

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

***XERANTHEMUM ANNUUM* L. ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK YÖNDEN ARAŞTIRMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fulya GÜLYURDU

Tez Danışmanı
Prof. Dr. İlkay ORHAN

ANKARA
Nisan 2011

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Farmakognozi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 27/04/2011

İmza

**Prof.Dr. Turhan BAYKAL
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**

İmza

**Doç.Dr. İ. İrem TATLI ÇANKAYA
Hacettepe Üniversitesi**

İmza

**Prof.Dr. İlkay ORHAN
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
RESİMLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Botanik Bölüm	3
2.1.1. Asteraceae Familyası	3
2.1.2. <i>Xeranthemum</i> Cinsinin Sistematikteki Yeri	5
2.1.3. <i>Xeranthemum</i> L. Cinsi	5
2.1.4. <i>Xeranthemum annuum</i> L.	6
2.2. Fitokimyasal Bölüm	9
2.2.1. Yağ Asitleri	9
2.2.2. Triterpen Türevi Bileşikler	10
2.2.3. Flavonoit Türevleri	12
2.2.4. Siyanojenik Bileşikler	13
2.2.5. Uçucu Yağ Bileşenleri	13
2.3. Biyolojik Aktivite Bölümü	14
2.3.1. Anti- <i>Helicobacter</i> Aktivite	14
2.3.2. Antiproliferatif ve Sitotoksik Aktivite	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Gereç	16
3.2. Yöntemler	16
3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması	16
3.2.2. <i>X. annuum</i> Ekstrelerinde Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini	17
3.2.2.1. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibisyonu	17
3.2.2.2. Bütirikolinesteraz Enzim İnhibisyonu	19

3.2.2.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu	20
3.2.3. <i>X. annuum</i> Ekstrelerinde Antioksidan Aktivite Tayini	21
3.2.3.1. 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	21
3.2.3.2. <i>N,N</i> -dimetil- <i>p</i> -Fenilendiamin (DMPD) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	22
3.2.3.3. Süperoksit (SO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	23
3.2.3.4. Demir İyonu-Şelasyon Etkinin Tayini	24
3.2.3.5. Demir-İndirgeme Antioksidan Gücünün (FRAP) Tayini	25
3.2.3.6. Fosfomolibdenyum-İndirgeme Antioksidan Gücünün (PRAP) Tayini	26
3.2.4. <i>X. annuum</i> Ekstrelerinde Fitokimyasal Analizler	27
3.2.4.1. Toplam Fenol Miktar Tayini	27
3.2.4.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini	27
3.2.4.3. Ekstrelerin İnce Tabaka Kromatografisi İle Analizi	28
4. BULGULAR	29
4.1. Ekstre Verimine Ait Bulgular	29
4.2. <i>X. annuum</i> Ekstrelerinin Kolinesteraz Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular	30
4.2.1. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular	30
4.2.2. Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular	31
4.2.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular	32
4.3. <i>X. annuum</i> Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulgular	33
4.3.1. 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Aktivite Tayinine Ait Bulgular	33

4.3.2. <i>N,N</i> -Dimetil- <i>p</i> -Fenilendiamin (DMPD) Radikal Süpürücü Aktivite Tayinine Ait Bulgular	34
4.3.3. Süper oksit (SO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayinine Ait Bulgular	35
4.3.4. Demir İyonu-Şelasyon Etkinin Tayinine Ait Bulgular	36
4.3.5. Demir-İndirgeme Antioksidan Gücüne Ait Bulgular	37
4.3.5. Demir-İndirgeme Antioksidan Gücüne (FRAP) Ait Bulgular	37
4.3.6. Fosfomolibdenyum-İndirgeme Antioksidan Gücüne (PRAP) Ait Bulgular	38
4.4. Toplam Fenol Miktar Tayini Bulguları	39
4.5 Toplam Flavonoit Miktar Tayini Bulguları	40
4.6. Ekstrelerin İnce Tabaka Kromatografisi İle Analizine Ait Bulgular	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	44
6. ÖZET	49
7. SUMMARY	50
8. KAYNAKLAR	51
TEŞEKKÜR	54
9. ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Ursolik asit	11
Şekil 2: Luteolin (A) ve kersetin (B)	12

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: <i>X. annuum</i> tohum yağında KAD ve GSK yöntemlerine göre tespit edilen yağ asitleri ve oranları	10
Tablo 2: <i>X. annuum</i> 'a ait ekstrelerin antiproliferatif etkisi	15
Tablo 3: <i>X. annuum</i> çiçek ve kök-gövde örneklerinden elde edilen ekstrelerin % verimleri (a/a)	29
Tablo 4: <i>X. annuum</i> bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin BChE inhibitör etkileri (% İnhibisyon±S.S.*)	31
Tablo 5: <i>X. annuum</i> bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin DPPH radikal süpürücü etkileri (%İnhibisyon±S.S.*)	33
Tablo 6: <i>X. annuum</i> bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin DMPD radikal süpürücü etkileri (%İnhibisyon±S.S.*)	34
Tablo 7: <i>X. annuum</i> bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin demir iyonu-şelasyon etkileri (%Şelasyon±S.S.*)	36
Tablo 8: <i>X. annuum</i> bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin demir-indirgeme antioksidan gücü (Absorbans±S.S.*)	37
Tablo 9: <i>X. annuum</i> bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (Absorbans±S.S.*)	38
Tablo 10: <i>X. annuum</i> ekstrelerinde toplam fenol miktarları	39
Tablo 11: <i>X. annuum</i> ekstrelerinde toplam flavonoit miktarları	40

