonucunda, droğumuzdan'dan hazırladığımız ekstrelerin, 9 farklı bakteri ve 1 maya üzerinde oluşturmuş olduğu inhibisyon zonlarının apı Tablo-7'de verilmiştir.



Tablo 7. *R. constantinopolitanus* DC. ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri

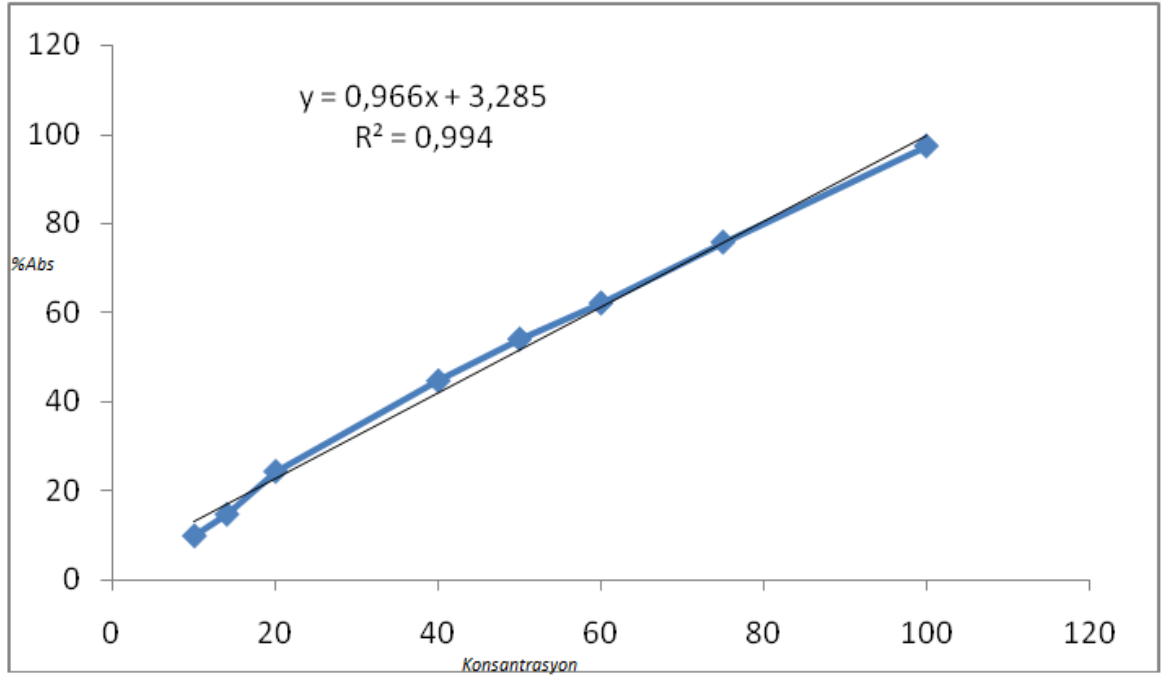
M.o.	Etanol		n-Hegzan		Etil Asetat		Su		Metanol		S.A.	
	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	^a MİK/MBK µg/mL
<i>B.c.</i>	-	512/1024	-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	512/512	18	4/4
<i>S.f.</i>	-	1024/-	-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	1024/1024	23	0,5/2
<i>S.a.</i>	-	128/512	11	256/-	14	-/-	11	-/-	-	512/512	38	0,125/0,25
<i>S.e.</i>	-	64/1024	-	256/-	-	-/-	-	-/-	-	256/512	26	0,25/1
G(-)	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MBK µg/mL	Z.ç. (mm)	^b MİK/MBK µg/mL
<i>E.c.</i>	-	1024/1024	-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	256/256	37	<0,015/<0,015
<i>K.p.</i>	-	256/256	-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	512/512	33	0,015/0,015
<i>P.a.</i>	-	256/256	-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	256/256	34	0,125/0,25
<i>S.t.</i>	-	256/256	-	-/-	-	-/-	-	-/-	-	256/512	36	0,015/0,015
Maya	Z.ç. (mm)	MİK/MFK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MFK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MFK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MFK µg/mL	Z.ç. (mm)	MİK/MFK µg/mL	Z.ç. (mm)	^c MİK/MFK µg/mL
<i>C.a.</i>	-	128/128	-	512/512	-	-/-	-	-/-	-	256/512	21	0,25/1

-: Etki yok, M.o.: Mikroorganizmalar, Z.ç.:Zon çapı, MİK:Minimum inhibitör konsantrasyon, MBK: Minimum bakterisidal konsantrasyon, MFK:Minimum fungisidal konsantrasyon, *B.c.*: *Bacillus cereus*, *S.f.*: *Streptococcus faecalis*, *S.a.*: *Staphylococcus aureus*, *S.e.*:*Staphylococcus epidermidis*, *E.c.*: *Escherichia coli*, *K.p.*: *Klebsiella pneumoniae*, *P.a.*:*Pseudomonas aeruginosa*, *S.t.*:*Salmonella typhimurium*, *C.a.*: *Candida albicans*, S.A.: Standart antimikrobiyaller ^a:Ampisilin, ^b:Siprofloksasin, ^c:Flukonazol.

3. ANTIOKSİDAN AKTİVİTEYE AİT BULGULAR

3.1. DPPH Radikali Yakalama Aktivitesine Ait Bulgular

R. constantinopolitanus 'tan hazırladığımız n-hegzan, etilasetat, etanol, metanol, su ekstralarının DPPH radikalini yakalama aktivitesine ait sonuçlar Tablo-9'da ve α - tokoferol kalibrasyon eğrisi ise Şekil-8'de yer almaktadır.



