



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr.
**ALKALOİDLERİNİN KİMYASAL ANALİZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Tuba BAYGAR
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışmanlar
Prof.Dr. Keriman GÜNAYDIN
Prof.Dr.Gülaçtı TOPÇU
Şubat, 2010

İSTANBUL



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr.
ALKALOİDLERİNİN KİMYASAL ANALİZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Tuba BAYGAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışmanlar

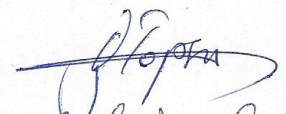
Prof.Dr. Keriman GÜNAYDIN

Prof.Dr.Gülaçtı TOPÇU

Şubat, 2010

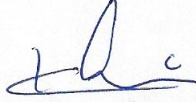
İSTANBUL


Prof. Dr. Keriman Günaydin


Prof. Dr. Gülaçtı Topcu

Bu çalışma 15/02/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

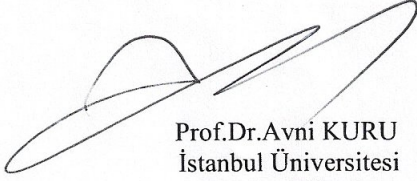
Tez Jürisi



Prof.Dr.Keriman GÜNAYDIN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



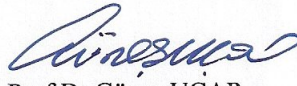
Prof.Dr.Güler TEMİZKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Prof.Dr.Avni KURU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Prof.Dr.Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü



Prof.Dr.Güneş UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Orman Fakültesi

ÖNSÖZ

Bu çalışmada *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisi soğanlarının alkaloidce zengin ekstresi antioksidan, genotoksik, sitotoksik ve antilkolinesteraz aktivitesi bakımından incelenmiş ve taşıdığı alkaloidlerin fraksiyonlandırılması ve izolasyonu yapılarak ekstredeki ana alkaloid olan likorin maddesi elde edilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN ve Sn. Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sn. Yard. Doç. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a, bitkinin teşhisinde yardımcı olan Sn. Doç. Dr. Ömer VAROL'a, tez çalışmam boyunca bilgi ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli dostum Sn. Fatemeh BAHADORİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sn. Mehmet ÖZTÜRK, Sn. Seda Damla HATİPOĞLU, Sn. Mert METİN, Sn. Mehmet BOĞA, Sn. Gülsen TEL'e ve tez çalışmama vermiş olduğu destek dolayısıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bütün hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmam sırasında da göstermiş oldukları anlayış, sabır ve tüm maddi-manevi desteklerinden dolayı sevgili ANNEME ve sevgili BABAMA, canım kardeşim ESRA'ya, sevgili hayat arkadaşım, değerli eşim Taçnur BAYGAR'a ve biricik kızım Ayça BAYGAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2010

Tuba BAYGAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BİTKİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.1.1. Amaryllidaceae Familyasının Genel Özellikleri	3
2.1.2. <i>Sternbergia</i> Walds. & Kit. Cinsinin Genel Özellikleri	5
2.1.3. <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr. Türünün Genel Özellikleri	5
2.2. ALKALOİDLER	7
2.2.1. Alkaloidlerin Sınıflandırılması	9
2.2.1.1. Feniletilamin Alkaloidleri	10
2.2.1.2. Piridin-Pirolidin Alkaloidleri	10
2.2.1.3. Tropan Alkaloidleri (Pirolidin-Piperidin Alkaloidleri)	10
2.2.1.4. İzokinolin Alkaloidleri.....	11
2.2.1.5. Kinolin Alkaloidleri	12
2.2.1.6. Piperidin Alkaloidleri	12
2.2.1.7. İndol Alkaloidleri	13

2.2.1.8. Purin veya Ksantin Alkaloidleri	14
2.3. AMARYLLIDACEAE ALKALOİDLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ	14
2.3.1. Crinine Tip	15
2.3.2. Galanthamine Tip	16
2.3.3. Lycorenine Tip	16
2.3.4. Lycorine Tip	17
2.3.5. Montanine Tip	17
2.3.6. Narciclasine Tip	18
2.3.7. Tazettine Tip	18
2.4. <i>Sternbergia</i> WALDST. & KİT. TÜRLERİ ALKALOİDLERİNİN KİMYASAL ANALİZLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ	22
2.5. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE	24
2.5.1. Antioksidan Çeşitleri	28
2.5.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	28
2.5.2.1. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi	29
2.5.2.2. β -karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)	29
2.6. SİTOTOKSİK AKTİVİTE	29
2.6.1. Brine Shrimp Toksikite Testi	30
2.7. GENOTOKSİK AKTİVİTE	31
2.8. ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTE.....	34
3. MALZEME VE YÖNTEM	36
3.1. BİTKİ MATERYALİ	36
3.1.1. Bitki Ekstresinin Hazırlanması	36

3.2. KİMYASAL ANALİZLER	38
3.2.1. Kolon Kromatografisi	38
3.2.1.1. Alkaloidlerin Kolondan İzolasyonu	39
3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi	40
3.2.3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	40
3.2.4. Nukleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi	40
3.2.5. IR (Infrared-Kırmızı ötesi) Spektroskopisi	40
3.2.6. Kütle Spektroskopisi	40
3.2.7. Erime Noktası	40
3.2.8. Optik Çevirme	40
3.3. EKSTRENİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ	41
3.3.1. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	41
3.3.2. Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi	42
3.4. AKİVİTE ÇALIŞMALARI	43
3.4.1. Antioksidan Aktivite Tayini.....	43
3.4.1.1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi.....	43
3.4.1.2. β-Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini).....	44
3.4.2. Sitotoksik Aktivite Tayini	45
3.4.2.1. Brine Shrimp Toksisite Testi.....	45
3.4.3. Genotoksik Aktivite Tayini	47
3.4.3.1. Kullanılan Bitki Ekstresine Ait Çözeltilerin ve <i>Allium cepa</i> Soğanlarının Hazırlanması	47
3.4.3.2. Makroskobik Analiz	47
3.4.3.3. Mikroskobik Analiz	48

3.4.3.4. Kromozomal Anormallikler.....	48
3.4.4. Antikolinesteraz Aktivite Tayini.....	48
3.5. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN	
CİHAZLAR	49
3.5.1. Rotary Evaporatör	49
3.5.2. Spektrofotometre	49
3.5.3. Mikroplaka Okuyucu	49
3.5.4. Mikroskoplar	49
3.6. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER	50
3.6.1. Kimyasal Maddeler	50
3.6.2. Kullanılan Çözeltiler	50
3.6.2.1. 0,1 mM DPPH Çözeltisi	50
3.6.2.2. β -karoten-Linoleik Çözeltisi	50
3.6.2.3. % 2'lik Na_2CO_3 Çözeltisi	50
3.6.2.4. % 10'luk Alüminyum Nitrat Çözeltisi	50
3.6.2.5. 1 M Potasyum Asetat Çözeltisi	51
3.6.2.6. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	51
3.6.2.7. % 2 Asetoorsen	51
3.6.2.8. Fosfat Tamponu	51
3.6.2.9. DTNB Çözeltisinin Hazırlanması	52
3.6.2.10. Asetilkolin iyodür Hazırlanması.....	52
3.6.2.11. Bütirilkolin iyodür Hazırlanması	52
3.6.2.12. Dragendorff Belirtecini Hazırlanması.....	52
3.6.2.13. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar.....	52
3.6.2.14. Kaya Tuzu	52
3.6.2.15. Yapay Deniz Suyu	52

3.7. İSTATİSTİK HESAPLAMALAR	53
4. BULGULAR	54
4.1. KİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI	54
4.2. EKSTRENİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT İÇERİĞİ	81
4.3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI	82
4.3.1. β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)	82
4.3.2. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi	83
4.4. SİTOTOKSİK AKTİVİTE SONUÇLARI	84
4.5. GENOTOKSİK AKTİVİTE SONUÇLARI	84
4.5.1. Makroskobik Analiz	84
4.5.2. Mikroskobik Analiz	86
4.5.3. Kromozomal Anormallikler.....	90
4.6. ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTE SONUÇLARI	95
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	97
6. KAYNAKLAR	100
7. ÖZGEÇMİŞ	110

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 : Muğla Merkez ilçesi Düğerek mevkiinden <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr.'a ait bir görünüm.....	6
Şekil 2.2 : Efedrin' in yapısı	10
Şekil 2.3 : Nikotin' in yapısı	10
Şekil 2.4 : Kokain' in yapısı	11
Şekil 2.5 : Novocaine (Procaine)' in yapısı	11
Şekil 2.6 : Morfin' in yapısı	11
Şekil 2.7 : Kodein' in yapısı	12
Şekil 2.8 : Kinin' in yapısı	12
Şekil 2.9 : Coniine' nin yapısı	13
Şekil 2.10 : Gramine' nin yapısı	13
Şekil 2.11 : Ergometrin'in yapısı	13
Şekil 2.12 : Kafein' in yapısı	14
Şekil 2.13 : Teobromin' in yapısı	14
Şekil 2.14 : Haemanthamine.....	15
Şekil 2.15 : Elwesine	15
Şekil 2.16 : Galanthamine	16
Şekil 2.17 : Hippeastrine	16
Şekil 2.18 : Lycorine	17
Şekil 2.19 : Pancracine..	17
Şekil 2.20 : Narciclasine	18
Şekil 2.21 : Tazettine	18
Şekil 3.1 : Ekstrelerin hazırlanışı	37
Şekil 3.2 : Pirokatekolün ölçü grafiği	41
Şekil 3.3 : Kersetinin ölçü grafiği	42
Şekil 3.4 : <i>Artemia salina</i> yumurta kistleri ve larvası	46
Şekil 4.1 : (-)-Likorin.....	54
Şekil 4.2 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-) likorinin IR spektrumu.....	58
Şekil 4.3 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorine ait kütle spektrumu (HRMS)	59
Şekil 4.4 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorinin ¹ H NMR spektrumu	60
Şekil 4.5 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)- likorinin ¹ H NMR spektrumu	61
Şekil 4.6 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorinin ¹ H NMR spektrumu	62
Şekil 4.7 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorinin ¹ H NMR spektrumu	63
Şekil 4.8 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorinin ¹ H NMR spektrumu.....	64
Şekil 4.9 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorinin ¹³ C (BB) NMR spektrumu.....	65
Şekil 4.10 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (-)-likorinin ¹³ C (BB) NMR spektrumu	66

Şekil 4.11 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin ¹³ C (BB) NMR spektrumu	67
Şekil 4.12 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin ¹³ C (APT) NMR spektrumu.....	68
Şekil 4.13 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin ¹³ C (APT) NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.14 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu.....	70
Şekil 4.15 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu	71
Şekil 4.16 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu	72
Şekil 4.17 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu	73
Şekil 4.18 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu	74
Şekil 4.19: <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu	75
Şekil 4.20 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu	76
Şekil 4.21 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu	77
Şekil 4.22 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu	78
Şekil 4.23 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu	79
Şekil 4.24 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.' den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu	80
Şekil 4.25 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin β-karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesi	82
Şekil 4.26 : <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (%)......	83
Şekil 4.27 : Uygulama dozlarına göre 48, 72 ve 144 saat uygulamalı örneklerin ortalama kök uzunlukları (cm.).....	85
Şekil 4.28 : Kontrol grubu hücrelerinde gözlenen normal mitoz bölünme evreleri..	87
Şekil 4.29 : Uygulama dozlarına göre 48 saat uygulama süreli örneklerde mitoz evrelerindeki ortalama hücre sayısı.....	88
Şekil 4.30 : Uygulama dozlarına göre 48 saat uygulamalı örneklerde mitotik indeks (MI)	89
Şekil 4.31 : Uygulanan dozların ardından kromozomlarda gözlene anormallikler..	91
Şekil 4.32 : Doz artışına bağlı olarak gözlenen ortalama anormal bölünen hücre çeşitleri.....	92
Şekil 4.33 : Doza bağlı olarak % anormal bölünen hücre sayısındaki artış	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Reaktif Oksijen Türleri.....	26
Tablo 2.2 : Reaktif Azot Türleri.....	26
Tablo 3.1 : Toksisite derecesinin değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler.....	46
Tablo 3.2 : Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar.....	52
Tablo 4.1 : Kuru bitki miktarı, ekstre miktarları ve % verimleri.....	54
Tablo 4.2 : (–)-Likorin’in NMR Spektral Verisi.....	55
Tablo 4.3 : <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid içeren ekstresinin toplam fenolik ve toplam flavonoit içeriği.....	81
Tablo 4.4 : <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid içeren ekstresinin β -Karoten-Linoleik Asit yöntemine göre antioksidan aktivitesi.....	82
Tablo 4.5 : <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid içeren ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi	83
Tablo 4.6 : <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid içeren ekstresinin Brine-Shrimp Toksisite Testi sonucu ve LC ₅₀ değeri	84
Tablo 4.7 : Uygulama dozlarına göre 48, 72 ve 144 saat uygulamalı örneklerin ortalama kök uzunlukları (cm) ve standart sapma değerleri.....	84
Tablo 4.8 : Kök uzunluklarının kontrol grubu kök uzunluğunun % olarak oranı..	85
Tablo 4.9 : Uygulama doz ve süresine (48 saat) bağlı olarak gözlenen mitoz safhalarındaki ortalama hücre sayısı, standart sapma değerleri ve gruplar arası önem durumları.....	88
Tablo 4.10 : Doz ve uygulama süresine göre mitotik indeks (MI).....	89
Tablo 4.11 : Uygulama dozuna bağlı olarak gözlenen ortalama anormal bölünen hücre sayıları	92
Tablo 4.12 : Ortalama anormal bölünen hücre sayısının toplam mitoz bölünen hücre sayısının % ‘si olarak değeri.....	93
Tablo 4.13 : <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid içeren ekstresinin Antikolinesteraz aktivitesi	96
Tablo 4.14 : <i>S. fischeriana</i> (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden izole edilen likorin alkaloidinin Antikolinesteraz aktivitesi	96

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Al(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	: Alüminyum nitrat nona hidrat
CD ₃ OD	: Dötoro metanol
CH	: Karbon-Hidrojen Bağı
CH ₂	: Metilen
CH ₃	: Metil
CH ₃ COOH	: Asetik asit
CHCl ₃	: Kloroform
cm	: Santimetre
d	: Dublet
dd	: Dublet dublet
g	: Gram
H	: Hidrojen
IC ₅₀	: İnhibisyon Konsantrasyonu (%50 madde konsantrasyonu için)
J	: Etkileşme Sabiti
L	: Litre
LC ₅₀	: Letal Konsantrasyon (% 50 ölüm oranı için)
LD ₅₀	: Letal Doz (% 50 ölüm oranı için)
ln	: Doğal logaritma
M	: Molar
m	: Multiplet
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
MI	: Mitotik İndeks
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	: Sodyum fosfat dibazik dihidrat
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	: Sodyum fosfat monobazik dihidrat
°C	: Santigrat derece
OH	: Hidroksil grubu
PEs	: Pirokatekole eşdeğer
ppm	: Milyonda bir birim
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
t	: Triplet
UV	: Ultraviyole
w/v	: Ağırlık/hacim
α	: Alfa
β	: Beta
λ	: Dalga boyu

ÖZET

***Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. ALKALOİDLERİNİN KİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ ***

Bu çalışmada, *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisi soğanlarının alkaloidce zengin ekstresi antioksidan, genotoksik, sitotoksik ve antikolinesteraz aktivitesi bakımından incelenmiş ve taşıdığı alkaloidlerin kolon ve ince tabaka kromatografisi yöntemleriyle fraksiyonlandırılması ve izolasyonu yapılarak ekstredeki ana alkaloid olan likorin maddesi elde edilmiştir.

S. fischeriana (Herbert) Rupr. soğanlarının alkaloidce zengin ekstresinin antioksidan aktivite potansiyeli başlıca iki yöntem olan DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi ve β -karoten-linoleik asit yöntemleriyle incelenmiştir. Ekstrenin genotoksik aktivitesi *Allium* testi uygulanarak araştırılmış, Brine Shrimp metodu ile ise sitotoksitesi belirlenmiştir. Ekstrenin ve likorinin antikolinesteraz aktivitesi ise başlıca iki enzime, asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE), karşı % inhibisyon olarak ölçülmüştür.

Bitkinin alkaloidlerini elde etmek için *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. yumrularından (soğanlarındaki) hazırlanan direkt metanol ekstresinden alkaloidce zengin kloroform ekstresi elde edilmiş, bu ekstreden de kolon kromatografisi ve müteakiben preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleriyle elde edilen alkaloidlerden likorin kristalizasyonla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu alkaloidin yapısının (–)-likorin olduğu tek ve çift dimensiyonlu nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, infrared (IR) ve kütle spektroskopisi teknikleri ile aydınlatılmıştır. *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid ekstresinin antioksidan aktivitesi değerlendirildiğinde, ekstrenin yüksek bir DPPH serbest radikal giderim aktivitesi gösterdiği, ancak β -karoten - linoleik asit yönteminde daha düşük aktivite gösterdiği yani lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitesinin zayıf olduğu belirlenmiştir. *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid ekstresinin Brine Shrimp Toksisite analizine göre sitotoksik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Genotoksitenin belirlenmesi amacıyla uygulanan *Allium* testi sonucunda ise *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid ekstresinin *Allium cepa* kök ucu meristem dokusunda mitoz bölünmekte olan hücreleri etkileyerek, mitoz bölünmeyi baskıladığı ve uygulanan ekstrenin doz artışına bağlı olarak kromozomal anormalliklere neden olduğu, anormal bölünen hücre sayısının da doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda, *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloidce zengin soğan ekstresinin oldukça yüksek antikolinesteraz aktivite gösterdiği, fakat BChE enzimine karşı AChE'den daha yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın, saf alkaloid likorinin AChE enzimine karşı daha yüksek inhibisyon göstermesi alkaloid ekstresinin içinde BChE enzimini inhibe edecek alkaloid yüzdesinin daha fazla olabileceğine işaret etmiştir. Elde edilen tüm veriler, ileride yapılacak çalışmalara kaynak oluşturabilecek nitelikte olup, konu üzerindeki araştırmalar devam edecektir.

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından 3487 no ile desteklenmiştir.

SUMMARY

CHEMICAL ANALYSIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ALKALOIDS FROM *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.[†]

In this study, the alkaloid-rich extract of bulbs of *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. was evaluated for its antioxidant, cytotoxic, genotoxic and anticholinesterase activities, and the main alkaloid lycorine was obtained by fractionation and isolation studies through column and preparative thin layer chromatography from its alkaloid-rich extract.

The antioxidant activity potential of the alkaloid-rich extract of the bulbs of *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. was investigated, namely by two complementary test systems, the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical scavenging method and total antioxidant activity (β -carotene - linoleic acid) method. Genotoxic activity was investigated by the application of the Allium test while Brine Shrimp Toxicity Assay was used for evaluating the cytotoxicity of the extract. Anticholinesterase activity of both extract and lycorine was measured against the two enzymes, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), as inhibition (%) value.

For the isolation of alkaloids of *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. from the prepared bulb extract, an alkaloid-rich chloroform extract was first obtained, and then alkaloids were obtained through column chromatography from this extract, and subsequently by preparative thin layer chromatography technique was used to afford lycorine which was purified by crystallization. The structure of this pure alkaloid was elucidated as (-)-lycorine based on 1D- and 2D-NMR (Nuclear Magnetic Resonance), IR (Infrared) and Mass spectroscopic techniques. Taking into consideration of the antioxidant activity results, the alkaloid extract exhibited high DPPH free radical scavenging activity, although the total antioxidant (lipid peroxidation inhibition activity) activity was found to be low which indicated a weak inhibition capacity of the extract on the lipid peroxidation. *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid-rich extract also showed cytotoxic effect on the Brine Shrimp Toxicity Assay. According to the results of Allium test for genotoxicity, *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid extract is depressed the mitosis by affecting the meristematic cells of *Allium cepa* roots during mitosis, and caused increased chromosomal aberrations as dose-dependent manner. The chromosomal aberrations were further increased by the increase of dose and application time.

As the result, the *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. bulb alkaloid extract exhibited high anticholinesterase activity showing higher inhibition value to the BChE enzyme rather than AChE. In contrary, a higher inhibition value was obtained by the isolated pure (-)-lycorine against AChE enzyme. These results indicate that the alkaloids may play a role as BChE inhibitors rather than AChE and probably are present in the extract with a higher percentage. The data obtained here are expected to constitute a base for the further studies, and the studies on *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. will be continued.

[†] This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University by a Project, numbered 3487.

1. GİRİŞ

Bitkiler çok eski zamanlardan beri insanlar tarafından değişik şekillerde değerlendirilmiştir. İnsanlar bitkileri gıda, yakacak, ilaç veya mesken yapımı için kullanmışlardır (Baytop, 1984). İlk yazılı tarih kaynaklarında insanların çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkilerden yiyerek veya çeşitli droglar hazırlayarak yararlandıkları belirtilmiştir (Başer, 1997). Bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanılmasının ilk bilimsel izleri ve yazılı delilleri 5000 yıl öncesi Çin, Hint ve Yakındoğu medeniyetlerine kadar uzanmaktadır. Daha sonraları doğal ilaçların sentetik türevleri sentezlenerek insanların hizmetine sunulmuştur (Baytop, 1984).

Son yıllarda bitkiler sahip oldukları çeşitli aktif maddeler nedeniyle ülkemizdeki birçok bilim adamının ilgisini çekmektedir. Amaryllidaceae ailesi bitkileri, içerdikleri aktif maddeler ve özellikle alkaloidler açısından ilaç ve tıp dünyasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Ülkemiz florasında yaklaşık olarak 10.000 kadar tür yetişmekte ve bunlardan 650 kadarı halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Baytop, 1984).

Tıbbi önemi olan Amaryllidaceae familyasına ait birçok türde biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olmasına rağmen, *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinin alkaloidlerine ait genotoksik, sitotoksik ve antikolinesteraz aktivitesi çalışmalarına literatürde pek rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisi soğanlarının alkaloidce zengin ekstresi antioksidan, genotoksik, sitotoksik ve antilkolinesteraz aktiviteleri bakımından incelenmiş ve taşıdığı alkaloidlerin fraksiyonlandırılması ve izolasyonu yapılarak ekstredeki ana alkaloid olan likorin maddesi elde edilmiştir. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğanlarının alkaloidce zengin ekstresinin antioksidan aktivite potansiyeli başlıca iki yöntem olan DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi ve β -karoten-linoleik asit yöntemleriyle incelenmiştir. Ekstrenin genotoksik aktivitesi Allium testi uygulanarak araştırılmış,

Brine Shrimp metodu ile sitotoksisitesi belirlenmiştir. Ekstrenin ve likorinin antikolinesteraz aktivitesi ise başlıca iki enzime, asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE), karşı % inhibisyon olarak ölçülmüştür.

2. GENEL KISIMLAR

2. 1. BİTKİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

2. 1. 1. Amaryllidaceae Familyasının Genel Özellikleri

Türkiye dünyanın en zengin floristik merkezlerinden biridir. Bunun nedeni yurdumuzun jeolojik yapısı, iklimsel durumu ve Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz olmak üzere üç farklı fitocoğrafik bölgeye sahip olmasıdır (Güner, 1994). Yurdumuz geofit adı altında toplanan soğanlı, rizomlu, tuberli bitki türleri açısından çok zengindir. Geofitler toprak altında soğan, yumru ve rizom gibi gıda maddesi depo eden özelleşmiş toprak altı gövdeleri taşıyan otsu bitkilerdir (Çetik, 1973).

Geofitler, bitkiler aleminde Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) bölümünde Kapalı Tohumlu Bitkiler alt bölümünde yer alır. Bu grup Tek Çenekli Bitkiler (Liliopsida) ve Çift Çenekli Bitkiler (Magnoliopsida) olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Seçmen ve diğ., 1998).

Geofitler çoğunlukla ilkbahar ve sonbahar aylarında toprak üzerinde görülmektedir. İlkbahar ve sonbahar aylarında yağmurların başlaması ve sıcaklığın normale dönmesi ile hızlı bir gelişme göstererek yaprak, çiçek ve tohum oluşturmaktadırlar (Koyuncu, 1994).

En son düzenlemelere göre yurdumuzdan ihraç ettiğimiz geofitler 14 cinse ait 21 türü kapsamaktadır. Bu 21 türün 6'sı sadece kültürü yapılarak üretilenlerden, 4'ü hem üretim hem de doğadan, 11'i ise yalnızca doğadan toplanarak ihraç edilmektedir. Üretimden ihraç edilen *Lilium candidum* (Liliaceae) ve *Sternbergia lutea* (Amaryllidaceae) türleri hariç, diğer tüm geofitler – üretim veya doğadan yapıldığına bakılmaksızın – kontenjane tabi olarak ihraç edilmektedir. Bu türlerin kontenjanları 1.000–7.000.000 adet arasında, toplam ihracat miktarları da yıllara göre 27 ile 30 milyon adet arasında değişmektedir (Arslan ve diğ., 2004).

Sternbergia cinsinin de dahil olduğu Amaryllidaceae familyasına ait cins ve türlerin büyük çoğunluğu süs bitkisi olarak dış ve iç mekanlarda kullanılmaktadır. Amaryllidaceae familyası yurdumuzda - ithal yoluyla getirilip süs bitkisi olarak çoğaltılanlar hariç- 5 cins ve 33 türle temsil edilmektedir. Bunlardan *Galanthus elwesii*, *G. woronowii*, *Leucojum aestivum* ve *Sternbergia lutea* türlerinin soğanları ihraç edilmektedir (Arslan ve diğ., 2004).

Liliales ordosuna ait olan Amaryllidaceae (Nergisgiller) familyası, 85 cinse ait yaklaşık 1100 tür içeren bir bitki topluluğudur (Ünver, 1999). Amaryllidaceae familyası bitkileri tek çenekli, tropik ve subtropik bölgelerde yayılma gösteren ve toprakaltı kısımları soğan, kormus veya rizom şeklinde olan çok yıllık otsu bitkilerdir. Yaprakları yassı, linear, bazen etli, sert ve liflidir. Liliaceae' ye benzeyen bu familya, ovaryumun alt durumlu olması, perigonun bazen parakorolla taşıması ve yapraklarının hiçbir zaman kladot şekline dönüşmemiş olması gibi özellikleriyle ondan ayrılır. Çoğu güzel çiçekli olduğu için süs bitkisi olma yönünden önemli bir familyadır (Tanker ve diğ., 1998). Amaryllidaceae bitkilerinin kokuları, esans endüstrisinde oldukça değerlidir. Bu nedenle uçucu bileşenleri oldukça ilgi çekmektedir (Amina ve diğ., 2008).

Amaryllidaceae türleri (Nergisgiller) soğanlı bitkiler olup, yıl boyunca yeraltında (toprağın içinde) olmalarına rağmen, bahar aylarında renkli çiçekler açarlar. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinin taksonomideki yeri aşağıdaki gibidir (Davis, 1984).

Takım	: Liliales
Familya	: Amaryllidaceae
Cins	: <i>Sternbergia</i> Waldstein & Kitaibel
Tür	: <i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr.

Bu çalışmada *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisi çalışılmıştır.

2. 1. 2. *Sternbergia* Walds. & Kit. Cinsinin Genel Özellikleri

Amaryllidaceae familyasının bir üyesi olan *Sternbergia* Walds. & Kit. (*Sternbergia* Waldstein & Kitaibel) cinsi dünyada Batı Avrupa'dan Orta Asya'ya kadar yayılmış 9 türü bulunan ve Türkiye'de ise 7 türle temsil edilen bir cinstir. Bu cinsin *S. schubertii* Schenk ve *S. candida* Mathew & Baytop türleri Türkiye (Batı Anadolu) için, *S. greuterina* Kamari & Artelari ise Yunanistan (Güney Ege adaları) için endemiktir. *S. pulchella* Suriye ve Lübnan'da, *S. chusiana* (Ker-Gawler) Ker-Gawler ex Sprengel. ve *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. Anadolu ve Asya'da, *S. colchiciflora* Waldst. & Kit. Güney Avrupa, Balkanlar, Batı Suriye, İran, Kırım ve Kafkasya'da, *S. sicula* Tinea ex Guss. Ege adaları, İtalya, Sicilya, Yunanistan ve Batı Anadolu'da, *S. lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel ise İspanya'dan Türkiye'ye kadar uzanan alanlarda yayılış göstermektedir (Dane, 1999).

15.11.2008 tarih ve 27055 sayılı T.C. Resmi Gazete'de yayınlanan Doğal Çiçek Soğanlarının 2009 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ (No: 2008/62)'de *Sternbergia lutea* hariç tüm *Sternbergia* türlerinin doğadan toplanarak soğanlarının ihraç edilmesi yasaklanmıştır (T.C. Resmi Gazete, 2008). Bu cinse ait bitkiler çağlardan beri dekoratif amaçlı olarak kullanmakla beraber, kültüre alınmaları pek yaygın değildir (Morales ve Castillo, 2004).

2. 1. 3. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. Türünün Genel Özellikleri

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğanı 2.5-3.5 cm. çapındadır. 4 ile 7 adet yaprağa sahip olmakla beraber, yapraklar ve çiçek birlikte gelişim gösterir ve düz, damarsız veya çok az damarlı, 6-12 mm. genişliğinde, gri-yeşil veya parlak yeşil renktedir. Çiçeklenme döneminde, çiçek sapının toprak üstü kısmı yaklaşık 3-15 cm. uzunluğundadır. Çiçek rengi genellikle açık sarıdır, çiçekler sessil veya yaklaşık 5 mm. uzunluğunda çiçek sapı üzerinde yer alır (Davis, 1984; Dostbil ve Ağaoğlu, 2003). Çiçeklenme dönemi yılın 1. ile 3. ayları arasındadır (Duman ve diğ., 2002).

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. türü hem kesintili yayılış göstermekte hem de bulunduğu lokasyonlarda oldukça az fertle temsil edilmektedir. Ayrıca gösterişli çiçeklere sahip olması nedeniyle az da olsa soğanları toplanmaktadır. Bu nedenle

populasyonlar gittikçe zayıflamaktadır. Ülkemizdeki nadir bitkilerden biri olarak kış nergisinin doğal yaşam alanlarında korunması önemlidir.

Türkiye Bitkileri Veri Servisi (TUBİVES) veri tabanlarına göre *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. taksonu Türkiye’de C2, C5 ve C6 karelerinde bulunmaktadır (Anon, 2009a).

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr., ormanlık alanlar, çalılıklar, maki içi ve açıklıkları ile taşlı yamaçlarda, deniz seviyesi ile 1.800 m. rakımlı bölgeler arasında yayılış gösterir. Kalkerli yataklardan oluşan organik madde bakımından zengin toprakları tercih eder. Ülkemizde Akdeniz, Güney ve Batı Anadolu ile Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi’nde yetiştiği bilinen bir türdür (Duman ve diğ., 2002).

Bitki İngilizce’de “*Black crocus*” ve “*Autumn daffodil*” gibi isimlerle bilinmektedir (Dostbil ve Ağaoğlu, 2003; Anon, 2009b). Türkiye’de ise “Kış nergisi” veya “Tavuk çiçeği” olarak bilinmektedir (Anon, 2009c). Şekil 2.1’de Muğla Merkez ilçesinden topladığımız *S. fischeriana* (Herbert) Rupr.’ a ait bir fotoğraf verilmektedir.



Şekil 2.1 : Muğla Merkez ilçesi Düğerek mevkiinden *S. fischeriana* (Herbert) Rupr.’ a ait bir görünüm.

2. 2. ALKALOİDLER

Bitkiler çok çeşitli organik bileşikler üretmektedir. Bunlardan karbonhidratlar, yağlar, amino asitler ve nükleik asitler primer metabolitler olup tüm bitkilerde bulunur ve esansiyel olarak metabolik görevlere sahiptir (Croteau ve diğ., 2000). Bitkilerin sekonder metabolitler olarak adlandırılan diğer organik bileşikleri ise başlıca terpenoidler, alkaloidler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşiklerden oluşmaktadır ve çoğunluğu direkt olarak bitkinin büyüme ve gelişmesinde yer almamaktadır. NAPRALERTSM veri bankasının güncel analiz bulgularına göre tanımlanmış 150.000 doğal ürün içerisinde yaklaşık 27.000 bilinen alkaloid bitkiler, mantarlar, deniz mikroorganizmaları, memeliler gibi çok çeşitli organik kaynaklardan izole edilmiştir. Sadece bitki kökenli olan alkaloidlerin sayısı ise 22.000'den fazladır (Jin, 2005).

Alkaloid terimi, "alkali" kelimesinin kökenlendiği Arapça *al-qali* (soda külünün ön formu) adından türevlenmektedir (Kutchan, 1995). Alkaloidler (alkali-benzeri bileşikler), farmakolojik olarak aktif ve nitrojen içeren bazı bileşenler olarak tanımlanmaktadır (Croteau ve diğ., 2000). Yapıdaki nitrojen atomu, heterosiklik sistemin üzerinde bulunur (Halfon, 2005).

Alkaloid kullanımına ilişkin en erken kayıtlar M.Ö. 3000 yıllarında Sümerler'de güçlü narkotik etkilere sahip haşhaş (afyon çiçeği), *Papaver somniferum*, bitkisinin yetiştirilmesinin resmedildiği taş tabletlere dayanmaktadır ve bitki burada "mutluluğun çiçeği" olarak ifade edilmiştir (Beyer ve diğ., 2009).

1800'lü yılların başında Alman bilimadamı Friederic Wilhelm Adam Sertürner tarafından gerçekleştirilen morfinin izolasyonu, bilinen ilk saf doğal madde izolasyonudur. Afyondan morfinin izolasyonu, ilaç endüstrisi ve farmakolojinin gelişiminde de yeni ufuklar açmış bir gelişmedir. 1827 yılında Heinrich Emanuel Merck of Darmstadt ticari olarak morfin satmaya başlamış ve bu büyük şirketin gelişim dönemi böylece başlamıştır (Huxtable ve Schwanz, 2001).

İnsanlardan izole edilen alkaloidlerin sayısı fazla olmasına rağmen, bilinen en iyi alkaloid kaynakları bitkiler, mantarlar, bakteriler, sucul hayvanlar ve mikroorganizmalardır (Cordell ve diğ., 2001).

İzole edilen ilk alkaloid morfin (1803-1804 DEROSNE ve SEGUIN, 1805 SERTÜRNER), sentezi yapılan ilk alkaloid kinin (1886 LADENBURG) ve tedavide kullanılan, az veya çok temizlenmiş ilk alkaloid striknin (1821 MAGENDİE)'dir (Tanker ve Tanker, 1990).

Morfinin keşfinden sonra yaklaşık 12.000 alkaloid izole edilmiştir. Çiçekli bitkilerin yaklaşık % 20'si alkaloid üretmektedir. Bazı bitkiler, örneğin cezayir menekşesi *Catharanthus roseus*, 100'den fazla monoterpen indol alkaloidi içermektedir (Croteau ve diğ., 2000).

Alkaloidler, amino asit metabolizmasında yan ürün olarak görülmektedir. Gerek zehirli yapıları gerekse acı tatları nedeniyle bitkileri koruma özelliğine sahiptirler. Alkaloidler ayrıca protein sentezinde yedek materyal olarak görev alabilmektedir. Bazı alkaloidler ise tıpkı hormonlar gibi düzenleyici ve uyarıcı etki göstermektedir (Halfon, 2005).

Alkaloidler bitkilerde köklerde (örneğin rezerpin), yapraklarda (örneğin nikotin), kabukta (örneğin kinin) ve meyvalarda (örneğin striknin) bulunurlar. Genellikle asetik, sitrik, okzalik, malik ve tartarik asit gibi çeşitli bitki asitlerinin tuzları şeklinde yer alırlar (Halfon 2005).

Alkaloidler bitkilerde hücre özsuyunda erimiş olarak bulunurlar. Nadir olarak serbest halde, genellikle ise tuzları halindedirler. Hücrelerde bulunan organik asitler; süksinik, tannik asitler ve bazı özel asitler (akonitik asit, mekonik asit, kinik asit) de alkaloidler ile tuz oluşturur (Uçar, 2004).

Alkaloidlerin tam bir tanımını yapmak gerekirse; bitkilerden elde edilen ve az miktarda bile çok yüksek fizyolojik ve farmakodinamik aktivite gösteren, halka içinde bir veya daha fazla N (azot) atomu taşıyan, bazik reaksiyon gösteren maddelerdir (Uçar, 2004).

Alkaloidler kimyasal olarak amonyağa benzer bileşiklerdir. Molekülünde oksijen bulunanlar genellikle sıvı, uçucu ve kuvvetli kokuludur. Diğerleri ise katıdır. Genel olarak suda az, organik çözücülerde ise çok çözünürler ve acı bir tatları vardır (Uçar, 2004).