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: <i>Xeranthemum annuum</i> L. (tek çiçek)	7
Resim 2: <i>Xeranthemum annuum</i> L. (Mardin-Batman arası, Haziran-2009)	7
Resim 3: <i>Xeranthemum annuum</i> L. (genel görünüm)	8
Resim 4: Versamax ELISA mikroplak okuyucu	30
Resim 5: <i>X. annuum</i> 'un kök-gövde kısımlarından elde edilen <i>n</i> -hekzan ekstresine ait İTK kromatogramı (<i>n</i> -hekzan:kloroform - 90:10)	41
Resim 6: <i>X. annuum</i> 'un çiçek ve kök-gövde kısımlarından elde edilen kloroform ve etil asetat ekstrilerine ait İTK kromatogramı (kloroform:metanol:su - 80:20:2)	42
Resim 7: <i>X. annuum</i> 'un çiçek ve kök-gövde kısımlarından elde edilen etanol ve su ekstrilerine ait İTK kromatogramı (kloroform:metanol:su - 61:32:7)	43

KISALTMALAR

A.B.D.:	Amerika Birleşik Devletleri
AChE:	Asetilkolinesteraz
BChE:	Bütirikolinesteraz
DMPD:	<i>N,N</i> -Dimetil- <i>p</i> -fenilendiamin
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DPPH:	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB:	5-5'-Ditiyo-bis (2-nitrobenzoik) asit
EDTA:	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc:	Etil asetat
EtOH:	Etanol
FRAP:	Demir-indirgeme antioksidan gücü
GSK:	Gaz-sıvı kromatografisi
GK-KS:	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
İTK:	İnce tabaka kromatografisi
KAD:	Karşı akım dağılımı
L-DOPA:	3,4-Dihidroksi-L- fenilalanin
NAPRALERT:	Natural product alert
NBT:	Nitroblue tetrazolium
PRAP:	Fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü
SO:	Süperoksit
SS:	Standart sapma
UV:	Ultraviyole

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bitkiler, eski çağlardan beri hem besin, hem de ilaç hammaddesi kaynağı olarak kullanılma işlevlerine bağlı olarak insanların dikkatini çekmiştir. Dünya üzerindeki biyolojik çeşitliliği meydana getiren en önemli canlı gruplarından biri olan bitkiler aleminde geniş araştırmalar yürütülmektedir. Özellikle ilaç araştırmalarında en zengin doğal kaynak olan bitkiler, araştırma materyali olarak önemli bir hedef teşkil etmektedir. Pek çok az gelişmiş ve gelişmekte olan toplumun konvansiyonel ilaca ulaşma ve satın alma şansının oldukça düşük olduğu modern hayatta, geleneksel tıp ve folklorik bilgiye dayalı tedavi şekilleri halen revaçtadır. Diğer yandan mevcut bitki türlerinin 1/8'inin de soyu tükenme tehdidi altında olduğu bildirilmesine rağmen, NAPRALERT (Natural Product Alert) veri tabanına göre; 10 yıl önce dünya üzerinde bilinen bitki türlerinin henüz %15'inin fitokimyası, sadece %5'inin ise biyolojik aktiviteleri taranabilmiştir.¹

Asteraceae familyasına mensup bir tür olan ve ülkemizde "ölmez ot, kağıt otu" olarak bilinen *Xeranthemum annuum* L. üzerinde fitokimya ve biyolojik aktivite açısından yapılmış oldukça az sayıda çalışmanın mevcut olması, diğer taraftan Türkiye'de yetişen *X. annuum* örneği üzerinde ise henüz araştırma yapılmamış olması nedeniyle, "*Xeranthemum annuum* L. Üzerinde Farmakognozik Yönden Araştırmalar" adlı tezimizde, bu türün araştırma materyali olarak seçilmesine karar verilmiştir.

Ancak, bitkinin dünyada ve ülkemizde halk arasında herhangi bir etnofarmakolojik amaçla kullanımının kayıtlı olmaması nedeniyle, bitki üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılacak deney

modellerinin seçiminde, tarafımızdan daha önceden uygulanan enzim inhibisyon testleri ile çeşitli antioksidan aktivite testleri kullanılarak, bitkinin nöroprotektif etkiye sahip olup olmadığı belirlenecektir.