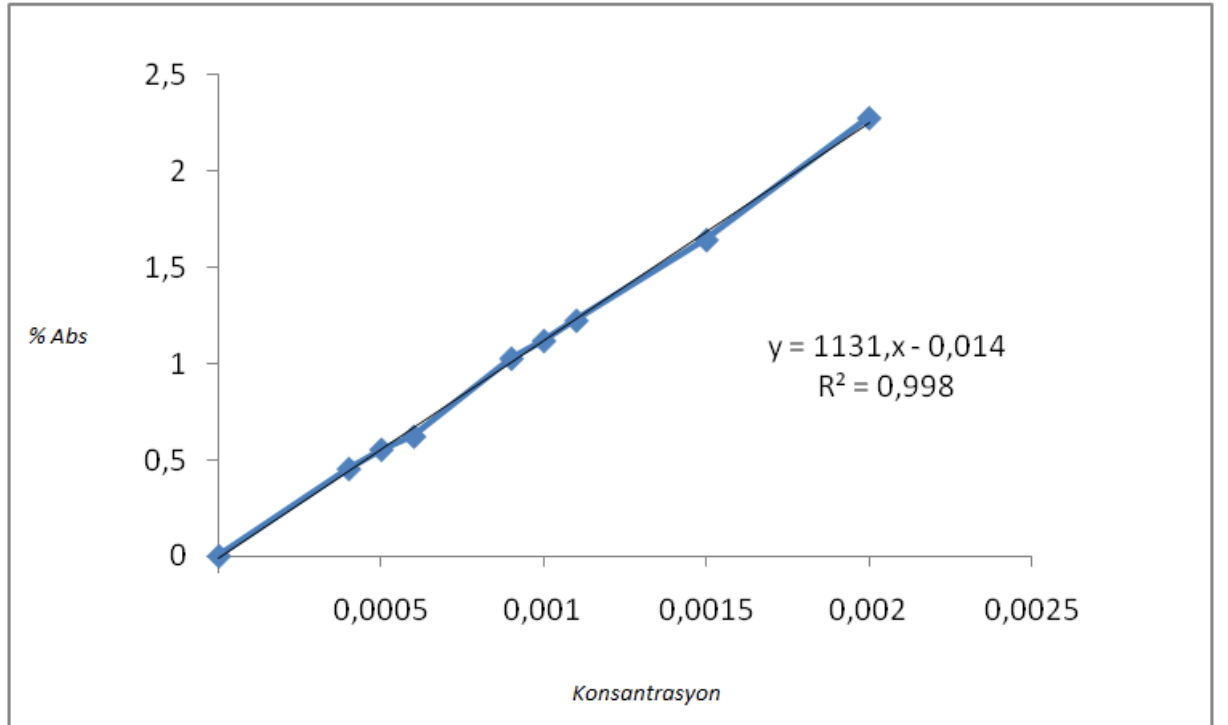
Şekil 8. DPPH Radikal Yakalama Aktivitesine Ait α -Tokoferol Kalibrasyon Eğrisi

Ekstreler (mg/ml)	% DPPH İnhibisyon (ort. \pm SD) (n=3)	EC ₅₀ Değerleri (mg/ ml)	Ekstre % Verimi	α -Tokoferol Ekvale \tilde{n} Değeri (Ort. \pm SD) (n=3)
Metanol (1000 mg/ml)	93,617 \pm 0,915	318,90	10,716	91,399 \pm 0,445
Metanol (750 mg/ml)	91,580 \pm 0,068			
Metanol (500 mg/ml)	70,536 \pm 0,059			
Metanol (400 mg/ml)	61,365 \pm 0,304			
Metanol (250 mg/ml)	42,926 \pm 0,170			
Su (1000 mg/ml)	90,875 \pm 0,134	328,31	9,304	88,230 \pm 0,309
Su (750 mg/ml)	80,184 \pm 0,074			
Su (500 mg/ml)	66,325 \pm 0,293			
Su (400 mg/ml)	54,350 \pm 0,067			
Su (250 mg/ml)	42,799 \pm 0,011			
Etanol (1000 mg/ml)	76,958 \pm 0,013	684,68	6,512	68,664 \pm 0,592
Etanol (750 mg/ml)	59,723 \pm 0,012			
Etanol (500 mg/ml)	47,741 \pm 0,163			
Etanol (250 mg/ml)	22,272 \pm 0,032			
Etil asetat (1000 mg/ml)	7,887 \pm 0,086	-	7,088	5,468 \pm 0,185
Etil asetat (750 mg/ml)	7,692 \pm 0,018			
Etil asetat (500 mg/ml)	6,764 \pm 0,017			
Etil asetat (250 mg/ml)	4,839 \pm 0,024			
n-Hegzan	-	-	2,661	-

Tablo 8. *R. constantinopolitanus* 'tan Hazırlanan Ekstrelerin % DPPH inhibisyon ve EC₅₀ Değerleri

3.2. Toplam Fenolik Madde Analizine Ait Bulgular

R. constantinopolitanus 'tan hazırladığımız ekstrelerin toplam fenolik madde analizine ait sonuçlar Tablo 10'da ve gallik asite ait kalibrasyon eğrisi Şekil 9 'da yer almaktadır.



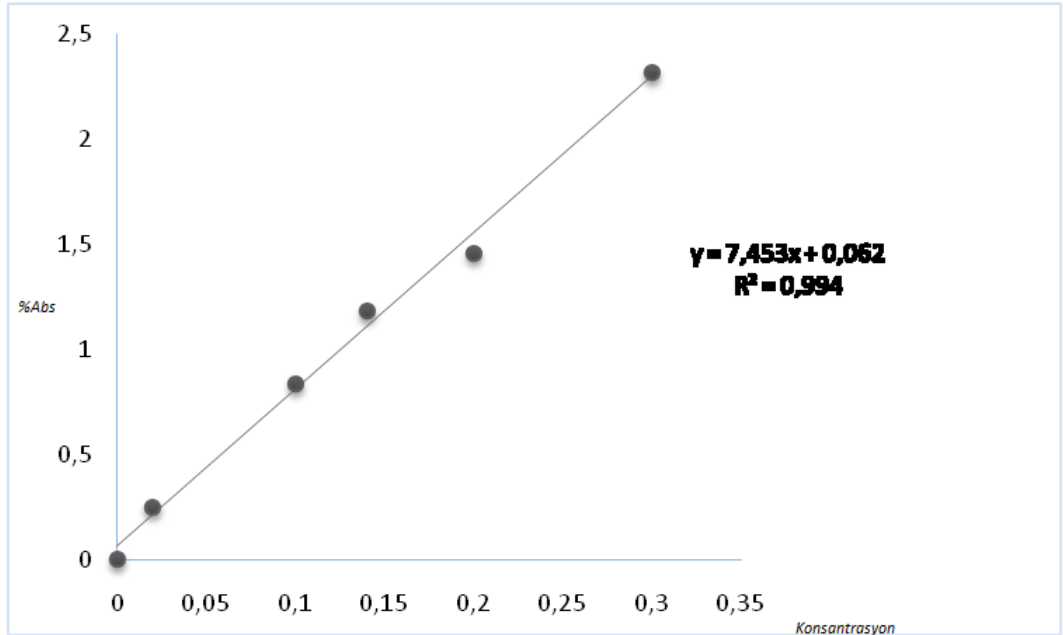
Şekil 9. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