Alkaloidler kimyasal yapılarına göre; Pseudo Alkaloid (heterosiklik azot halkası içerirler ancak azot kaynağı aminoasit değildir.), Proto Alkaloid (azot halka içinde değil, yan zincirlerde bulunur.) ve Gerçek Alkaloidler (heterosiklik azot halkası içerirler ancak azot kaynağı aminoasittir.) olarak ayrılırlar (Uçar, 2004).

Alkaloidlerin kullanım alanları çok geniştir. Çok eski yıllardan beri tedavide kullanılmaktadır. Çünkü çok az miktarlarda bile çok yüksek fizyolojik aktiviteye sahiptirler. Değişik alkaloid grupları antienflamatuvar, antispazmodik, antibakteriyel, göz tedavisinde, kusturucu, hipnotik olarak, analjezik, kanser tedavisinde, afrodizyak, yüksek tansiyonun önlenmesinde, fare zehiri, halüsinojenik, psikoregülatif ve insektisid olarak kullanılmaktadır (Uçar, 2004).

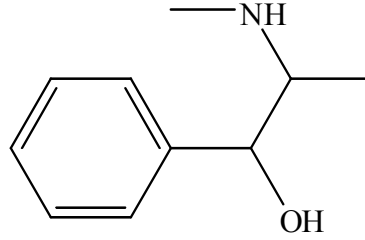
2. 2.1. Alkaloidlerin Sınıflandırılması

Alkaloidler, doğal ürünler arasında en fazla çeşitlilik gösteren yapılardır. Ana halkanın yapısına göre alkaloidleri aşağıdaki şekilde sınıflandırmak mümkündür (Halfon, 2005):

1. Feniletilamin alkaloidleri
2. Piridin-pirolidin alkaloidleri
3. Pirolidin-piperidin (Tropan) alkaloidleri
4. Piridin ve piperidin alkaloidleri
5. Kinolin alkaloidleri
6. İzokinolin alkaloidleri
7. İndol alkaloidleri
8. Purin alkaloidleri

2. 2. 1. 1. Feniletilamin Alkaloidleri

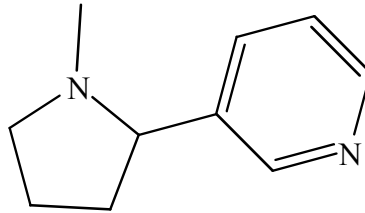
Ephedra türlerinde bulunan efedrin, insanlarda adrenal bezler tarafından stres, korku ve heyecan durumlarında salgılanan adrenal ve noradrenalin hormonlarına benzer fizyolojik etkiye sahiptir (Halfon, 2005). Fenilalanin amino asiti, efedrin biyosentezinde öncü moleküldür (İzhaki, 1998). Amfetamin, metamfetamin, meskalin alkaloidleri de feniletilamin alkaloidlerine örnek olarak verilebilir (Halfon, 2005).



Şekil 2.2 : Efedrin' in yapısı.

2. 2. 1. 2. Piridin-Pirolidin Alkaloidleri

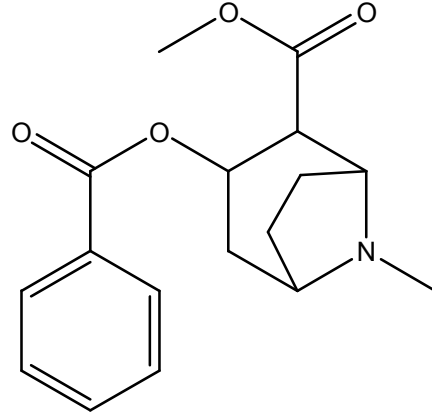
Piridin alkaloidleri, bir piridin çekirdeği ve bir pirolidin veya bir piperidin ünitesi içeren bileşiklerdir. Pirolidin halkası nikotin, piperidin halkası ise anabasin alkaloidinde görülmektedir (Aniszewski, 2007). En bilinen piridin-pirolidin alkaloidi Solanaceae familyasında bulunan nikotindir. Tütünün temel alkaloid içeriği olan nikotin, yapraklarda % 4 ile % 6 oranında bulunmaktadır (Halfon, 2005).



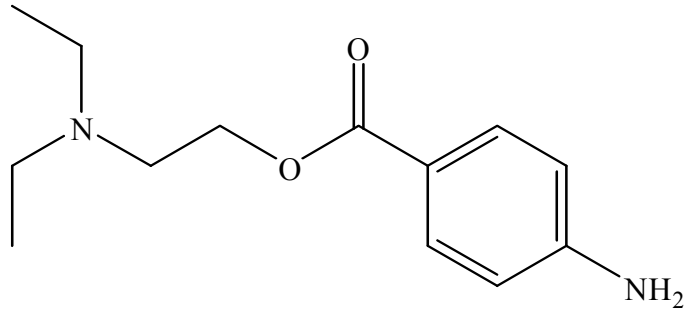
Şekil 2.3 : Nikotin' in yapısı.

2. 2. 1. 3. Tropan Alkaloidleri (Pirolidin-Piperidin Alkaloidleri)

Tropan alkaloidleri, pirolidin ve piperidin halkaları içeren bisiklik yapıdaki alkaloidlerdir. Tropan alkaloidlere örnek olarak oftalmik çalışmalarda göz bebeklerini büyütmek üzere kullanılan atropin (Solanaceae) ile mental ve fiziksel uyarıcı kokain (*Erythroxylum coca*) verilebilir (Halfon, 2005).



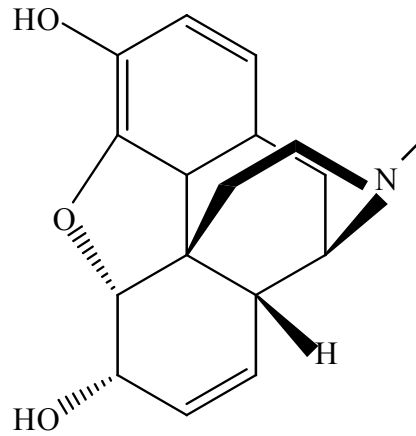
Şekil 2.4 : Kokain' in yapısı.



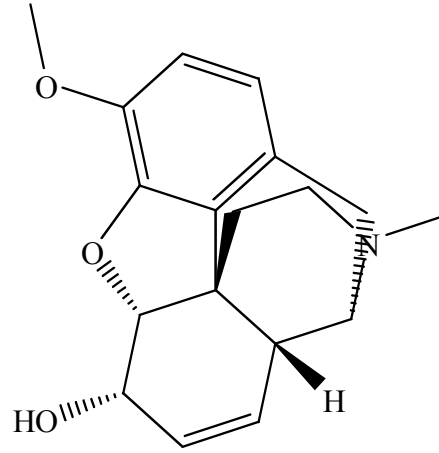
Şekil 2.5 : Novocaine (Procaine)' in yapısı.

2. 2. 1. 4. İzokinolin Alkaloidleri

Bu grup alkaloidlerden en bilineni morfindir. *Papaver somniferum* bitkisinden elde edilen afyonun % 10'u morfindir. Afyon bitkisi, morfin dışında, tamamı ağrı kesici özelliğe sahip yirmi kadar alkaloid içermektedir. Bunlardan kodein, güçlü bir antitussif (öksürüğe karşı) etkiye sahiptir (Halfon, 2005).



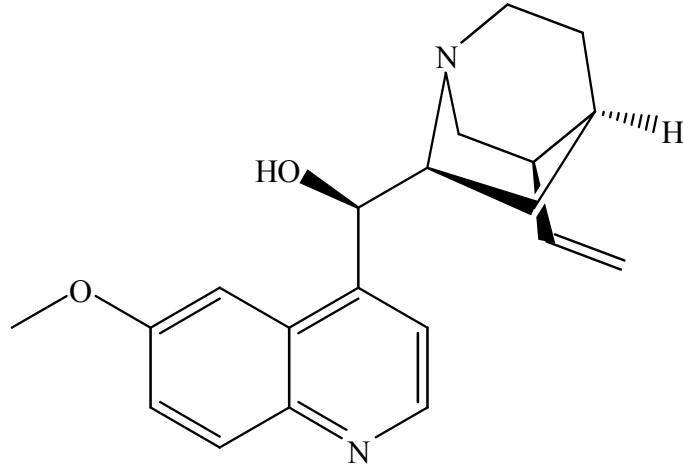
Şekil 2.6 : Morfin' in yapısı.



Şekil 2.7 : Kodein' in yapısı.

2. 2. 1. 5. Kinolin Alkaloidleri

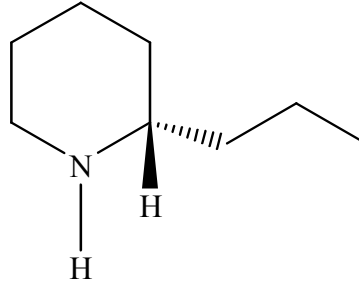
Kinin, Güney Amerika'da yetişen Cinchona ağacının aktif bileşenini oluşturur. 1800'lü yıllarda sıtma hastalığının tedavisinde kullanılırken, günümüzde kinin yerine klorokin kullanılmaktadır (Halfon, 2005).



Şekil 2.8 : Kinin' in yapısı.

2. 2. 1. 6. Piperidin Alkaloidleri

M.Ö. 399 zamanında Filozof Socrates'in intihar etmek için kullandığı "Hemlock" (baldıran otu) zehirinin yapısında bulunan ve ayrıca oldukça toksik olan ve motor sinir uçlarında paralize neden olan bir tür piperidin alkaloid coniine, ilk sentezlenen alkaloiddir (Arıhan ve diğ., 2009). Coniine alkaloidi, *Conium maculatum* bitkisinde bulunmaktadır.

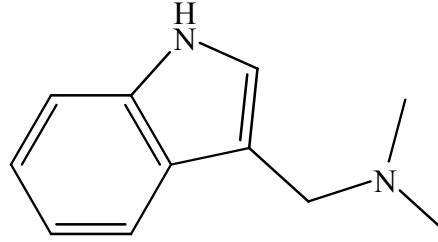


Şekil 2.9 : Coniine' nin yapısı.

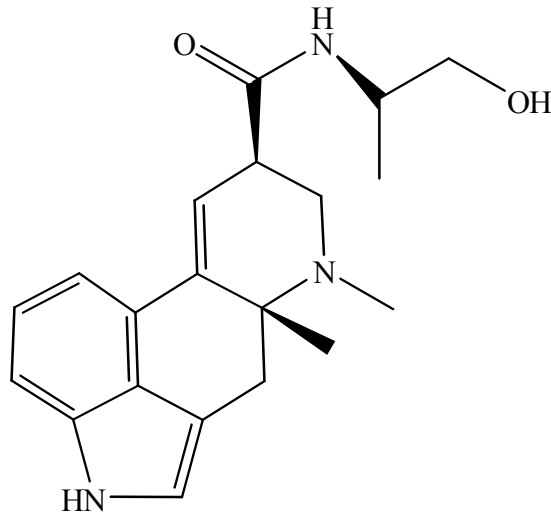
2. 2. 1. 7. İndol Alkaloidleri

İndol halka yapısından türevlenen alkaloidlerdir. Gramin, rezerpin örnek olarak verilebilir. Ergot (ergolin) alkaloidleri en önemli indol grubu alkaloidlerindendir (Halfon, 2005).

Liserjik asitin peptid türevlerine ergot alkaloidleri adı verilir. Ergot mantarları (*Claviceps purpurea*) tarafından üretilirler, psikiyatride kullanılırlar (Tudzynski ve diğ., 2001).



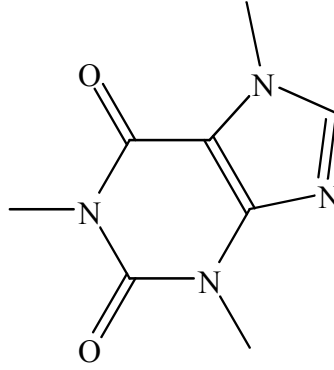
Şekil 2.10 : Gramine' nin yapısı.



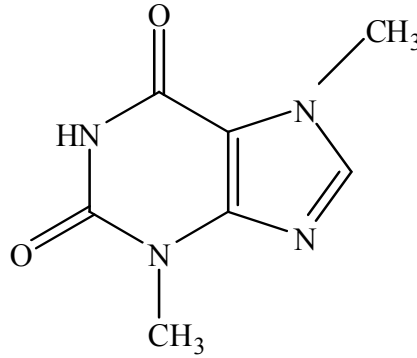
Şekil 2.11: Ergometrin'in yapısı.

2. 2. 1. 8. Purin veya Ksantin Alkaloidleri

Çay, kahve, kola ve kakaoda bulunan kafein ve yine kakao ve çayda bulunan teobromin, bu grupta yer alır (Halfon, 2005).



Şekil 2.12 : Kafein' in yapısı



Şekil 2.13 : Teobromin' in yapısı.

2. 3. AMARYLLIDACEAE ALKALOİDLERİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

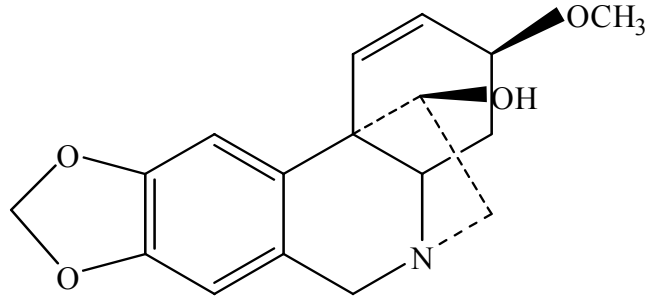
Amaryllidaceae familyası, alkaloid içeren en önemli 20 familyadan biridir. Bu alkaloidler, izokinolin alkaloidleri olarak kabul edilirler (Ünver, 2007). Günümüze kadar Amaryllidaceae familyasından yapısal olarak birbirinden farklı 500 kadar alkaloid izole edilmiştir (Jin, 2005).

Amaryllidaceae alkaloidleri yapısal olarak yedi alt gruba ayrılmıştır (Hoshino, 1998; Ünver, 1999; Martin ve diğ., 2001):

2. 3. 1. Crinine Tip

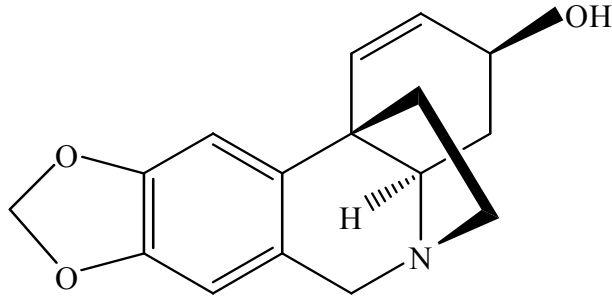
5,10b-Ethanophenanthridine Tipi

A: (+)-Crinine Tip



Şekil 2.14 : Haemanthamine.

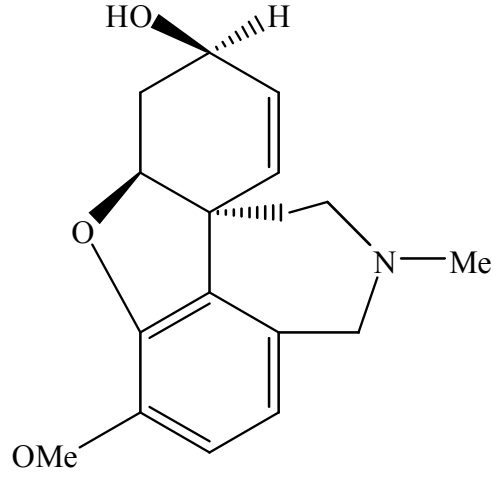
B: (-)-Crinine Tip



Şekil 2.15 : Elwesine.

2. 3. 2. Galanthamine Tip

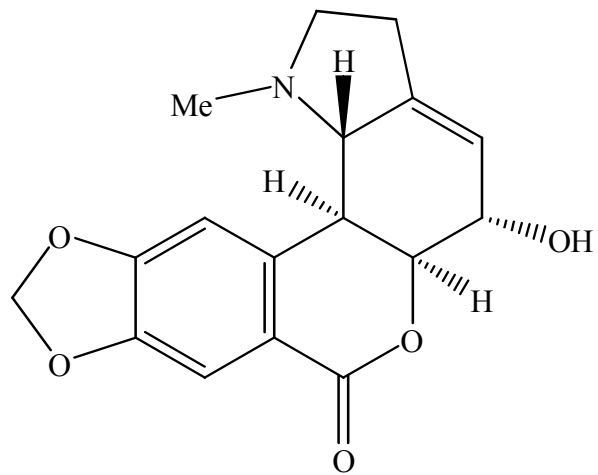
Dibenzofurane Tipi



Şekil 2.16 : Galanthamine

2. 3. 3. Lycorenine Tip

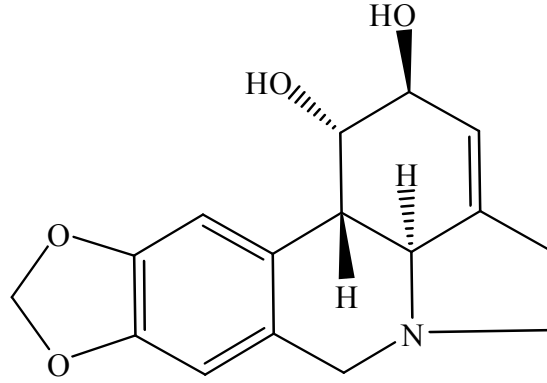
2-Benzopyranol[3,4g]indole Tipi



Şekil 2.17 : Hippeastrine

2. 3. 4. Lycorine Tip

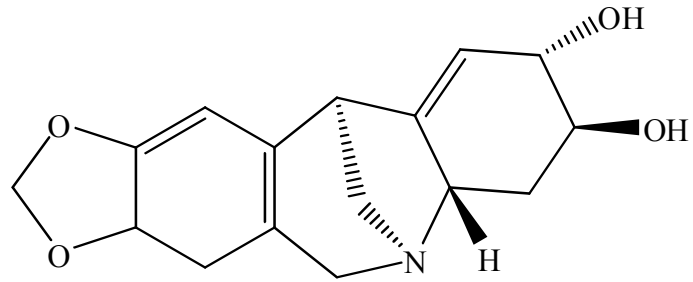
4,5-Ethanophenanthridine Tipi



Şekil 2.18 : Lycorine

2. 3. 5. Montanine Tip

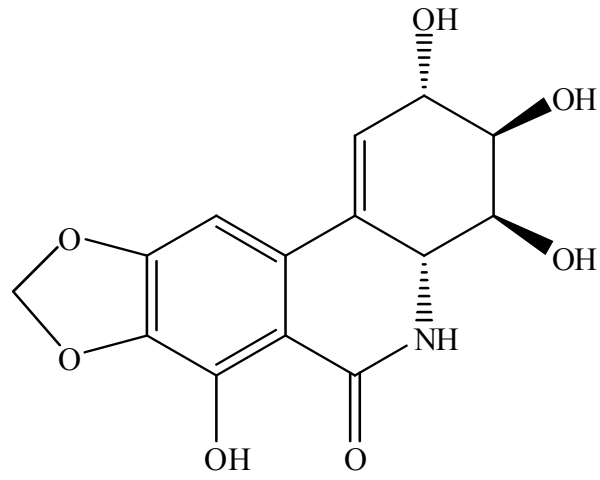
Methanomorphanthridine Tipi



Şekil 2.19 : Pancracine

2. 3. 6.Narciclasine Tip

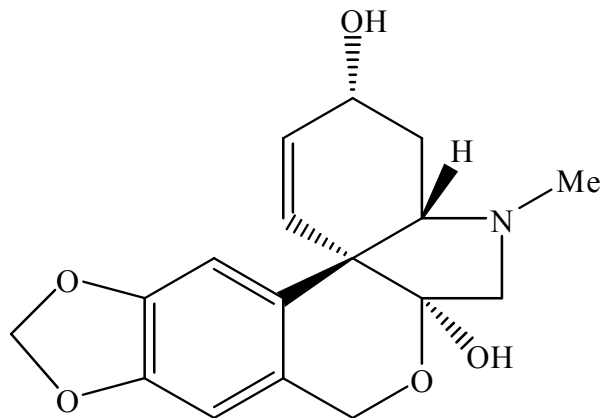
Phenanthridone Tipi



Şekil 2.20 : Narciclasine

2. 3. 7.Tazettine Tip

2-Benzopyrano[3,4c] indole Tipi



Şekil 2.21 : Tazettine

Amaryllidaceae familyasına ait bitkiler, özellikle yapılarındaki alkaloidler nedeniyle sahip oldukları değişik farmakolojik etkileri ile oldukça dikkat çekmektedir. Amaryllidaceae türleri üzerine yapılan yoğun fitokimyasal çalışmalar sonucunda fizyolojik etkileri ve yapıları farklı olan 500 kadar alkaloid izole edilmiştir. Türkiye’de Amaryllidaceae familyasına ait bitkilerden *Leucojum*, *Pancratium*, *Narcissus*, *Sternbergia* ve *Galanthus* cinsleri alkaloid içerikleri bakımından öne çıkmaktadır (Ünver, 2007). Orhan ve Şener (2003a) tarafından yapılan ve Amaryllidaceae familyası türlerinden *Galanthus elwesii*, *G. ikariae*, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta*, *Leucojum aestivum* ve *Pancratium maritimum* bitkilerinin asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmada, her iki *Galanthus* türü ve *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkilerinin ekstrelerinin yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Yine bu çalışmada *G. ikariae* ve *N. tazetta* subsp. *tazetta* bitkilerinden izole ettikleri alkaloidlerin tek tek antikolinesteraz aktivitelerini değerlendirdiklerinde, tek başına bir alkaloidin değil, ekstredeki tüm alkaloidlerin sinerjik etkileşimine bağlı olarak antikolinesteraz aktivitesinin arttığını bildirmiştir.

Amaryllidaceae alkaloidleri içerisinde en yaygın ve en dikkat çekici olan galantamin alkaloididir. Galantamin güçlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Galantamin kullanımının en büyük yan etkisi mide bulantısı olmakla beraber, kullanılan dozun aşamalı olarak artırılması ile bu etki ortadan kaldırılabilir. Galantamin öncelikle Nivalin® adı altında Avusturya’da onaylanmış, ardından Reminyl® adı ile Amerika Birleşik Devletleri’nde ve Türkiye dahil olmak üzere bazı Avrupa ülkelerinde lisans almıştır (Orhan ve Şener, 2003b).

Likörin ise bu familya içerisinde yaygın olan bir başka alkaloiddir. Antiviral, antitümör, antimalarial, sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri kanıtlanmıştır (Ünver, 2007). Likörin, kan kanseri hücrelerinin hücre döngüsünü durdurarak canlı hücre sayısını azaltan ve hücre gelişimini baskılayan bir alkaloid olarak tanımlanmıştır (Liu ve diğ., 2004). Ayrıca pre-B lenfoid hücre hattında (KM3) hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozisi teşvik ettiği bildirilmiştir (Li ve diğ., 2007). Son yıllarda, özellikle likörinin antitümör/antikanser aktiviteleri yapı-aktivite ilişkileri yönünden de farklı gruplar tarafından (McNulty ve diğ., 2009; Lamoral-Thyes ve diğ., 2009) incelenmektedir.

Likorinin ayrıca romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılan indomethacin adı verilen ilaçtan daha güçlü bir antienflamatuvar ajan olduğu (Çitoğlu ve diğ., 1998), *Saccharomyces cerevisiae*'ya karşı antifungal aktivite gösterdiği (Del Giudice ve diğ., 2005), *Trypanosoma brucei* protozoa parazitine karşı öldürücü etki gösterdiği (Mackey ve diğ., 2006), askorbik asit biyosentezini inhibe ettiği (Arrigoni ve diğ., 2007), çiçek hastalığı vaccinia virüsüne (Deng ve diğ., 2007) ve çocuk felci virüsüne (poliovirus) (Hwang ve diğ., 2008) karşı aktif olduğu tespit edilmiştir.

Hippeastrum vittatum (Amaryllidaceae) bitkisi soğanlarının diklorometan ekstresinin 5 farklı insan hücre hattı (HT29 klon adenokarsinoma, H460 akciğer karsinoma, RFX393 renal hücre karsinoma, MCF7 göğüs kanseri ve OVCAR3 epitel yumurtalık kanseri) üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren çalışmada ekstre potansiyel antiproliferatif olarak aktif bulunmuş ve ekstreden izole edilen alkaloidler arasında (montanin, likorin ve vittatin), montanin alkaloidi en fazla miktarda bulunduğundan, sitotoksik etkinin bu alkaloid tarafından gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır (Silva ve diğ., 2008).

Krinamin ve hemantamin alkaloidlerinin, mikromolar konsantrasyonlarda tümör hücrelerindeki apoptozisi teşvik ettiği belirlenmiştir (McNulty ve diğ., 2007). HeLa (insan servikal karsinomu), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi) ve Jurkat (insan T-hücresi lösemi hücre hattı) hücre hatları ile yapılan antikanser çalışmasında, narsiklasin (Narsiklasin tipi alkaloid), likorin (Likorin tipi alkaloid) ve hemantamin apoptozisi teşvik etme özellikleri ile birlikte, antiproliferatif etkileriyle de tanımlanmıştır. Aynı çalışmada, kollajen yayılma analizi ile gerçekleştirilen antiinvazif ve antimetastatik aktivite analizinde bufanamid (Krinin halka-tipi alkaloid) en aktif alkaloid olarak tanımlanmıştır. Evidente ve Kornienko (2009) tarafından gerçekleştirilen antikanser çalışması, Amaryllidaceae alkaloidlerinin insan kanser tedavisinde kullanılması açısından oldukça önemli bulgular ortaya koymaktadır.

Pancratium maritimum, *Leucojum aestivum* ve *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkileri ile yapılan antimalariyal çalışma sonucunda likorin tipi, krinin tipi, tazettin tipi ve galantamin tipi alkaloidler içerisinde 6-hidroksihemantamin, hemantamin ve likorin *Plasmodium falciparum*'a karşı en yüksek aktiviteyi, galantamin ve tazettin ise en düşük aktiviteyi göstermiştir (Şener ve diğ., 2003).

Türkiye’de yetişen bazı tıbbi bitkilerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesine yönelik yapılan Brine Shrimp Toksisite testinde, Amaryllidaceae familyasına ait *Pancratium maritimum*, *Leucojum aestivum* ve *Narcissus tazetta* bitki ekstrelerinin 24 saatin ardından % 100 oranında ölüme yol açtığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmanın sonucuna göre Amaryllidaceae familyasına ait *Leucojum aestivum* ve *Narcissus tazetta* bitkileri, *Artemia salina* larvalarının yanı sıra böceklerle, nematodlara ve mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu aktivite göstermektedir (Şener ve diğ., 1998).

Kaya ve Gözler (2005), *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus* bitkisinin etanol ve alkaloid ekstreleri ile yaptıkları Brine Shrimp Toksisite testinde, bitki kısımlarına ait etanol ekstreleriyle kıyaslandığında alkaloid ekstrelerinin daha anlamlı LC₅₀ değerlerine sahip olduğunu bildirmiştir. Amaryllidaceae alkaloidleri içerisinde (-)-lycorine, (+)-pinoselinol, (+)-11-hydroxyvittatine ve (+)-vittatine, Brine Shrimp Toksisite testinde LC₅₀ değeri için 1000 µg/mL toksisite sınır değerinin altında sonuçlar vererek, sitotoksik açıdan aktif olarak bildirilmiştir (Kaya ve diğ., 2004).

Şener ve diğ. (1999) tarafından yayınlanan ve Türkiye’de yetişen Amaryllidaceae familyasına ait bazı türlerin alkaloid içerikleri ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesine dayanan bir derleme çalışmasında, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* ve *Leucojum aestivum* bitkilerine ait etanol ekstreleri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pseudomolli*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacter cloacea*, *Corynebacterium hoffmanni*, *C. diptheriae* ve *Salmonella typhi*’ye karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Bunun yanında, her iki bitkinin de etanol ekstreleri antifungal, antimalariyal, antiplatelet ve insektisidal aktiviteleri açısından aktif bulunmuştur.

Conforti ve diğ., (2009) tarafından *Galanthus reginae-olgae* subsp. *vernalis* (Amaryllidaceae) bitkisinin farklı çözücülerde hazırlanan ekstreleriyle yapılan antioksidan ve antikolinesteraz aktivitesi çalışmasında, *G. reginae-olgae* subsp. alkaloid ekstreleri, DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim aktivitesi ve β-karoten linoleik asit test sistemi ile ölçülen antioksidan aktiviteleri açısından yüksek sonuçlar verirken, aynı zamanda asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi açısından da yüksek aktivite göstermiştir. Özellikle etanol ekstresinin yüksek antioksidan aktivite göstermesi, etanol ekstresindeki polar fenolik bileşiklerin varlığı ile ilişkilendirilmiştir.

Crinum jagus ve *Crinum glaucum* (Amaryllidaceae) bitkilerinin içerdği hamain ve likorin alkaloidleri asetilkolinesteraz inhibisyonu açısından en yüksek aktiviteyi gösterirken hemantamin ve krinamin en düşük aktiviteyi göstermişlerdir (Houghton ve ark., 2004).

2. 4. *Sternbergia* Waldst. & Kit. TÜRLERİ ALKALOİDLERİNİN KİMYASAL ANALİZLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Sternbergia Waldst. & Kit. cinsine ait türlerin içerdği alkaloidlerin kimyasal analizleri ile ilgili literatür taramasında *Sternbergia lutea* Ker-Gawl. türünde lycorine, galanthine, hippeastrine, tazettine, galanthamine, hippamine, sternbergine, lutessine (Evidente ve diğ., 1984a; Evidente ve diğ., 1984b; Evidente 1986), (+)-pretazettine, (-)-epimaritinamine, (-)-maritinamine, (+)-demethylaritidine, (+)-haemanthamine, (+)-11-hydroxyvittatine, (+)-vittatine, (-)-haemanthidine; *Sternbergia sicula* Tin. ex Guss. Türünde ise (+)-vittatine, (+)-11-hydroxyvittatine, (+)-tazettine, (+)-haemanthamine, (-)-11-epi-haemanthamine, (-)-haemanthidine, (+)-demethylmaritidine (+)-buphanisine ve (-)-siculine (Pabucçuoğlu ve diğ., 1989) alkaloidlerinin izole edildiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise fitokimyasal olarak *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstrelerinden alkaloidlerin eldesi için çalışılmış, 6 alkaloid daha izole edilmesine rağmen miktarının azlığı ve/veya spektral verilerin tamamlanamaması yüzünden şu ana değin (-)-likorin alkaloidinin yapısı aydınlatılmıştır.

Sternbergia sicula ve *Sternbergia lutea* bitkileri ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmasında, her iki bitkiye ait *n*-hegzan, etil asetat, etanol ve su ekstrelerinin Gram (+) bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P suşuna karşı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak hiçbir ekstreinin *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşu ve *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 suşu bakterilerine karşı inhibisyon etkisi göstermediği tespit edilmiştir. *Escherichia coli* ATCC 11230 ve *Salmonella typhimurium* CCM 5445 bakteri suşlarına karşı ekstrelerin çoğu inhibisyon etkisi göstermiştir. *Candida albicans* ATCC 10239 suşuna karşı tüm *S. lutea* ekstreleri antifungal aktivite göstermiştir. Aynı şekilde *S. sicula* bitkisinin tüm ekstreleri mayaya karşı inhibisyon aktivitesi göstermiştir (Ünver ve diğ., 2005).

Sternbergia clusiana ile yapılan bir çalışmada, kuru bitki soğanlarının oda sıcaklığında etanol ile ekstraksiyonunun ardından elde edilen likorin, hemantidin, hemantamin ve tazettin alkaloidlerinin kobay albino erkek fareler üzerindeki analjezik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucuna göre dört alkaloidin de test edilen dozlar üzerinden değerlendirildiğinde aspirinden daha güçlü analjezik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tanker ve diğ., 1996).

Araştırmalarımıza göre *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitki ekstrelerinin biyolojik aktiviteleri üzerine Türkiye’de yapılmış sadece iki çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birinde kuru bitkinin aseton ekstresinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Mycobacterium smegmatis* CCM 2067, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753 ve *Klebsiella pneumonia* FML 5 bakteri suşlarına karşı inhibisyon aktivitesi göstermesine karşın, *Corynebacterium xerosis* UC9165, *Micrococcus luteus* A 2971, *Bacillus megaterium* NRS, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus megaterium* DSM 32 bakteri suşlarına karşı herhangi bir inhibisyon aktivitesi göstermediği belirlenmiştir (Dostbil ve Ağaoğlu, 2003). Diğeri ise çok yeni bir yayın olup üç *Sternbergia* türü üzerinde yapılan bir çalışmada elde edilen alkaloidlerin HPLC ile kantitatif miktar tayini ve bu alkaloidlerin analjezik, antienflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite tayinlerini kapsamakla birlikte ayrıntılı bir bilgiye rastlanmamıştır (Çitoğlu ve diğ., 2008).

Bu tez çalışmasında ise *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğanlarının alkaloidce zengin ekstresinin Brine Shrimp Toksisite testi ile sitotoksitesi, Allium testi ile genotoksitesi, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi ve β -karoten-linoleik asit sistemleriyle antioksidan aktivitesi ve Ellman yöntemiyle antikolinesteraz aktivitesi incelenmiştir.

2. 5. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE

Oksijen, canlılar için hayati önem taşıyan bir bileşiktir. Oksijen, solunum ile alındıktan sonra mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aşamalı bir indirgenme işlemine girer ve suya metabolize olur (Cadenas ve diğ., 2000). Ancak bazı durumlarda oksijen reaksiyonu tamamlayamadan sistemden ayrılır. Bu durumda reaktif ara ürünler oluşur. Bu reaktif ara ürünler genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak adlandırılırlar (Gülçin ve diğ., 2003).

Yükseltgenme yani oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi işlemidir. Yükseltgenme potansiyeli karşısındakine göre yüksek olan madde yükseltgenirken diğeri indirgenir. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler de oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir (Papaz, 1996). “Oksidatif Stres” şeklinde tanımlanan bu durum, serbest radikallerin ve oksidanların üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik için kullanılan bir terimdir (Sies, 1985).

İnsan vücudu, oksijen tüketimine dayanan enzimatik sistemler aracılığıyla ROS üretebilmektedir. Bu ROS az miktarda olduklarında sinyal taşıma ve büyüme regülasyonunda rol alarak faydalı olabilmektedir. Ancak oksidatif stres durumunda, ortamda bol miktarda bulunduklarında, protein ve lipid gibi pek çok moleküle saldırma eğiliminde bulunduklarından, oldukça tehlikeli olabilmektedirler. ROS’nin özellikle membran destabilizasyonu, DNA kırılması ve düşük yoğunluklu proteinlerin oksidasyonu yoluyla yoğun olarak hücre yaşlanmasında, mutagenezde ve koroner kalp hastalığında rol aldığı bildirilmiştir (Atmani ve diğ., 2009).

Hücre, gerek süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler ile endojen savunma sistemi aracılığıyla, gerekse C vitamini ve E vitamini (alfa tokoferol) gibi antioksidanlar ile eksojen savunma sistemi aracılığıyla ROS’nin etkilerini en aza indirmeye çalışır. Son yıllarda sebze ve meyvelerin tüketilmesiyle kanser ve kardiyovasküler hastalık riskinin azalması konusundaki çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır. Dünya genelinde pek çok bitkinin güçlü antioksidan kapasiteye ve serbest radikalleri yakalama

aktivitesine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Atmani ve diğ., 2009). Doğal antioksidanlar, flavonoidler başta olmak üzere sinnamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddelerdir (Öztürk ve diğ., 2004).

Bitkilerin yararlı ve sağlıklı etkilerini flavonoidler aracılığıyla gerçekleştirdiği bilinmektedir. Flavonoidler, bitkileri ultraviyole ışınlar ve hatta herbivorlara karşı koruyan ikincil metabolitlerdendir. Flavonoidlerin bu etkileri, elektronları serbest radikallere dönüştürme, antioksidan enzimleri aktive etme, alfa tokoferol radikallerini indirgeme ve miyeloperoksidaz, ksantin oksidaz ve NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidaz gibi serbest radikal üreten enzimleri inhibe etme gibi özellikleri aracılığıyla gerçekleştirdikleri belirlenmiştir (Atmani ve diğ., 2009).

Organik asitler, karotenoidler ve taninler de fenolik antioksidanlar ile birlikte sinerjik etki göstererek antioksidan görevi görmektedir (Gülçin ve diğ., 2004). Fenoller, benzen halkasına bağlı hidroksil grubu içeren ve bu özellikleri dolayısıyla zincir kırılması ile peroksil radikallerini giderici rol oynayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri için *in vitro* testlerde güçlü antioksidan olarak kullanılan önemli bitki bileşenleridir (Diri Akay, 2006). Fenolik bileşikler ile antioksidan aktivite arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişkinin varlığı Velioğlu ve diğ. (1998) tarafından bildirilmiştir.