In vitro nöroprotektif etkinin belirlenmesinde test yöntemleri olarak; Alzheimer hastalığının patolojisinde rol oynayan asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzimleri ile Parkinson hastalığının patolojisinde yer alan tirozinaz enzim inhibisyonu uygulanacaktır. Diğer yandan, nörodejenerasyonun meydana gelmesine sebep olan bir diğer etken de oksidatif hasar ve başta demir olmak üzere, beyinde çeşitli metallerin birikimidir. Dolayısıyla, tez kapsamında, bitkinin çiçek ve kök-gövde kısımlarından hazırlanan *n*-hekzanlı, kloroformlu, etil asetatlı, etanollü ve sulu ekstrelerin AChE enzim inhibitör aktivitesi ile asetilkolinesterazın “kardeş enzimi” olarak bilinen BChE enzim inhibitör aktivitesi spektrofotometrik bir tarama yöntemi olan Ellman yöntemi² ile ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) mikropak okuyucuda incelenecektir. Tirozinaz inhibisyonu da yine mikropak yöntemi ile tayin edilecektir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri; radikal formasyonu temeline dayanan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite, *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) radikal süpürücü aktivite ve süperoksit (SO) radikal süpürücü aktivite testleri ile metal-bağlantılı antioksidan aktivite yöntemleri olan demir iyonu-şelasyon etki, demir-indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (PRAP) yöntemleri ile incelenmesi amaçlanmaktadır.

Bitki örneği üzerinde yapılan fitokimyasal içerikli deneylerde ise; hazırlanan ekstrelerde spektrofotometrik yöntemle; gallik asit eşdeğeri olarak toplam fenol miktar tayini ile kersetin eşdeğeri olarak toplam flavonoit miktar tayini yapılacaktır. Ayrıca, bitkinin ekstrelerin ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kimyasal profilleri hakkında fikir edinilmeye çalışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Tez içeriğindeki “Genel Bilgiler” kısmı; ilk olarak Asteraceae familyası ile tez materyalini oluşturan bitki türünün ait olduğu *Xeranthemum* cinsinin ve *Xeranthemum annuum* L.’in sistematikteki yeri ve botanik özellikleri hakkında bilgi verildiği “Botanik Bölüm” ile başlamaktadır. Botanik bölümü, türün genel olarak ihtiva ettiği bileşiklerin bahsedildiği “Fitokimyasal Bölüm” ile *Xeranthemum* L. cinsine ait türler üzerinde yapılmış biyolojik aktivite çalışmalarının sınıflandırılarak derlendiği ve kronolojik sıralamaya göre verildiği “Biyolojik Aktivite Bölümü” takip etmektedir.

2.1. Botanik Bölüm

2.1.1. Asteraceae Familyası

Çoğunlukla otsu, ancak bir kısmı da çalimsı veya ağaç tipinde tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık bitkileri kapsayan bir familyadır.³ İçinde 1000’e yakın cins ve 20.000’e yakın tür barındırması sebebiyle en zengin familyalardan biri olan Asteraceae, önceden “Compositae” olarak isimlendirilmiştir.⁴ Yapraklar genellikle alternan, karşılıklı veya hepsi tabanda dizilmiştir. Lamina tam, kenarları dişli, loblu veya parçalı olabilir. Çiçekler kapitulum durumunda ve kapitulum tabanında braktelerden oluşan bir involukrum bulunmaktadır.⁵ Çiçekler bazen bir adet olup, kapitulum bazen ikinci bir kapitulum gibi görünen ve “psödocefalyum” adı verilen çiçek tepesine gömük durumdadır. Erdişi veya tel eşeyli olan çiçekler, aktinomorf veya zigomorftur. Reseptakulum genellikle çıplak veya tüylerle kaplanmıştır. Kaliks bir papus halinde, bazen bir halka veya pul şeklinde, bazı türlerde de eksiktir. Korolla birleşik halde 5 petale sahip,

çoğunlukla tüp veya dil şeklini almakla beraber, nadiren bilabiat haldedir. Stamenler 4 veya 5 adet olup, filamentler serbest, anterler birleşik halde bulunur. Ovaryum alt durumlu, 2 karpelli ve bir ovüllüdür. Meyve; tepesinde bir papus, bir kaliks artığı veya tepede böyle bir kısmı olmayan bir aken tipindedir.

Ülkemizde 130'un üzerinde cins ve 1200 civarında tür ile temsil edilen en geniş bitki familyalarından biridir.

“Flora of Turkey” e göre; Asteraceae familyası içerdiği cinsler açısından A-F arasında olmak üzere, 6 alt gruba ayrılmaktadır:³

1. Çiçeklerin tümü dilsli (ligulat), dilsli petaller 5 dişli, lateksli bitkiler **Grup A**
1. Çiçeklerin tümü dilsli değil, en azından merkezde bulunanlar tüpsü, lateks taşımayan bitkiler (Grup B'de *Gundelia* hariç)
 2. Yapraklar ve/veya filaryumlar dikenli, bazen batıcı (dikenler bazen kancalı halde) **Grup B**
 2. Yapraklar ve filaryumlar dikensiz
 3. Kapitulum ışınsal, kenarlardaki çiçekler genellikle 3-dişli (nadiren 5 veya fazla) dilsli petal taşır ve kesin olarak tabla çiçeklerinden uzundur
 4. Dilsipetaller parlak sarı-turuncu renklere **Grup C**
 4. Dilsli petaller beyaz, krem, pembe, kırmızı, mor veya mavi renklere **Grup D**
 3. Kapitulumlar diskoit (tablamsı) veya diskiform, kenar çiçekler tubular, bazen uzamış, genişlemiş veya ışınsal, ancak genellikle ±silindirik biçimde veya çok küçük dilsli ve tabla çiçeklerinden daha kısa

5. Reseptakulum paleasöz veya uzun tüylü (tüyler en az korolla kadar uzun) **Grup E**

5. Reseptakulum çıplak veya çoğunlukla alveollerin kenarları siliat veya dişli **Grup F**

X. annuum, **Grup E** altında yer almaktadır.

2.1.2. *Xeranthemum annuum* L. Türünün Sistematikteki Yeri

Bölüm:	Spermatophyta
Sınıf:	Dicotyledonae
Alt sınıf:	Dialypetalae
Takım:	Asterales
Familya:	Asteraceae
Cins:	<i>Xeranthemum</i> L.
Tür:	<i>Xeranthemum annuum</i> L.