Ekstreler (1000 mg/ml)	Miktar
metanol	0,0128 mg/ ml \pm 0,0003
su	0,0812 mg/ ml \pm 0,0005
etanol	0,0798 mg/ ml \pm 0,0008
etilasetat	0,0823 mg/ ml \pm 0,0023
n-Hegzan	0,0803 mg/ ml \pm 0,0008

Tablo 9. *R. constantinopolitanus* 'tan Hazırlanan Ekstrelerin (1 mg/ml) toplam Fenolik Madde Miktarına Ait Sonuçlar

3.3. Toplam Flavonoit Analizine Ait Bulgular

R. constantinopolitanus'dan hazırladığımız ekstrelerin toplam flavonoit analizine ait sonuçlar Tablo 11 ve Şekil 10 'da kersetine ait kalibrasyon eğrisi yer almaktadır.



Şekil 10. Kersetin Kalibrasyon Eğrisi

Ekstreler (1000 mg/ml)	Miktar
metanol	9,563 mg/ ml \pm 0,0012
su	12,252 mg/ ml \pm 0,0015
etanol	9,571 mg/ ml \pm 0,0021
etilasetat	6,588 mg/ ml \pm 0,0018
n-Hegzan	10,334 mg/ ml \pm 0,0016

Tablo 10. *R. constantinopolitanus* 'tan Hazırlanan Ekstrelerin (1 mg/ml) Toplam Flavonoid Madde Miktarın Ait Sonuçlar

BÖLÜM III

TARTIŞMA

1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR

Çalışmamızda Türkiye'de yabani olarak yetişen 85 türden biri olan *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinin tayinine yardımcı olmak için bitkiden hazırlanan alkol metaryalinden yararlanılarak anatomik karakterler incelenmiştir. Ayrıca droğa ait toz drogta anatomik olarak incelenmiştir.

Kuzey Yarım Kürede oldukça geniş bir yayılış gösteren *Ranunculus* genusuna ait bitkiler ülkemizde halk arasında kabızlık, romatizma, hemoroid, ödem ve sarılık tedavisinde kullanılmaktadır (3-5). Fakat Türk Farmakopesi veya diğer farmakopelerde *Ranunculus* türlerine ait herhangi bir monograf yer almamaktadır (78-81).

Çalışmamızda, İzmir Karagöl mevkiinden çiçekli halde iken toplanan *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinin alkol metaryalinden yararlanarak kök, gövde ve yaprağa ait anatomik karakterler belirlenmiştir. Ayrıca ileride yazılacak olan *R. constantinopolitanus*'a ait monografin hazırlanmasına yardımcı olması amacıyla droğa ait makroskobik ve mikroskobik araştırmalar yapılmıştır.

a. Yaprğa Ait Bulgular

Yaprak dorsiventral olup, 2 sıra palizat ve sıkışık, 4-5 hücre sıralı sünger parankimasından ibarettir. İkinci sıra palizat hücreleri birinci sıraya göre biraz daha geniştir. Alt ve üst epidermiste yer alan hücrelerin dorsal çeperleri ventral çeperlerden daha kalın, lateral çeperleri ise incedir. Gerek alt gerekse üst epidermiste yer alan stomalar mezofitiktir. Orta damarı çevreleyen damar parankiması hücreleri bol miktarda kloroplast taşımaktadır. Orta damarda koleteral iletim demetleri ile iletim demetlerini çevreleyen alt epidermis hücreleri arasında birkaç hücreden ibaret damar parankiması ve 2-3 hücre sırasından oluşan çeperleri kalınlaşmış sklerankima demetleri bulunmaktadır. İletim demetlerinin kutuplarında bulunan hücrelerin çeperleri diğer hücrelere göre kalın olup, gövdedeki iletim demetlerini çevreleyen sklerankima demetlerine benzemektedir. İletim demeti ile alt epidermis arasındaki hücrelerin çeperleri biraz kalınlaşmış ve 1 sıralı 3-4 hücreden ibaret kollenkima bulunmaktadır.

b. Gövdeye ait bulgular

Gövde enine kesitinin genel görünümünde, epidermis hücrelerinin üzeri ince bir kütikula ile örtülüdür. Epidermis hücrelerinin altında tek sıralı, çeperleri kalınlaşmış hipodermis tabakası bulunmaktadır. Hipodermisin altında kloroplast içeren, ince çeperli, 5-6 hücre sırasından oluşan parankimatik hücreler bir halka oluşturmaktadır. Bunların iç kısmında, kloroplast içermeyen parankimatik hücrelerin

çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış, çapları dıştan içe doğru büyüyen ve çeperleri incelen parankimatik hücreler bulunmaktadır. Bu parankimatik hücreler içinde kapalı koleteral iletim demetleri ve bu iletim demetlerinin dış yüzeye bakan kısımlarında sklerankima demetleri bulunmaktadır. Gövdenin öz kısmı buradaki hücrelerin parçalanmasından dolayı boş olarak görülmektedir. Gövde enine kesitinde epidermis üzerinde tek hücreli, çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış basit örtü tüylerine ve mezofitik tipte stomalara rastlanmaktadır. Gövdede kristal oluşumu gözlenmemiştir.