ROS, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibi serbest radikalleri içeren aktive olmuş oksijen formları içermektedir (Gülçin ve diğ., 2003). Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren moleküllerdir ve reaksiyona girme kapasiteleri oldukça yüksektir. Tablo 2.1 de Reaktif Oksijen Türleri (ROS) verilmiştir. ROS'nin yanı sıra, hücrede reaktif azot türleri de meydana gelmektedir (Tablo 2.2).

Canlı organizmalarda çok çeşitli ROS çeşitli yollarla meydana gelebilir. Normal aerobik solunumda, hücrelerde üretilen oksidanların ana kaynağı peroksizomlar, lökositler ve makrofajlar olarak tanımlanabilir. Serbest radikallerin eksojen kaynakları ise tütün kullanılması, radyasyon, bazı kirleticiler, organik çözücüler ve pestisitler olarak

verilebilir (Gülçin ve diğ., 2003). Ultrason ve mikrodalga radyasyonları da oksidanların oluşumuna neden olabilmektedir (Sies, 1997).

Tablo 2.1: Reaktif Oksijen Türleri (Formül) (Halliwell ve Gutteridge, 1999)

Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$)
Hidroksil ($OH^{\bullet}$)
Alkoksil ($RO^{\bullet}$ / $LO^{\bullet}$)
Peroksil ($ROO^{\bullet}$ / $LOO^{\bullet}$)
Hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Ozon (O_3)
Singlet oksijen ($^1\Delta O_2$)

Tablo 2.2: Reaktif Azot Türleri (Formül) (Halliwell ve Gutteridge, 1999)

Nitrik oksit (NO)
Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$)
Peroksinitrik asit ($ONOOH$)
Diazot trioksit (N_2O_3)

Serbest radikallerin hücre içinde proteinler, lipidler, karbonhidratlar, enzimler ve DNA (Deoksiribonükleik Asit) üzerinde önemli etkileri vardır. ROS, DNA zincirlerine zarar vermekte, pürin ve pirimidin bazlarında da modifikasyonlar oluşturabilmektedir. DNA molekülüne saldırımları sonucunda yaşlanma ve kanser gibi çeşitli sonuçlar meydana getirebilirler. Serbest radikaller, proteinlerin peptid bağlarını koparabilirler. Hücre membranındaki proteinleri yıkarak, hücrenin ölümüne sebep olabilirler. Lipidler üzerindeki etkisi “lipid peroksidasyonu” olarak adlandırılır. Lipidlerin peroksidasyonu, karbonil ve alkenler gibi hücreye zararlı birçok bileşiğin oluşmasına neden olur (Loeckie ve diğ., 1999). Reaktif oksijen ve azot türleri (serbest radikaller) insan vücudunda kendiliğinden oluşur (endojen kaynaklı) veya dış etkenler ile (eksojen kaynaklı) vücuda girer. Hücrede serbest radikallerin miktarı arttıkça, oksidatif stres baş gösterir. Oksidatif stres, serbest radikallerin ve oksidanların üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmıştır (Sies, 1997).

Antioksidanlar ise, ortamda bulunduğu takdirde serbest radikallerin zararlarını geciktiren veya en aza indirgeyen moleküllerdir. Antioksidan savunma sistemi, serbest radikal oluşumunu en aza indirgese de % 100 etkili değildir. Bu nedenle besinler yoluyla antioksidanların alınması, insan sağlığını korumak adına önem kazanmaktadır. Hidroksil radikallerinin DNA'ya hasar vermesi, hemen hemen tüm aerobik hücrelerde görülmektedir. Bu durum, yaşa bağılı olarak kanser hastalığının artmasına sebep olarak gösterilebilir. Aynı şekilde lipid peroksidasyonu da arterosklerozis hastalığını tetiklemektedir (Halliwell, 2009). Antioksidanlar genellikle lipidlerin peroksidasyonundan kaynaklanan besin kalitesindeki kötüleşmeyi engellemek için kullanılırlar (Gülçin ve diğ., 2004).

Birçok klinik bozukluğun patogenezinde doğal antioksidan savunma sisteminin eksikliği sonucu serbest radikallerin yol açtığı oksidatif stres yer almaktadır. Çoğu hastalıkta, hastalığın aktivitesi arttıkça oksidan oluşumu artar. Bu nedenle potansiyel antioksidan terapisi gerek antioksidan enzimlerin çalışması için, gerekse doğal serbest radikal giderim aktivitesi için gereklidir. Hastalıklar, oksidatif stres ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlikten kaynaklandığından, antioksidan katkılar ile oksidatif doku hasarını en aza indirmek ve böylece hastalığın ilerlemesini önlemek mümkün görünmektedir. Oksidatif hasarlar, diyabet ve Alzheimer hastalığı gibi pek çok kronik hastalığı tetiklemektedir (Conforti ve diğ., 2009).

ROS, hücre zarı lipidlerinin peroksidasyonunu başlatma ve böylece lipid peroksidasyonunun birikmesine yol açma eğilimine sahiptir. Bu peroksidasyon ürünleri veya bunların sekonder oksidasyon ürünleri, örneğin malondialdehit (MDA), oldukça reaktiftir ve protein, amin ve DNA gibi biyolojik substratlar ile reaksiyona girerler (Kehrer, 1993). 1940'lı yılların sonunda lipid peroksidasyonunun bazı fenolik bileşikler aracılığıyla inhibe edildiğinin keşfinden sonra, sentetik antioksidanların gıda endüstrisine uygulanması gerçekleşmiştir. Lipid peroksidasyonu gıdaların bozulmasına yol açan en önemli etken olup, gıdalarda fonksiyonel özelliklerin ve besinsel değerin kaybına yol açmaktadır (Gülçin ve diğ., 2004).

Günümüzde BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (Bütillenmiş hidroksi tolueen) ve TBHQ (*t*-bütillhidroksikininon) gıda endüstrisinde gıdaların oksidatif bozulmasını önlemek üzere en çok kullanılan sentetik antioksidan maddelerdir. Ancak BHA ve BHT'nin, yüksek uçucu karaktere sahip olması ve artan sıcaklıklar karşısında stabilitesini kaybetmesi (Gülçin ve diğ., 2004) gibi özelliklerinin yanı sıra karaciğer hasarları ve kansere neden olduğu düşünülmektedir (Öztürk ve diğ., 2007).

Bu nedenle sentetik antioksidanların yerini tutabilecek, bitkilerde doğal olarak bulunan güvenilir antioksidanların bulunması için yapılan çalışmalar giderek önem kazanmış ve doğal kökenli ve daha etkili bileşiklerin keşfiyle ilgili araştırmalar artmıştır (Öztürk ve diğ., 2007).

2. 5. 1. Antioksidan Çeşitleri

Genel olarak antioksidanlar iki gruba ayrılır; Birincil Antioksidanlar ve İkincil Antioksidanlar. Birincil antioksidan maddeler, zincir kırma tepkimeleri oluşturan veya serbest radikal temizleyen türlerdir (Uçar, 2004).

Birincil antioksidanlar, eser miktarlar bulunduklarında bir lipid radikali ile etkileşerek oksidatif reaksiyonun başlamasını geciktirir veya durdurur. BHT ve BHA birincil sentetik antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Antolovich ve diğ., 2002).

İkincil antioksidan maddeler veya koruyucu antioksidan maddeler ise, metallerin aktivasyonunu azaltıcı, lipid hidroperoksitlerin istenmeyen uçucu türlere parçalanmasını engelleyen, tekli oksijen yakalayan ya da birincil antioksidanların yeniden üretimini sağlayan türlerdir (Uçar, 2004). Askorbik asit ve beta karoten, ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Antolovich ve diğ., 2002).

2. 5. 2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Uygulanan yönteme bağlı olarak, ekstrelerin kimyasal yapısına, bileşenlerin farklı fonksiyonel gruplarına, polaritelerine ve kimyasal davranışlarına göre sonuçların değişmesi muhtemeldir. Bu nedenle, ekstrelerin antioksidan potansiyellerinin çoklu analizler ile

değerlendirilmesi uygun olmaktadır (Öztürk ve diğ., 2007). Çalışmamızda DPPH Serbest Radikal Giderim Yöntemi ve β -Karoten Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini) kullanılmıştır.

2. 5. 2. 1. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi

Bu yöntem, hidrojen verici antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan DPPH (1,1-difenil- 2- pikril- hidrazil) ile reaksiyona girmesi ve bu radikali süpürüm aktivitesi ile α - α -difenil- β -pikril hidrazin'e dönüştürmesi reaksiyonuna dayanır. Renk değişimi (karakteristik mor rengin açılması), antioksidan bileşiklerin süpürüm potansiyelini ifade eder. Örneklerin absorbans değişiklikleri 517 nm'de ölçülür (Benabadji ve diğ., 2004). Antioksidanlar radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltır, reaksiyon karışımının düşük absorpsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir (Gülçin ve diğ., 2004).

2. 5. 2. 2. β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini) :

Antioksidan bileşiklerin varlığında, bir serbest radikal olan linoleik asitin nötralize edilmesi sonucu β -karoten yıkımının durdurulmasına dayanır. 50 °C' de inkübe edilen numunelerin 490 nm'de 15 dakikalık aralıklarla β -karoten'in rengi giderilene kadar spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir (Benabadji ve diğ., 2004).

2. 6. SİTOTOKSİK AKTİVİTE

Bitkilerin ilaç olarak kullanılması ile ilgili Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organization, WHO) tarafından belirlenen temel kriterlerden biri de toksik olmamalarıdır (Sowemimoa ve diğ., 2007). Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Akut toksisite saptanmasında başvurulacak deneylerin amacı, biyolojik sistemlerde kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek ve doz-yanıt ilişkisinde karakteristik veriler elde etmektir. Bu veriler, yeni ilaçların kliniğe uygulanmasındaki olabilirlik derecesini ortaya koymaktadır (Karayel, 2006). Akut toksisitede mortalite testi, kronik toksisitede ise dokulardaki patolojik incelemeler yapılır. Akut toksisitenin araştırılmasında ortalama letal doz (LD₅₀ veya LC₅₀ değerleri) tayini kullanılır. LD₅₀, deney hayvanlarının belirli koşullarda ve doğrudan uygulanan toksik maddenin, bu hayvan popülasyonununun % 50'sini öldüren dozu olarak tanımlanır. LC₅₀ ise, belirli bir süre içerisinde, ortamda (su,

hava gibi) bulunan kimyasal maddeye maruz kalan deney hayvanlarının veya hücre kültürünün % 50'sini öldüren madde konsantrasyonu olarak tanımlanır. Bu tanımlar, Ekonomik İşbirliği ve Gelişme Kuruluşu (The Organization For Economic Cooperation and Development: OECD) tarafından “Bir maddenin deney hayvanlarının % 50'sini öldüreceği beklenen ve istatistiksel olarak tayin edilen tek dozu” şeklinde tanımlanmaktadır. Diğer bir deyişle bir maddenin letal doz değeri sabit değildir ve spesifik bir hayvan topluluğunda, belirlenmiş koşullarda doz-letalite (cevap) ilişkisini gösteren istatistiksel bir terimdir. LD₅₀ ve LC₅₀ değerleri, grafiksel yöntemler ile hesaplanır (Vural, 2005).

2. 6. 1. Brine Shrimp Toksisite Testi

Aremia salina larvaları, LC₅₀ düzeyinin tespitinde kullanılan toksisite test organizmalarından biridir. *Artemia salina* L., (1758), Crustacea alt şubesi, Branchiopoda sınıfı Anostraca takımına bağlı bir kabukludur. Son derece tuzlu ortamlarda yayılım göstermektedir (Başbuğ, 1999).

Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksitelerinin tayininde oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla, toksik maddelerin *in vivo* olarak *Artemia salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak “Brine Shrimp Lethality Assay”ın kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Karayel, 2006).

Artemia salina'nın kullanıldığı bazı sucul toksisite testleri ile, rodentlerin (fare veya sıçan) kullanıldığı toksisite testleri arasında bir korelasyon olup olmadığını anlamak üzere bazı çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Her iki testten elde edilen LD₅₀ değerleri, aynı kimyasalların insanlar için geçerli olan akut oral letalite verileriyle kıyaslandığında, sonuçlar arasında genellikle iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak, bu kimyasalların, oral akut toksisite potansiyellerinin test edilip, insanlar için geçerli olan akut dozlarla kıyaslandığında; sucul testlerin, rodent testlerine nispeten biraz daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ancak sucul toksisite testlerinin, suda çözünebilen maddelerin toksisite değerlerinin saptanmasında daha uygun olduğuna da değinilmiştir. Yine başka bir çalışmada ise, *Artemia salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile

yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Karayel, 2006).

2. 7. GENOTOKSİK AKTİVİTE

Hücre bölünmesi makromoleküler düzeyde karmaşık bir takım biyokimyasal olayları içeren ve birbirini izleyen çeşitli işlemler sonucu gerçekleşmektedir. Canlıların büyüme ve gelişmesi, bu canlıları oluşturan hücrelerin düzenli büyüme ve çoğalmasına bağlıdır (İnceer ve Beyazoglu, 2000).

Kimyasal ajanların organizmalarda yol açtığı hasarlar arasında, genotoksik ve mutajenik etkiler, nesilden nesile aktarılabilecek genetik hasarlar meydana getirme kapasiteleri açısından en olumsuz olanlardır. Bu nedenle, DNA ile reaksiyona giren bileşenleri tanımlama adına genotoksik ve mutajenik analizlerin geliştirilmesi, çevresel kalitenin sağlanması adına önem kazanmaktadır. Bu anlamda kullanılan test sistemleri, kullanılan biyolojik sisteme ve bu sistemin verdiği genetik sonucuna göre gruplandırılabilir. Prokaryotların kullanıldığı analizler gen mutasyonunu ve birincil DNA hasarlarını teşvik eden ajanları belirleyebilmektedir. Öte yandan, ökaryotların kullanıldığı analizler, gen mutasyonlarından kromozom hasarlarına kadar pek çok genetik etkiyi belirleyebilmektedir (Leme ve Marin-Morales, 2009). Genotoksik analizlerde bitkiler kolay bulunabilir ve depolanabilir olmaları, çoğunlukla uygun kromozom şartlarına sahip olmaları, ucuz olmaları ve en önemlisi diğer test sistemleri ile iyi bir korelasyon göstermeleri açısından elverişli organizmalardır (Fiskesjö, 1985).

Günümüzde en sık kullanılan yüksek organizasyonlu bitkisel kaynaklar *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia*, *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* ve *Hordeum vulgare* olarak sıralanabilir. Bunların arasında *A. cepa*, düşük kromozom sayısı ($2n=16$) ve kromozomlarının büyük ve iyi görünümde olmaları nedeniyle mitotik döngüde kromozomal anormallikleri ve dağılımlarını görüntülemeadaki şartların uygun oluşu açısından en çok tercih edilen organizma olmaktadır (Leme ve Marin-Morales, 2009).

Bir bitkisel test sistemi olan *Allium* testi ile soğan bitki köklerinin büyümesini engelleyen uygulamaların toksisiteyi ölçülebilmektedir. *Allium cepa* soğanlarının bir

test sistemi olarak kullanılması ilk defa Levan (1938) tarafından tanımlanmıştır (Fiskeşjö, 1985). Günümüze kadar Allium testi, bitkisel kökenli antikanser ilaçları da dahil olmak üzere farklı bileşiklerin sitostatik, sitotoksik, genotoksik ve mutajenik özelliklerini belirlemede sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Kuras ve diğ., 2009). *A. cepa* kök meristem hücrelerinde hücre siklusu yaklaşık 20 saattir (Rank ve Nielsen, 1993).

Allium testi, toksisitenin belirlenmesinde ve izlenmesinde kullanılan oldukça faydalı bir biyolojik yöntemdir. Çok çeşitli bileşiklerin anti-mitotik aktivitelerinin ve sitotoksik değerlendirmelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Oloyede ve diğ., 2009). Allium testi, geniş kullanım alanına sahip bir testtir ve ökaryotlar ve prokaryotların kullanıldığı test sistemlerinde görülen sonuçlara eş sonuçlar vermektedir (Metin ve Bürün, 2008).

Literatürde genotoksik etkinin Allium testi ile belirlenmesi ile ilgili pek çok çalışmaya rastlamak mümkündür.

Liliaceae familyası *Colchicum* türlerinden elde edilen bir alkaloid olan kolşisinin poliploidiye yol açığının keşfinden sonra bitkisel kökenli pek çok alkaloidin sitolojik anormalliklere yol açtığı bildirilmiştir (El-Khier ve El-Khier, 1992). Antimitotik bir ajan olan kolşisin, hücrelerin bölünmesini sağlayan mikrotübüllerin oluşumu ve mitotik iğ ipliklerinin normal fonksiyonunu önleyerek metafaz aşamasını durdurur. Bu olay hücrede kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar ve poliploid yapılar ortaya çıkar. Kolşisinin bu etkiye sahip olduğunun keşfedilmesi, bitki ve hayvan hücrelerinde bu aktivitesi üzerine önemli çalışmalar yapılmasına ve tıp ile biyoloji dallarında bu özellikten yararlanılmasına fırsat doğurmuştur (Yeşiltepe, 2006).

Akinboro ve Bakare (2007), *Borreria filiformis* ve *Vinca rosea* sulu ekstrelerinin Allium testinde meydana getirdikleri kromozom anormalliklerinden vinkristin ve vinblastin alkaloidlerinin sorumlu olduğunu öne sürmüşlerdir.

Tıbbi bitki ekstrelerinin *A. cepa* kök ucu mitoz bölünmesine olan etkileri kromozomların dağılması ile sonuçlanan eksen bozulmaları, kromozomların yapışması,

anafaz köprülerinin oluşması ve bunun gibi çeşitli anormallikler şeklinde görülmektedir (Abu ve Duru, 2006).

Akinboro ve Bakare (2007), *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Morinda lucida* (Rubiaceae), *Cymbopogon citratus* (Graminae), *Mangifera indica* (Anarcadiaceae) ve *Carica papaya* (Caricaeae) bitkilerinin sulu ekstreleri ile yaptıkları *Allium* testine göre, makroskobik ve mikroskobik parametreler arasında doğrusal bir ilişki olduğunu, *Allium cepa*'da kök gelişmesi azaldığında, bölünen hücre sayısının da azaldığını bildirmiştir. Çalışma sonucunda, kök gelişiminde uygulanan doza bağlı olarak azalmanın meydana geldiği görülmüştür. Çalışmada gözlenen eksen düzensizliklerinin, test edilen ekstrelerdeki alkaloid varlığından ileri geldiği belirtilmiştir. Test edilen ekstreler, *Allium cepa*'da kök gelişimi üzerine baskılayıcı etki göstermiştir.

Kuras ve diğ. (2009), *Uncaria tomentosa* (kedi pençesi) bitkisinin alkaloid içermeyen (Alkaloid Free/AF) ve alkaloidce zengin (Alkaloid Rich/AR) ekstrelerinin mitotik aktivite ve kromozomlar üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yaptıkları *Allium* testi sonucunda, alkaloidce zengin olan ekstrenin kromozomlar üzerindeki etkilerinin daha fazla olduğu, mitozun gecikme veya inhibisyona uğradığı ve mitotik fazların değiştiğini gözlemiştir.

Allium testinde pozitif sonuç alınması, bir uyarı niteliği taşımakla beraber, test edilen numunenin çevre ve insan sağlığı adına risk oluşturduğu göz önüne alınmalıdır. Çevresel kirleticiler tarafından oluşturulan toksik etkilerin en önemlisi, genotoksitedir. Genotoksik bileşikler, insan popülasyonu ve doğal ekosistem adına tehdit oluşturmaktadır (Odeigah ve diğ., 1997). Literatürde *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisiyle ilgili genotoksik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2. 8. ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTE

Asetilkolin öncelikle asetilkolinesteraz ve ikincil olarak bütirilkolinesteraz enzimleri tarafından inhibe edilen ve Alzheimer hastalığının patolojisinde rol oynadığı bilinen, iki sinir hücresi arasında iletişimi sağlayan bir kimyasaldır. Her iki enzim de beyinde bulunur. Alzheimer hastalığının etiyolojisi halen açıklığa kavuşturulmamasına rağmen, asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibisyonunu sağlayarak asetilkolin miktarının artırılması, Alzheimer hastalığının tedavisinde geliştirilen en etkili strateji olarak bilinmektedir. Bu nedenle, Alzheimer hastalığının tedavisinde asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) inhibitörleri kayda değer tedavi alternatifleri olarak düşünülmektedir (Orhan ve diğ., 2004).

Asetikolinesteraz (AChE) enziminin temel rolü, asetilkolin (ACh) seviyesinin kontrol edilmesidir. Asetilkolin, beyinde korteksde yer alan ve sinirsel uyarıları taşıyan kimyasal bir maddedir (Adsersen ve diğ., 2007). AChE 'nin inhibisyonu, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde stratejik rol oynar. Alzheimer hastalığına bağlı olarak gelişen bilişsel bozukluğun tedavisinde kullanılan tacrine, donepezil, rivastigmine gibi az sayıda sentetik ilaç bulunmaktadır. Ancak bu bileşiklerin yan etkilerinin olması ve sentetik yerine doğal ajanların bulunabilme imkanları, daha iyi AChE inhibitörlerinin araştırılmasına gereksinim doğurmuştur (Mukherjee ve diğ., 2007).

Asetilkolin beyinde serebral korteksin sinapsında bulunur. Alzheimer hastalarında görülen temel problemlerden biri, serebral kortekste bir bozukluk meydana gelmesidir (Bierer ve diğ., 1995). Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan tedavi edici ajanlar, asetikolinesteraz inhibisyonu ile ACh seviyesini artırır. Bu etkiye sahip bileşiklerin, hafıza kaybı ve yaşlanmayla ilişkili bilişsel bozulma durumunda geleneksel olarak kullanılan bitkilerde mevcuttur (Houghton ve diğ., 2004).

İlk AChE inhibitörü, Whitehouse tarafından 1993 yılında 1, 2, 3, 4-tetrahydro-9-aminoacridine (tacrine) olarak bildirilmiştir. Günümüzde Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde donepezil (Kelly ve diğ., 1997), galantamine (Scott ve Goa, 2000) ve rivastigmine (Gottwald ve Rozanski, 1999) kullanılmaktadır (Mukherjee ve

diğ., 2007). İlk olarak Avusturya’da Nivalin ® adı ile satılan ve ardından Reminyl® adı ile lisansı onaylanan ilaç (Orhan ve Şener, 2003a) galantamin alkaloidinin hidrobromür tuzu şeklinde piyasaya sunulmaktadır (Lopez ve diğ., 2002).

Alzheimer hastalarında asetilkolinesteraz seviyesi azalırken, bütirilkolinesteraz aktivitesi artar ve AChE ile BChE arasındaki oran normal kişilerde 0,6 iken, hastalığa sahip kişilerde 11’e kadar çıkabilmektedir. Günümüzde Alzheimer hastalığının bulgularının tedavisinde kolinesteraz inhibisyonu en sık kullanılan tedavi şeklidir. Kolinerjik bozukluğun düzeltilmesinde AChE (EC3.1.1.7) ve BChE (EC3.1.1.8) enzimleri hedeflenir (Adersen ve diğ., 2007). Böylece kolinerjik nöronlar arasındaki sinapslarda mevcut asetilkolin miktarının artışı sağlanmaktadır (Jung ve Park, 2007).

Bitkisel kaynaklardan potansiyel AChE inhibitörlerinin tanımlanmasına yönelik etnofarmakolojik yaklaşımlar ve biyoanalizler gün geçtikçe artmaktadır. AChE inhibitörlerinin belirlenmesine yönelik pek çok yöntem, Ellman tarafından 1961’de tanımlanan Ellman reaksiyonlarına dayanmaktadır (Ellman ve diğ., 1961; Mukherjee ve diğ., 2007).

AChE inhibitörleri ile ilgili çalışmaların çoğu, galantamin gibi asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine sahip alkaloidler üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar 35’ten fazla alkaloidin AChE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu aktiviteye sahip olduğu belirlenen diğer bileşenler ise terpenoidler, glikozidler ve kumarinler olarak bildirilmiştir. Acanthaceae, Apocynaceae, Amaryllidaceae, Angelicae, Araceae, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Buxaceae, Combretaceae, Compositae, Coniferae, Cyperaceae, Ebenaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Gentianaceae, Guttiferae, Lamiaceae, Leguminosae, Lilliaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Molluginaceae, Moraceae, Musaceae, Nelumbonaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Sapotaceae, Solanaceae ve Tamaricaceae, AChE inhibisyon potansiyeline sahip bitkilerin yer aldığı familyalar olarak bildirilmiştir (Mukherjee ve diğ., 2007).

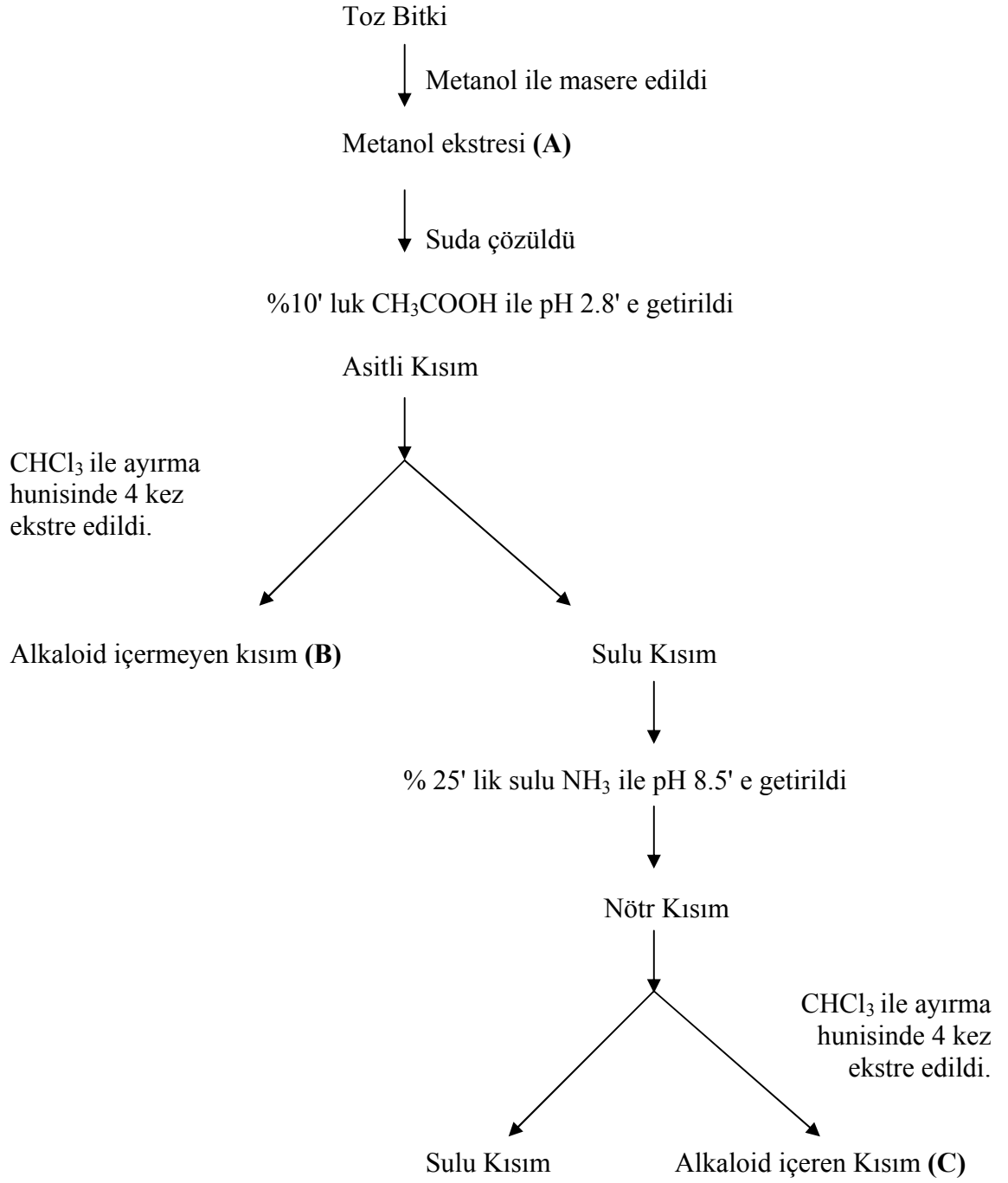
3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. (Amaryllidaceae) bitkisi, Muğla ili Merkez Düğerek mahallesinden Muğla'ya giden yolun 1.km'sinde, yolun sağ taraflarında bulunan 600 m rakımlı makilik alandan 14 Mart 2009 tarihinde toplanmıştır. Bitkinin teşhisi Muğla Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç.Dr.Ömer Varol tarafından yapılmıştır. Bitki, Muğla Üniversitesi Herbaryumu'na Ö.V. 4224 (MUH) no ile kayıtlıdır.

3. 1. 1. Bitki Ekstresinin Hazırlanması

Bitkinin soğanları, toprak ve üst kabuklarından temizlenerek, gölgede kurutuldu. Kuruyan soğanlar bir mutfak robotunun doğrayıcı kısmı ile toz haline getirildi. Toz hale getirilen soğanlar 2,5 L metanol ile üç kez ard arda 3 gün süre ile (72 saat) masere edildi. Toz haline getirilen soğanların ağırlığı 1.647 g olarak tartıldı. Rotaevaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra elde edilen metanol ekstrelerine **A** sembolü verildi. Bu ekstre az miktarda suda çözüldükten sonra % 10'luk asetik asit ile pH 2.8'e getirildi ve ayırma hunisinde kloroform ile ekstre edildi. Kloroform fazına geçen kısım alkaloid içermemektedir. Kloroform rotaevaporatörde uçuruldu, elde edilen ekstreye **B** sembolü verildi. Daha sonra ayırma hunisinde kalan sulu kısım % 25'lik amonyak ile pH 8.5'e ayarlandı ve kloroform ile ekstre edildi. Bu işlem sulu fazda alkaloid kalmayınca kadar tekrar edildi. Alkaloid teşhisi, sulu kısmın ince tabaka kromatografisinde alüminyum oksit plaklar kullanılarak Dragendorff belirteci ile turuncu renk vermesiyle yapıldı. Kloroform fazına geçen kısım alkaloid içermektedir. Kloroform rotaevaporatörde uçuruldu, böylece elde edilen ekstreye **C** sembolü verildi Şekil 3.1'de ekstrelerin hazırlanışı gösterilmektedir (Atta-ur-Rahman ve diğ., 1995; Boğa, 2007). Çalışmamızın bundan sonraki kısmında bahsedilecek tüm analizler, alkaloid içeren **C** ekstresi üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu ekstre, bundan sonraki kısımda "*Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi" olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.1 : Ekstrelerin hazırlanışı.

3. 2. KİMYASAL ANALİZLER

3. 2. 1. Kolon Kromatografisi

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresini fraksiyonlandırmak üzere kolon kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. Kolon kromatografisinde kullanılan kolonun özellikleri aşağıda gösterilmiştir:

Kolon Şartları:

Kolon Boyutları: 75 cm. x 3 cm.

Adsorban: Silikajel

Çözücü Sistemi: Petrol eteri ile başlanıp artan oranlarda sırasıyla gradient çözücüler diklorometan, aseton, metanol kullanıldı.

Fraksiyon Hacmi: 50 mL

Materyal: *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. bitkisinin kuru soğan alkaloid ekstresinin paketlenme yöntemiyle ucuna pamuk yerleştirilerek silika jel adsorban (50 cm. kadar) ile doldurulmuş 75 cm.'lik bir açık kolonda ilavesinden sonra gittikçe polaritesi artan çözücülerle elüe edilerek fraksiyonlandırıldı. Elüsyona (yıkama işlemine) petrol eteri ile başlandı, artan oranlarda diklorometan ilave edildi, % 100 diklorometandan sonra gradient olarak aseton kullanıldı ve tamamen asetona geçildikten sonra % 100 metanole kadar yıkamaya devam edildi. Toplanan 104 fraksiyonun ince tabaka kromatografisi (ITK=TLC / Thin Layer Chromatography) yapılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Likorin alkaloidi alkaloidce zengin kısım olarak izlenen diklorometan - aseton (95:5) - (80:20) çözücü sistemi ile yıkanırken gelen fraksiyonların birleştirilmesi ve buradan kristalizasyonla elde edildi. Miktarlarının çok daha az ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) spektrumlarının tamamlanamaması nedeniyle henüz yapısı aydınlatılamayan diğer alkaloidler de genelde bu çözücü sistemiyle ve daha polar çözücülerle yıkama esnasında elde edildi, hatta % 80-90 aseton ve % 100 metanol sırasında da çok az miktarda elde edilen bazı alkaloidler mevcuttur.

3.2.1.1. Alkaloidlerin Kolondan İzolasyonu

ITK kromatografisi sonucunda birleştirilen fraksiyonlar ve elde edildikleri çözücü sistemleri aşağıdaki gibidir:

1-15 (petrol eteri - diklorometan) (100 : 0) – (80 : 20)

16- 25 (petrol eteri - diklorometan) (75 : 25) – (50 : 50)

26-35 (petrol eteri - diklorometan) (50 : 50) – (25: 75)

36- 45 (petrol eteri - diklorometan) (20 : 80) – (100 : 0)

46-55 (diklorometan - aseton) (95 : 5) – (80: 20) (Likorin elde edildi) (TS-1)

56-65 (diklorometan - aseton) (75 : 25) – (50 : 50)

66-75 (diklorometan - aseton) (50 : 50) – (25 : 75)

76-85 (aseton - metanol) (20 : 80) – (100 : 0)

86-90 (aseton - metanol) (98 : 2) – (96 : 4)

90-95 (aseton - metanol) (95 : 5) – (90 : 10)

96-98 (aseton- metanol) (85 : 15) – (75 : 25)

99-100 (aseton - metanol) (50 : 50)

101-102 (aseton - metanol) (25 :75)

103-104 (metanol)

Fraksiyon 95'den sonra toplanan fraksiyonlar 50 mL yerine 100 mL'lik yıkamalar ile alınmıştır, hatta 100. fraksiyondan sonra 200 mL'lik iki yıkama yapılmıştır. Likorin ilk

elde edilen alkaloid olduğu için **TS 1** kodu verildi, daha sonraki fraksiyonlardan elde edilenlere sırasıyla TS-2, TS-3, vb. kodları verilerek devam edildi.

3. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi

Fraksiyonlar UV ışık ($\lambda=254$) altında ince tabaka kromatografisiyle uygun çözücü sistemlerinde yürütülen alüminyum plakalarda incelendi. En iyi çözücü sisteminin Kloroform: Aseton (80:20) olduğu belirlendi. Benzer görünüş ve Rf değerinde olan fraksiyonlar birleştirildi.

3. 2. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Kolon kromatografisi ile elde edilen 104 fraksiyondan ince tabaka kromatografisi ile benzer görünüş ve Rf değerine sahip olanlar belirlendi ve bu fraksiyonlardan preparatif ince tabaka kromatografisi ile maddeler saflaştırıldı.

3. 2. 4. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

Kolon kromatografisinde ayrılmış olan ve preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılan maddelerin CD₃OD (dötero metanol) çözücüsünde ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları alınmıştır. Spektrumlar, İ.Ü. Avcılar İleri Analizler Laboratuvarındaki Varian UNITY Innova Spektrometresinde (Rezolüsyon: ¹H için 500 MHz, ¹³C için 125 MHz) alınmıştır.

3. 2. 5. IR (Infrared-Kırmızı ötesi) Spektroskopisi

Likorinin IR spektrumu Thermo Nicolet 6700 FT-IR cihazında alınmıştır.

3. 2. 6. Kütle Spektroskopisi

Likorinin HRMS spektrumu elektro-spray analiz yöntemiyle Bruker Micro TOFQ cihazında UME (Ulusal Metroloji Enstitüsü), TÜBİTAK, Gebze’de alınmıştır.

3.2.7. Erime Noktası

Likorinin erime noktası Reichert-Kofler cihazında alınmıştır.

3.2.8. Optik Çevirme

Likorinin optik çevirmesi AA-5 polarimetre cihazında alınmıştır.