2.1.3. *Xeranthemum* L. Cinsi

Akdeniz bölgesinden güneybatı Asya'ya kadar uzanan bölgede yayılış gösteren tek yıllık bir bitki cinsidir.³ Yapraklar linear-eliptik, tam ve sesildir. Kapitulum heterogamöz, diskiform, çıplak dallarda tektir. İnvolutrum kampanulat-ovoit veya fusiform, filaryumlar pluriseriyat, skariyöz, imbrikat, dış kısmı kısa, iç kısmı bariz şekilde daha uzun, ışınsal ve renklidir. Reseptakulum paleasöz olup, kenardaki çiçekler verimsiz, eşit olmayan şekilde iki dudaklı, iç kısımdakiler hermafrodit, tüpsü ve 5-lobludur. Filamentler serbesttir. Akenler oblong, aşağısı ince, yukarısı kesik şekildedir. Papus, 5 veya 10-15 aristat-ince puldan oluşmaktadır.

Xeranthemum L. cinsi ülkemizde, aşağıda verilen 4 tür ile temsil edilmektedir:³

- X. annuum* L.
- X. cylindraceum* Sm. in Sibth. & Sm.
- X. inapertum* (L.) Miller
- X. longipapposum* Fisch. & Mey

2.1.4. *Xeranthemum annuum* L. Türü

X. annuum ülkemizde “ölmez ot, kağıt otu”, İngilizce’de ise benzer anlama sahip “immortelle, everlasting flower” gibi isimlerle bilinmektedir. Türkiye’nin yanısıra Güney Avrupa, Kafkasya, Lübnan, Suriye ve İran’da da yayılış gösteren bu bitkinin sinonim adları *X. squarrosum* Boiss., *X. radiatum* Lam., *X. radiatum* Lam. var. *pictum* Boiss. olup, Mayıs-Eylül döneminde çiçeklenmektedir (Resim 1-3).⁴ Tek yıllık, dallanan, dikine büyüyen, 5 ile 60 cm arasında uzayan bir bitkidir. Yapraklar alternan, sesil, linear ve çiçek başları bir adettir. Petal benzeri involukral brakteler yaygın, pembemsi, lila, bazen beyaz, tüpsü çiçekler mor renklidir. İnvolumen glabröz, dış filaryumlar ovat-mukronat, iç kısımdakiler linear-eliptik, ışınsal, beyazdan parlak pembe veya mora değişen renklerde ve kalıcıdır.⁶ Papus 5 pullu, akenden daha kısa veya çok az uzundur.^{4,6}

X. annuum, güzel ve dayanıklı çiçekleri, bahçe bitkisi ve kesme çiçek olarak da tercih edilmekte olup, Çek Cumhuriyeti ve Slovakya gibi bazı ülkelerde nesli tükenme tehlikesi altında olan bir türdür. İber yarımadası florasında da bu tür koruma altına alınmıştır.⁷



Resim 1: *Xeranthemum annuum* L. (tek çiçek)

(<http://www.eol.org/pages/6261628> websitesinden alınmıştır. Giriş tarihi: 01.Ocak.2011)



Resim 2: *Xeranthemum annuum* L. (Mardin-Batman arası, Haziran-2009)

(Fotoğraf: Prof.Dr. İlkay Orhan)



Resim 3: *Xeranthemum annuum* L. (genel görünüm)

(http://az.wikipedia.org/wiki/%C5%9E%C9%99kil:Xeranthemum_annuum.JPG
websitesinden alınmıştır. Giriş tarihi: 01.Ocak.2011)

2.2. Fitokimyasal Bölüm

Literatür sayısının az olması nedeniyle, sadece *Xeranthemum annuum* L. türü değil, *Xeranthemum* L. cinsinin diğer türlerinin de kimyasal bileşiklerinden bahsedileceği bu bölümde; “Yağ Asitleri”, “Triterpen Türevi Bileşikler”, “Flavonoit Türevi Bileşikler”, “Siyanojenik Bileşikler” ve “Uçucu Yağ Bileşenleri” olmak üzere 5 alt başlık halinde kronolojik sıraya uygun olarak incelenecektir.