c. Köke ait bulgular

Kök enine kesitinde epidermis ve onun altındaki hipodermis hücrelerinin çeperleri süberinleşmiş, korteks hücrelerinin çeperleri incedir. Endodermis hücrelerinin çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış, ksileme (protoksilem) karşılık gelen yerlerde bulunan endodermis hücrelerinin çeperleri ince geçit hücresi şeklinde bulunmakta, endodermisin iç kısmında bulunan perisikl hücrelerinin de çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış durumdadır. Ksilem tetraark şeklinde olup, metaksilem hücreleri merkezde geniş hücreler şeklinde görülmektedir. Protoksilemlerin arasında floem bulunmaktadır. Buna ilave olarak kökün gövdeye yakın 1-1.5 cm' lik kısmı nişasta depo ederek yumru şeklini almıştır. Bu yumru kökler anatomik olarak incelendiğinde, endodermis hücrelerinin ince çeperli olduğu ve korteks parankimasi hücreleri içerisinde bol miktarda nişastanın depo edildiği görülmektedir. Ayrıca tetraark şeklinde olan ksilem yumru kalınlığına bağlı olarak diark veya triark şeklinde olabilmektedir (102).

2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ARAŞTIRMALARI

Tezimizin konusunu oluşturan *R. constantinopolitanus* DC bitkisinden hazırlanan drog örneği üzerinde, kalite kontrolleri esas alınabilecek bazı deneyler

yapılmıştır. Kalite kontrol deneyleri için, Avrupa Farmokopesi ve Avrupa Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde yer alan yöntemler esas alınmıştır (79,81).

Bu amaçla farmakopede yer alan gravimetrik esaslı nem, total kül, hidroklorik asitte çözünmeyen kül ve sülfat külü miktar tayinlerine ait temel yöntemler uygulanmıştır (79,81).

Yapılan deneyler sonucunda kurutmada kayıp miktarı $\% 6.957 \pm 0.246$; total kül miktarı $\% 14.958 \pm 0.341$; sülfat külü miktarı $\% 18.655 \pm 0.651$ ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı da $\% 1.894 \pm 0.064$ olarak bulunmuştur.

Literatür taramalarımızda *R. constantinopolitanus* DC. Bitkisi için bu kalite kontrol deneyleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle ileride hazırlanabilecek monograf için elde ettiğimiz sonuçların katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Yapılan fitokimyasal taramalar sonucunda bitkimizden hazırlanan metanol, n-hegzan, su, etil asetat ekstraları hazırlanmış olup, bu ekstraların sırasıyla $\% 10.716$, $\% 2.661$, $\% 9.304$, $\% 7.088$ verimde oldukları gözlenmiştir. Metanol ekstrelerimiz steroid, triterpen, flavonoid içermektedir.

Bulunan sonuçlara göre bitkimizden hazırlanan metanol, etilasetat ve etanol ekstraları flavonoid içermektedir.

Yapılan antimikrobiyal aktivite deneylerinde etanol ve etilasetat ekstralarımızın aktivite göstermesinin nedeninin, bitkimizin taşıdığı göstermesinin nedeninin, bitkimizin taşıdığı flavonoidlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Yine, DPPH yöntemi ile yapılan antioksidan aktivite tayininde metanol ve etanol ekstralarımızın aktivite göstermesinin nedeni bu ekstraların içerdiği flavonoidlerdir.

Çünkü flavonoidler antioksidan, anti fungal, antimikrobiyal, antinflamatuar ve yara iyi edici aktivitelere sahiptirler (70-72,101).

3. BİYOLOJİK AKTİVİTE TAYİNİ ARAŞTIRMALARI

a. *Ranunculus* türlerinin Brine shrimp yöntemiyle sitotoksitesini araştırılmış ve *Ranunculus pedatus* Waldst. & Kit. subsp. *Pedatus*'un n-hegzan, etil asetat, metanol ve su ekstralarının sitotoksik etki gösterdiğini, bunun da ekstraların içerdiği vitekisin, izovitekisin, ursolik asit ve berberinden kaynaklandığını bildirilmiştir (69) *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinden hazırlanan etil asetat, n-hegzan, etanol, metanol ve su ekstraları sitotoksik aktivitesi tayini için ekstralara Brine Shrimp (*Artemia salina*) metodu uygulanmıştır. Sonuç olarak n-hegzan ekstresinde düşük sitotoksik aktivite gözlenmiş ve diğer ekstralarda ise sitotoksik aktiviteye rastlanmamıştır (Tablo 6).

b. *Ranunculus marginatus* var. *trachycarpus* ve *R. sprunerianus*'un antibakteriyal aktivitelerini incelemiş n-hegzan, etil asetat, metanol ve su ekstralarının disk difüzyon yöntemiyle test edilen bütün bakterilere (*Streptococcus faecalis* ATCC 8043, *Staphylococcus aureus* ATCC, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 29998) karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir (90). *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinden hazırlanan etil asetat, n-hegzan, etanol, metanol ve su ekstralarının antimikrobiyal aktivitesini araştırmak amacıyla ekstralara disk difüzyon ve mikrodilüsyon metodları uygulanmıştır. Disk difüzyon yönteminde n-hegzan, etilasetat ve su ekstralarının sadece *S.aureus*' a (ATCC 6538p) karşı antimikrobiyal etkisinin olduğu görülmüştür. Mikrodilüsyon yöntemine göre ise, su ve etil asetat ekstralarının hiçbir test organizması üzerine etkili olmadığı

(MİK>1024) belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin ise etanol ekstresinde *S.aureus* (ATCC 6538p) ve *S. epidermidis* (ATCC 12228) adlı bakterilere karşı olduğu görülmüştür (Tablo 8).