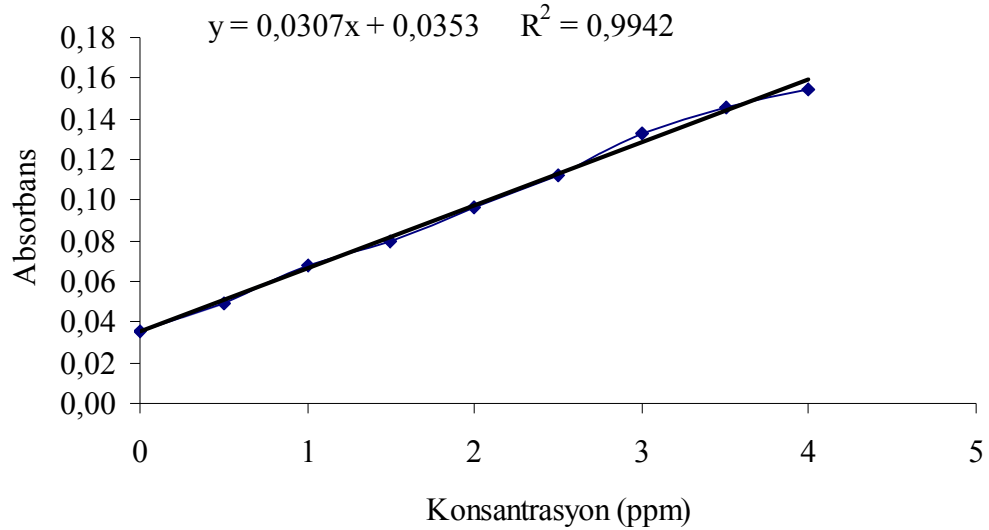
3. 3. EKSTRENİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ

3. 3. 1. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu Reaktif (FCR) kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Öztürk ve diğ., 2007; Yeşilyurt ve diğ., 2008). 1 mg *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi içeren 1 mL çözelti distile su ile 46 mL'ye tamamlandı. Bu karışıma 1 mL FCR ve 3 dakika sonra % 2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 3 mL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden (Şekil 3.2) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Absorbans} = 0,0307 (\mu\text{g}) + 0,0353 (R^2: 0,9942)$$

Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirildi.



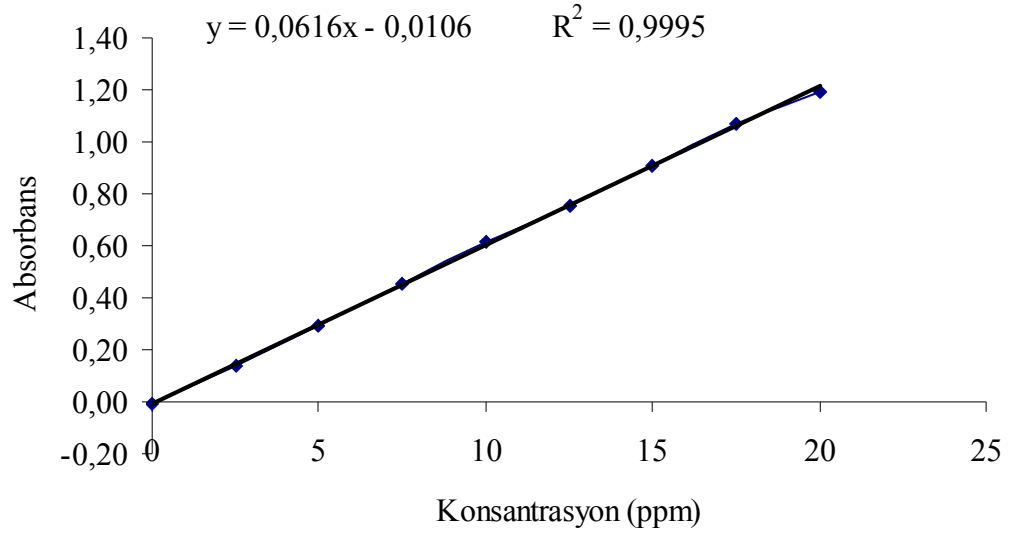
Şekil 3.2 : Pirokatekolün ölçü grafiği.

3. 3. 2. Toplam Flavonoit İçeriğinin Belirlenmesi

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin toplam flavonoit içeriği kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi (Park ve diğ., 1997; Topçu ve diğ., 2007). 1 mg *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi içeren çözeltiden 500 µL alındı ve üzerine 3,3 mL metanol ilave edildi. Bu karışıma 100 µL 1 M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 45 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbanları okundu. Ekstrenin toplam flavonoit içeriği, standart kersetin grafiğinden (Şekil 3.3) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Absorbans} = 0,0616 (\mu\text{g}) - 0,0106 (R^2: 0,9995)$$

Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.3 : Kersetinin ölçü grafiği.

3. 4. AKİVİTE ÇALIŞMALARI

3. 4. 1. Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite tayini, *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ile Serbest Radikal Giderimi ve β -Karoten-Linoleik Asit ile lipid peroksidasyonunun belirlenmesi şeklinde gerçekleştirildi.

3. 4. 1. 1. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin serbest radikal giderim aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Kirby ve Schmidt, 1997; Kabouche ve diğ., 2007). 10 mg *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi 10 mL etanolde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 125, 250, 500 ve 1000 μ L alınarak etanol ile hacimleri 1 mL'ye tamamlandı ve üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika inkübe edildikten sonra sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (Burits ve diğ., 2001):

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

A = Absorbans

Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirildi. Standart olarak BHT ve α -tokoferol kullanıldı.

3. 4. 1. 2. β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)

Toplam antioksidan aktivite β -karoten-linoleik asit sistemiyle belirlendi (Miller, 1971; Dapkevicius ve diğ., 1998). 10 mg *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi 10 mL etanolde çözülerek stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 125, 250, 500 ve 1000 μ L alınarak etanol ile hacimleri 1 mL'ye tamamlandı ve üzerlerine 4 mL β -karoten-linoleik asit çözeltisi ilave edildi. Çözelti test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Tüpler 50 °C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karotenin rengi kayboluncaya kadar (120 dakika) inkübasyona devam edildi. Bu süre sonunda absorbanslar tekrar ölçüldü. β -karotenin renk açılım hızı (R) aşağıdaki formül ile hesaplandı (Cheung ve diğ., 2003):

$$R = \ln (a/b)/t$$

$\ln$ = doğal logaritma

a = başlangıç absorbansı

b = t zaman (dakika) inkübasyonundan sonraki absorbans

t = 50 °C'deki inkübasyon süresi

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Antioksidan Aktivite (\% İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirildi. Standart olarak BHT ve α -tokoferol kullanıldı.

3. 4. 2. Sitotoksik Aktivite Tayini

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler kullanılarak brine shrimp (*Artemia salina*) yöntemi ile sitotoksik aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda LC₅₀ değeri hesaplanarak toksisite derecesi belirlenmiştir.

3. 4. 2. 1. Brine Shrimp Toksisite Testi

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden yapay deniz suyu ile hazırlanan 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm'lik çözeltiler kullanıldı. 20 mg *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi, 2 mL diklorometan içerisinde çözüldü. Bu çözeltiden 500, 50 ve 5 µL miktarlar alınarak, 5 mL hacime ayarlanmış cam test tüplerine konuldu. Çözücüler, 1 gece çeker ocak altında bekletilerek uçuruldu. Test tüpleri toplam 5 mL olacak şekilde steril yapay deniz suyu ile dolduruldu. Böylece toplamda 1000, 100 ve 10 µg/mL konsantrasyonlar elde edildi.

Çalışma genel olarak Sowemimoa ve diğ., (2007) 'ne göre yapılmıştır. Akvaryum malzemesi satan firmadan temin edilen SERA marka (Sera North America, Inc. Montgomeryville, U.S.A.) *Artemia salina* yumurtaları (kistleri), içerisinde 2 L yapay deniz suyu bulunan 5 L hacmindeki plastik, şeffaf, ağzı açık bir tank içerisine 2 g tartılarak serpildi. Tank içerisindeki yapay deniz suyu çift çıkışlı bir hava motoru ile çift hortum kullanılarak sürekli havalandırıldı. Ayrıca tank içerisindeki su sıcaklığının 28°C sabit olacak şekilde termostat ile ısıtılması sağlandı. Tank, masaüstü bir ışık kaynağının yanında yaklaşık 48 saat süre ile aydınlıkta bırakılarak *Artemia salina* larvalarının (nauplii) yumurtalardan çıkması beklendi. *Artemia salina* yumurtalarının görüntüsü ve yumurtadan çıkmış bir *Artemia salina* larvası Şekil 3.4'te verilmiştir.

Artemia salina larvaları, yumurtadan çıktıktan sonra ışığın yoğun olduğu bölgeye doğru su içerisinde göç etmektedir (Choudhary ve Thomsen, 2001). Buradan yola çıkarak, larvaların yoğun olduğu kısımdan bir mikropipet yardımıyla yaklaşık 10 µL su ile birlikte alınan larvalar stereomikroskop altında petri kabı içerisine aktararak 30'ar adet olarak sayıldı. İçerisinde 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm'lik konsantrasyonlarda *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin bulunduğu cam tüpler içerisine 30 adet canlı organizma aktarıldı. 24 saat ışık altında geçen sürenin

sonunda bir büyüteç yardımıyla canlı ve ölü (hareketsiz olmalarına göre ölü olarak tanımlanmıştır) larvaların adeti sayıldı ve LC₅₀ değeri ile % 95 güvenilirlik alt ve üst limitleri EPA (The U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.) Probit Analizi Programı (Versiyon 1.5) Probit Analizi kullanılarak hesaplandı (Anon, 2009d). Çalışma 3 paralel olarak gerçekleştirildi. Kontrol olarak steril yapay deniz suyu kullanıldı. Çalışma sonucuna göre elde edilen LC₅₀ değerleri, Tablo 3.1 e göre yorumlandı.

Tablo 3.1 : Toksisite derecesinin değerlendirilmesinde kullanılan referans değerler (Karayel, 2006).

Toksisite Derecesi	LC ₅₀ Limitleri
Oldukça toksik	< 10 µg/mL
Toksik	10-100 µg/ mL
Zararlı	100-1000 µg/ mL
Toksik Değil	> 1000 µg/ mL



Şekil 3. 4 : *Artemia salina* yumurta kistleri (a) ve larvası (b).

3. 4. 3 Genotoksik Aktivite Tayini

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. Soğan alkaloid ekstresinin genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla *Allium testi* uygulanmıştır. *Allium* testinde makroskobik analiz Rank ve Nielsen (1993) ve Akinboro (2007) 'ya göre, mitotik indeksin belirlenmesi ve mikroskobik analiz ise Akinboro (2007) 'ya göre değiştirilerek uygulanmıştır.

3. 4. 3. 1. Kullanılan Bitki Ekstresine Ait Çözeltilerin ve *Allium cepa* Soğanlarının Hazırlanması

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden distile su kullanılarak hazırlanan 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm konsantrasyonlardaki çözeltiler kullanıldı. Dozlar ağırlık/hacim (w/v) olarak hazırlandı. Çözeltiler günlük olarak değiştirildi ve kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında saklandı. Kullanılmadan önce oda sıcaklığına erişmeleri sağlandı. Kontrol olarak distile su kullanıldı.

Deney materyali olarak Muğla ili haftalık semt pazarından satın alınan açık kahverengi kabuklu, taze ve sağlıklı (yaklaşık 25-30 g) *Allium cepa* soğanları kullanıldı. Soğanların ince kahverengi kabukları temizlendi, primordiyal dokuya zarar verilmeden köklenmenin gelişeceği bölge bir bıçak yardımıyla temizlendi.

3. 4. 3. 2. Makroskobik Analiz

Çalışma standart prosedürlere uygun olarak gerçekleştirildi (Fiskesjö, 1985; Rank, 1993; Akinboro, 2007). Sağlıklı ve taze durumdaki soğanlardan taze primordiyal köklere sahip olanları seçilmiş ve her grupta 8 soğan olacak şekilde toplam 4 gruba (kontrol grubu, 10 ppm grubu, 100 ppm grubu, 1000 ppm grubu) ayrılmıştır. Fiskesjö (1985) tarafından tanımlanan modifiye edilmiş çalışma formu dikkate alınarak, çalışmanın başlangıcında soğanlar direkt olarak test edilecek sıvılar içerisine alınmıştır. Her soğanın uç kısmı, çalışma sıvıları ile doldurulmuş 100 mL'lik beherlere yerleştirilerek, karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. 48, 72 ve 144 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, her bir konsantrasyondaki ve kontrol grubundaki her bir soğanın kök demetlerinin toplam uzunluğu santimetre (cm) olarak cetvel ile ölçülmüştür.

3. 4. 3. 3. Mikroskopik Analiz

Çalışma genel olarak Akinboro (2007) 'de açıklandığı gibi uygulanmıştır. Sağlıklı ve taze durumdaki soğanlardan taze primordiyal köklere sahip olanları seçilmiş ve her grupta 8 soğan olacak şekilde toplam 4 gruba (Kontrol grubu, 10 ppm grubu, 100 ppm grubu, 1000 ppm grubu) ayrılmıştır. Fiskeşjö (1985) tarafından tanımlanan modifiye edilmiş çalışma formu dikkate alınarak, çalışmanın başlangıcında soğanlar direkt olarak test edilecek sıvılar içerisine alınmıştır. İlk 24 saatin ardından sıvılar tazeleriyle değiştirilmiştir. İkinci günde (48.saat) ise mikroskopik preparatların hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Mikroskopik preparatlar hazırlanırken ezme preparat yöntemi uygulanmıştır (Elçi, 1994). Steril bistüri ile soğanlardan alınan kök uçları öncelikle 1 N HCl içeren tespit (fiksasyon) çözeltisine alınmıştır. 5 dakika sürenin ardından tespit çözeltisinden çıkarılan örnekler temiz bir lam üzerine alınarak % 2'lik asetoorsein çözeltisine tabi tutulmuş, lam alevden geçirme yöntemiyle ısıtılarak tespit çözeltisinin kök ucu hücrelerine nüfuz etmesi sağlanmıştır. Preparat temiz bir lamel ile kapatılarak kök meristem dokusu ezme preparat tekniğine uygun olarak hazırlanıp mikroskopta incelenmiştir. Her çalışma grubundan 20 preparat hazırlanmıştır. Her preparatta 10 tesadüfi bölgede toplam 1000 hücre sayılmıştır.

3. 4. 3. 4. Kromozomal Anormallikler

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin Allium testi yöntemi ile mitotik aktivitesinin ve kromozom morfolojisinin değerlendirilmesine dayanan çalışmada, 48 saat inkübasyon süresinde Kontrol grubu, 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm konsantrasyonlarını içeren çözeltilerde köklendirilen soğanlarda kök ucu meristem dokusunda mitoz bölünen hücrelerde gözlenen kromozomal anormallikler incelenmiştir.

3. 4. 4. Antikolinesteraz Aktivite Tayini

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak (Ellman ve diğ., 1961) bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü (Kıvrak ve diğ., 2009). Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkol iniyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. 96 kuyucuklu mikrolakaların herbir kuyucuğuna 0,1 M pH=8 fosfat

tamponundan 160 µL, 10 µL *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden veya elde ettiğimiz saf madde (–)-likorinden etanol ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözelti, AChE veya BChE çözeltisinden ise 10 µL ilave edildi. 25 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 10 µL DTNB çözeltisi ve 10 µL asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodür ilave edildi. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. OStandart olarak galantamin kullanıldı.

Kolinesteraz

Asetilkolin iyodür (veya Bütirilkolin iyodür) —————► Tiyokolin
Tiyokolin + DTNB —————► 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit

Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (A = Absorbans):

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

3. 5. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN CİHAZLAR

3. 5. 1. Rotary Evaporatör

Heidolph Laborata 4000 Efficient Rotary Evaporatör (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Almanya)

3. 5. 2. Spektrofotometre

DR-2800 (Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Almanya)

3. 5. 3. Mikroplaka Okuyucu

SpectraMax 340 PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) , 96 Kuyucuklu

3. 5. 4. Mikroskoplar

Işık Mikroskobu, Olympus CX31 (Olympus America, Melville, NY, U.S.A.)

Stereomikroskop, Olympus SZX 16 (Olympus America, Melville, NY, U.S.A.)

3. 6. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER

3. 6. 1. Kimyasal Maddeler

Folin-Ciocalteu (FCR) reaktifi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,6-di-*t*-bütıl-1 hidroksitoluen (BHT) Fluka firmasından (Fluka Chemie GmbH, Sternheim, Almanya); α -tokoferol, kersetin, β -karoten, linoleik asit, bütirilkolinesteraz, asetilkolinesteraz, 5,5'-dithiobis (2- nitrobenzoik) asit (DTNB), asetilkolinyodür, bütirilkolinyodür, galantamin Sigma firmasından (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Almanya.); sodyum karbonat, sodyum fosfat monobazık, sodyum fosfat dibazık, pirokatekol, potasyum asetat, alüminyum nitrat, Tween-40, kloroform, diklorometan, petrol eteri, metanol, etanol, asetik asit, % 25'lik amonyak, bizmut (III) nitrat, potasyum iyodür, orsein, hidroklorik asit, silika jel ve alüminyum oksit plak (1.05550) E. Merck firmasından (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. Kullanılan kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

3. 6. 2. Kullanılan Çözeltiler

3. 6. 2. 1 . 0,1 mM DPPH Çözeltisi

4 mg DPPH 100 mL etanolde çözümlenerek hazırlandı.

3.6. 2. 2. β -Karoten-Linoleik Çözeltisi

β -karoten çözeltisi, 0,2 mg β -karoten 1 mL kloroformda çözümlenerek hazırlandı. Bu çözeltiye 20 μ g linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotary evaporatörde uçurulduktan sonra 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş distile su ilave edildi ve 20 dakika karıştırıldı.

3.6 .2. 3. % 2'lik Na_2CO_3 Çözeltisi

2 g Na_2CO_3 tartılarak 100 mL'lik balon joje içine alındı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.6. 2. 4. % 10'luk Alüminyum Nitrat Çözeltisi

1,76 g $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ bileşiğı distile su ile 10 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3. 6. 2. 5. 1 M Potasyum Asetat Çözeltisi

0,9615 g potasyum asetat 10 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

3.6. 2.6. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Kersetin Çözeltisi

25,8 mg kersetin 25 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

Pirokatekol Çözeltisi

10 mg pirokatekol 100 mL distile suda çözülerek hazırlandı.

BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) Çözeltisi

10 mg BHT 10 mL etanol içerisinde çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

α -tokoferol Çözeltisi

% 97'lik 10,31 mg α -tokoferol 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α -tokoferol çözeltisi hazırlandı.

Galantamin Çözeltisi

10 mg galantamin 10 mL etanol içerisinde çözünerek 1000 ppm'lik galantamin çözeltisi hazırlandı.

3.6 .2.7. % 2 asetoorsein

2 g orsein, % 45'lik asetik asit içerisinde ısıtılarak çözüldü.

3.6. 2.8. Fosfat tamponu

8,89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartıldı. Bir miktar saf su ile çözüldü ve hacmi 500 mL'ye tamamlandı. 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mL'lik balon jojeye konuldu. Bir miktar saf su ile çözülerek hacme tamamlandı.

- pH=8 tamponu hazırlanması: Fosfat tamponu için hazırlanan Na_2HPO_4 'den 94,7 mL, NaH_2PO_4 'den de 5,3 mL alındı. pH metre ile pH kontrol edildi ve 200 mL'ye seyreltilti.
- pH=7 tamponu hazırlanması: NaH_2PO_4 'den 39 mL, Na_2HPO_4 'den de 61 mL alındı. pH metre ile pH kontrol edilerek 200 mL 'ye seyreltilti.

3.6. 2.9. DTNB çözeltisinin hazırlanması

16 mg DTNB pH=7 tamponunda çözöldü. 7,5 mg NaHCO₃ 1 mL pH=7 tamponunda çözöldü. İkisi karıştırıldı ve 4 mL'ye pH=7 tamponuyla seyreltildi.

3.6. 2.10. Asetilkolin iyodür Hazırlanması

16 mg asetikolin iyodür tartıldı ve 4 mL deiyonize suda çözöldü.

3.6. 2.11. Bütirilkolin iyodür Hazırlanması:

4 mg bütirilkolin iyodür tartıldı ve 4 mL deiyonize suda çözöldü.

3.6. 2.12. Dragendorff Belirtecini Hazırlanması

25 mL A çözeltisi, 25 mL B çözeltisi, 100 mL glasiyal asetik asit ve 350 mL distile su karıştırılarak 500 mL Dragendorff belirteci hazırlandı.

A Çözeltisi:

4,25 g Bizmutsubnitrat 250 mL su ile çözöldü. Hazırlanan çözeltinin üzerine 50 mL glasiyal asetik asit ilave edildi.

B Çözeltisi:

40 g potasyum iyodür 100 mL suda çözöldü.

3.6. 2.13. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Adsorbanlar

Kimyasal analiz kısmında kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar Tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2 : Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar.

No	Yöntem	Adsorban
1	Kolon Kromatografisi	Silika Jel (Silika jel 60, 0.063-0.200 mm, Merck 107734)
2	İnce Tabaka Kromatografisi Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	Aluminyum oksit (Hazır 20x20 TLC plak, 60 F ₂₅₄ , neutral, Merck 105550)

3. 6. 2. 14. Kaya tuzu

Akvaryum malzemesi satan firmadan temin edilen, iyotsuz kaya tuzu kullanılmıştır.

3. 6. 2. 15. Yapay deniz suyu

35 g kaya tuzu 1 L distile su içerisinde çözünerek hazırlandı.

3. 7. İSTATİSTİK HESAPLAMALAR

Toplam Fenolik ve Flavonoit İçeriğın Belirlenmesi, Antioksidan Aktivite Tayini ve Antikolinesteraz Aktivitesi sonuçlarının değeriendirilmesinde, sonuçlar üç paralel testin ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir. Sonuçlar Student *t* testine göre % 95 güven sınırları içinde bulunmuştur. Paralel ölçümler arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Sitotoksisite testinde EPA (The U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, U.S.A.) Probit Analizi Programı (Versiyon 1.5) Probit Analizi uygulanmıştır (Anon, 2009d). Genotoksisite testinde ise SPSS 14.01 paket programı kullanılarak gruplar arasındaki önem farkı çok yönlü karşılaştırma testi (LSD) kullanılarak bulunmuştur ($p<0.05$).

4. BULGULAR

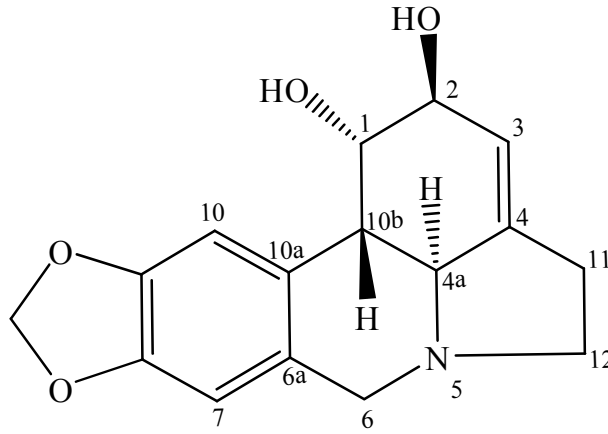
Tablo 4.1 de kuru toz halindeki bitkinin (soğan kısmı) ve bundan hazırlanan ekstrelerin miktarları ve % verimleri verilmiştir.

Tablo 4.1: Kuru bitki miktarı, ekstre miktarları ve % verimleri

Bitki	Kuru Toz Bitki (Hava Kurusu) (gram)	Ekstre	Ekstre Miktarı (gram)	% Verim
<i>Sternbergia fischeriana</i> (Herbert) Rupr. (soğan)	1647	A	175,54	% 10,65
		B	62,11	% 3,77
		C	4,27	% 0,26

4. 1. KİMYASAL ANALİZ SONUÇLARI

Kromatografik işlemler sonucunda *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden izole ettiğimiz ilk alkaloid (–)-Likorin’dir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : (–)-Likorin

(–)-Likorin, opak beyaz amorf kristaller halinde (25 mg) elde edilmiştir (Verim: % 0.001), (Rf: $\approx 0,4$), Erime Noktası: 249 °C; optik çevirmesi $[\alpha]^{25}_D$ -64 ($c=0.1$, MeOH), IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3329, 2922, 2853, 2370, 2341, 1653, 1486, 1356, 1261, 1203, 1183, 1131, 1036, 1002, 938.

Tablo 4.2: (-)-Likorin'in NMR Spektral Verisi (500 MHz, CD₃OD, ppm)

C No	¹ H-NMR	Multiplicity (J (Hz))	¹³ C-NMR*	APT	
1	4.38	brs	70.55	CH	C-4a
2	4.08	brs	71.73	CH	
3	5.56	brs	117.70	CH	
4	-	-	142	q	
4a	2.78	d (11)	61.03	CH	
6 α	3.45	d(14)	56.42	CH ₂	C-6a, C-10a ve C-4a
β	4.02	d(14)			
6a	-	-	129.01	q	
7	6.56	s	106.78	CH	C-8, C-6a ve C-6
8	-	-	146.24	q	
9	-	-	146.74	q	
10	6.80	s	104.60	CH	C-8, C-9 ve C-6a
10a	-	-	128.33	q	
10b	2.62	d(11)	39.97	CH	
11 α	2.48	ddd(1.5, 9, 17.2)	27.88	CH ₂	
β	2.59	brdd(8.6, 17.2)			
12 α	2.34	dd(9, 18)	53.27	CH ₂	
β	3.3	m			
OCH ₂ O	5.82	d(1)	100.85	CH ₂	C-8,C-9

*APT (Attached Proton Test), HSQC ve HMBC yöntemlerine dayanarak karbonlar ve protonlar belirlenmiştir.

IR spektrumunda (CHCl₃) hidroksil grubuna ait gerilim bandı 3329 cm⁻¹ de, CH ve CH₂ gerilim bantları 2922 ve 2853 cm⁻¹ de, bunların uzantısı olan overtone ve Fermi bantları 2369 ve 2341 cm⁻¹ de izlenmiştir. Çifte bağa ait gerilim bandı 1653 cm⁻¹ de, 1630, 1541, 1501 cm⁻¹ de ise aromatiklik bantları ve C-N gerilim bandı ise 1036 cm⁻¹ de izlenmiştir. Karakteristik dioksimetilen sinyaline ait bant ise 938 cm⁻¹ de gözlenmektedir (Şekil 4.2).

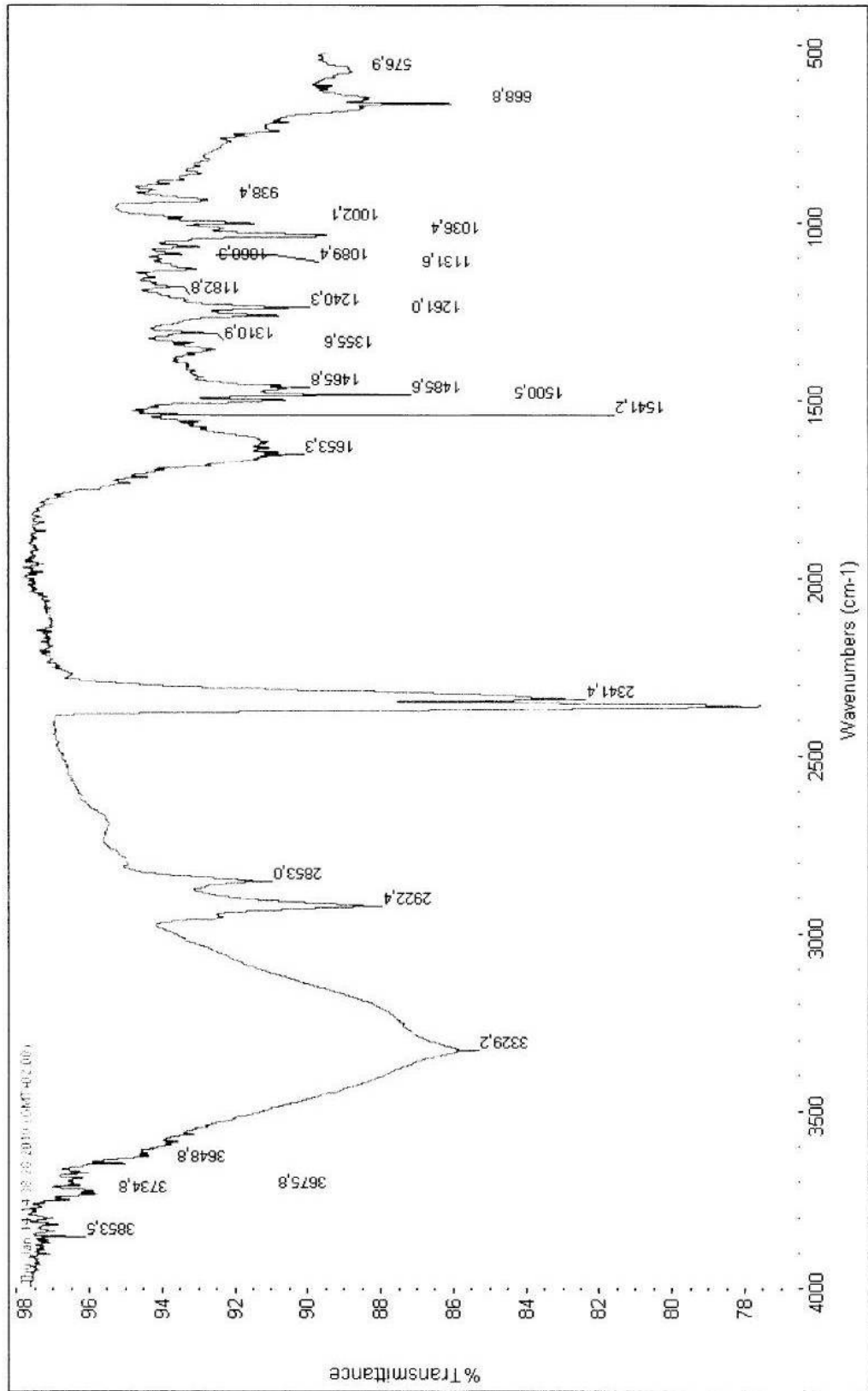
Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda iki singlet sinyali aromatik sinyallerin rezonans olduğu alanda izlenince yapıda bir aromatiklik olduğuna işaret etti. Ayrıca 5.82 ppm'de 2 protonluk uzun keskin bir sinyalin varlığı yapıda bir dioksimetilen grubunun varlığını göstermiştir. İlâveten 5.56 ppm de bir olefinik proton genişlemiş bir singlet (brs)

şeklinde izlenmektedir. Elektronegatif atomlara bağlı olabileceği düşünülen sinyaller 4.38 ve 4.08 ppm lerde birer protona karşılık gelen genişlemiş singletler halinde (brs) izlenmişlerdir. ^1H NMR spektrumunda ayrıca 4.02 - 2.34 ppm arasında gözlenen sinyaller de yapıda N ve O'ye komşu diğer protonların varlığına işaret etmiştir. (Şekil 4.4-4.8)

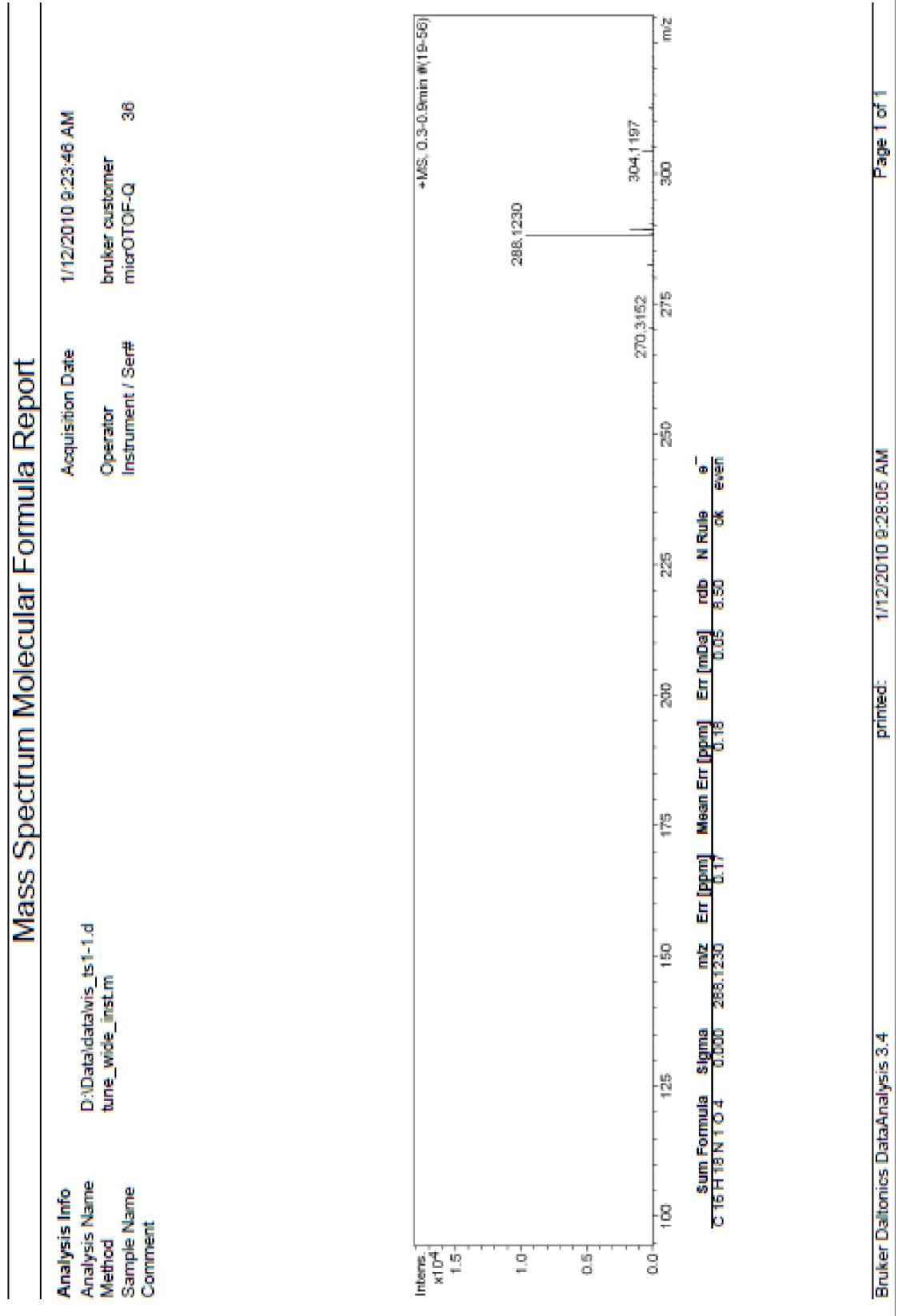
Alınan ^{13}C spektrumu ise yapının iskeleti hakkında daha fazla bilgi vermiştir: 129.01, 106.78, 146.24, 146.74, 104.60 ve 128.33 ppm de gözlenen 6 sinyal yapıda bir aromatik halkanın varlığına işaret etmiştir. Bu piklerden 146.24, 146.74 piklerinin diğerlerine nazaran daha alt alanda gözükmesi bu C'ların dioksimetilen halkasının katerner C'larına işaret ederek bu grubun benzen halkasına bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Nitekim 100.85'de O-CH₂-O (dioksimetilen) grubunun karbon sinyali olarak açıkça gözlenmektedir. 53.27, 56.42 ve 61.03 de piklerin gözlenmesi N'un varlığını bir kez daha onaylamaktadır, çünkü yapıda hiç metoksi grubu olmadığı proton NMR spektrumundan açıkça anlaşılmaktadır, bu durumda ^{13}C spektrumunda 50- 60 ppm arasında çıkan sinyallerin OCH₃ grubuna ait olmayıp N'a komşu C'lar olduğu açıkça anlaşılmıştır (Şekil 4.9-4.13). Çift dimensiyonlu tekniklerden direkt C-H korelasyonuna dayanan Heteronuklear Single Quantum Korelasyon (HSQC) tekniğiyle hangi protonun hangi C'a bağlı olduğu, tabii ki katerner karbonlar hariç, saptanmıştır (Şekil 4.14-4.18). Katerner karbonların saptanabilmesi için ise Heteronuklear Multiple Band Korelasyon (HMBC) tekniği kullanılmıştır. Bu teknikte birbirine üç bağ uzaklıkta olan bir proton ve karbon arasındaki *J* değerinin genelde *J*=6-8 Hz olduğu varsayılarak geliştirilen 2D NMR tekniği kullanılarak birbirinden üç bağ uzaklıktaki H ve C'ların korelasyon göstermesiyle hiç proton taşımayan C'ların da belirlenmesi mümkün olmaktadır (Şekil 4.19-4.24). Likorinin elektro spray analiz yöntemiyle alınan Yüksek Rezolüsyonlu Kütle Spektrumu (High Resolution Mass Spectrometry/ HRMS)'nda moleküler pik (M+1)'e karşılık gelen pik olarak *m/z* 288,1230 (teorik *m/z* 288,1236) de izlenmektedir. Sonuç olarak likorinin kapalı formülüne C₁₆H₁₇NO₄ karşılık gelen yapının moleküler piki 287,1157 'dir (Şekil 4.3).