2.2.1. Yağ Asitleri

Amerika Birleşik Devletleri’nde kültürü yapılan *X. annuum* tohumlarından petrol eteri kullanarak Soxhlet cihazı ile yaklaşık %25 verime sahip sabit yağ elde edilmiş ve yağ metil esterifikasyona tabi tutularak metil esterleri hazırlanmıştır.⁸ Esterifiye edilen yağ “karşı akım dağılımı” (KAD) (counter current distribution, CCD) kromatografisine uygulanmış ve yağ asiti bileşimi hem KAD hem de gaz-sıvı kromatografisi (GSK) ile tespit edilmiştir. Yağda palmitik, stearik, oleik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi yağ asitlerinin yanı sıra bazı ilginç epoksi ve hidroksi türevi yağ asitlerinin varlığına da ilk defa rastlanmıştır. Bunlar; *cis*-5, *cis*-9, *cis*-12-oktadekatrienik asit; *cis*-9-*L*, 10-*L*-epoksioktadekanoik; *cis*-9-*L*, 10-*L*-epoksi-*cis*-12-oktadesenoik (koronarik) asit ve *cis*-12-*D*, 13-*D*-epoksi-*cis*-9-oktadesenoik (vernolik) asit olarak aydınlatılmış, ayrıca iki hidroksi yağ asitinin karışımının %11 oranında yağda bulunduğu saptanmıştır.

Buna göre; yağda bulunan yağ asitlerinin oranları her iki yöntemle göre Tablo 1’de verilmiştir.

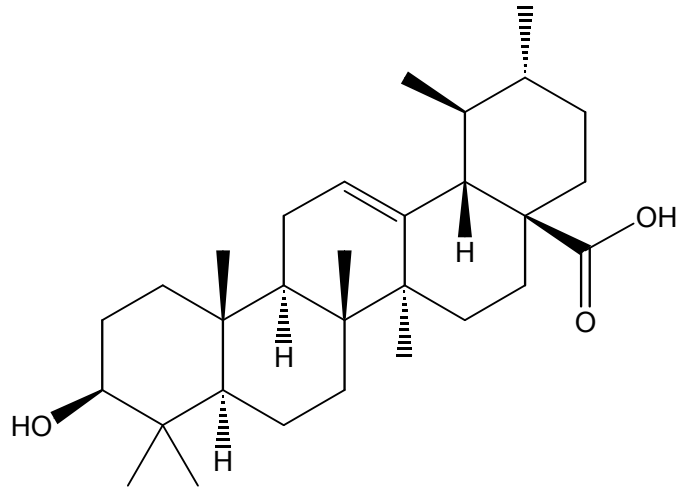
Tablo 1: *X. annuum* tohum yağında KAD ve GSK yöntemlerine göre tespit edilen yağ asitleri ve oranları⁸

Yağ asiti	Karbon:çifte bağ sayısı	Yağ asiti oranları (% a/a)	
		KAD	GSK
Palmitik asit	C16:0	9	11
Stearik asit	C18:0	3	4
Oleik asit	C18:1	16	20
Linoleik asit	C18:2	36	49
Linolenik asit	C18:3	1	1
Bilinmeyen bir yağ asiti	C19:2	5	6
Epoksi yağ asiti	C18:0	3	Eser miktarda
Epoksi yağ asiti	C18:1	10	5
Hidroksi yağ asiti	C18:2	11	Tayin edilemedi
Toplam		94	96

2.2.2. Triterpen Türevi Bileşikler

1978 yılında, Serkerov ve Tairov tarafından *X. cylindricetum*'dan bir triterpen alkol türevinin izolasyonu bildirilmiştir.⁹

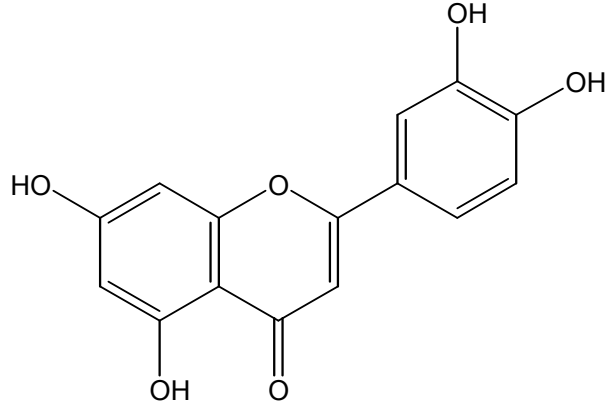
Rusya'dan 1978 yılının Temmuz ayında toplanan *X. annuum* örneğinden %70 etanol ile hazırlanan ekstreden hepsi α -amirin türevi olmak üzere, 4 adet triterpen türevi izole edilmiş ve bunlardan birinin kimyasal yapısı "ursolik asit" olarak aydınlatılmıştır¹⁰ (Şekil 1).