c. *R. arvensis* L. bitkisinin antioksidan aktivitesini belirlemek üzere kloroform, kloroform: metanol(1:1), metanol, metanol:aseton(1:1) ve su ekstrilerine DPPH Radikali Yakalama Yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak metanol ekstresinin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (102). Raziq ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *R. maricatus*'un etilasetat ekstresinden izole ettikleri yeni flavonoide 'ranunkozit' adını vermişler ve bu heterozitin DPPH radikali yakalama, lipoksigenaz ve ksantin oksidaz inhibitör aktivitelerini araştırdıklarında güçlü aktivite gösterdiğini saptamışlardır (103). Droğun antioksidan aktivitesini belirlemek üzere ekstreler DPPH radikali yakalama yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde analizleri de yapılmıştır. Sonuç olarak, droktan hazırlanan metanol ekstresinin belli bir düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. İncelenen ekstriler içinde sırasıyla metanol, su ve etanol ekstrileri en aktif, etil asetat ve n-hegzan ekstrilerinde ise antioksidan aktivite gözlenmemiştir (Tablo 8). Toplam fenolik ve toplam flavonoit madde analizleri sonucunda ise, metanol ekstresinde toplam fenolik ve toplam flavonoit madde miktarlarının yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 9,10). Tezimiz kapsamında yaptığımız bu çalışmada toplam fenolik madde içeriği fazla olan ekstrilerin antioksidan aktivitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

d. WST-1 hücre proliferasyonu yöntemi ile sitotoksik aktiviteyi belirlemek amacı ile WST-1 yöntemi kullanılmış ve *R. ternati* 'den elde edilen polisakkarit ekstrilerinin göğüs kanser hücreleri üzerindeki aktivitesini incelemek amacıyla yürüttükleri bir çalışmada MTT yöntemi ile MCF-7 göğüs kanseri hücre

serileri kullanmışlardır. *R.ternati* polisakkaritlerini içeren ekstrelerin kör kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre apoptozuna sebep olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, droğun göğüs kanser hücrelerine karşı oldukça azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (88). Droğumuzdan hazırlanan etanol ekstremizin göğüs kanser hücreleri üzerindeki azaltıcı etkisinin, etanol ekstremizin içerdiği flavonoidlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü flavonoidler sitotoksik aktiviteye sahiptir. (104,105). *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinden hazırlanan etanol ve kloroform ekstreleri WST-1 hücre proliferasyonu ile sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi amacı ile etanol ve kloroform ekstreleri hazırlanmıştır. Bununla birlikte, yaptığımız taramalarda, metanol ekstresinin flavonoid içerdiğinin saptamıştık. Flavonoidlerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (102).

Bu uygulamaların sonucunda elde edilen kromatogramlar, bu çalışmanın “Bulgular” kısmında yer almaktadır.

BÖLÜM IV

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tezimizle ilgili çalışmamızın ilk aşamasında, ülkemizde yabani olarak yetişen *Ranunculus constantinopolitanus* DC. bitkisinin tayinine yardımcı olacak ve diğer *Ranunculus* türlerinden ayırt edilmesini sağlayacak anatomik özellikler, makroskobik ve mikroskobik olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, bitkinin 70⁰'lik etanolde saklanmış toprak üstü ve kök örnekleri kullanılmıştır.

Araştırmamızın ikinci aşamasında ise, Avrupa Farmakopesinde yer alan yöntemler esas alınarak *R. constantinopolitanus* DC. bitkisinin çiçekli dönemde toplanan drog örneklerinin nem, total kül, sülfat külü ve hidroklorik asitte çözünmeyen külü miktarları belirlenmiştir. Ayrıca; droğumuzdan hazırlanan metanol, etil asetat, su ve n-hegzan ekstrilerine fitokimyasal tarama da yapılmıştır. Çalışmalarımız ileride hazırlanacak bir monograf için kaynak oluşturabilecek bir niteliktedir.

Çalışmalarımızın önemli bir kısmını oluşturan biyolojik aktivite tayinin belirlenmesi için öncelikle, *R. constantinopolitanus*'un n-hegzan, etil asetat, metanol, etanol ve su ekstreleri hazırlanmıştır. Droğun sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, droktan hazırlanan ekstrelere Brine Shrimp (*Artemia salina*) ve WST-1 hücre proliferasyonu yöntemleri uygulanmıştır. Sonuç olarak, n-hegzan ekstresinde sitotoksik aktivite gözlenmiş ve diğer ekstrelerde ise sitotoksik aktiviteye

rastlanmamıştır. WST-1 hücre proliferasyonu yönteminde ise etanol ekstresinin göğüs kanseri hücrelerini azaltıcı etkisi gözlenmiştir.

R. constantinopolitanus 'un antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon ve mikrodilüsyon metodları ile araştırılmıştır. Disk difüzyon yönteminde sadece n-heksan, etil asetat ve su ekstraktlarının sadece *S.aureus* ' a karşı antimikrobiyal aktivitesi gözlenmiş, mikrodilüsyon yönteminde ise en yüksek aktivite etanol ekstresinde *S.aureus* ve *S. Epidermidis*'e karşı gözlenmiştir.

Droğtan hazırladığımız metanol ekstresinin DPPH radikali yakalama yöntemi kullanılarak antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde analizleri de yapılmıştır. Droğun etanol ekstresinin antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır. Toplam fenolik madde ve flavonoid içeriği araştırıldığında, toplam fenolik madde miktarı sırasıyla etil asetat, su, n-heksan, etanol ve metanol ekstraktlarında olduğu ve flavonoid içeriğinin ise sırasıyla; su, n-heksan, etanol, metanol ve etil asetat olduğu görülmüştür.