Bütün bu veriler doğrultusunda ve yapılan literatür taramasıyla yapının bir alkaloid olduğu kesinlik kazanmış ve Amaryllidaceae familyası bitkilerinde yaygın olarak bulunan likorin olduğu anlaşılmıştır. Fakat literatürde likorine ait NMR verileri çok

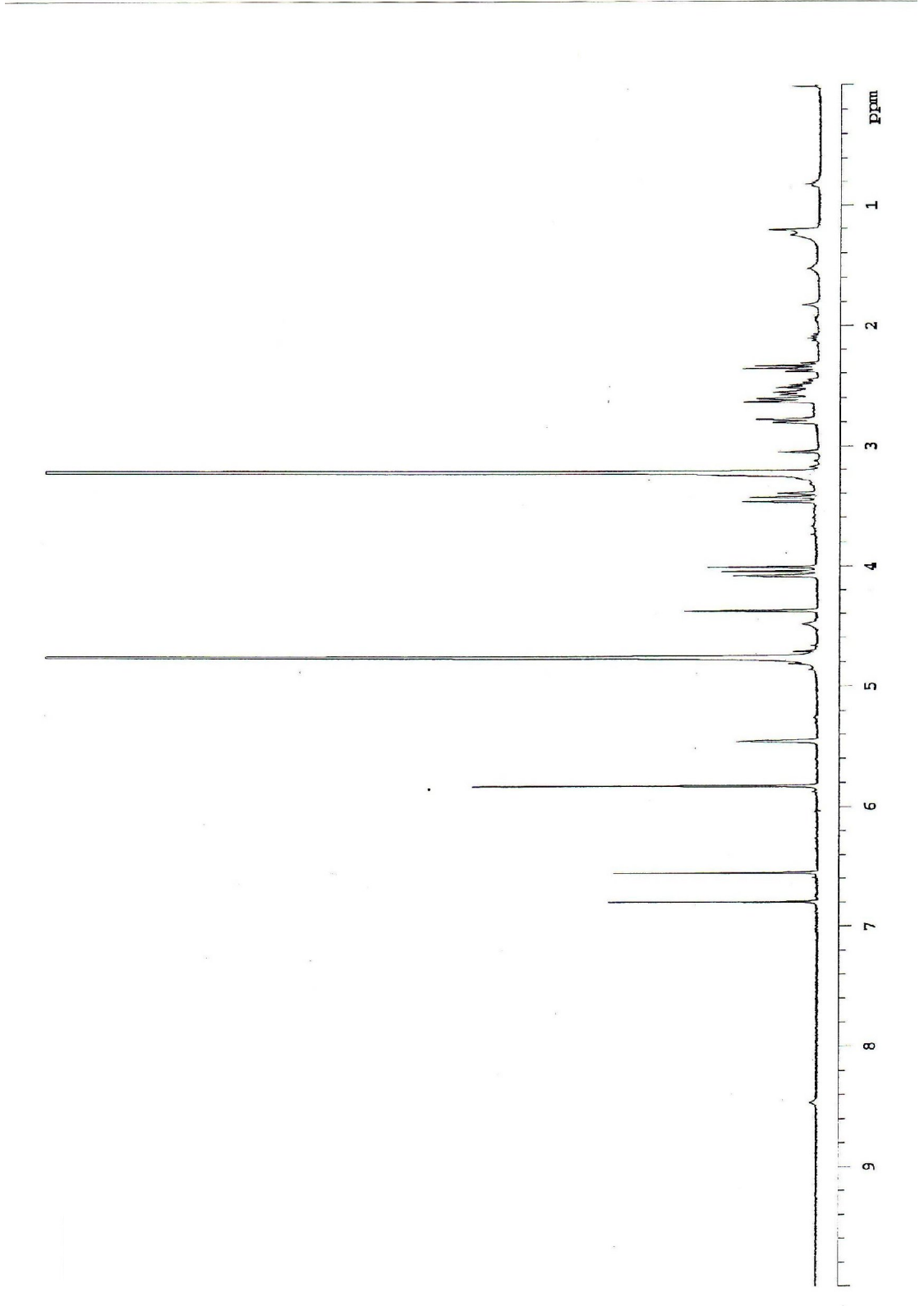
farklılıklar göstermektedir ve nitekim bunların bir kısmı rasemik, bir kısmı (-), bir kısmı ise (+) likorin olarak aydınlatılmıştır. Yaptığımız kapsamlı literatür çalışması (Cordell, 1981; Evidente ve diğ., 1983; Likhitwitayawuid ve diğ., 1993; Yamada ve diğ., 2009;) ile bu tez çalışmasında *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisi soğanlarından izole ettiğimiz maddenin (-)-likorin olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1).



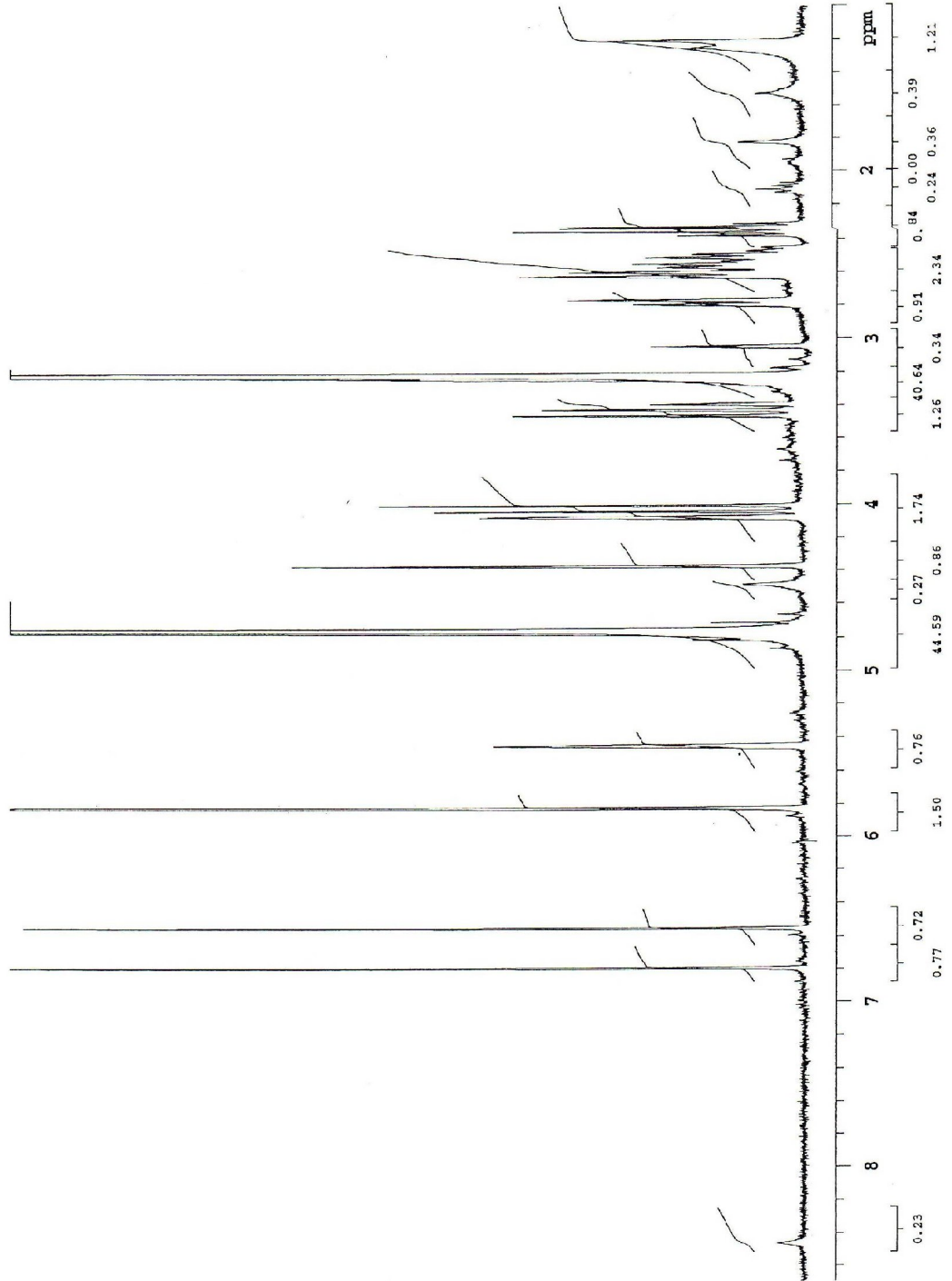
Şekil 4.2 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin IR spektrumu.



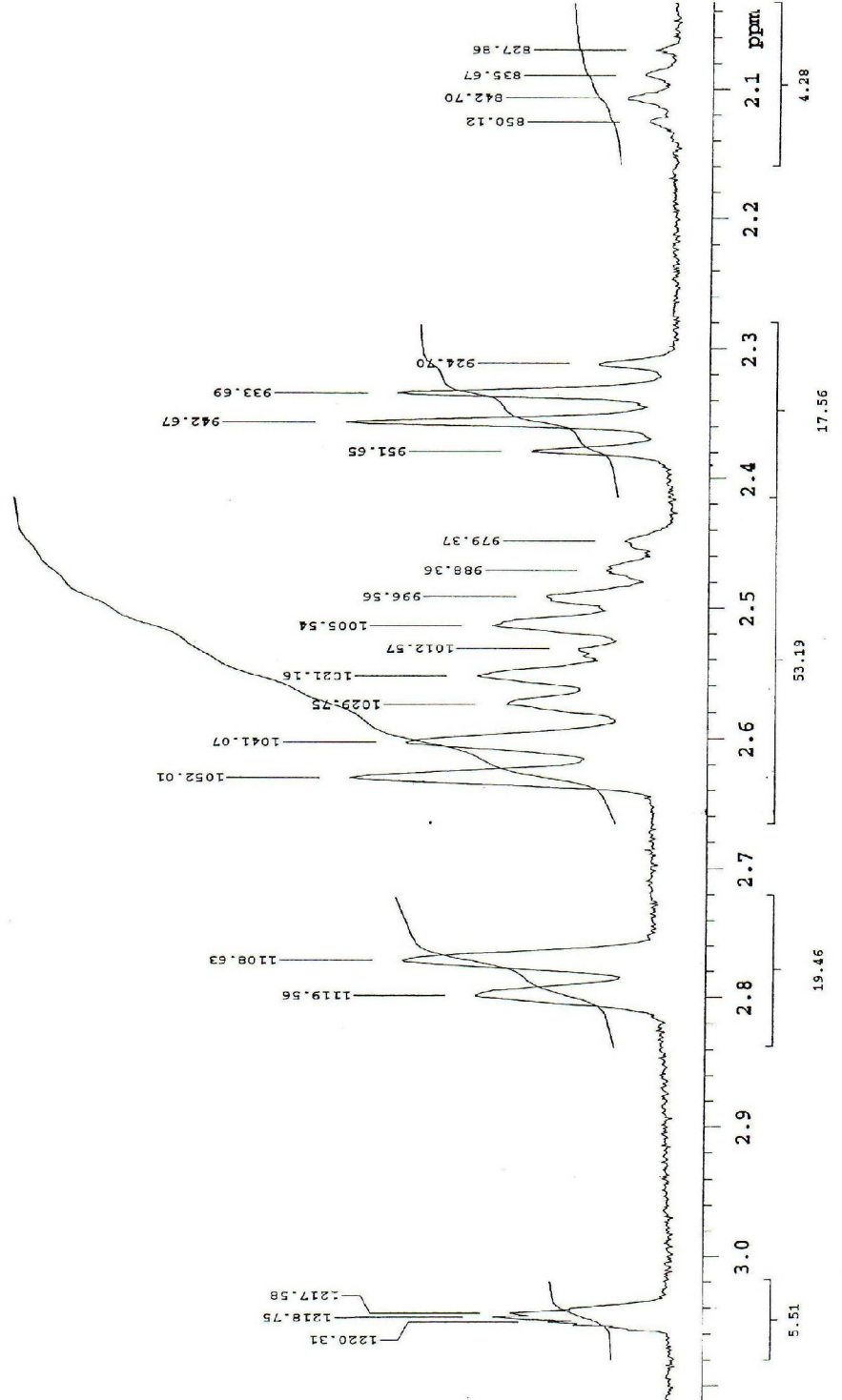
Şekil 4.3 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorine ait kütle spektrumu (HRMS).



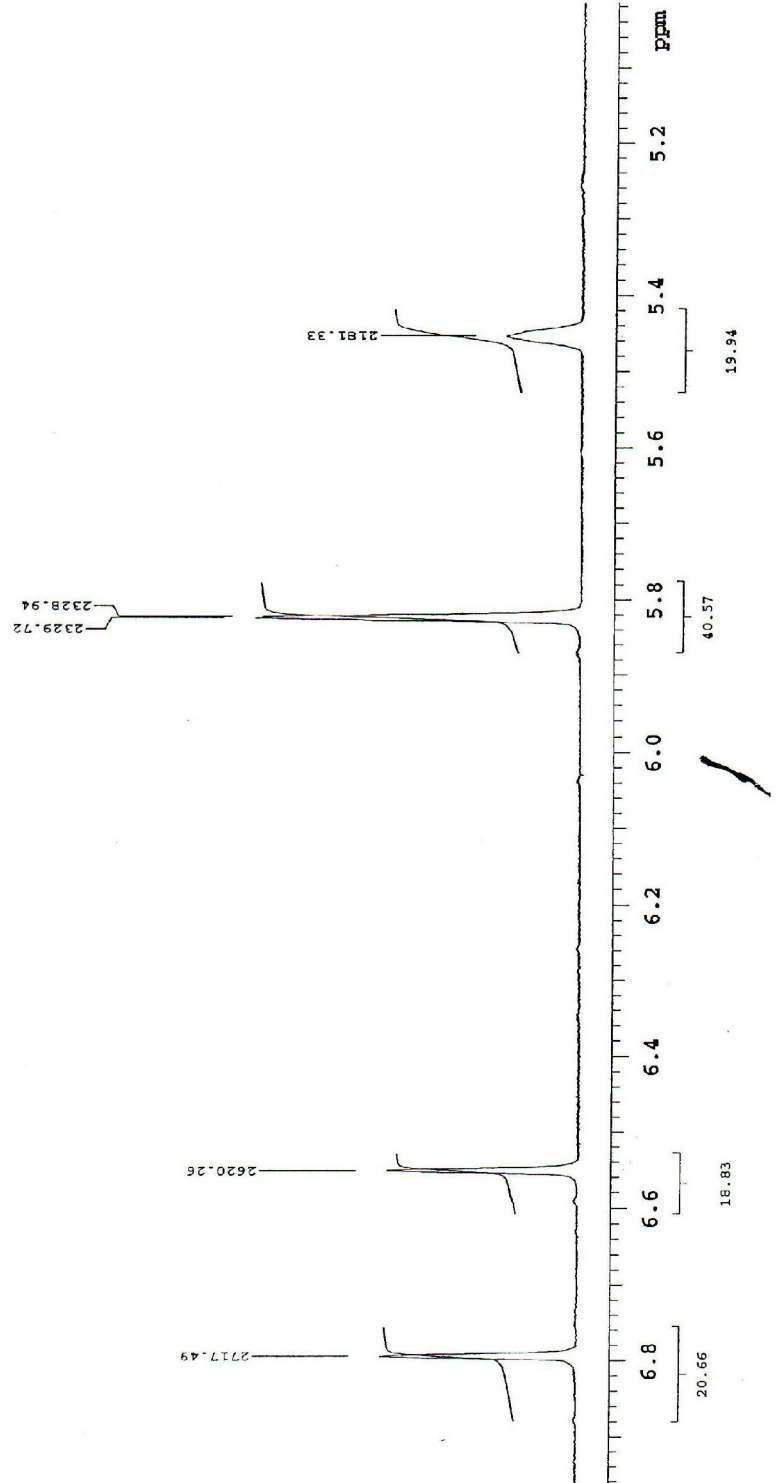
Şekil 4.4 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin ^1H NMR spektrumu.



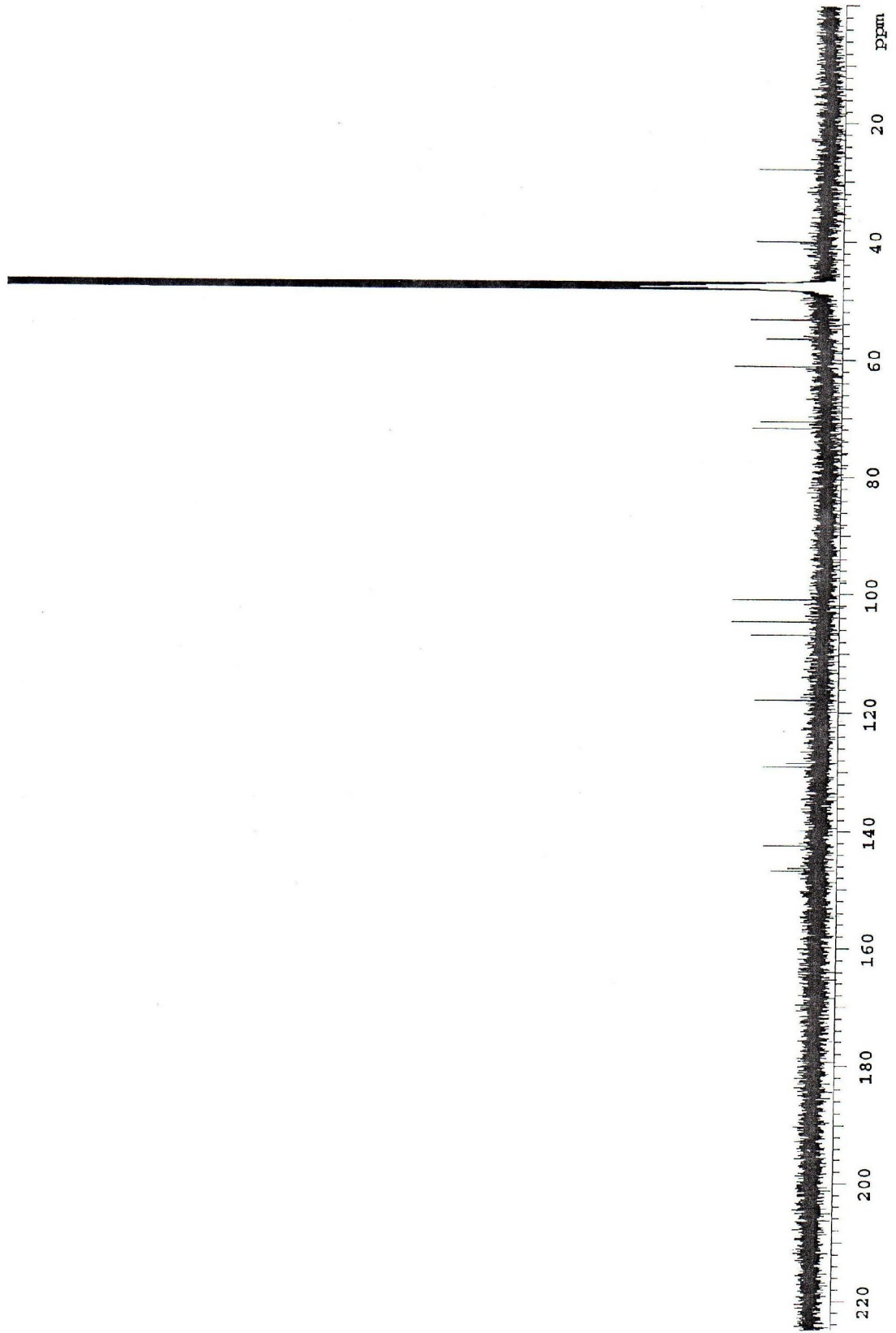
Şekil 4.5 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (-)-likorinin ^1H NMR spektrumu.



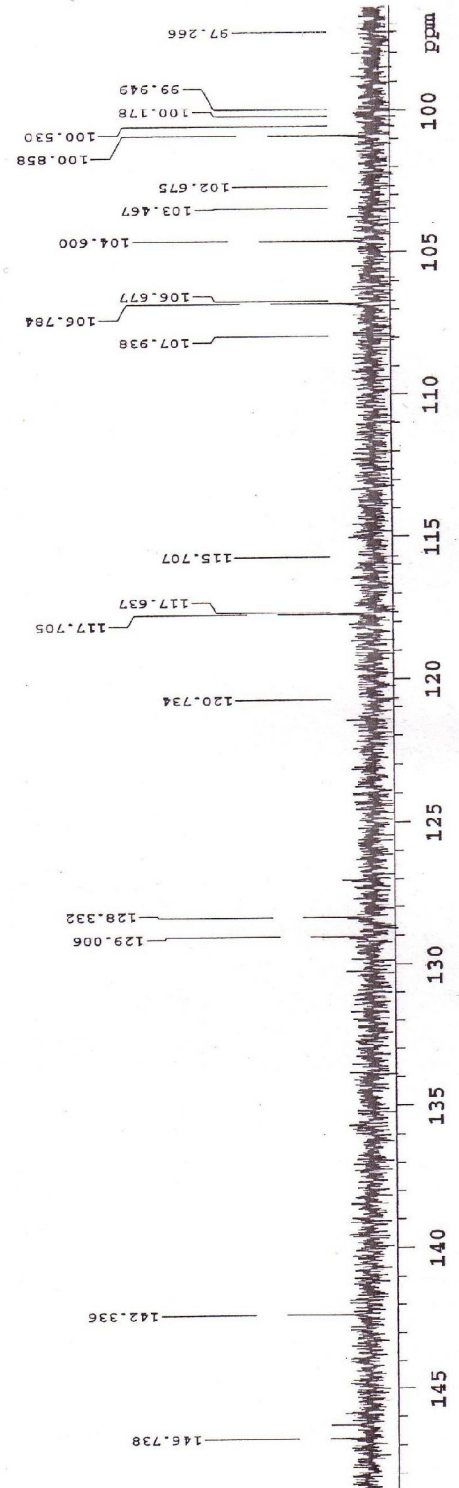
Şekil 4.6 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin ¹H NMR spektrumu



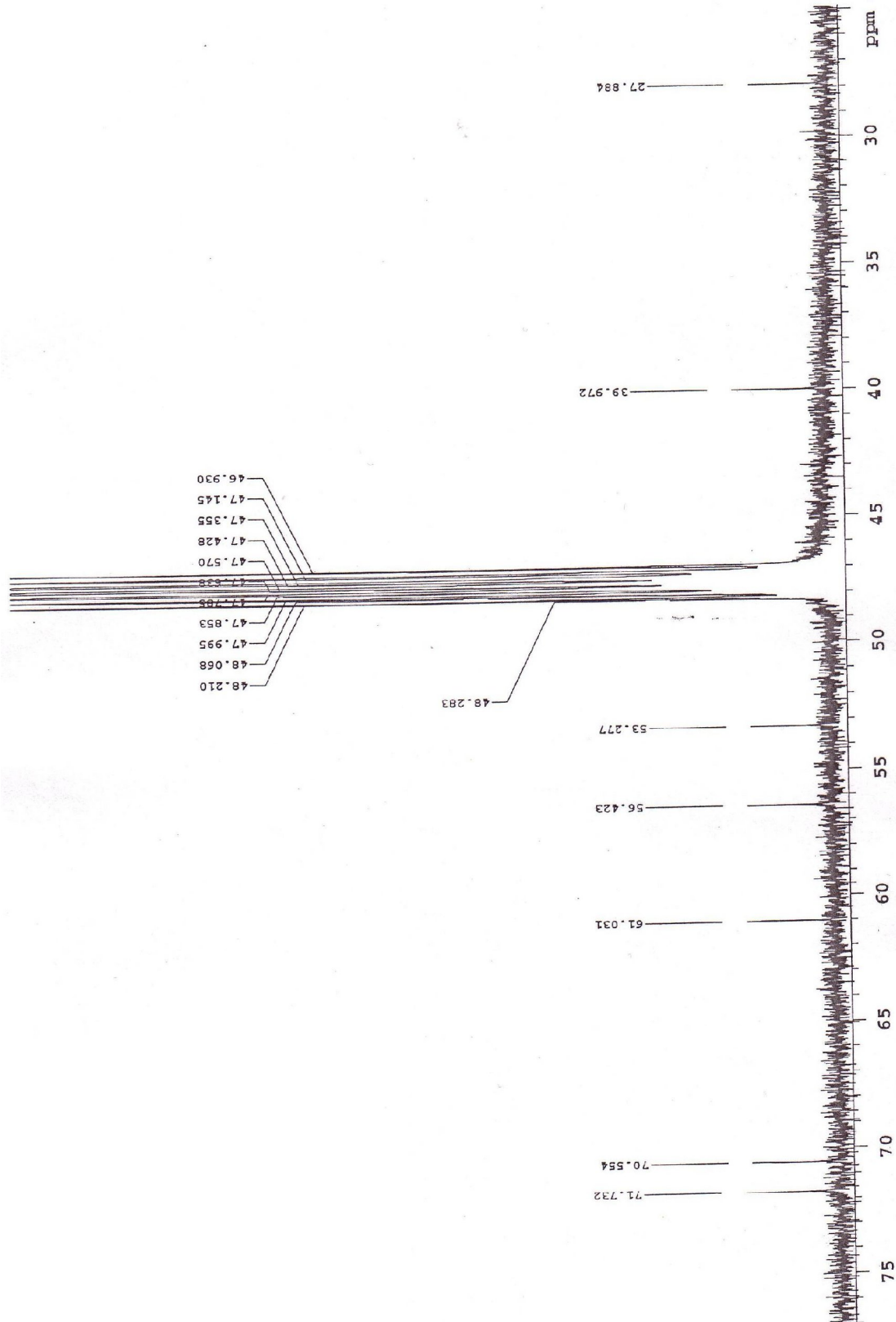
Şekil 4.8 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin ^1H NMR spektrumu.



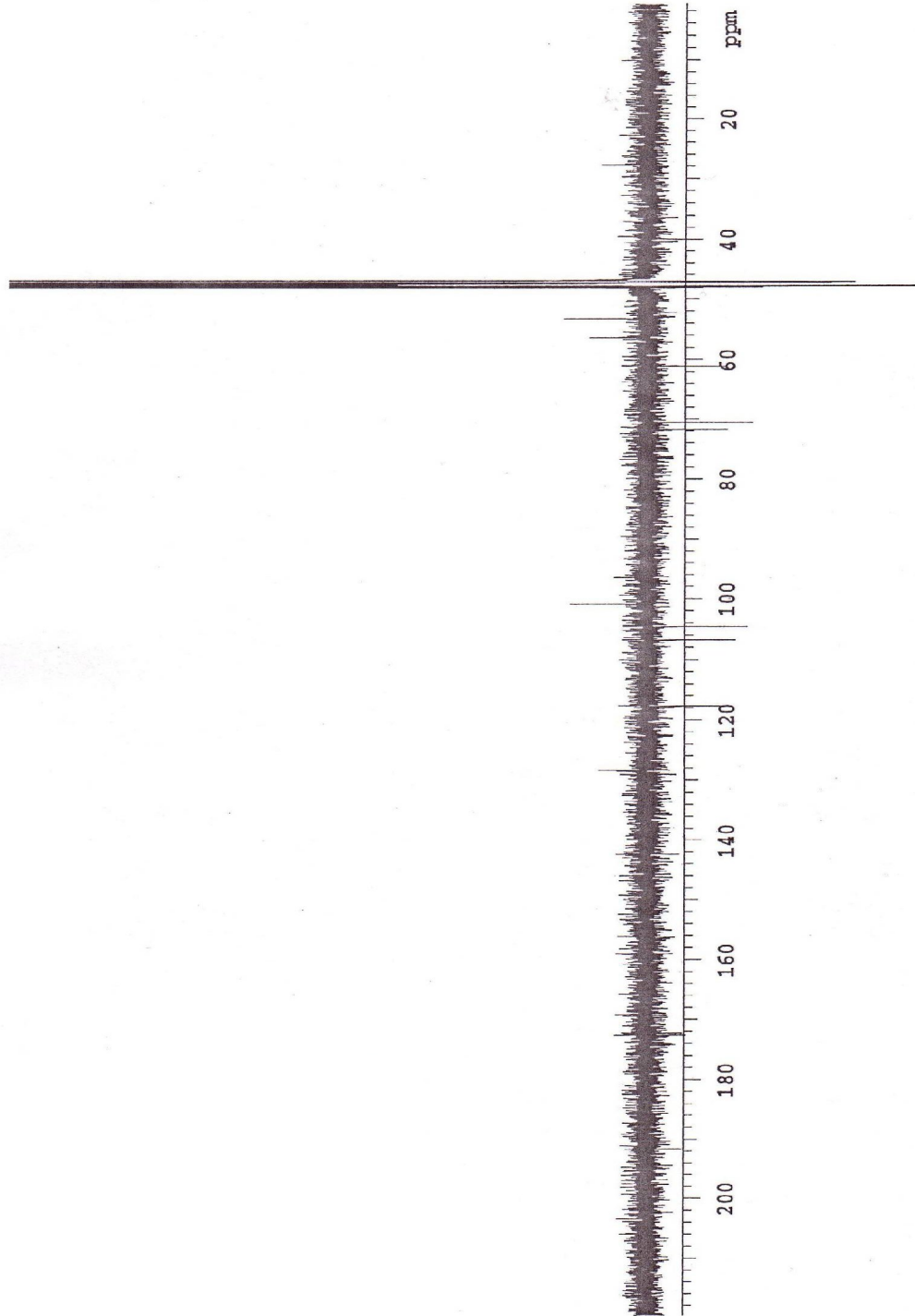
Şekil 4.9 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (-)-likorinin ^{13}C (BB) NMR spektrumu.



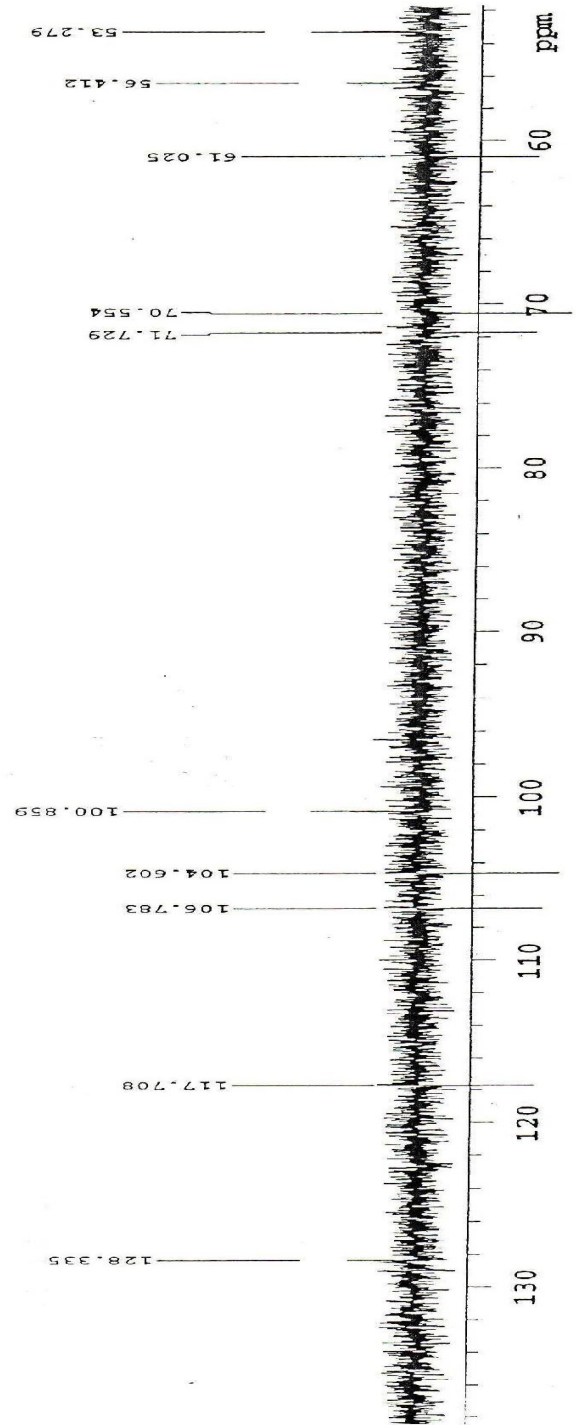
Şekil 4.10 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin ^{13}C (BB) NMR spektrumu



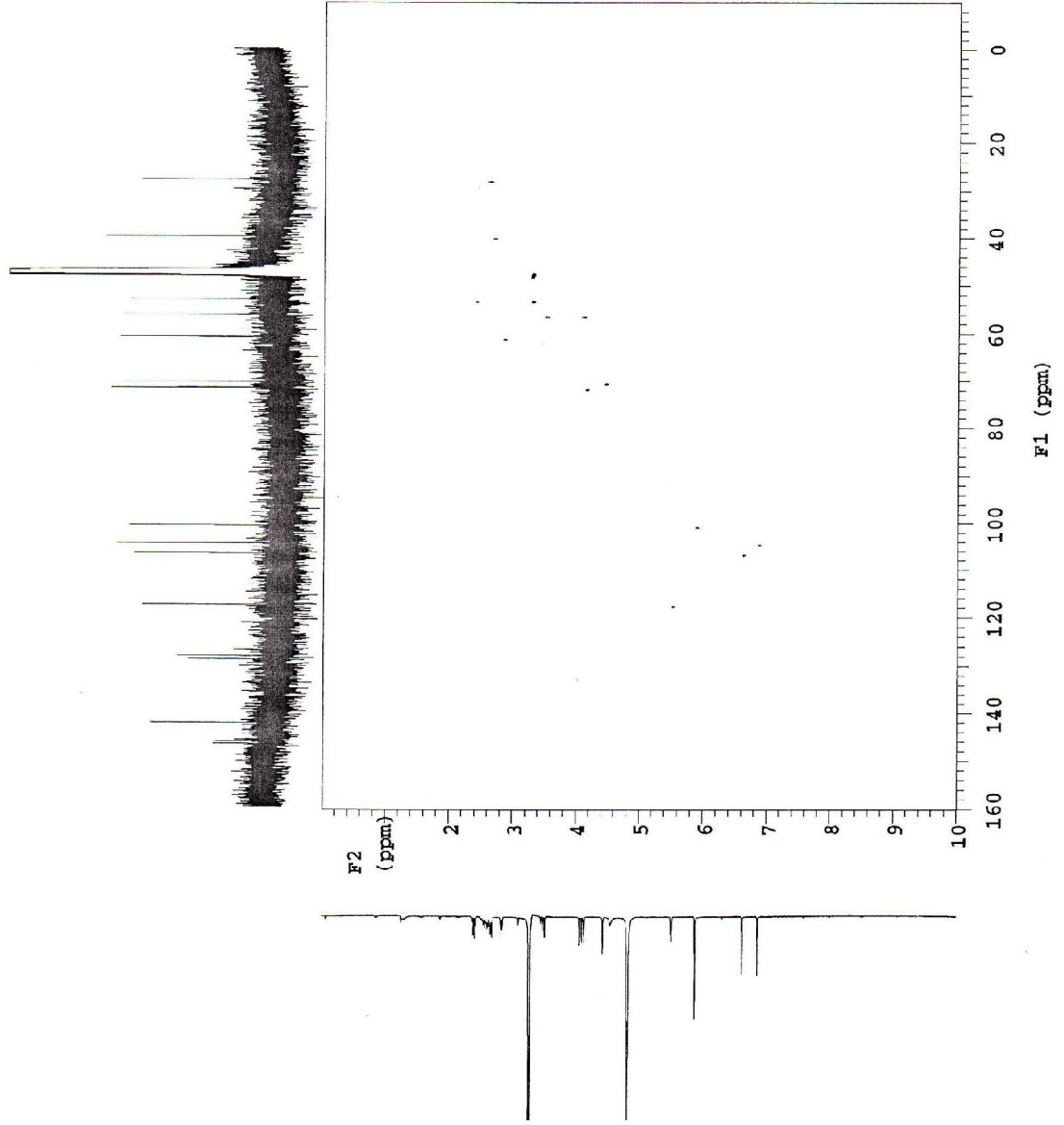
Şekil 4.11 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin ^{13}C (BB) NMR spektrumu.