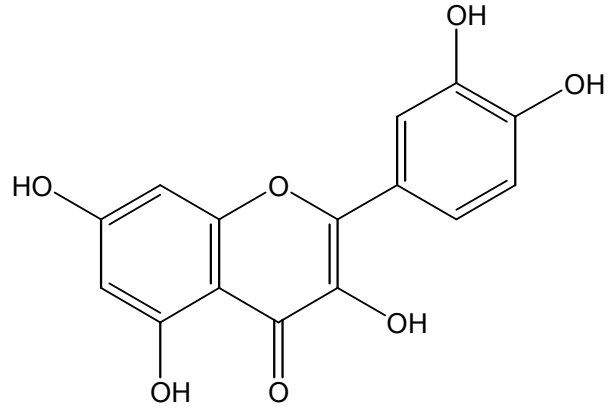
Şekil 1: Ursolik asit

2.2.3. Flavonoit Türevleri

Rusya'dan 1978 yılının Temmuz ayında toplanan *X. annuum* örneğinden %70 etanol ile hazırlanan ekstrede, polifenolik yapıya sahip oldukları tespit edilen 6 adet bileşikten, 2 tanesinin "luteolin" ve "kersetin" adlı flavonoit türevleri olduğu bulunmuştur.¹⁰



(A)



(B)

Şekil 2: Luteolin (A) ve kersetin (B)

2.2.4. Siyanojenik Bileşikler

Huebel ve ark. tarafından *X. cylindraceum*'un olgunlaşmamış akenlerinden "zierinksilozit" adı verilen yeni bir siyanojenik heterozit izole edilmiştir.¹¹ Aynı türün yine meyvelerinden "sambunigrin, zierin, epilukumin ve zierinksilozit" olmak üzere 4 adet bilinen siyanojenik heterozit türevinin yanı sıra, "zerantin" adlı açıl trisakkarit türevi yeni bir siyanojenik bileşik daha izole edilmiştir.¹² *X. cylindraceum*'un olgunlaşmamış akenlerinden *meta* konumunda hidroksil taşıyan mandelonitril türevi bazı siyanojenik heterozitler de elde edilmiştir.¹³

Daha sonra Nahrstedt ve Schwind tarafından yapılan bir çalışmada;¹⁴ daha önce *X. cylindraceum*'un olgunlaşmamış akenlerinden izole edilen ve "2- β -D-glukopiranoziloksi-2S-[*m*-hidroksifenil]-asetonitril" kimyasal yapısına sahip "zierin" adlı siyanojenik heterozitin biyogenetik prekürsörünün "fenilalanin" adlı aminoasit olduğu tespit edilmiştir.

2.2.5. Uçucu Yağ Bileşenleri

Yunanistan'da yetişen *X. annuum* örneğinin topraküstü kısımlarından buhar distilasyonu ile elde edilen uçucu yağın bileşimi gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GK-KS) ile analiz edilmiştir.¹⁵ Uçucu yağda çoğunluğu monoterpen ve seskiterpen hidrokarbonlar olmak üzere toplam 97 bileşen olduğu ve ana bileşenler olarak %15.2 oranında β -pinen ve %8.6 oranında β -karyofillen bulunduğu saptanmıştır.

2.3. Biyolojik Aktivite Bölümü

Literatür araştırmalarımıza göre; *Xeranthemum* türleri için bildirilen herhangi bir etnofarmakolojik veri bulunmamaktadır. Sadece *X. annuum*'un Sırbistan'da evlerde kullanılmak üzere süpürge yapımında kullanıldığına dair bir etnobotanik bilgi yayınlanmıştır.¹⁶ Dolayısıyla, *Xeranthemum* türleri üzerinde etnofarmakolojik kullanımına bağlı herhangi bir biyolojik aktivite çalışması bulunmamaktadır. Ancak yapılan biyolojik aktivite çalışmaları da oldukça sınırlı sayıda olup, aşağıda verilen alt başlıklar halinde bahsedilecektir.

2.3.1. Anti-*Helicobacter* Aktivite

Stamatis ve ark. tarafından Yunanistan'da yetişen 70 adet bitkiden hareketle hazırlanan %70 metanollü ekstralarının antibakteriyel etkisi, gastrik ülserle sebep olduğu bilinen bir bakteri türü olan *Helicobacter pylori*'nin 15 adet klinik izolatına karşı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak test edilmiştir.¹⁷ Bu bitkiler arasında bulunan *X. annuum*'un topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstresinin etkili olmadığı tespit edilmiştir.

2.3.2. Antiproliferatif ve Sitotoksik Aktivite

Macaristan'da yetişen, aralarında *X. annuum*'un da bulunduğu Asteraceae familyasına mensup 26 bitki türünden hareketle %50 metanol ile hazırlanan ekstralar fraksiyonlanarak, *n*-hekzan, kloroform ve sulu-metanol fraksiyonları elde edilmiştir.¹⁸ Daha sonra ekstraksiyonda kullanılan bitki materyali kurutulmuş, su ile ekstre edilmiş ve sulu ekstralar da hazırlanmıştır. Elde edilen ekstralar, antiproliferatif ve sitotoksik aktivitelerinin belirlenebilmesi için HeLa (serviks adenokarsinoma), MCF-7 (göğüs adenokarsinoma) ve A431 (deri epidermoir karsinoma) olmak üzere üç insan hücre paneline karşı *in vitro*

olarak test edilmiştir. *X. annuum*'un çiçek-meyve, topraküstü kısımları ve köklerinden ayrı ayrı yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlanan ekstrelerde, bu hücre panellerine karşı denenmiş ve Tablo 2'de verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 2: *X. annuum*'a ait ekstrelerin antiproliferatif etkisi¹⁸