Hazırladığımız tezin *R. constantinopolitanus* DC. bitkisi için kalite kontrol ve biyolojik aktivite yöntemlerini içermesi nedeniyle ileride hazırlanacak monograf için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

BÖLÜM V

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Davis PH, Cullen J, MJE Coode editors. Flora of Turkey and East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Edinburg 1965; 95:146-169
2. Baytop A. Farmasötik Botanik, İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Baha Matbası, İstanbul. 1977; (25)2311:166-169
3. Baytop T. Theraphy with medicinal plants in Turkey (Past and present),2nd ed. Nobel tıp yayınevi 1999: 45-55
4. Gürhan G, Ezer N. Halk arasında homoroid tedavisinde kullanılan bitkiler-1, Hacettepe Üniv. Ezc. Fak. Derg. 2004; 24(1): 37-55
5. Sezik E, Yeşilada E, Honda G, Takaishi Y, Takeda Y, Tanaka T. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in central Anatolia, Journal of Ethnopharmacology, 2001;75:95-115
6. Baytop T. Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul 1963;1039:141-142
7. Aslam MS, Choudhary BA, Uzair M, Ijaz AS. The genus *Ranunculus*: Phytochemical ve Ethnopharmacologic Review. Int J Pharm Pharm Sci. 2012; 4:Suppl 5 2012; 4(5): 15-22
8. Nazır S, ZhaoW, Tahir K, Jing Q, Khan S. *In vitro* antimicrobial activity of the chemical ingredients of *Ranunculus hirtellus*. Global Journal of Pharmacology. 2014; 8(1):53-59
9. Nazır S, Li B, Tahir K, Khan A, Khan ZUH , Khan,S. Antimicrobial activity of five constituents isolated from *Ranunculus muricatus*, Medical Plants Research. 2013;7(47):3438-3443.

10. Webster SD. A chromatographic investigation of the flavonoids of *Ranunculus L.* subgenus *Batrachium* (DC.) a gray (water buttercups) and selected species in subgenus *Ranunculus*. *Aquatic Botany* 1991;40 issue:1:11-26.
11. Prieto JM, Recio MC, Ciner, RM, Manez S, Rios JL. Pharmacological approach to the pro- and anti- inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus L.* *Journal of Ethnopharmacology* 2003;89:131-137.
12. Mantle D, Gok MA, Lennard TW. Adverse and beneficial effects of plant extract on skin and skin disorders. *Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews* 2001; 20:89-103
13. Zou Y, Tan C, Wang B, Jiang S, Zhu D. Phenolic compounds from *Ranunculus chinensis*. *Chemistry of Natural Compounds* 2010; 46,(1):6-10.
14. Emsen İM. İlginç ve öldürücü bitki kökenli olan buttercup (*Ranunculus*: Düğün çiçeği) yanığı. *Türk Plast Reconstr Est Cer Derg*, 2006;14:2.
15. Töngel MÖ, Ayan İ. Samsun ili çayır ve meralarında yetişen bazı zararlı bitkiler ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *J Of Fac Of Agric OMU*, 2005; 20(1): 84-93.
16. Turan H, Sarıcı M, Turan A. Yaşlı bir hastada üğün çiçeğine bağlı gelişen irritan fitokontakt dermatit. *Turkish Journal of Geriatrics* 2012; 15(4): 476-478.
17. Akbuluk S, Semur H, Köse Ö, Özhasenekler A, Çeliktaş M, Başbuğ M, Yağmur M. Phytocontract dermatitis due to *Ranunculus arvensis* mimicking burn injury: report of three cases and literature review. *Int J Emerg Med* 2011; 4: 7-10.
18. Köse R, Okur Mİ, Bingöl I, Çetin H. Phytocontract dermatitis mimicking a burn injury due to *Ranunculus constantinopolitanus*. *Contract Dermatitis* 2008; 59: 249-250.

19. Fostok SF, Ezzeddine RA, Homaidan FR, Al-Saghir JA., Salloum RG, Saliha NA, Talhouk RS. Interleukin-6 and cyclooxygenase-2 downregulation by fatty acid fractions of *Ranunculus constantinopolitanus*. BMC Complementary and Alternative Medicine 2009; 9: 44-49.
20. <https://plants.usda.gov/care/profile?symbol=RANUN>
21. Raptipishe S, Pakravan M, Tavassoli A. Phycogenetic relationships in *Ranunculus* species (Ranunculaceae) based on nrDNA trnL-F sequences. Progress in Biological Sciences 2011; 1(1): 41-47.
22. Elçi B, Erik S. Gdl (Ankara) ve evresinin etnobotanik zellikleri. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakltesi Dergisi. 2006; 26(2): 57-64.
23. Campell WE, Cragg ML, Powrie AH. Anemonin, protoanemonin and ranunculin from Knowltonia capensis. Phytochemistry. 1979; 18 :323-324.
24. Abou-Tayoun A. Anti-tumor activities of extracts from indigenous Lebanese plants using a murine in vitro model of squamous cell carcinogenesis. AUB nature conservation center, Amarican University of Beirut Plant Database 2004 Available from: <http://hdl.handle.net/10938/6794>.
25. Nazır S, Zhao W, Tahir K, Jing Q, Khan S. In vitro antimicrobial activity of the chemical ingredients of *Ranunculus hirtellus*. Global Journal of Pharmacology 2014; 8(1) :53-59.
26. Calka O, Akdeniz N, zkol HU, Karadağ AS, Behçet L. Irritant contact dermatitis caused by *Ranunculus kotschyi* Boiss. in 6 cases. Contract Dermatitis 2011; 64: 158-184.
27. Turner NJ. Counter-irritant and other medicinal uses of plants in Ranunculaceae by native peoples in British Colombia and neighbouring ares. J Ethnopharmacol 1984;11 (2): 181-201.