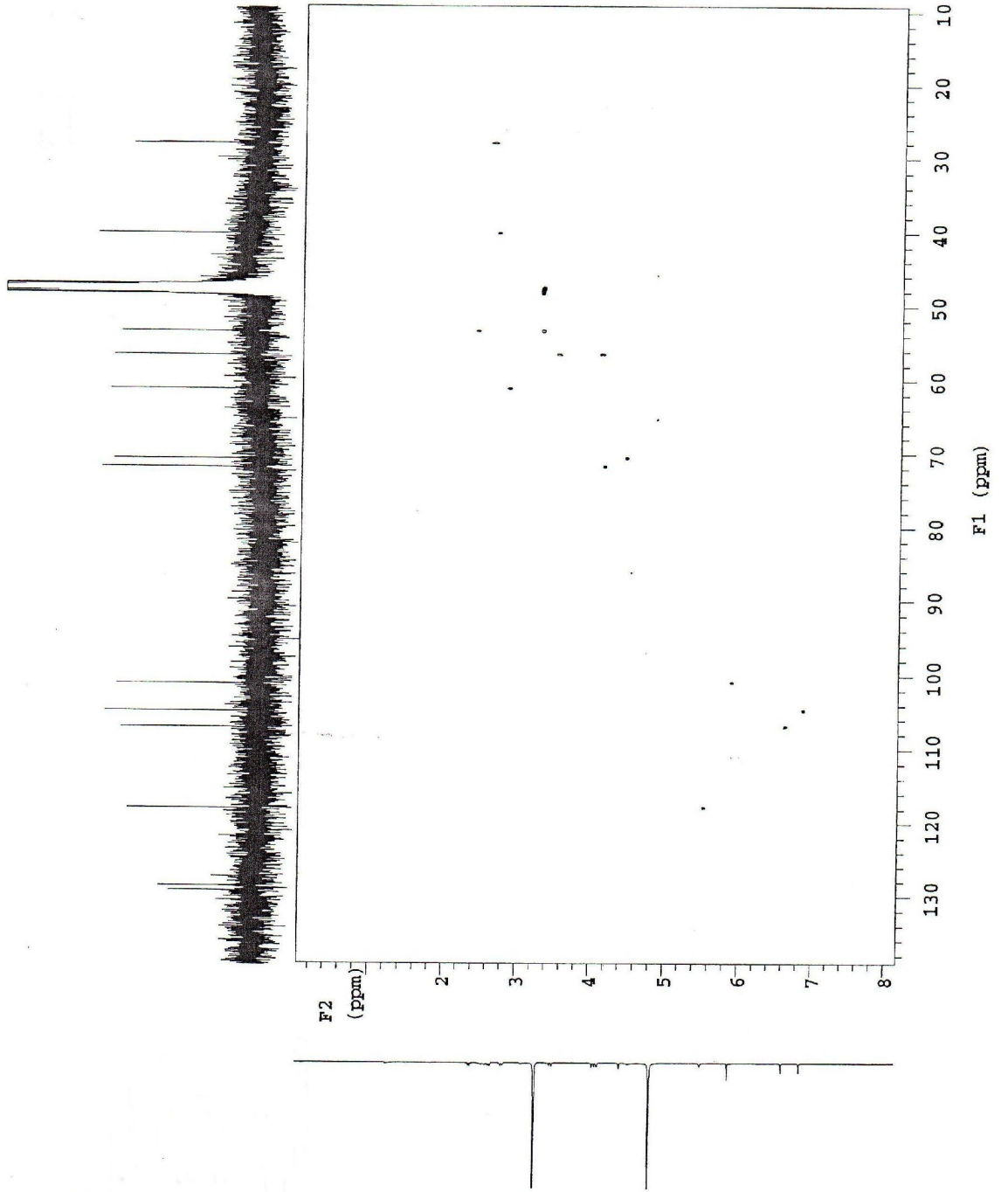
Şekil 4.12 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin ^{13}C (APT) NMR spektrumu.



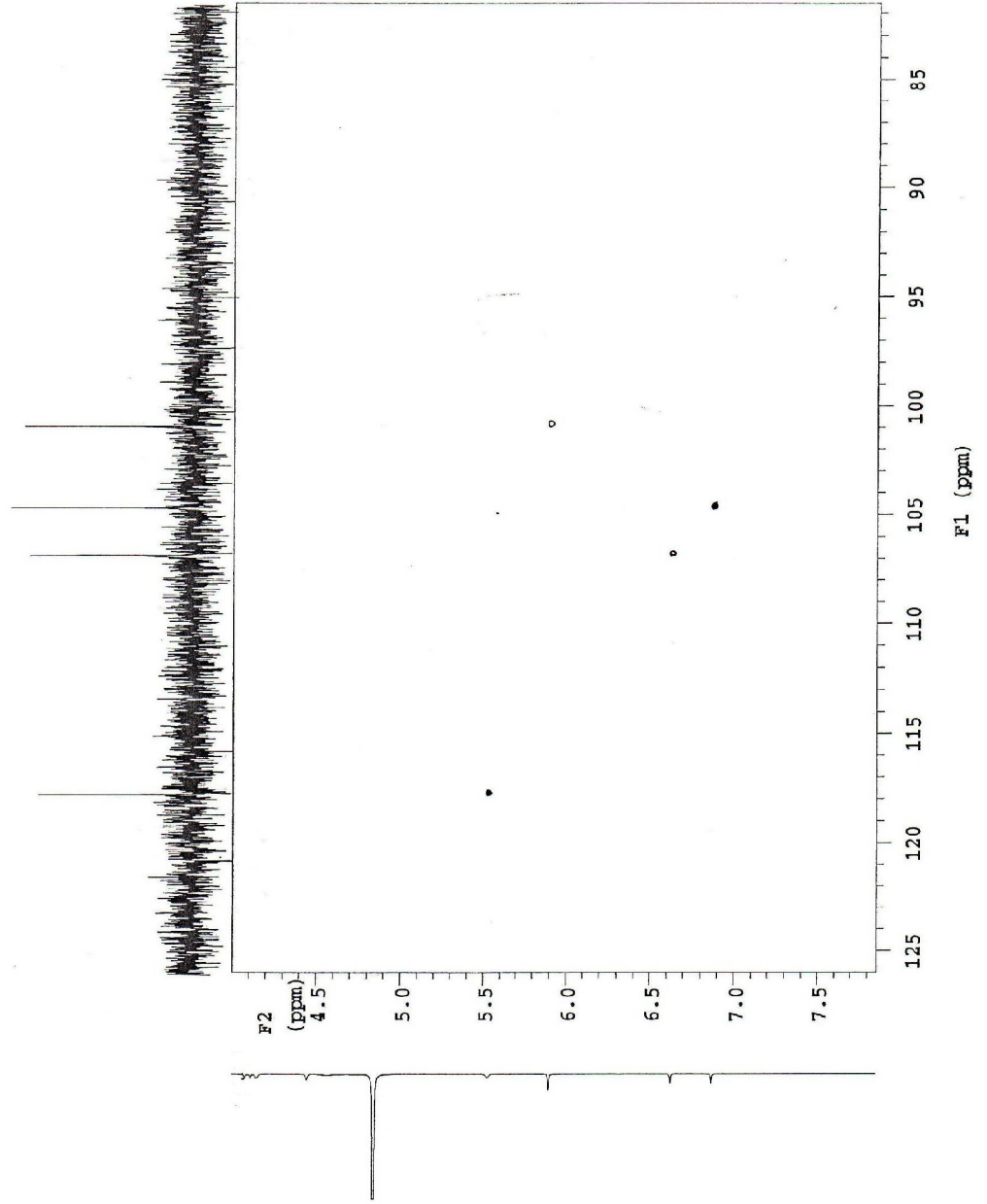
Şekil 4.13. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr' den izole edilen (–)-likorinin ^{13}C (APT) NMR spektrumu.



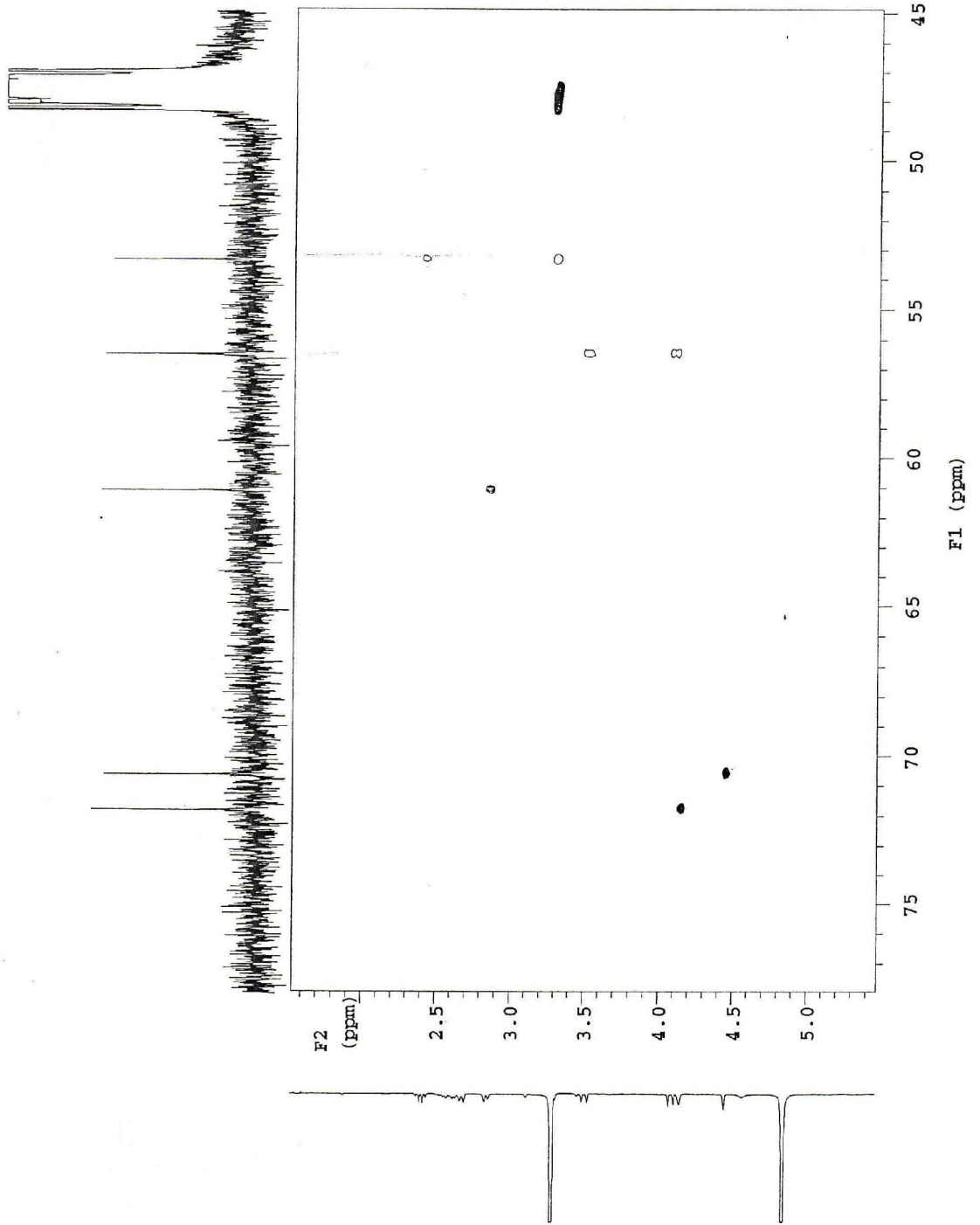
Şekil 4.14 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu.



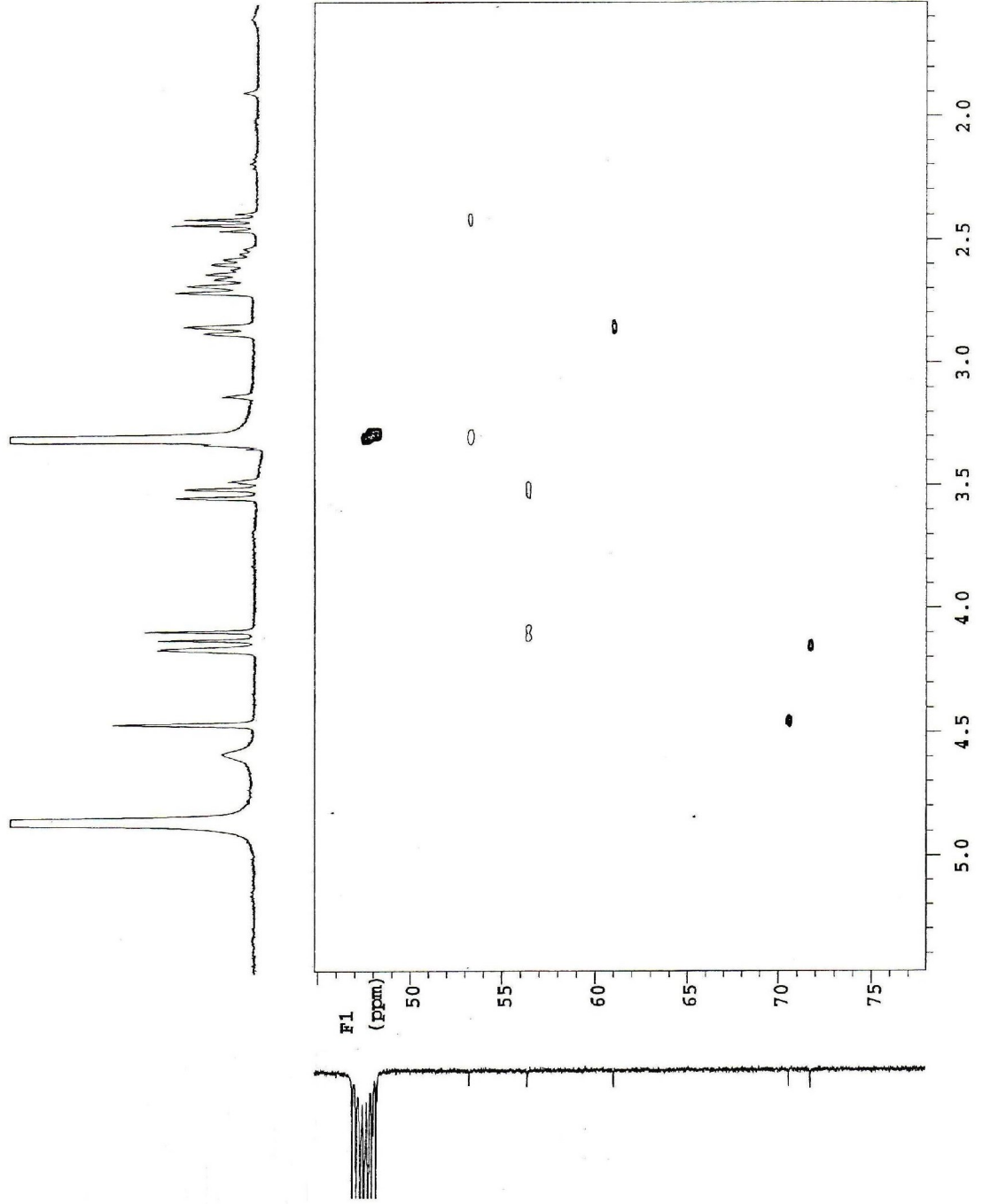
Şekil 4.15 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu.



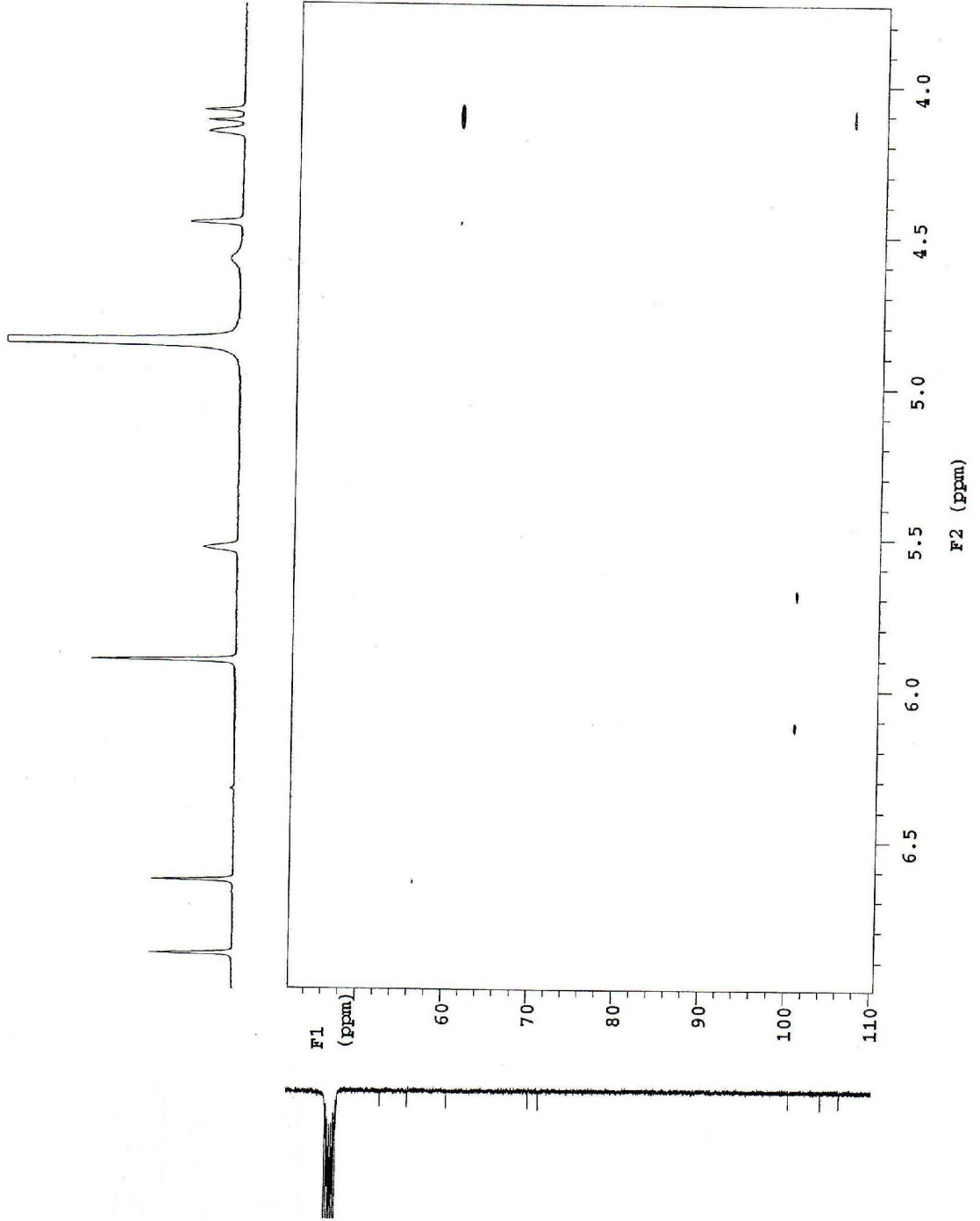
Şekil 4.16 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu.



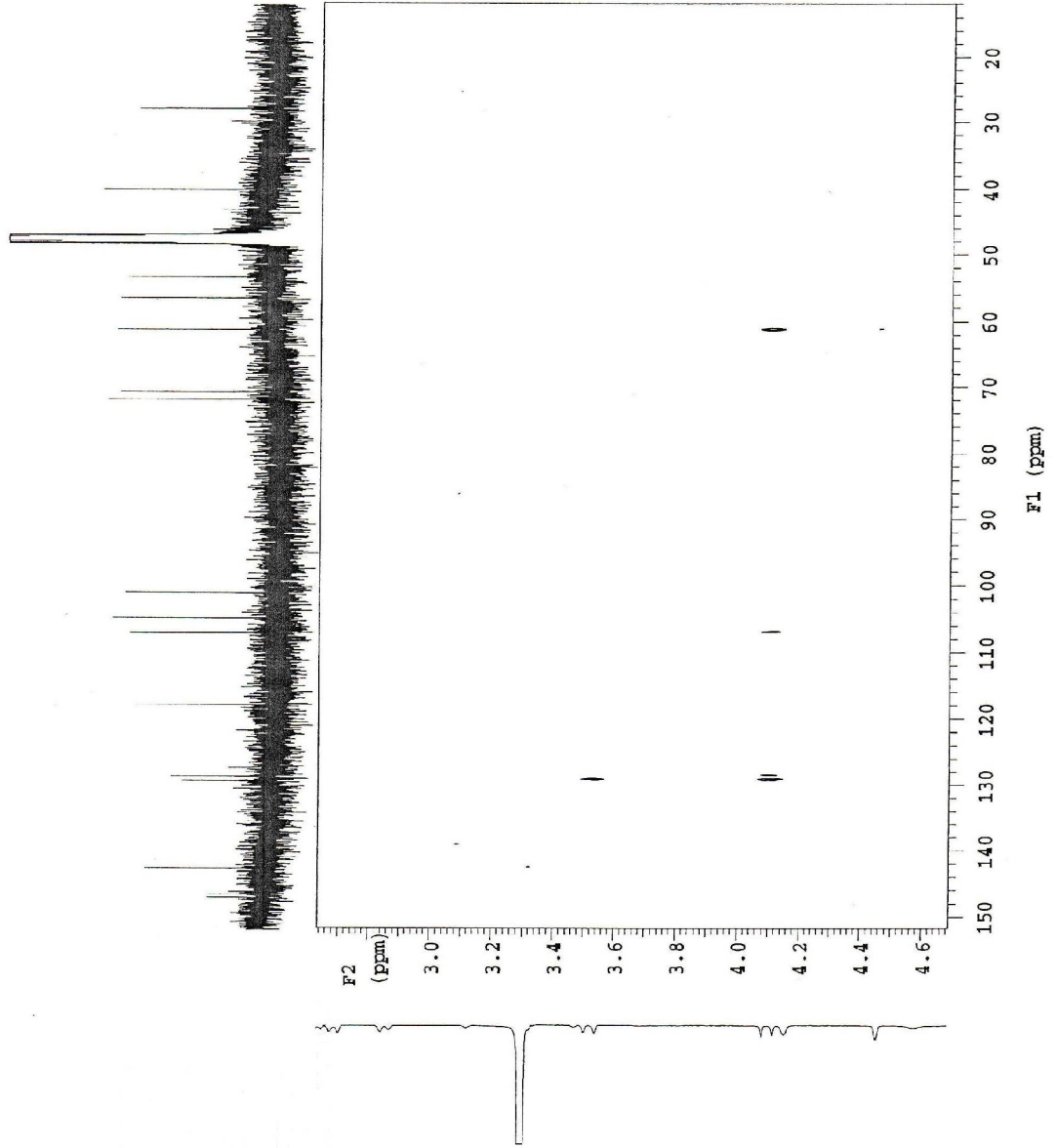
Şekil 4.17 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu.



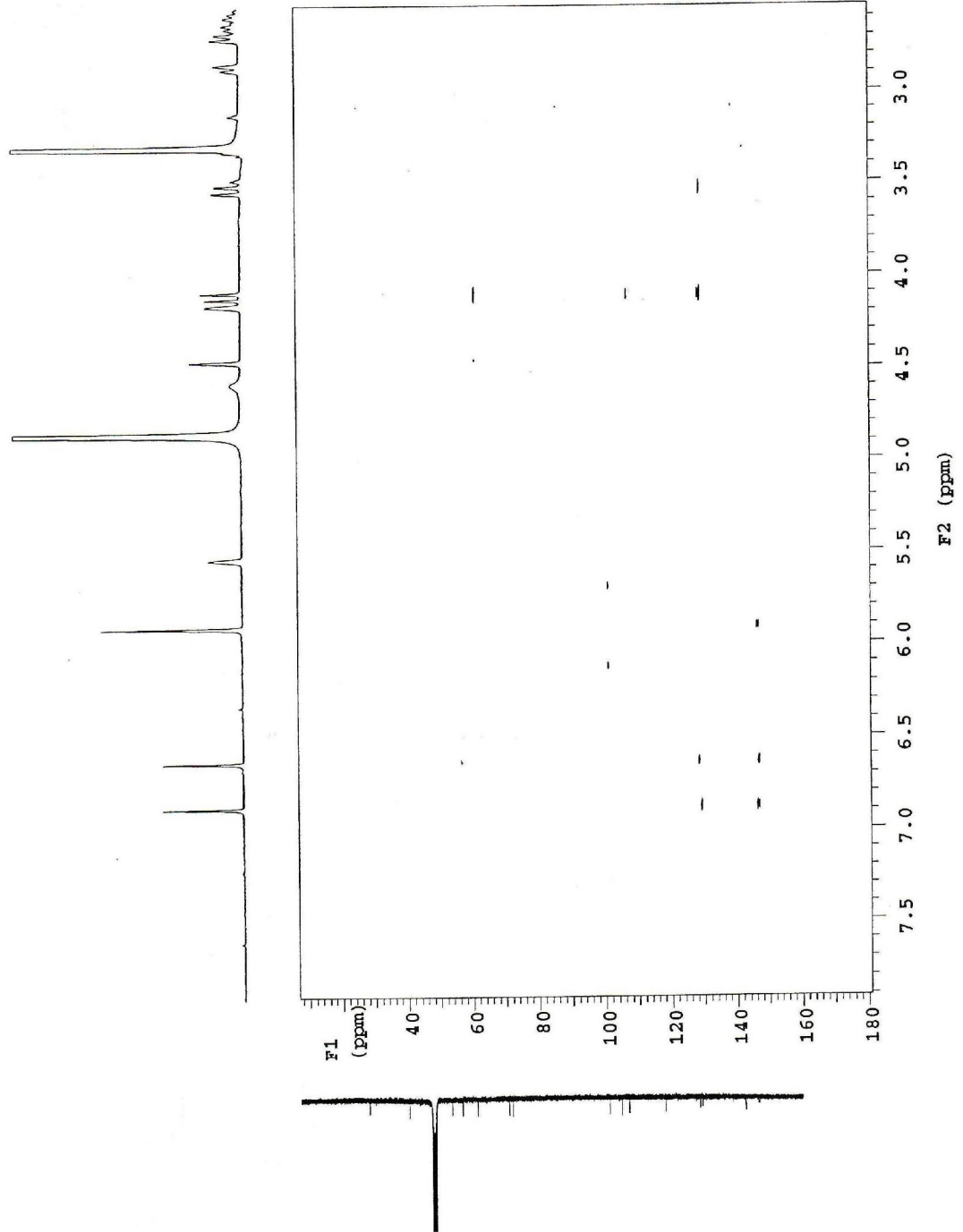
Şekil 4.18 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HSQC NMR spektrumu.



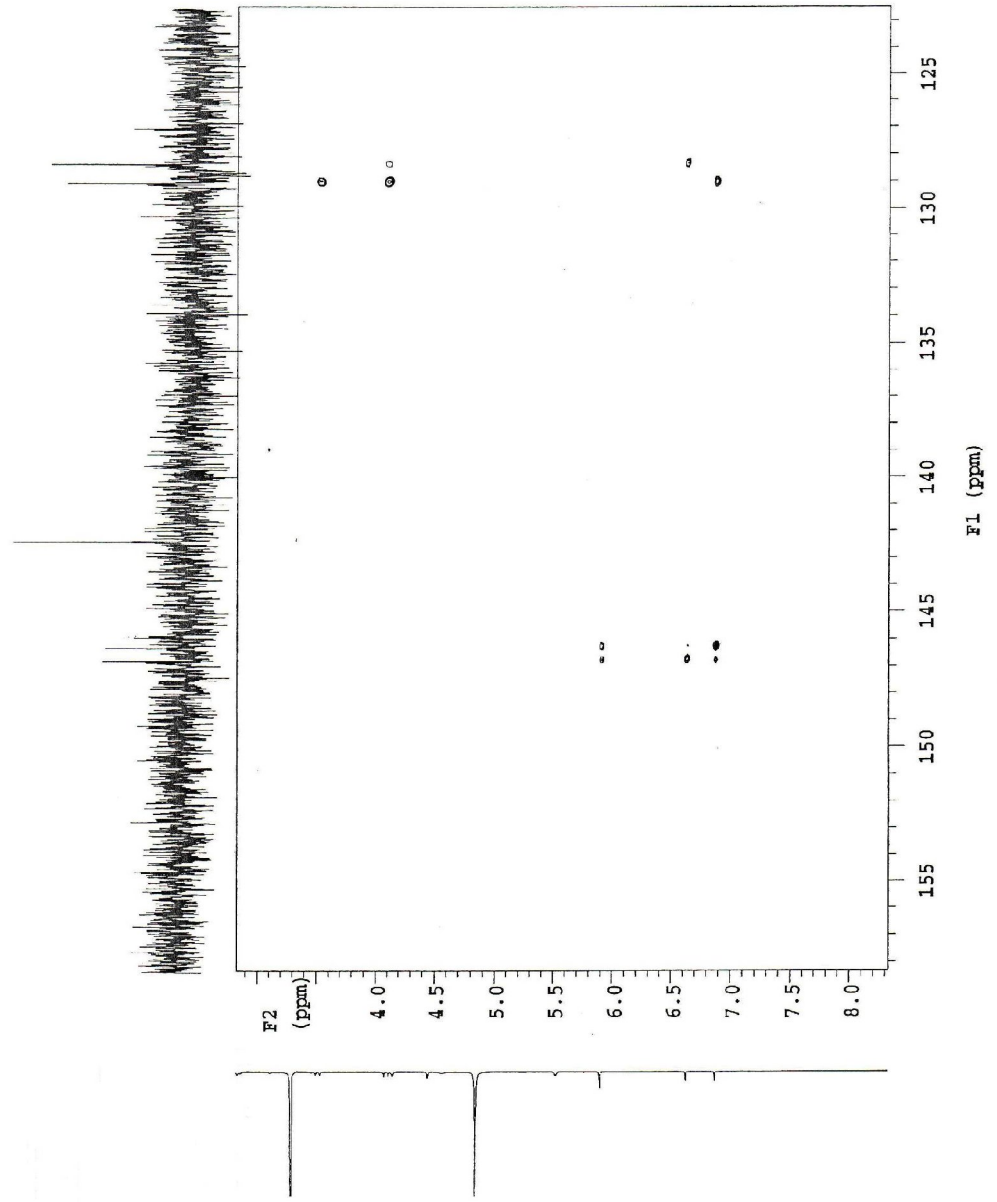
Şekil 4.19 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu.



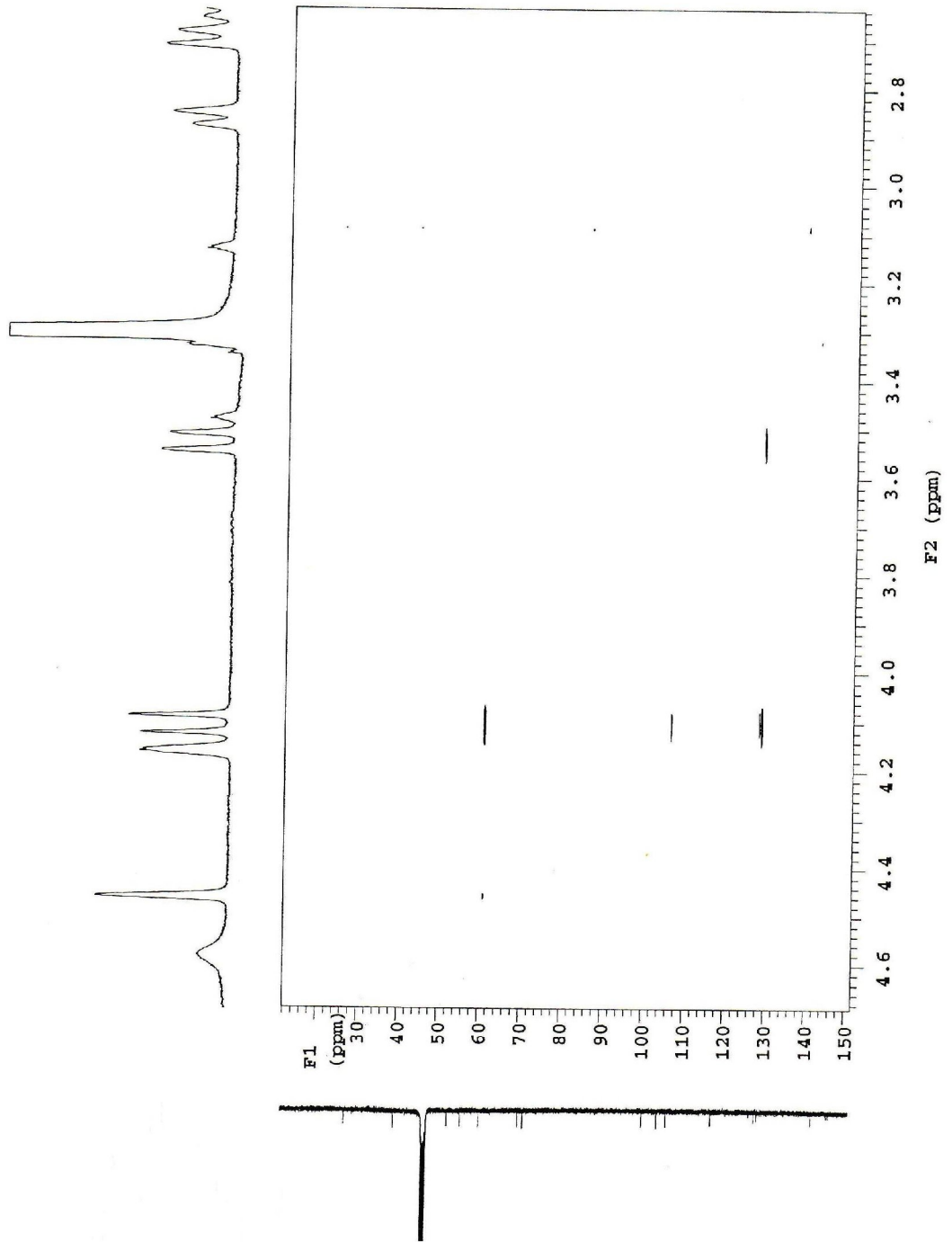
Şekil 4.20 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu.



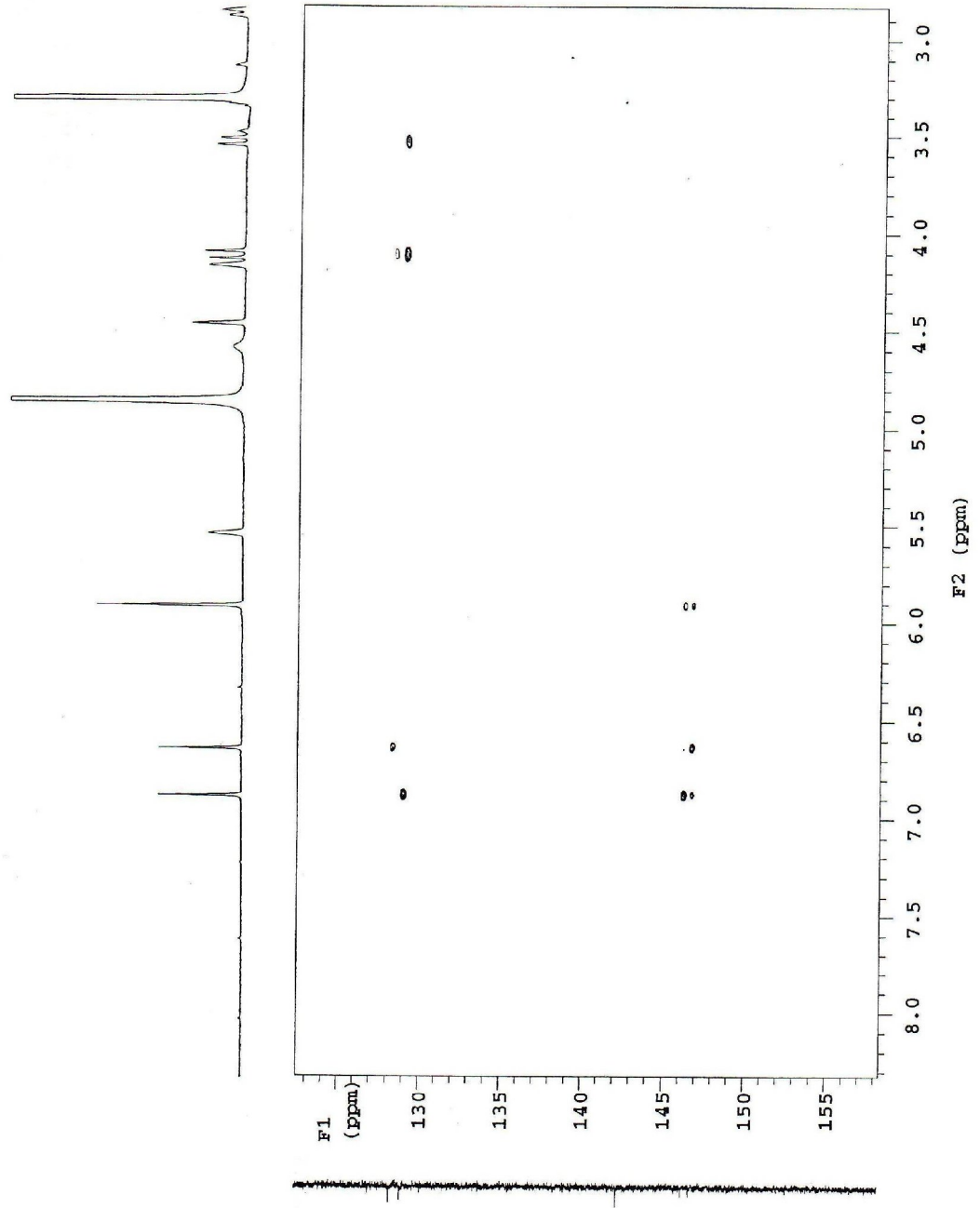
Şekil 4. 21 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu.