<i>X. annuum</i> Bitki kısmı	Ekstre tipi	Antiproliferatif etki (%)		
		HeLa	MCF-7	A431
Çiçek-meyve	<i>n</i> -Hekzan	10.24±1.86	1.58±1.62	14.61±3.50
	Kloroform	9.46±0.94	9.53±3.09	17.03±2.34
	Sulu-metanol	6.97±1.41	7.86±2.89	9.09±3.44
	Su	3.89±1.59	10.97±2.11	16.19±3.33
Topraküstü kısımlar	<i>n</i> -Hekzan	2.32±1.86	7.26±1.75	14.11±2.36
	Kloroform	10.66±1.64	16.39±1.63	9.50±3.32
	Sulu-metanol	9.61±1.47	18.80±2.39	14.92±3.35
	Su	2.69±1.70	13.41±2.40	7.57±1.54
Kök	<i>n</i> -Hekzan	6.63±1.70	2.79±1.17	20.56±4.25
	Kloroform	17.66±1.29	24.87±2.26	25.47±2.31
	Sulu-metanol	22.03±2.66	21.95±1.35	17.00±1.96
	Su	2.58±1.98	21.74±1.00	15.31±4.34

Buna göre; en yüksek etkiyi bitkinin köküne ait kloroformlu ekstre A431 hücre paneline karşı (%25.47±2.31) göstermiştir. Ancak ekstrelerde sitotoksik aktivite gözlenmemiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Deneysel çalışmalarımızda araştırma materyali olarak belirlenen *Xeranthemum annuum* L. (Asteraceae), Mardin ve Batman illeri arasında yol kenarından, 2009 yılı Haziran ayında toplanmıştır. Bitkinin teşhisi Prof.Dr. Hayri Duman (Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara) tarafından yapılmıştır. Bitki örneği, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda muhafaza edilmektedir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Tez çalışmalarımızda kullanılan *X. annuum* bitkisinin çiçekleri ile kök-gövde kısmı ayrılarak, ayrı ayrı gölgede ve oda sıcaklığında kurutulmuş, daha sonra toz edilmiştir. Toz edilen *X. annuum* çiçek (3.50 g) ve kök-gövde kısımları (12.60 g) örnekleri dijital terazide (Shimadzu) tartılarak, ekstraksiyon için hazırlanmıştır. Bitki kısımları *n*-hekzan (Merck) ile 3 gün süre ile ekstraksiyona tabi tutulmuş, süre sonunda toplanan *n*-hekzanlı faz, alçak basınç altında 45°C'de su banyosu kullanılarak evaporatörde (Büchi) yoğunlaştırılmış ve *n*-hekzan ekstresi elde edilmiştir.

Daha sonra kalan bitki kısımları, sırasıyla kloroform (CHCl₃), etil asetat (EtOAc) ve etanol (%90) (EtOH) ile oda sıcaklığında her solvan için yine 3'er gün süreyle olmak üzere maserasyona tabi tutulmuş, süre sonunda filtre kâğıdından süzülen organik fazlar, evaporatörde kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Kalan bitki kısımları, en son distile su ile 3 gün

boyunca oda sıcaklığında masere edilmiş, süzölen sulu kısımlar, alçak basınç altında 40°C'de evaporatörde yoğunlaştırılmış, yoğunlaştırılan kısımlar -80°C'de dondurulmuş ve daha sonra fakültemiz merkez laboratuvarında bulunan liyofilizatörde liyofilize edilmiştir.

Böylece, bitkinin hem çiçek, hem de kök-gövde kısımlarından 5'er ekstre olmak üzere (*n*-hekzan, kloroform, etil asetat, etanol ve su) olmak üzere toplam 10 ekstre elde edilmiş, elde edilen ekstrelerin verimleri hesaplanmış ve daha sonra aktivite deneylerinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır. Türlerle ait % ekstre verimleri (a/a) Tablo 3'de verilmektedir.

3.2.2. *X. annuum* Ekstrelerinde Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayini

3.2.2.1. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör aktivite Ellman ve ark. tarafından geliştirilen, modifiye edilmiş spektrofotometrik Ellman yöntemi² kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim kaynağı olarak elektrikli yılan balığı AChE'ı (Sigma, EC 3.1.1.7) kullanılırken, substrat olarak asetiltiyokolinyodür (Sigma, ABD), 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik)asit (DTNB, Sigma, ABD) ise renklendirici madde olarak kullanılmıştır.

Hazırlanan *n*-hekzan, kloroform, EtOAc, EtOH ve distile su ekstreleri tartılarak etanolde (%75) çözülmüş ve örneklerden hareketle 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır.

Deney protokolüne göre; 96 kuyucuklu mikroplaktaki bütün kuyucuklara ilk önce 140 µl 0.1 M fosfat tamponu çok kanallı mikropipet (Eppendorff) yardımı ile konulmuştur. Mikroplağın ilk 4 ve son 8 kuyucuğu kontrol olarak ayrılmıştır. Bu ayrılan kuyucuklara kontrol olarak kullanılan etanol (20 µl) yine mikropipet (Eppendorff) yardımıyla eklenmiştir. Hazırlanmış olan örneklerden 20'şer µl, her örnek 6 paralel olacak şekilde geriye kalan kuyucuklara ilave edilmiştir. AChE enzim çözeltisinden 20 µl bütün kuyucuklara eklendikten sonra mikroplaklar 10 dakika 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mikroplaktaki tüm kuyucuklara 10 µl DTNB çözeltisi, hemen arkasından 10 µl 0.4 mM substrat çözeltisinden (asetiltiyokolinilyodür) eklenmiştir. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/10'una tekabül edecek şekilde seyrelmiştir.