28. Bai Y, Benn MH, Majak W, McDiarmid R. Extraction and HPLC determination of Ranunculin in species of the buttercup family. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 2235-2238.
29. Prieto JM, Recio MC, Ciner RM, Manez S, Rios JL. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *J Ethnopharmacol* 2003; 89: 131-137.
30. Zielinska D, Zielinski H. Antioxidant activity of flavone C-glycosides determined by updated analytical strategies. *Food Chemistry* 2011; 124: 672-678.
31. Akkol EK, Süntar İ, Erdoğan TF, Keleş H, Gönenç TM, Kivçak B. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *R. constantinopolitanus*: a comparative study. *J Ethnopharmacol* 2012; 139: 478-484.
32. Tosun F, Akyüz Kızılay Ç, Şener B, Vural M, Palittapongarnpim P. (). Antimycobacterial activity of some Turkish plants. *Pharmaceutical biology* 2004; 42 (1): 39-43.
33. Qasem JR. Fungicidal activity of *Ranunculus asiaticus* and other weeds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Ann Appl Biol* 1996; 128: 533-540.
34. Zhang L, Yang Z, Tian JK. Two new indolopyridoquinazoline alkaloidal glycosides from *Ranunculus ternatus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2007; 55(8): 1267-1269.
35. Tian JK, Sun F, Cheng YY. Chemical constituents from the roots of *Ranunculus ternatus*. *J Asian Nat Prod Res* 2006; 8(1-2): 35-39.
36. Chi Y, Yang Y, Yu S. Effect and composition of organic acid of *Radix Ranunculus ternati*. *Nanjing Zhongyiyao Xuebao* 2007; 23(6): 365-367.

37. Bonora A, Tosi B, Dall'Olio G, Bruni A. Quarternary alkaloids in rhizomes of *Ranunculus serbicus*. *Phytochemistry* 1990; 29, (7): 2389-2390.
38. Bonora A, Tosi B, Dall'olio G, Bruni A. Occurance and phylogenetic implications of quartenay alcoloids in *Ranunculus serbicus* (Ranunculaceae). *Phyton* (Horn, Austria) 1990; 30 (2): 265-272.
39. Bissa S, Bohra A. Evaluation of antibacterial potential of *Ranunculus sceleratus*. *Int J Bot Res* 2012; 5(1): 10-13.
40. Gürhan G, Ezer N. Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler-1. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2004; 24(1): 37-55.
41. Karagöz A, Cevahir G, Özcan T, Sadıkoğlu N, Yentür S, Kuru A. Bazı yüksek bitkilerden hazırlanan sulu ekstrelerin antiviral aktivite potansiyellerin değerlendirilmesi, 14.BİHAT, Eskişehir, 29-31 Mayıs 2002; 318-321.
42. Khan WN, Ali I, Gul R, Choudhary MI. Xanthine oxidase inhibiting compounds from *Ranunculus repens*, *Chem Nat Comp* 2008; 44(1): 22-26.
43. Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, Pillay P, Matsibisa MG, Bhaqwandiin N, Smith PJ, Folb PI. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in Souht Africa. *J Ethnopharmacol*, 2004; 92: 177-191.
44. Xiong Y, Deng KZ, Gao WY, Guo YQ. Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus*. *Zhonqquo Zhong Yao Za Zhi* 2008; 33(8): 909-11.
45. Tian JK, Sun F, Cheng Y. Chemical constituents from the roots of *Ranunculus ternatus*. *J Asian Nat Prod Res*. 2006; 8(1-2): 35-9
46. Calka O , Akdeniz N, Uce ÖH, Karadağ AS, Behçet L().Irritant contract dermatitis caused by *Ranunculus kotschy* Boiss in 6 cases. *Jhon Wiley & Sons Als. Contract Dermatitis* 2011; 64: 158-184

47. Lingji. Studies on the chemical constituents in *Ranunculus muricatus* L. *Zhongguo Xiandai Yingyong Yanxue* 2009; 26(6): 460-462
48. Lorimer SD, Barns G, Evans AC, Foster LM, May BC, Perry NB, Tangney RS. Cytotoxicity and antimicrobial activity of plants from New Zealand's subantarctic islands. *Phytomedicine* 1996; 2(4): 327-333.
49. Mares D. Antimicrobial activity of protoanemonin, a lactone from Ranunculaceous plants. *Mycopathologica* 1987; 98 (3): 133-140.
50. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Microbiological properties of protoanemonin isolated from *Ranunculus bulbosus*. *Phytother Res* 1993; 7(1): 21-24.
51. Li YL, Ma SC, Yang YT, Ye SM, But SBH. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunye. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 79: 365-368.
52. Viskupicova J, Ondrejovic M, Sturdik E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. *J Food Nutr Res*, 2004; 47 (4), 151–162.
53. Tanker M, Tanker N. *Farmakognozi cilt 1*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Ankara 1991; 66: 180-182.
54. Prieto JM, Braca A, Morelli I, Barker A, Schaffer U. A new acylated quercetin glycoside from *Ranunculus langinosus*, *Fitoterapia* 2004; 75: 533-538.
55. Kähkönen MP, Hopia A, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 3954-3962.
56. Campos MG, Webby RF, Markham KR. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2008; 51: 742-745

57. Pourmorad F, Hosseinimehr S J, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol* 2006; 5(11): 1142–1145.
58. Fuhrman B, Buch S, Vaya J. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(2): 267-75.
59. Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol* 2006; 5, 11: 1142–1145.
60. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arc Biochem Biophys* 1994; 308(1): 278-284.
61. Sertsever A, Gök V,. Doğal antioksidanların biyoyararlılığı, 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2-4 Ekim 2003; 83-98.
62. Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects, Review. *Eur Food Res Tech* 2004; 219: 561-571.
63. Kang J, Xie C, Li Z, Nagarajan S, Schauss AN, Wu T, WuX. Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry* 2011; 128: 152-157.
64. Ru QM, Wang LJ, Li WM, Wang J L, Ding, Y T. In vitro antioxidant properties of flavonoids and polysakkarides extract from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Molecules* 2012; 17: 11281-11291.