Şekil 4.22 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu.



Şekil 4.23 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr'den izole edilen (–)-likorinin HMBC NMR spektrumu.



Şekil 4.24 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr.'den izole edilen (–)-likorin HMBC NMR spektrumu.

4. 2. EKSTRENİN TOPLAM FENOLİK VE FLAVONOİT İÇERİĞİ

Fenolik bileşikler özellikle serbest radikallerin giderimi aşamasında önemli rol oynamaktadır. Fenollerdeki hidroksil grupları radikalleri yok eder ve sistemin antioksidan etkisine doğrudan katkıda bulunurlar (Türkoğlu ve diğ., 2006).

Ekstrenin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Öztürk ve diğ., 2007; Yeşilyurt ve diğ., 2008). Toplam flavonoit içeriği ise kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi (Park ve diğ., 1997; Topçu ve diğ., 2007).

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin fenolik içeriğinin flavonoit içeriğine göre daha fazla olduğu belirlendi. Alkaloid eldesi amaçlı olarak yapılan ekstraksiyon yöntemi sonucunda elde edilen ekstrenin fenolik içeriğinin yüksek olması da taşıdığı alkaloidlerin fenolik yapıda olduğuna işaret etmektedir.

Tablo 4.3 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin toplam fenolik ve toplam flavonoit içeriği^a

Örnek	Fenolik içerik (µg PEs/mg ekstre) ^b	Flavonoit içerik (µg QEs/mg ekstre) ^c
Ekstre	63,84±0,37	10,00±0,65

^a Değerler pirokatekole eşdeğer olarak hesaplandı ve 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verildi ($p < 0.05$).

^b PEs, Pirokatekol eşdeğerliği. $R^2=0.9942$ $y=0.0307x+0.0353$

^c QEs, Kersetin eşdeğerliği. $R^2=0.9995$ $y=0.0616x-0.0106$

4. 3. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SONUÇLARI

4. 3. 1. β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)

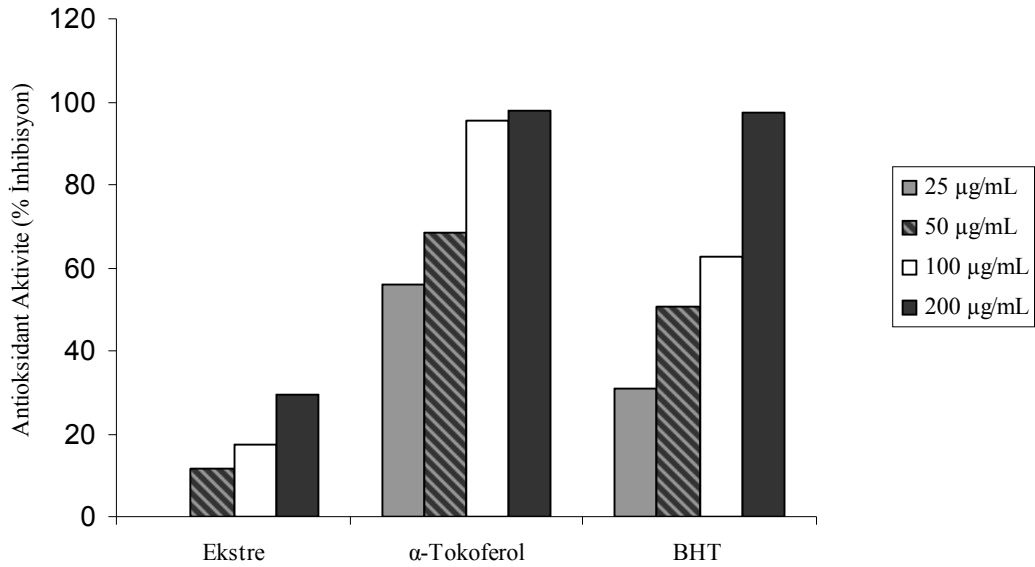
Bu yöntemde *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin, antioksidan aktivitesinin 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda bile standartların altında kaldığı gözlenmiştir. Ancak konsantrasyonun artmasıyla antioksidan aktivite de artmaktadır (Şekil 4.25). Tablo 4.4 de *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin β -Karoten-Linoleik Asit yöntemine göre antioksidan aktivitesi % inhibisyon ve IC_{50} değeri olarak verilmiştir.

Tablo 4.4 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin β -Karoten-Linoleik Asit yöntemine göre antioksidan aktivitesi (% inhibisyon) ^a

Örnek	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
Ekstre	ad	11,74 $\pm$ 7,43	17,46 $\pm$ 1,36	29,60 $\pm$ 1,60	>100
α -Tokoferol ^b	55,85 $\pm$ 0,49	68,21 $\pm$ 0,72	95,55 $\pm$ 0,95	97,63 $\pm$ 0,89	4,58
BHT ^b	30,95 $\pm$ 2,51	50,50 $\pm$ 1,82	62,64 $\pm$ 9,89	97,40 $\pm$ 0,76	63,30

^a Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verildi. $p < 0.05$.

^b Standart bileşikler, ad: aktif değil.



Şekil 4. 25 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin β -karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesi.

4. 3. 2. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi

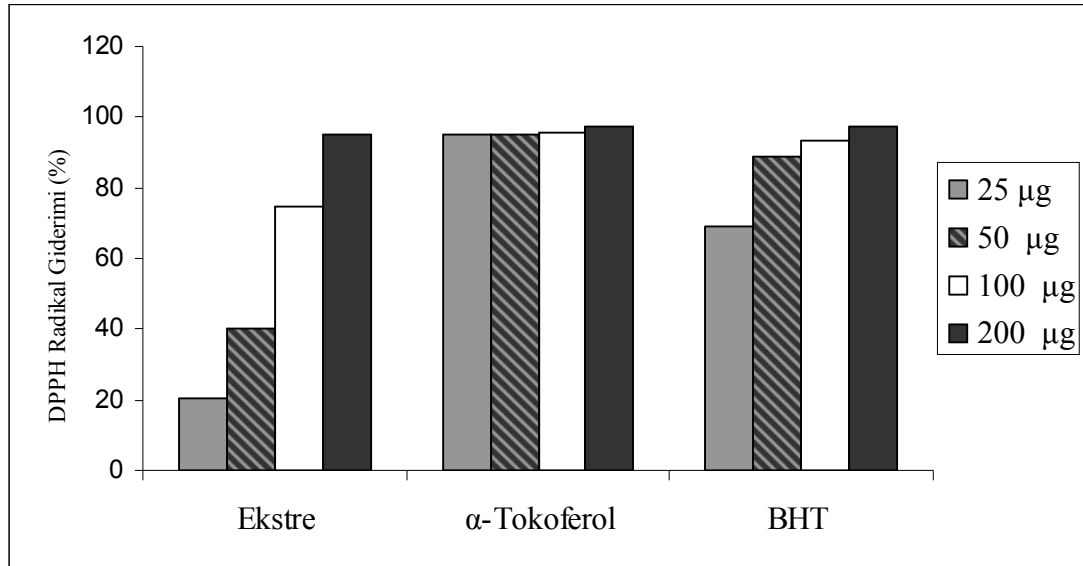
DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm’de karakteristik absorpsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldir. Antioksidanlar radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltırlar. DPPH’nin rengi açıldığı için absorpsiyonda azalma olur (Türkoğlu ve diğ., 2006). Reaksiyon karışımının düşük absorpsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir (Gülçin ve diğ., 2004; Kabouche ve diğ., 2007). *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, konsantrasyon artırıldığında standartlara oldukça yakın sonuçlar vermiştir (Tablo 4.5). Özellikle 200 µg konsantrasyonunda % inhibisyon açısından BHT ve α-Tokoferol ile hemen hemen eşdeğer sonuçlar alınmıştır (Şekil 4. 26).

Tablo 4.5 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) ^a

Örnek	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
Ekstre	20,11±1,42	40,23±0,41	75,00±2,55	95,00±0,16	65,06
α-Tokoferol ^b	94,95±0,04	95,05±0,14	95,88±0,11	97,58±0,51	15,53
BHT ^b	69,12±0,80	89,10±0,32	93,38±0,68	97,38±0,38	11,27

^a Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verildi. $p < 0.05$.

^b Standart bileşikler.



Şekil 4. 26 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (%)

4. 4. SİTOTOKSİK AKTİVİTE SONUÇLARI

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin Brine Shrimp Toksisite testinde *Artemia salina* larvalarına karşı gösterdiği sonuçlar Tablo 4.6 da verilmektedir. LC₅₀ değerinin 10 ppm'in üstünde fakat 100 ppm'in altında olması, ekstrenin toksik etkisini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.6 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin Brine Shrimp Toksisite Testi sonucu ve LC₅₀ değeri

Ekstre (ppm)	Ölü Organizma Sayısı	LC ₅₀ µg/mL	Üst % 95 Güvenilirlik Limiti	Alt % 95 Güvenilirlik Limiti	Toksisite Derecesi
10	7	50,020	98,826	22,112	Toksik
100	19				
1000	27				

4. 5. GENOTOKSİK AKTİVİTE SONUÇLARI

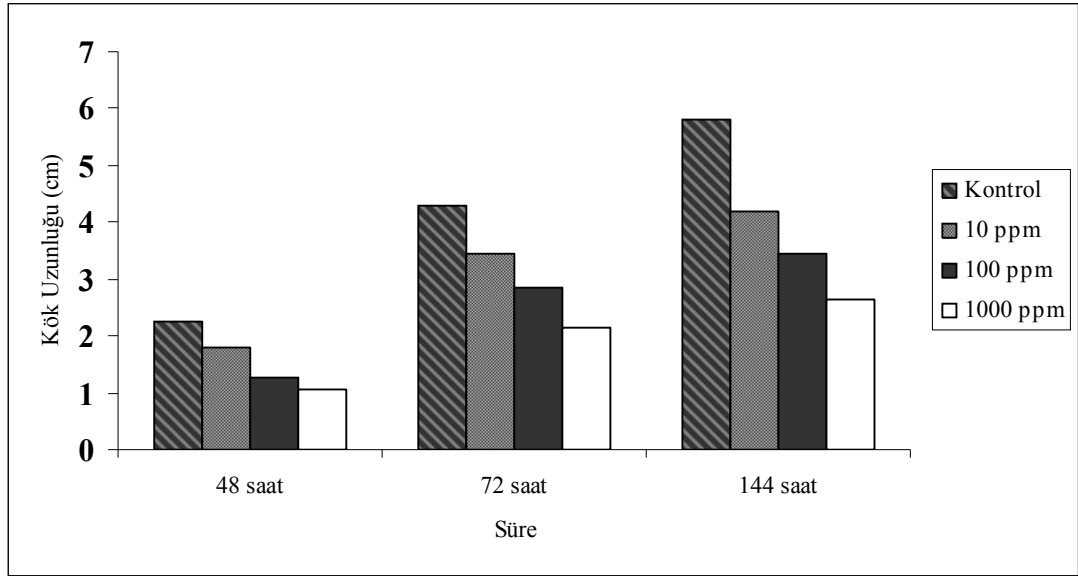
4. 5. 1. Makroskobik Analiz Sonuçları

Her çalışma grubundaki soğanlar, uygulama süreleri (48, 72 ve 144 saat) sonunda toplam kök demetinin cetvel ile cm. cinsinden ölçülmesi şeklinde değerlendirilmiştir. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin uygulandığı soğanların kök uzunluğu, kontrol grubu ile kıyaslandığında doza bağlı olarak azalmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7 de verilmiştir. Uygulanan süre arttıkça kök uzunlukları artarken, doza bağlı olarak meydana gelen azalma Şekil 4.27'de verilmiştir.

Tablo 4.7 : Uygulama dozlarına göre 48, 72 ve 144 saat uygulamalı örneklerin ortalama kök uzunlukları (cm.) ve standart sapma değerleri

Doz (ppm)	Uyg. Süresi (saat)	Kök Uzunluğu Ort.± S.D. (cm.)	Doz (ppm)	Uyg. Süresi (saat)	Kök Uzunluğu Ort.± S.D. (cm.)	Doz (ppm)	Uyg. Süresi (saat)	Kök Uzunluğu Ort.± S.D. (cm.)
Kontrol	48	2,25±0,14a	Kontrol	72	4,3±0,09a	Kontrol	144	5,8±0,24a
10	48	1,8±0,15a	10	72	3,45±0,35b	10	144	4,2±0,09b
100	48	1,275±0,13b	100	72	2,85±0,39c	100	144	3,45±0,21bc
1000	48	1,05±0,11b	1000	72	2,15±0,23c	1000	144	2,65±0,16c

*Sütunlar arasındaki harfler, istatistiki olarak farklı grupları temsil etmektedir (p<0.05).



Şekil 4.27 : Uygulama dozlarına göre 48, 72 ve 144 saat uygulamalı örneklerin ortalama kök uzunlukları (cm.)

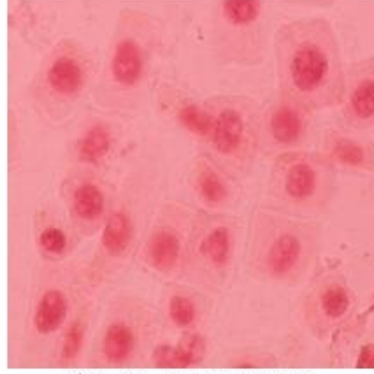
Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin uygulandığı soğanlarda kök gelişiminin kontrol grubu kök uzunluğunun % 'si olarak değerlendirilmesi sonucu hazırlanan Tablo 4.8 e göre, aynı sürede köklendirilen soğanlarda, doza bağlı olarak kök gelişiminin inhibisyon oranı artmıştır.

Tablo 4.8 : Kök uzunluklarının kontrol grubu kök uzunluğunun % olarak oranı

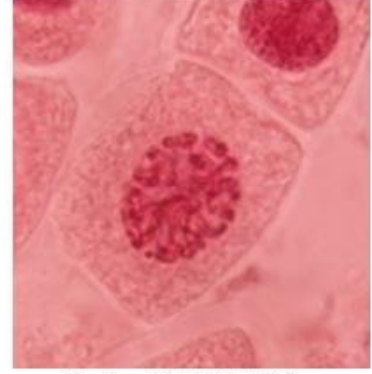
Dozlar (ppm)	Uygulama Süresi (saat)	Kök Uzunluğu Ort.± S.D. (cm)	Kök Gelişimi İnhibisyon Oranı (%)
Kontrol	48	2,25±0,14	-
10	48	1,8±0,15	20
100	48	1,275±0,13	43
1000	48	1,05±0,11	53
Kontrol	72	4,3±0,09	-
10	72	3,45±0,35	20
100	72	2,85±0,39	34
1000	72	2,15±0,23	50
Kontrol	144	5,8±0,24	-
10	144	4,2±0,09	28
100	144	3,45±0,21	41
1000	144	2,65±0,16	54

4. 5. 2. Mikroskopik Analiz

Çalışma genel olarak Akinboro (2007)' de açıklandığı gibi uygulanmıştır. Sağlıklı soğanlar seçilmiş ve 8 tekrarlı 4 grup (Kontrol grubu, 10 ppm grubu, 100 ppm grubu, 1000 ppm grubu) oluşturulmuştur. Fiskesjö (1985) tarafından tanımlanan modifiye edilmiş çalışma formu dikkate alınarak, çalışmanın başlangıcında soğanlar direkt olarak test edilecek sıvıları içeren beherlere yerleştirilerek köklenmeleri izlenmiştir Her 24 saatlik uygulama periyodu sonunda beherlerdeki bitki ekstresi içeren sıvılar tazelenmek amacıyla değiştirilmiştir. 48 saatlik uygulama periyodu sonunda kökler mikroskopik inceleme amaçlı hasat edilerek ezme preparat yöntemiyle preparatlar hazırlanmıştır. Her bir uygulama dozundan 48. saat sonunda 20 preparat hazırlanmıştır. Her preparatta 10 tesadüfi bölgede yaklaşık toplam 20.000 hücre incelenmiştir. Her preparatta bölünen sağlıklı ve anormal hücreler tespit edilmeye çalışılmış ve gözlenenler istatistiki hesaplamalar için kayıt altına alınırken, ışık mikroskobu ile 10x40 veya 10x100 büyütme fotoğrafları çekilmiştir. Her uygulama dozunda incelenen toplam 20 preparattaki sağlıklı bölünen ve anormal bölünen hücrelerin ortalamaları alınarak, o doza ait ortalama toplam bölünen hücre sayısı elde edilerek MI (mitotik indeks) hesaplanmıştır. MI, uygulama dozundaki toplam bölünen hücre sayısının (anormal hücreler de dahil) toplam hücre sayısına olan oranı olarak hesaplanmış ve gözlenen 1000 hücre başına mitoz bölünen hücre sayısı olarak verilmiştir. Kontrol grubu *A. cepa* kök meristem dokusunda mitoz bölünen hücrelere ait mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.28'de verilmiştir.



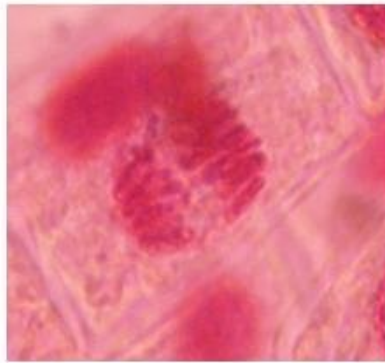
İnterfaz (M.B.40x10)



Profaz (M.B.100x10)



Metafaz (M.B.100x10)



Anafaz (M.B.100x10)



Telofaz (M.B.100x10)

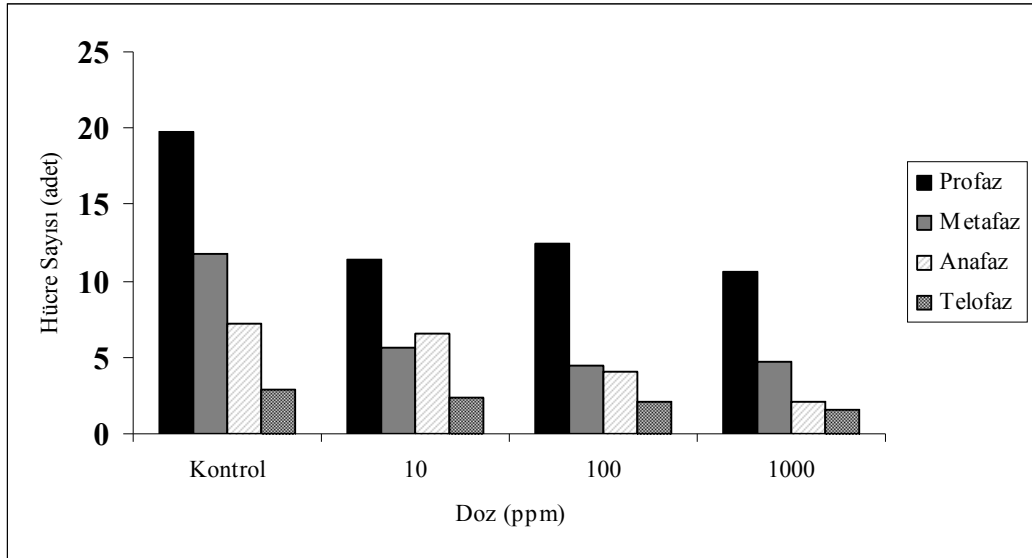
Şekil 4.28.: Kontrol grubu hücrelerinde gözlenen normal mitoz bölünme evreleri

Uygulama dozuna bağılı olarak 48 saat sonunda gözlenen mitoz safhalarındaki ortalama hücre sayısı ve istatistiki verileri Tablo 4.9 da verilmiştir. Uygulanan dozlara göre 48 saat uygulama süreli örneklerde mitoz evrelerindeki ortalama hücre sayısı grafiksel olarak Şekil 4.29’da verilmiştir.

Tablo 4.9 : Uygulama dozuna bağılı olarak 48 saat sonunda gözlenen mitoz safhalarındaki ortalama hücre sayısı, standart sapma değerleri ve gruplar arası önem durumları*

Dozlar (ppm)	Uyg. Süresi (saat)	Ortalama PROFAZ	Ortalama METAFAZ	Ortalama ANAFAZ	Ortalama TELOFAZ	Ortalama Toplam Bölünen Hücre
Kontrol	48	19,7±4,19a	11,8±1,64a	7,25±1,86a	2,9±0,97a	41,65±7,53
10	48	11,45±2,25b	5,6±1,6b	6,5±1,96a	2,35±1,34ab	25,9± 4,07
100	48	12,50±2,28b	4,4±1,63b	4,1±1,8b	2,05±1,39b	23,05± 4,55
1000	48	10,55±1,82b	4,75±1,68b	2,1±1,29c	1,55±0,99b	18,95± 3,88

*Sütunlar arasındaki harfler, istatistiki olarak farklı grupları temsil etmektedir (p<0.05).



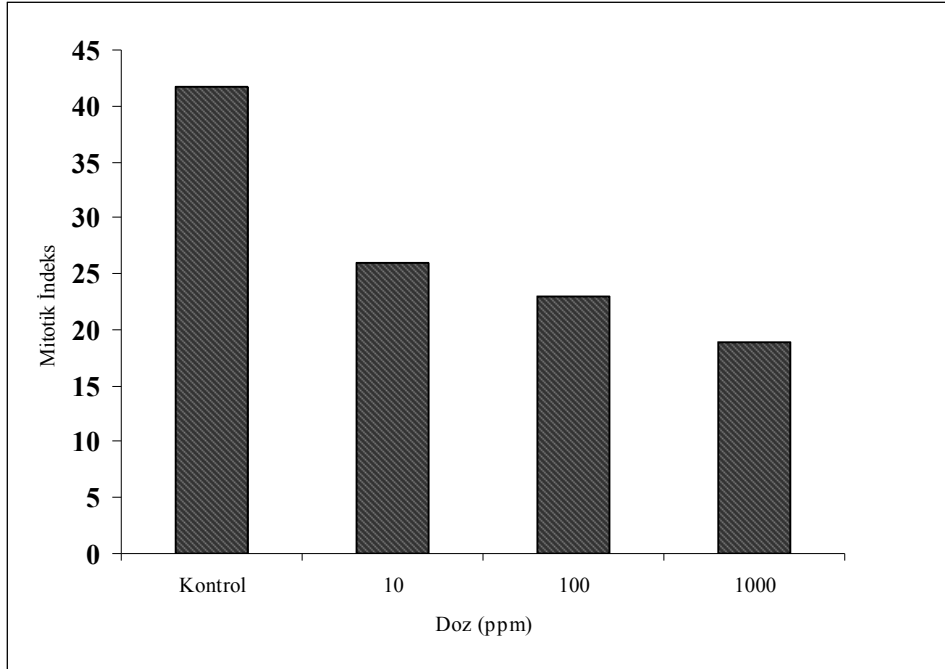
Şekil 4. 29 : Uygulama dozlarına göre 48 saat uygulama süreli örneklerde mitoz evrelerindeki ortalama hücre sayısı

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi ile hazırlanan 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm’lik çözeltilerde ve distile su kullanılarak hazırlanan kontrol grubunda köklendirilen soğanların 48 saat sonunda hesaplanan mitotik indeks değerleri, doza bağılı olarak bir azalmanın meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Kontrol

grubunda mitotik indeks değeri 41,65 iken, 1000 ppm'lik doz uygulanan grupta 18,95 olarak azalmıştır (Tablo 4.10). Bu durum, *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinin soğan alkaloid ekstresinin konsantrasyonu arttıkça, *Allium cepa* kök meristem dokusu hücrelerindeki mitoz bölünmeyi baskıladığını göstermektedir. Uygulama dozlarına göre 48 saat uygulama süreli örneklerde mitotik indeks (MI) değerleri grafiksel olarak Şekil 4.30'da verilmiştir.

Tablo 4.10: Doz ve uygulama süresine göre mitotik indeks (MI)

Dozlar (ppm)	Uygulama Süresi (saat)	Mitotik İndeks (MI)
Kontrol	48	41,65
10	48	25,9
100	48	23,05
1000	48	18,95



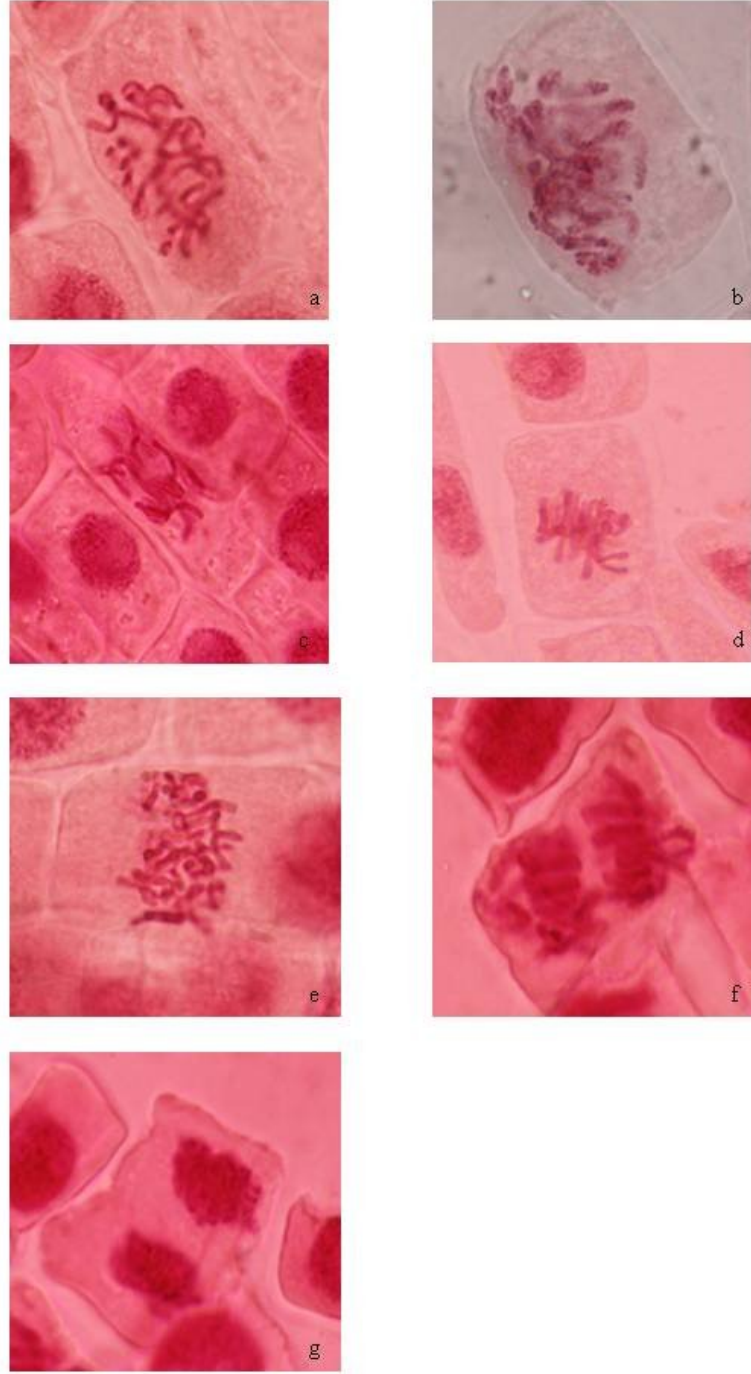
Şekil 4.30 : Uygulama dozlarına göre 48 saat uygulama süreli örneklerde mitotik indeks (MI)

4.5.3. Kromozomal Anormallikler

48 saatlik uygulama periyodunun sonunda *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ve kontrol grubunda 48 saatlik uygulama periyodu sonunda gözlenen kromozomal anormallikleri Şekil 4.31’de verilmiştir. Gözlenen kromozomal anormalliklere ait mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.31’de ve doz artışına bağlı olarak gözlenen anormal bölünen hücre çeşitlerinin ortalama sayılarının grafik olarak değerlendirmesi Şekil 4.32’de verilmiştir. Uygulama dozuna bağlı olarak gözlenen anormal bölünen hücre sayılarının ortalama değerleri toplam gözlenen hücre sayısına göre hesaplanarak, gözlenen 1000 hücre başına anormal bölünen hücre sayısının ortalaması olarak Tablo 4.11 de verilmiştir.

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin farklı dozlarına 48 saat maruz kalan *A. cepa* kök meristem doku hücrelerinin kromozomlarında bu ekstrenin sitotoksik ve genotoksik etkisini net olarak ortaya koyacak çeşitli anormallikler gözlenmiştir. Bu anormalliklerin frekansları, aynı uygulama periyodu içinde kontrol grubunda kendiliğinden meydana gelen anormallikler ile karşılaştırıldığında önem arz etmektedir.

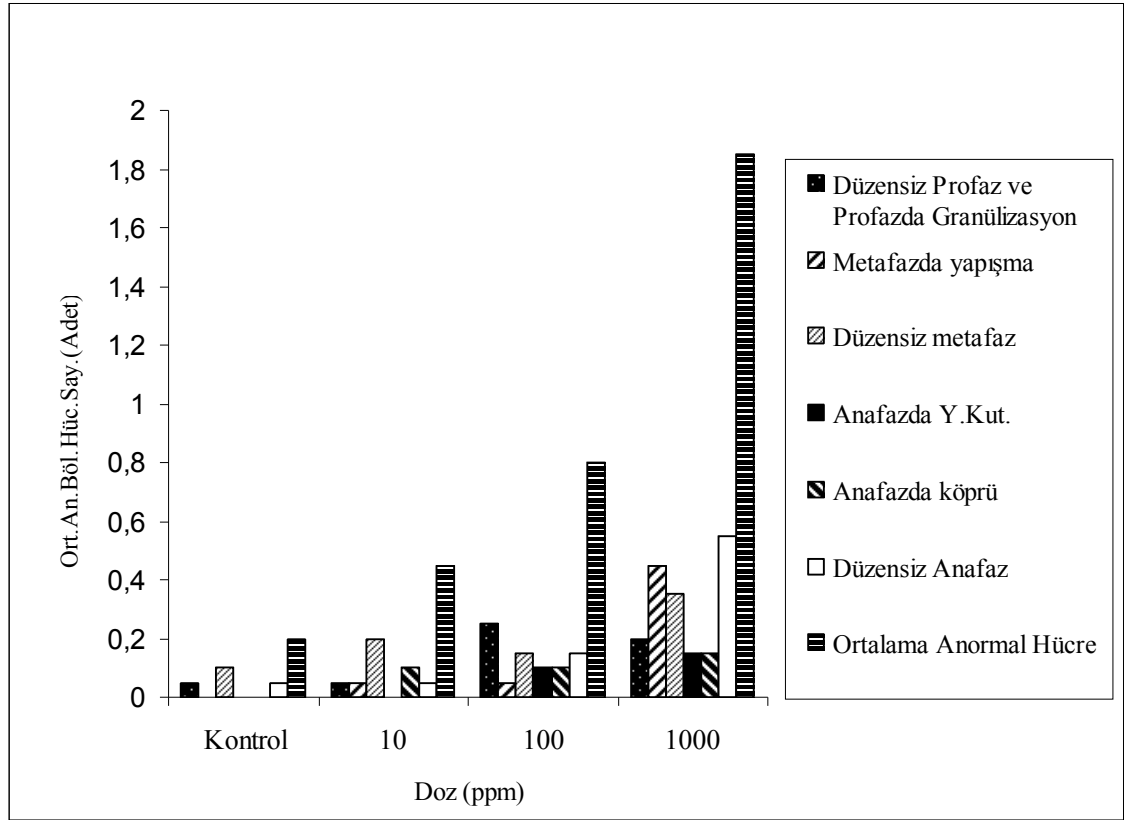
Sonuçlara göre, özellikle nukleus içerisinde düzensiz yayılma gözlenmiştir. Profaz safhasında düzensiz yayılma, erozyon ve granülizasyonlar gözlenmiştir. Metafaz safhasında ise kromozomlarda yapışma, metafaz tablasında düzensiz metafaz oluşumu, metafaz ekseninden sapmalar gözlenmiştir. Ayrıca anafazda köprü oluşumu ve anafazda yanlış kutuplaşma ve düzensiz anafaz yayılımları gözlenmiştir.



Şekil 4.31 : Uygulanan dozların ardından kromozomlarda gözlenen anormallikler: a,b Düzensiz Profaz ve Profazda Granülizasyon [(a) 1000 ppm, (b) 100 ppm] (M.B.100x10), c-Düzensiz Metafaz ve Metafazda Yapışma (M.B.40x10) (100 ppm), d-Metafazda yapışma (M.B.100x10) (10 ppm), e-Düzensiz metafaz (M.B.100x10) (1000 ppm), f-Anafazda yanlış kutuplaşma ve köprü (M.B.100x10) (1000 ppm), g-Anafazda köprü (M.B.100x10) (10 ppm)

Tablo 4.11: Uygulama dozuna bağılı olarak gözlenen ortalama anormal bölünen hücre sayıları

Dozlar (ppm)	Düzensiz Profaz ve Profazda Granülizasyon	Metafazda yapışma	Düzensiz metafaz	Anafazda Y.Kut.	Anafazda köprü	Düzensiz Anafaz	Ortalama Anormal Bölünen Hücre
Kontrol	0,05	0	0,1	0	0	0,05	0,2
10	0,05	0,05	0,2	0	0,1	0,05	0,45
100	0,25	0,05	0,15	0,1	0,1	0,15	0,8
1000	0,2	0,45	0,35	0,15	0,15	0,55	1,85

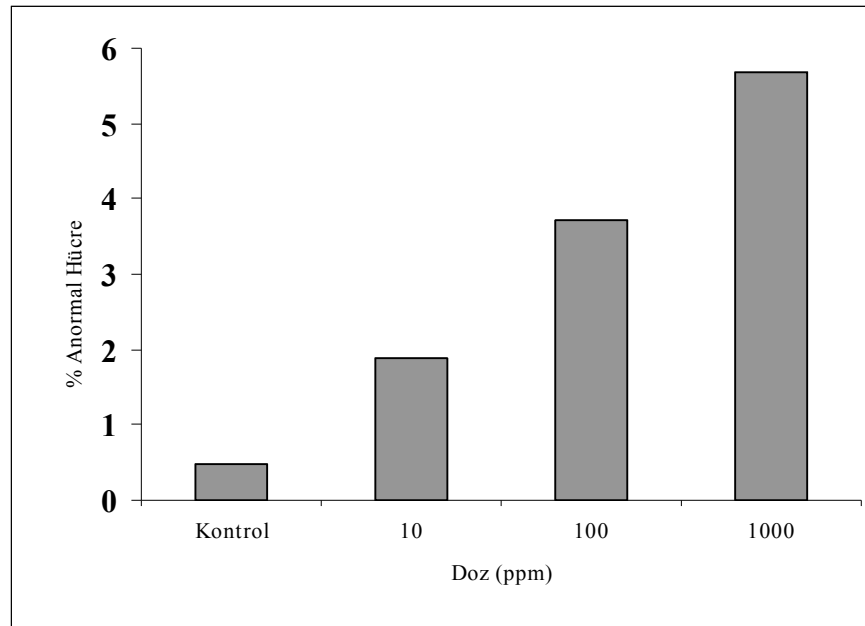


Şekil 4. 32 : Doz artışına bağılı olarak gözlenen ortalama anormal bölünen hücre çeşitleri

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin farklı dozlarına 48 saat maruz kalan *A. cepa* kök meristem doku hücrelerinin mitoz bölünme safhalarında gözlenen kromozomal anormallikler ile toplam bölünen hücre sayısı arasındaki % ilişki Tablo 4.12 de verilmiştir. Doza bağılı olarak % anormal bölünen hücre sayısının artışı Şekil 4.33’de gösterilmiştir.

Tablo 4.12 : Ortalama anormal bölünen hücre sayısının toplam mitoz bölünen hücre sayısının % 'si olarak değeri

Dozlar (ppm)	% Anormal Hücre
Kontrol	0,48
10	1,89
100	3,72
1000	5,69



Şekil 4. 33: Doza bağlı olarak % anormal bölünen hücre sayısındaki artış

Sonuç olarak, zaman ve doz artışına bağlı olarak gruplar arasındaki kök uzunlukları karşılaştırıldığında *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresine maruz kalan köklerin ortalama uzunlukları doz artışına bağlı olarak azalmıştır. 48 saatlik uygulama süresi sonunda doz artışına bağlı olarak kontrol grubu ile karşılaştırılan deney gruplarındaki köklerde, bölünen hücre sayısının düşmesine bağlı olarak MI'in de düştüğü ve bu nedenle köklerdeki uzama miktarlarının azaldığını tablolarda net olarak gözleyebilmekteyiz (Tablo 4.7 ve Tablo 4.9).

Profaz, metafaz ve telofaz safhalarında sağlıklı bölünen hücre sayısı açısından kontrol grubu ile 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm'lik çözeltileri içeren gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Anafaz safhasında ise kontrol grubu ile 10 ppm *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Mitotik indeks değerlerine bakıldığında, *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid ekstresine ait 10 ppm, 100 ppm ve 1000 ppm'lik dozlarının uygulandığı gruplarda mitotik indeksin doz artışı ile doğru orantılı olarak azaldığı görülmüştür (Tablo 4.8).

Kromozomal anormallikler değerlendirildiğinde, mitoz bölünmede düzensiz profaz yerleşimi gösteren hücrelerin ortalaması açısından kontrol grubu ve 1000 ppm'lik doz uygulanan grup arasındaki farkın büyük olduğu (kontrol grubunda 0,05 iken, 1000 ppm doz uygulanan grupta 0,45) diğer bütün gruplarda ortalama anormal bölünen hücre sayılarının (düzensiz profazda kontrol ve 10 ppm-100 ppm grupları arasında, metafazda yapışmanın 10-100-1000 ppm gruplar arasında, düzensiz metafazın 10-100-1000 ppm grupları arasında, anafazda yanlış kutuplaşmanın 10-100-1000 ppm grupları arasında, anafazda köprünün 10-100-1000 ppm grupları arasında, düzensiz anafazın 10-100-1000 ppm grupları arasında) birbirine yakın olduğu görülmüştür. (Tablo 4.11). Uygulama dozlarına bakıldığında ise, ortalama toplam anormal hücre sayısı en yüksek 1000 ppm'lik ekstre içeren uygulama grubunda görülmüştür.

S. fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresine maruz kalan uygulama gruplarında doz artışına bağlı olarak kök uzunluğu ve mitotik indekste azalma görülürken, toplam anormal bölünen hücre sayısında artış olduğu istatistiki olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlar, Allium test metodu kullanılarak muhtemel sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılan *S. fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid ekstresinin soğan köklerinde doz ve süre artışına bağlı olarak kök meristem dokusunda hücre bölünmesini istatistiki olarak önemli derecede baskıladığını göstermektedir.

4. 6. ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTE SONUÇLARI

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin antikolinesteraz aktivitesi, AChE ve BChE enzimleri kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre, *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi, standart olarak kullanılan ve aynı zamanda Alzheimer hastalığında kullanılan ilacın etken maddesi olan galantamin ile eş konsantrasyonlara % inhibisyon açısından oldukça yakın sonuçlar vermiştir. IC₅₀ değeri araştırıldığında ise sonucun birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerine karşı % inhibisyon değerleri Tablo 4.13 de verilmiştir. Ayrıca elde edilen saf alkaloid likorin daha önce başka Amaryllidaceae familyası bitkilerden izole edilerek antikolinesteraz aktivitesi incelendiği için sadece tek dozda 400 µg/mL de AChE ve BChE enzimlerine karşı % inhibisyonu incelenmiş ve AChE'ye karşı aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.14).

Tablo 4.13 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin antikolinesteraz aktivitesi ^a

	AChE Analizi (% İnhibisyon)				IC ₅₀ (µg/mL)
	25.00 µg/mL	50.00 µg/mL	100.0 µg/mL	200.0 µg/mL	
Ekstre	50.00±0.69	60.99±1.37	68.60±0.16	74.78±0.37	25.00
Galantamin^b	68,36±1,10	74.38±0.65	78.59±0.47	81.41±0.03	5.01
	BChE Analizi (% İnhibisyon)				IC ₅₀ (µg/mL)
	25.00 µg/mL	50.00 µg/mL	100.0 µg/mL	200.0 µg/mL	
Ekstre	48.05±0.69	65.28±0.77	71.65±0.51	74.64±0.71	17.82
Galantamin^b	40.59±0.88	48.73±0.90	65.02±0.44	75.54±1.05	50.88

^aDeğerler 3 paralel ölçümün ölçümün Ortalaması ± Standart Sapma olarak verildi (p<0.05).

^bµM konsantrasyonda standart drog.

Tablo 4.14 : *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinden izole edilen likorin alkaloidinin Antikolinesteraz aktivitesi ^a

Numune (400.0 µg/mL)	AChE Analizi (% İnhibisyon)	BChE Analizi (% İnhibisyon)
Likorin	69,22±0,28	45,36±4,54
Galantamin^b	84.24 ±0.73	87.72±0.80

^aDeğerler 3 paralel ölçümün ölçümün Ortalaması ± Standart Sapma olarak verildi (p<0.05).

^bµM konsantrasyonda standart drog.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Amaryllidaceae familyası bitkileri içerdikleri alkaloidlerin biyolojik aktiviteleri açısından oldukça önemli bitkilerdir ve son yıllarda bu familyanın bitkileri üzerindeki araştırmalar çok artmıştır. Özellikle *Galanthus* türlerinden izole edilen galantamin isimli alkaloid hafif ve orta derecedeki Alzheimer hastalığının tedavisinde en yaygın olarak kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörü bitkisel ilaçtır. Bu nedenle aynı familya bitkilerinden biri olan *Sternbergia* cinsinin dünyada nadir olarak yetişen bir türü olan *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisi seçilerek toplandı. Bitkinin soğanlarından maserasyonla önce direkt metanol ekstresi hazırlandı ve sonra bu ekstreya asitlendirme-alkalileştirme işlemleri uygulandı ve organik çözücü ile tüketerek alkaloidce zengin ekstre hazırlandı. Soğan alkaloid ekstresinin taşıdığı alkaloidlerin saflaştırılmasına çalışılarak elde edilen alkaloidlerden (–)-likorin saflaştırılmış ve yapısı başlıca NMR spektroskopisinin yanı sıra IR ve kütle spektroskopik yöntemleriyle karakterize edilmiştir.

Tıbbi olarak önemli alkaloidlerin yer aldığı Amaryllidaceae familyasındaki bitkilerden pek çoğu biyolojik aktiviteleri açısından değerlendirilmiş olmasına rağmen *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinden hazırlanan herhangi bir ekstresinin genotoksik Allium testi, Brine Shrimp sitotoksik aktivite ve Antikolinesteraz aktivitesine dayanan çalışmalara literatürde rastlanmamıştır.

Likorin alkaloidinin çift dimensiyonlu tekniklerle analizinin tayin edilerek (–)-likorin olduğunun belirlenmiş olması da hangi optikçe aktif izomerinin bu türde bulunduğunu belirlemek açısından önemlidir. Yapılan çalışmaların pekçoğunda hangi optik izomeri olduğu belirtilmemiştir, bu nedenle de literatürde likorinin protonlarının kimyasal kaymasına ait çok farklı NMR verileri bulunmaktadır.

Sternbergia fischeriana bitkisinden hazırlanan soğan alkaloid ekstresinin antioksidan aktivite testleri başlıca iki yöntem ile, DPPH serbest radikal giderim aktivitesine tamamlayıcı olarak β -karoten-linoleik asit test yöntemi ile, ekstrelerin antioksidan aktivitesi araştırılmıştır.. Çünkü dünyada antioksidan aktivite testleri artık tek bir test yöntemiyle değil, en az birkaç test yöntemiyle yapılmaktadır. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi konsantrasyon arttırıldıkça artmış ve standartlara oldukça yakın sonuçlar vermiştir ve özellikle 200 μ g konsantrasyonunda standart olarak uygulanan BHT ve α -Tokoferol ile hemen hemen aynı inhibisyonu göstermiştir (Tablo 4.5). β -Karoten-linoleik asit test yönteminde ise soğan alkaloid ekstresi BHT ve α -tokoferol standartlarının oldukça altında bir inhibisyon göstermiştir.

Sternbergia fischeriana (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin Brine Shrimp Toksikite testinde *Artemia salina* larvalarına karşı toksisite gösterdiği (LC_{50} = 50,020 μ g/mL) ve konsantrasyona bağlı olarak öldürücü etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu bitkinin herhangi bir ekstresi sitotoksik olarak hiçbir test sisteminde daha önce incelenmemiştir.

Genotoksitenin belirlenmesi için yapılan Allium testi sonucuna göre *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin kök ucu hücrelerinin mitoz bölünmesi üzerine inhibisyon etkisinin bulunduğu ve konsantrasyona bağlı olarak kromozomal anormalliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Literatürde *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinin soğan alkaloid ekstresi üzerinde bu tez çalışmasında yapılan araştırma dışında genotoksik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Houghton ve diğ. (2004), likorinin de yapısı göz önüne alındığında, antikolinesteraz aktivitesinin Amaryllidaceae alkaloidlerinin yapısında bulunan ve C-1 ve C-2 üzerinde mevcut olan iki serbest hidroksil grubunun varlığı ve stereokimyası ile ilişkili olduğu öne sürmüştür. Nitekim son yıllarda likorinin asetilkolinesteraz aktivite çalışmaları yapı-aktivite ilişkilerini irdeler bir tarzda ve mekanistik olarak sürdürülmektedir (McNulty, ve diğ.,2009; Lamoral-Thyes ve diğ., 2009).

Alzheimer hastalığının tedavisinde büyük önem taşıyan asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmesi açısından değerlendirildiğinde *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresinin, şu anda Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ve çalışmamızda standart madde olarak kullandığımız galantamin adlı alkaloidin inhibisyon değerine oldukça yakın sonuçlar gösterdiği belirlenmiştir. 200 µg/mL konsantrasyonunda *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. soğan alkaloid ekstresi, ve standart madde olarak kullanılan galantaminin % inhibisyonu sırasıyla (74,78) ve (81,41) bulunmuştur. Bütirikolinesteraz enziminin inhibisyonunda ise ekstre standart madde olarak kullanılan galantaminden daha yüksek bir inhibisyon, yani oldukça iyi bir IC₅₀ değeri (17,82 µg/mL) vermiştir.

Bu çalışmada izole edilen likorin pek çok Amaryllidaceae familyası bitkisinden de izole edilip antikolinesteraz etkileri daha önce araştırıldığı için bu çalışmada AChE ve BChE enzim inhibisyonu değerleri sadece tek konsantrasyonda 400 µg/mL de incelenmiş ve sırasıyla % 69,22 ve % 45,36 olarak bulunmuştur. Aynı şartlarda galantaminin inhibisyon değerleri sırasıyla 84,24 ve 87,72 µg/mL olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinin sahip olduğu alkaloidlerden (–)-likorin tanımlanmış ve bu alkaloidleri içeren ekstreinin biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. alkaloid ekstresi genotoksik, sitotoksik ve antikolinesteraz aktivitesi açısından ilk defa incelenmiştir. Elde edilen bulguların bundan sonraki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ayrıca AChE ve BChE enzimlerine karşı yeni alkaloidleri elde edebilmek amacıyla *Sternbergia fischeriana* (Herbert) Rupr. bitkisinin yaprak ve çiçekli kısımlarının da ekstrelerinin hazırlanarak incelenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Anon., 2009a,
<http://www.weski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php?com=11610&tur=Sternbergia%20fischeriana> [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2009]
- Anon., 2009b,
http://www.backyardgardener.com/plantname/pda_994b.html [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2009]
- Anon., 2009c,
<http://agaclar.net/forum/showthread.php?t=3417> [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2009]
- Anon., 2009d,
<http://www.epa.gov/EERD/stat2.htm> [Ziyaret Tarihi: 20 Aralık 2009]
- ABO-EL-KHIER Z.A., ABO-EL-KHIER G.M., 1992, Cytological Effects of Certain Active Constituents of *Peganum harmala* L. 1. Effect of Harmol and Harmine Alkaloids on Mitosis of *Allium cepa*, *Journal of King Saud University*, 4 (1), 37-45.
- ABU, N.E., DURU, N.U., 2006, Cytological Effects of Oxytocic Agents on Mitotic Chromosomes of *Allium cepa*, *Journal of Agriculture, Food, Environment and Extension*, 5 (2), 1-7.
- ADSERSEN, A., KJØLBYE, A., DALL, O., JAGER, A.K., 2007, Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Corydalis cava*, Schweigg. & Kort, *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 179–182.
- AKINBORO, A., BAKARE, A.A., 2007, Cytotoxic and Genotoxic Effects of Aqueous Extracts of Five Medicinal Plants on *Allium cepa* Linn, *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470-475.
- AMINA H., ABOU-DONIA, SOAD M., TOAIMA, HALA M., HAMMODA, E.S., ERI, K., HIROMITSU, T., 2008, Phytochemical and Biological Investigation of *Hymenocallis littoralis* SALISB, *Chemistry & Biodiversity*, 5, 332-340.
- ANISZEWSKI, T., 2007, *Alkaloids--secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*, Elsevier, Amsterdam, 978-0-444-52736-3.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P.D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S., ROBARDS, K., 2002, Methods for Testing Antioxidant activity, *Analyst*, 127, 183–198.
- ARIHAN, O., BOZ, M., İSKIT, A.B., İLHAN, M., 2009, Antinociceptive Activity of Coniine in Mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 274–278.

ARRIGONI, O., ARRIGONI LISO, R., CALABRESE, G., 1975, Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis, *Nature*, 256, 513–514.

ARSLAN, N., GÜRBÜZ, B., GÜMÜŞÇÜ, A., İPEK, A., SARIHAN, E. O., ÖZCAN, S.; MİRİCİ, S.; PARMAKSIZ, İ., 2004, *Sternbergia candida* Mathew et. Baytop Türünün Kültüre Alınması Üzerinde Araştırmalar, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, 975-94077-2-8, 61-65.

ATMANİ, D., CHAHER, N., BERBOUCHA, M., AYOUNİ, K., LOUNİS, H., BOUDAUD, H., DEBBACHE, N., ATMANİ, D., 2009, Antioxidant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, *Food Chemistry*, 112, 303–309.

BAŞBUĞ, Y., 1999, Tuz Gölünde Yaşayan *Artemia salina* (L., 1758)'nın Üreme Özellikleri, *Turkish Journal of Zoology*, 23 (2), 635-640.

BAŞER, K.H.C., 1997, Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin İlaç ve Alkollü İçki Sanayinde Kullanımı, İstanbul Ticaret Odası, Yayın No:1997-39, İstanbul.

BAYTOP, T., 1984, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İstanbul Üniversitesi, Yayın No:3637, Eczacılık Fakültesi No:40, İstanbul.

BENABADJI, S.H., WEN, R.; ZHENG, J., DONG, X.C., YUAN, S.G., 2004, Anticarcinogenic and Antioxidant Activity of Diindolylmethane Derivatives, *Acta Pharmacologica Sinica*, 25 (5), 666-671.

BEYER, J., DRUMMER, O.H., MAURER, H.C.H.H., 2009, *Herbal Drugs of Abuse*, In Ramawat K.G., (Ed.) *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, Springer Yayınevi, Almanya, 978-3-540-79116-4.

BIERER, L.M., HOF P.R., PUROHIT, P.D., CARLIN, L., SCHMEIDLER, J., DAVIS, K.L., PERL, P.D., 1995, Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's Disease, *Archives of Neurology*, 52, 81-88.

BOĞA, M., 2007, *Türkiye’de Yetişen Vinca Türlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

BURITS, M., ASRES, K., BUCAR, F., 2001, The Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*, *Phytotherapy Research*, 15, 103-108.

CADENAS, E., DAVIES, K. J. A., 2000, Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress and Aging, *Free Radical Biology & Medicine*, 29 (3/4), 222–230.

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K., OOI, V.E.C., 2003, Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts, *Food Chemistry*, 81, 249-255.

CHOUDHARY, I.M., THOMSEN, W.J., 2001, *Bioassay Techniques For Drug Development*, Harwood Academic Publishers, Hollanda, 90-5823-051-1.

CONFORTI, F., LOÏZZO, M.R., MARRELLI, M., MENICHINI, F., STATTI, G.A., UZUNOV, D., MENICHINI, F., 2009, Quantitative Determination of Amaryllidaceae Alkaloids from *Galanthus Reginae-Olgae* Subsp. *Vernalis* and *In Vitro* Activities Relevant for Neurodegenerative Diseases, *Pharmaceutical Biology*, 48 (1), 2-9.

CORDELL, G. A., 1981, Introduction to Alkaloids: A Biogenetic Approach, *Wiley-Interscience Publication*, İngiltere, 978-0471034780.

CORDELL, G., A., QUINN-BEATTIE, M.L, NORMAN, R.F., 2001, The Potential of Alkaloids in Drug Discovery, *Phytotherapy Research*, 15, 183–205.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G., 2000, Natural Products (Secondary Metabolites) in: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R., (EDS.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Maryland, USA, 0943088399.

ÇETİK, R., 1973, *Vejetasyon Bilimi* , Ülkemiz Matbaası, Ankara.

ÇİTOĞLU, G., TANKER, M., GÜMÜŞEL, B., 1998, Antiinflammatory Effects of Lycorine and Haemanthidine, *Phytotherapy Research*, 12, 205–206.

ÇİTOĞLU SALTAN, G., YILMAZ SEVER, B., BAHADIR, O., 2008, Quantitative Analysis of Lycorine in *Sternbergia* Species Growing in Turkey, *Chemistry of Natural Compounds*, 44 (6), 826-828.

DANE, F., 1999, *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel (Amaryllidaceae) Üzerinde Sitoembriyolojik İnceleme, *Turkish Journal of Biology* , 23, 9-22.

DAPKEVICIUS, A., VENSKUTONIS, R., BEEK, T.A.V., LINSSEN, J.P.H., 1998, Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140-146.

DAVIS P.H, 1984, *Flora of Turkey and the East Aegeon Islands*, , Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 8, 362.

DENG, L., DAİ, P., CİRO, A., SMEE, D.F., DJABALLAH, H., SHUMAN, S., 2007, Identification of novel antipoxviral agents: mitoxantrone inhibits vaccinia virus replication by blocking virion assembly, *Journal of Virology*, 81 (24), 13392–13402.

DEL GIUDICE, L., MASSARDO, D.R., PONTIERI, P., WOLF, K., 2005, Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: null alleles of RTG genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rho0 petites of *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene*, 354, 9–14

DİRİ, A.H., 2006, *Salvia candidissima* Vahl. Uçucu Bilesenlerinin Karakterizasyonu ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

DREWS, J., 2000, Drug Discovery: A Historical Perspective, *Science*, 287, 1960-1964.

- DOSTBİL, N., AĞAOĞLU, S., 2003, An Investigation about Antimicrobial Activity of Black Crocus (*Sternbergia Fischeriana*), *Journal of Food Safety* 23, 215-219.
- DUMAN, H., KOYUNCU, M., ÜNAL, F., 2002, The Genus *Sternbergia* Waldst & Kit. (Amaryllidaceae) in Turkey, *The Karaca Arboretum Magazine*, 6 (3) 115-130.
- ELÇİ, Ş., 1994, Sitogenetik Araştırma Yöntemleri ve Gözlemler, 100. Yıl Üniversitesi Yayınları, Van, Yayın No:18, Fen Edeb. Fak. Yayın No:16, 52-83.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- EVIDENTE A., CICALA M.R., 1983, ^1H and ^{13}C NMR analysis of lycorine and a-dihydrolycorine. *Phytochemistry*, 22, 581–583.
- aEVIDENTE, A., IASIELLO, I., RANDAZZO, G., 1984, Hippamine, a Minor Alkaloid From *Sternbergia lutea*, *Journal of Natural Products*, 47 (6), 1061-1062.
- bEVIDENTE, A., IASIELLO, I., RANDAZZO, G., 1984, Isolation of Sternbergine, a New Alkaloid From *Sternbergia lutea* *Journal of Natural Products*, 47 (6), 1003-1008.
- EVIDENTE, A., 1986, Isolation and Structural Characterization of Lutessine, A New Alkaloid from Bulbs of *Sternbergia lutea*, *Journal of Natural Products*, 49(1), 90-94.
- EVIDENTE, A., KORNIENKO, A., 2009, Anticancer Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae Alkaloids and Their Synthetic Derivatives, *Phytochemistry Reviews*, 8, 449–459.
- FISKESJO, G., 1985, The Allium Test as a Standard in Environmental Monitoring, *Hereditas*, 102, 99-112.
- GÜLÇİN, İ., BÜYÜKOKURĞLU, M.E., OKTAY, M., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2003, Antioxidant and Analgesic Activities of Turpentine of *Pinus nigra* Arn.subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe, *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 51–58.
- GÜLÇİN, İ., ŞATI, İ.G., BEYDEMİR, Ş., ELMASTAŞ, M., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2004, Comparison of Antioxidant Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) Buds and Lavender (*Lavandula stoechas* L.), *Food Chemistry*, 87, 393-400.
- GÜLÇİN, İ., OĞUZ, M.T., OKTAY, M., BEYDEMİR, Ş., KÜFREVİOĞLU, Ö.İ., 2004, Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.), *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 25-33.
- GOTTWALD, M.D., ROZANSKI, R.I., 1999, Rivastigmine a brainregion selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer's disease: review and current status, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 8, 1673-1682.

GÜNER, A., 1994, “*Bitkiler Dünyası*” Bilim ve Teknik, TÜBİTAK Yayını, Cilt: 27, Sayı 321, Pro- Mat Basın Yayın A. Ş., Ankara.

HALFON, B., 2005, *Natural Products Lecture Notes*, Boğaziçi Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 975-518251-9.

HALLIWELL, B., 2009, Free Radicals and Antioxidants: A Personal View, *Nutrition Reviews*, 52 (8), 253 – 265.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford publicat. 3rd, Clarendon Press, Oxford, ISBN: 0-19-855291-2.

HOSHINO, O., 1998, *The Amaryllidaceae alkaloids*. In: Cordell G.A., (ed) The alkaloids chemistry and pharmacology, vol 51., Academic Press Inc., New York, 0-12-469529-9.

HOUGHTON, P.J., AGBEDAHUNSI, J.M., ADEGBULUGBE, A., 2004, Choline Esterase Inhibitory Properties of Alkaloids from Two Nigerian *Crinum* Species, *Phytochemistry*, 65, 2893–2896.

HUXTABLE, R.J., SCHWARZ, S.K.W., 2001, The Isolation of Morphine-First principles in science and ethics, *Molecular interventions*, 1(4), 189-191.

HWANG, Y.C., CHU, J.J.H., YANG, P.L., CHEN, W., YATES, M.V., 2008. Rapid identification of inhibitors that interfere with poilliovirus replication using a cell-based assay, *Antiviral Research*, 77, 232–236.

İNCEER, H., BEYAZOĞLU, O., 2000, Bakır Klorür’ün *Vicia hirsuta* (L.) S.F. Gray Kök Ucu Hücreleri Üzerine Sitogenetik Etkileri, *Turkish Journal of Biology*, 24, 553–559.

IZHAKI, I., 1998, Essential Amino Acid Composition of Fleshy Fruits Versus Maintenance Requirements of Passerine Birds, *Journal of Chemical Ecology*, 24 (8), 1333-1345

JIN, Z., 2005, Amaryllidaceae and Sceletium Alkaloids, *Nat. Product Reports Articles*, 22, 111–126.

JUNG, M., PARK, M., 2007, Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*, *Molecules*, 12, 2130-2139.

KABOUCHE, A., KABOUCHE, Z., ÖZTÜRK, M., KOLAK, U., TOPÇU, G., 2007, Antioxidant Abietane Diterpenoids from *Salvia Barrelieri*, *Food Chemistry*, 102, 1281–1287.

KARAYEL, C., 2006, *Yeni Sentezlenmiş Bazı Pirazolin Eklenmiş Triazol Türevlerinin Antimikrobiyal Aktivite ve Toksisitelerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

KAYA, G. İ., ÜNVER, N., GÖZLER, B., BASTIDA, J., 2004, (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1059–1062.

KAYA, G.İ., GÖZLER, B., 2005, Quantitative and cytotoxic activity determinations on *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus*, *Fitoterapia*, 76, 340–343.

KELLY, C.A., HARVEY, R.J., CAYTON, H., 1997, Drug treatments for Alzheimer's disease. *British Medical Journal*, 314, 693–694.

KEHRER, P.J., 1993, Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease, *Critical Reviews in Toxicology*, 23(I), 2 1-48.

KIVRAK, İ., DURU, M.E., ÖZTÜRK, M., MERCAN, N., HARMANDAR, M., TOPÇU, G., 2009, Antioxidant, Anticholinesterase and Antimicrobial Constituents from The Essential Oil and Ethanol Extract of *Salvia Potentillifolia*, *Food Chemistry* 116, 470–479.

KIRBY, A. J., SCHMIDT, R. J., 1997, The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs, *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 103–108.

KOYUNCU, M., 1994, *Geofitler*, Bilim ve Teknik Tübitak Yayınları, Cilt 27, Sayı:321, Pro-Mat Basın Yayın A.Ş., Ankara.

KURAS, M., PILARSKI, R., NOWAKOWSKAC, J., ZOBEL, A., BRZOST, K., ANTOSIEWICZE, J., GULEWICZ, K., 2009, Effect of Alkaloid-Free and Alkaloid-Rich Preparations from *Uncaria tomentosa* Bark on Mitotic Activity and Chromosome Morphology Evaluated by Allium Test, *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 140–147.

KUTCHAN, T.M., 1995, Alkaloid Biosynthesis- the Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants, *Plant Cell*, 6, 723-735.

LAMORAL-THEYS, D., ANDOLFİ, A., VAN GOÏETSENOVEN, G., CİMMİNO, A., LE CALVE, B., WAUTHOZ, N., MEGALİZZİ, V., GRAS, T., BRUYERE, C., DUBOİS, J., MATHİEU, V., KORNIENKO, A., KİSS, R., EVIDENTE, A., 2009, Lycorine, the Main Phenanthridine Amaryllidaceae Alkaloid, Exhibits Significant Antitumor Activity in Cancer Cells That Display Resistance to Proapoptotic Stimuli: An Investigation of Structure-Activity Relationship and Mechanistic Insight, *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 6244–6256

LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A., 2009, *Allium cepa* Test in Environmental Monitoring: A Review on Its Application, *Mutation Research*, 682, 71–81.

LIU, J., HU, W-X., HE, L-F., YE, M., LI, Y., 2004, Effects of Lycorine on HL-60 Cells Via Arresting Cell Cycle and Inducing Apoptosis, *FEBS Letters*, 578, 245–250.

LI, Y., LIU, J., TANG, L-J., SHI, Y-W., REN, W., HU, W-X., 2007, Apoptosis Induced by Lycorine in KM3 Cells is Associated With the G0/G1 Cell Cycle Arrest, *Oncology Reports*, 17, 377-384.

LIKHITWITAYAWUID, K., ANGERHOFER, C.K., CHAI, H., PEZZUTO, J.M., CORDELL, G.A., 1993, Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from The Bulbs of *Crinum amabile*, *Journal of Natural Products*, 56, (8), 1331-1338.

LOECKIE L., DE, Z., JOHN, H. N., MEERMAN, J.N.M., COMMANDEUR NICO P.E.V., 1999, Biomarkers of Free Radical Damage Applications In Experimental Animals and In Humans, *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (1/2), 202–226.

LOPEZ, S., BASTIDA, J., VILADOMAT, F., CODINA, C., 2002, Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and *Narcissus* Extracts, *Life Sciences*, 71, 2521–2529.

MAMMADOV, R., SAHRANÇ, B., 2003, Muğla İl Merkezinde Sonbaharda Tespit Edilen Bazı Geofitler, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 12 (48), 13-18.

MACKEY, Z.B., BACA, A.M., MALLARİ, J.P., APSEL, B., SHELAT, A., HANSELL, E.J., CHIANG, P.K., WOLFF, B., GUY, K.R., WILLIAMS, J., MCKERROW, J.H., 2006. Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*, *Chemical Biology & Drug Design*, 67, 355–363.

MARTIN G. BANWELL, ALISON J. EDWARDS, KATRINA A. JOLLIFFE, MİCHAEL KEMLER, 2001, An operationally simple and fully regiocontrolled formal total synthesis of the montanine-type *Amaryllidaceae* alkaloid (±)-pancracine, *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 1 Articles*, 1345–1348

MCNULTY, J., NAIR, J.J., CODİNA, C., BASTIDA, J., PANDEY, S., GERASIMOFF, J., GRIFFIN, C., 2007, Selective Apoptosis-Inducing Activity of Crinum-Type Amaryllidaceae Alkaloids, *Phytochemistry*, 68 (7), 1068-1074.

MCNULTY, J., NAIR, J.J., CODINA, C., BASTIDA, J., PANDEY, S., GRIFFIN, C., 2009, Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells, *Phytochemistry*, 70, 913–919

METİN, M., BÜRÜN, B., 2008, Cytogenetic Effects of *Urginea maritima* L. Aqueous Extracts on the choromosomes by using Allium test Method, *Caryologia*, 61(4), 342-348

MILLER, H. M., 1971, A simplified method for the evaluation of antioxidants, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 45, 91.

MORALES, R., CASTILLO, J., 2004, El jenero Sternbergia (Amarillydaceae) en la Peninsula Iberica, *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(2), 119-128.

MUKHERJEEA, P.K., KUMAR, V., MAL, M., HOUGHTON, P. J., 2007, Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants, *Phytomedicine* 14, 289–300.

ODEIGAH, P.G.C., NURUDEEN, O., AMUND, O.O., 1997, Genotoxicity of Oil Field Wastewater in Nigeria, *Hereditas*, 126, 161-167.

OLOYEDE, A., OKPUZOR, J., OMIDIJI, O., 2009, Cytological and Toxicological Properties of a Decoction Used for Managing Tumors in Southwestern Nigeria, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12 (4), 383-387.

aORHAN, İ., ŞENER, B., 2003. Bioactivity-directed Fractionation of Alkaloids from Some Amaryllidaceae Plants and Their Anticholinesterase Activiy, *Chemistry of Natural Compounds*, 39 (4), 383-386

bORHAN, İ., ŞENER, B., 2003, Acetylcholinesterase Inhibitors from Natural Resources, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 28, 51-58.

ORHAN, İ., ŞENER, B., CHOUDHARY, M.I., KHALID, A., 2004, Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 57–60

ÖZTÜRK, M., AYDOĞMUŞ-ÖZTÜRK, F., DURU, M.E., TOPÇU, G., 2007, Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An Edible Medicinal Plant, *Food Chemistry*, 103, 623–630.

ÖZTÜRK, N., TUNALIER, Z., KOŞAR, M., BAŞER, K.H.C., 2004, *Petroselinum Crispum*, *Anethum Graveolens* ve *Eruca Sativa*’nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri *Toplantısı*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, 376-384.

PARK, Y. K., KOO, M. H., IKEGAKI, M., CONTADO, J. L., 1997, Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil, *Arquivos de Biologiae Technologia*, 40, 97–106.

PABUÇÇUOĞLU, V., RICHOMME, P., GÖZLER, T., KIVÇAK, B., FREYER, A.J., SHAMMA, M., Four New Crinine-Type Alkaloids from *Sternbergia* Species, *Journal of Natural Products*, 52 (4), 785-791.

PAPAS, A.M., 1996, Determinants of Antioxidant Status in Humans, *Lipids* , 31, 77-82.

RANK, J., NIELSEN, M.H., 1993, A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures, *Hereditas*, 118, 49-53

SEÇMEN, Ö., GEMİCİ, E., GÖRK, G., BEKAT, L., LEBLEBİCİ, E., 1998, *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Ege Üniv. Fen. Fak. Kitaplar Serisi, No: 116, İzmir.

SCOTT, L.J., GOA, K.L., 2000, Galantamine: a Review of Its Use in Alzheimer’s Disease, *Drugs*, 60, 1095–1122.

SIES, H., 1985, *Oxidative Stress: Introductory remarks*. In *Oxidative Stress*, ed. Sies. Academic Press, London.

SIES, H., 1997, Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function In Oxidative Stres, *Experimental Physiology*, 82, 291-295.

SILVA, A.F.S., ANDRADE, J.P.DE., MACHADO, K.R.B., ROCHA, A.B., APEL, M.A., SOBRAL, M.E.G., HENRIQUES, A.T., ZUANAZZI, J.A.S., 2008, Screening for Cytotoxic Activity of Extracts and Isolated Alkaloids from Bulbs of *Hippeastrum vittatum*, *Phytomedicine* 15, 882–885.

SOWEMIMOA, A.A., FAKOYA, F.A., AWOPETU, I., OMOBUWAJO, O.R., ADESANYA, S.A., 2007, Toxicity and Mutagenic Activity of Some Selected Nigerian Plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 427–432.

ŞENER, B., BİNGÖL, F., ERDOĞAN, İ., BOWERS, W.S., EVANS, P.H., 1998, Biological Activities of Some Turkish Medicinal Plants, *Pure & Applied Chemistry*, 70 (2), 403-406.

ŞENER, B., KOYUNCU, M., BİNGÖL, F., MUHTAR, F., 1999, Production of Bioactive Alkaloids from Turkish Geophytes, *Pure & Applied Chemistry*, 70 (11), 1-6.

ŞENER, B., ORHAN, İ., SATAYAVIVAD, J., 2003, Antimalarial Activity Screening of Some Alkaloids and the Plant Extracts from Amaryllidaceae, *Phytotherapy Research*, 17, 1220–1223.

T.C. RESMÎ GAZETE, 15.11.2008, Sayı: 2755, *Doğal Çiçek Soğanlarının 2009 Yılı İhracat Listesi Hakkında Tebliğ* (No: 2008/62).

TANKER, M., ÇİTOĞLU, G., GÜMÜHEL, B., HENER, B., 1996, Alkaloids of *Sternbergia clusiana* and Their Analgesic Effects, *International Journal of Pharmacognosy*, 34 (3), 194-197.

TANKER, M., TANKER N., 1990, *Farmakognozi*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 975-482-066-X.

TANKER, N., KOYUNCU, M., COŞKUN, M., 1998, *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 975-482-411-8.

TOPÇU, G., AY, M., BİLİCİ, A., SARIKÜRKÇÜ, C., ÖZTÜRK, M., ULUBELEN, A., 2007, A New Flavone from Antioxidant Extracts of *Pistacia Terebinthus*, *Food Chemistry*, 103, 816–822.

TUDZYNSKI, P., CÍORREIA, T., KELLER, U., 2001, Biotechnology and genetics of ergot alkaloids, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 593–605.

TÜRKOĞLU, A., KIVRAK, I., MERCAN, N., DURU, M.E., GEZER, K., TÜRKOLU, H., 2006, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Morchella conica* Pers., *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1146-1150

UÇAR, N., 2004, *Muscari bourgaei Baker Türü Üzerinde Bazı Fitokimyasal Araştırmalar*, Yüksek Lisans, Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

UR-RAHMAN, A., SULTANA, A., NIGHAT, F., BHATTI, M.K., KURUCU, S., KARTAL, M., 1995, Alkaloids From *Vinca major*, *Phytochemistry*, 38(4), 1057–1061.

ÜNVER, N., 1999, *Bolu Abant Gölü Çevresinde Yabani Olarak Yetişen Galanthus Plicatus Bieb.subsp. Byzantinus (Baker) D.A. Webb (Amaryllidaceae) Bitkisinin Alkaloidleri Üzerinde İzolasyon ve Yapı Aydınlatma Çalışmaları*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

ÜNVER, N., KAYA, G. İ., ÖZTÜRK, H. T., 2005, Antimicrobial Activity of *Sternbergia sicula* and *Sternbergia lutea*, *Fitoterapia*, 76, 226–229.

ÜNVER, N., 2007, New Skeletons and New Concepts in Amaryllidaceae Alkaloids, *Phytochemistry Reviews*, 6, 125–135.

VELİOĞLU Y.S., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B.D., 1998, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117

VURAL, N., 2005, *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 975-482-289-1.

YAMADA, K., YAMASHITA, M., SUMİYOSHİ, T., KATSUMİ NİSHİMURA, K., TOMİOKA, K., 2009, Total Synthesis of (-)-Lycorine and (-)-2-*epi*-Lycorine by Asymmetric Conjugate Addition Cascade, *American Chemical Society ,ORGANIC LETTERS*, 11 (7), 1631-1633.

YEŞİLTEPE, B., 2006, *Colchicum bivona* Guss. Tohumlarının Alkaloidleri Üzerinde Araştırmalar, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

YEŞİLYURT, V., HALFON, B., ÖZTÜRK, M., TOPÇU, G., 2008, Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*, *Food Chemistry*, 108, 31–39.

7. ÖZGEÇMİŞ

Tuba (GÜNDÜZ) BAYGAR, 19/12/1980 tarihinde İstanbul'da doğdu. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği (Tezsiz Yüksek Lisans) programından mezun oldu. 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programına kayıt oldu. Tuba BAYGAR evli olup, Ayça isminde bir kızı bulunmaktadır.