65. Hassan E M, Hassan R A , El-Toumy S A, Mohamed S M, Omer E A. Phenolic metabolites and antioxidant activity of *Codiaeum variegatum* CV. Spirale. Journal Of Pharmacy Research 2014; 8(5): 619-623.
66. An F, Yang G, Tian J, Wang S. Antioxidant effects of the orientin and viteksin in *Trollius chinensis* Bunge in D- galactose aged mice. Neural Regen Res. 2012; 7(33): 2565,2575.
67. Terzioğlu S, Yaşar A, Yaylı N, Yılmaz N, Karaoğlu S, Yaylı N. Antimicrobial activity and essential oil compositions of two *Ranunculus* species from Turkey: *R. constantinopolitanus* and *R. arvensis*. Asian Journal of Chemistry 2008; 20(4): 3277-3283.
68. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biol Med 2001; 30(33): 433-446.
69. Zhou Y, Liu YE, Cao J. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. Clin Cancer Res. 2009; 15:5161–5169.
70. Lago J H, Toledo-Arruda A C, Mernak M, Barrosa K H, Martins M A, Iolanda F L C, Prado C M. Review Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. Molecules 2014; 19(3): 3570-95.
71. Chen H, Pu J, Liu D, Yu W, Shao Y, Yang G, Xiang Z, He N. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L). PLoS ONE 2016; 11(4): 1-14.
72. Wieklik M, Luczak M, Panasiak W, Kobus M, Lammer-Zarawska E. Structural basis for antiviral activity of flavonoids-naturally occurring compounds Acta virol 1988; 32(6): 522-5.

73. Gryglewski R J, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemical pharmacology* 1987; 1; 36(3): 317-22.
74. Kawai M, Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Maruta M, Kuwahara Y, Ohkawara T, Hagihara K, Yamadori T, Shima Y, Ogata A, Kawase I, Tanaka T. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergology International* 2007; 56(2): 113-123.
75. Furhman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(3): 549-54
76. Hertog M G L, Feskens E J M , Hollman P C H , Katan M B, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* , 1993; 342: 1007-10
77. Baytop A. *Bitkisel Drogların Anatomik Yapısı, Baha Matbası*, İstanbul, 1972; 26-27.
78. *Deutsches Arzneibuch 10*. Frankfurt Govi- Verlag- GmbH. Stuttgart, Alman Eczacı Yayınevi / Frankfurt am Main, Govi, 1998.
79. *European Pharmacopeia*. Council of Europe, 6TH Edition 2007:1261-1266
80. *U.S. Pharmacopeia, U.S.P.* 1985
81. *Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi*. 2004:117-265
82. Yadav R N S, Agarwala M. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal Of Phytolog* 2011; 3(12):10-14.
83. Sakar K, Tanker M. *Fitokimyasal Analizler*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1991; 67: 118-145.

84. Erdoğan T. Bazı *Ranunculus* türleri üzerinde brine shrimp yöntemiyle sitotoksik aktivite çalışmaları, Ankara Ecz. Fak Derg. 2008; 37(3): 171-177.
85. Finney DJ, Probit Analysis. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1971.
86. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr Protoc Immunol, 2001; 33 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432654>.
87. Franceour A M, Assalian A. Microcat:a Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Based on WST-1. Biochemia 1996; 3: 19-25.
88. De-Li Sun, Han-Bing Xie, Yun-Zhan Xia. A Study on the Inhibitory Effect of Polysaccharides from Radix *Ranunculus ternati* Human Breast Cancer MCF-7 Cell Lines. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013; 10(6): 439–443.
89. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2012.
90. Kaya GI, Somer NU, Konyalıoğlu S, Yalcın HT, Yavaşoğlu U, Sarıkaya B, Onur MA, Antioxidant and antibacterial activities of *Ranunculus marginatus* var. *Trachycarpus* and *R. sprunerianus*. Turkish Journal of Biology, 2010; 34: 1-8
91. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline. M44-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2004.

92. Esmaceli MA, Sonboli A. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food Chem Toxicol* Mar 2010; 48(3): 846-53.
93. <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>
94. Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of Total Phenolics with Phomolybdis-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16: 144-158.
95. Atasağangil M. Biyokimya pratik dersleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Güzel İstanbul matbası 1996; 11: 9-56.98
96. Tamczyk M., Gudej J. Quantitative analysis of flavonoids in the flowers and leaves of *Ficaria verna* Huds. *Z Naturforsch* 2003; 58c: 762-764.
97. Küçüker O, Bitki Morfolojisi I. Kapalı Tohumlu Bitkiler, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları, İstanbul, 1998; 248: 25-30.
98. Hasman M, Bitki anatomisi, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi yay, İstanbul matbaası, 1963; 1003(55): 224-30.
99. Bitki anatomisi, Prof.Dr. Semahat Yentür , İstanbul Üniversitesi yayınları sayı:3808, Fen Fakültesi İstanbul, 2003; 227: 303-355.
100. Fahn A. Plant Anatomy. Pergamon Press 1967; 248-55.
101. Nayak SB, Sandiford S, Maxwell A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2009; 6: 351-356
102. Bhatti M, Ali A, Ahmad A, Saeed A, Malik S. Antioxidant and phytochemical analysis of *Ranunculus arvensis* L. extracts. *BMC Res Notes* 2015; 8:279.
103. Raziq N, Saeed M, Ali M S, Zafar S, Shahid M, Lateef M. A new glycosidic antioxidant from *Ranunculus muricatus* L. (Ranunculaceae) exhibited

lipoxygenasae and xanthine oxidase inhibition properties, Natural Product Research. 2017; 31(11): 1251-1257.

104. So F, Gutherie N, Chambers A, Carroll K. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. Cancer Letters, 1997; 112(2): 127-133

105. Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. Pharmacogn Rev, 2014; 8(6): 122-146

106. McLaughlin, J L. Crown Gall Tumours on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation in Methods Plant Biochemistry, Hostetmann Academic Press, London 1991; 6: 1-32.

107. Meyer B N, Ferrigni NR, Putnam JE, Jakobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, Planta Med., 1982; 49(9): 1217-1219.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İzmir’de doğdum. 2007 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Bölümüne girdim. Haziran 2011’de mezun oldum. 2012 yılında Ege Üniversitesi

Eczacılık Fakóltesi Farmakognozi programında tezli yüksek lisans eğitimime başladım. İzmir'de yaşamaktayım.