Mikroplaklar 412 nm dalga boyunda 96 kuyucuklu enzymlenmiş immunosorbent assay (ELISA) mikroplak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, A.B.D.) okutulmuştur. Ekstrelerin %AChE inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve referans ilaç olarak galantamin ile mukayese edilmiştir. Her örnek 6 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 6 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Sonuçlar Softmax PRO 4.3.2.LS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.2. Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibisyonu

Bütirilkolinesteraz (BChE) inhibitör aktivite ölçümünde AChE enzim inhibisyonu ölçümünde (3.2.2.1.) kullanılan yöntem aynı şekilde uygulanmıştır.² Ancak bu deneyde enzim kaynağı olarak at serum bütirilkolinesterazı (Sigma, EC 3.1.1.8), substrat olarak ise bütiriltiyokolinklorür (Sigma, A.B.D.) kullanılmıştır. Renklendirici madde olarak yine DTNB (Sigma, A.B.D.) uygulanmıştır. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/10'una tekabül edecek şekilde seyrelmiştir.

Ekstrelerin %BChE inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve sonuçlar referans ilaç olarak galantamin ile mukayese edilmiştir. Her örnek 6 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 6 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\%İnhibisyon = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 412 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Sonuçlar Softmax PRO 4.3.2.LS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayini

Bitkinin çiçek ve kök-gövde kısımlarından hazırlanan ekstralar tartılarak dimetilsülfoksit'de (DMSO) çözülmüş ve 62.5 µg/ml, 125 µg/ml ve 250 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde dilüsyonları hazırlanmıştır. Ekstrelerin tirozinaz (EC 1.14.1.8.1, 30 U, mushroom tyrosinase, Sigma) inhibisyon kapasitesi, Masuda ve ark. tarafından geliştirilen, 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin'in (L-DOPA) substrat olarak kullanıldığı modifiye dopakrom yöntemi ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.¹⁹ Referans olarak α-kojik asit'in (Sigma) kullanıldığı deneyler, 96 kuyucuklu mikropalak kullanılarak ELISA mikropalak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, A.B.D.) gerçekleştirilmiştir. Deney protokolüne göre; hazırlanan dilüsyonlardan belli hacimde alınarak, daha önceden her birine fosfat tamponu (pH 6.8) eklenmiş kuyucuklara ilave edilmiştir. Bunun üzerine eşit miktarda enzim çözeltisi ile L-DOPA çözeltisi konulmuş ve kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/15'ine tekabül edecek şekilde seyrelmiştir. İnkübasyon süresini takiben, 96 kuyucuklu mikropalaklar ELISA cihazına yerleştirilerek, örnekler ve kontrolün absorbansları 475 nm dalga boyunda okunmuş ve tirozinaz inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 6 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 6 deneyden elde edilen ortalama %inhibisyon±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

$$\%İnhibisyon = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 475 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 475 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

Sonuçlar Softmax PRO 4.3.2.LS bilgisayar programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. X. *annuum* Ekstrelerinde Antioksidan Aktivite Tayini

3.2.3.1. 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Antioksidan aktivite tayini için en çok tercih edilen yöntemlerden biri DPPH (Sigma) radikal süpürücü aktivite tayinidir. Deneyde kullanılan DPPH, serbest radikal olup, ortaklanmamış bir elektronu nedeniyle 517 nm dalga boyunda güçlü absorpsiyon verir. Yöntem Marsden S. Blois tarafından bulunmuş olup,²⁰ ekstrelele Hatano tarafından modifiye edilmiş şekli uygulanmıştır.²¹

Ekstreler, 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda, DPPH stok çözeltisi ise 6×10^{-5} mol/l konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmış ve etanolde (%75) çözülmüştür. Her örnekten deney tüplerine, mikropipet yardımıyla belli bir miktarda alınarak üzerlerine 2700 µl DPPH çözeltisi eklenmiş ve böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/40'ına tekabül edecek şekilde seyrelmiştir. Daha sonra tüpler oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbansı 517 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan etanole karşı spektrofotometrede (Unico UV-Visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Örneklerin DPPH serbest radikaline karşı %inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve gallik asit referans olarak kullanılmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonun ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A₁ = DPPH stok çözeltisinin 517 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂ = Örnek çözeltilerinin 517 nm dalga boyundaki absorbansı

3.2.3.2. N,N-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Viyole-pembe renkli *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) radikalinin indirgenmesi esasına dayanan yöntemde, ekstrelerin DMPD radikal süpürücü aktiviteleri Schlesier ve ark. tarafından geliştirilen yöntemle göre tayin edilmiştir.²²

Yönteme göre; ekstreler 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış ve etanolde (%75) çözülmüştür. Her örnekten deney tüplerine, mikropipet yardımıyla belli bir miktarda alınarak üzerlerine 100 mM DMPD, 0.1 M asetat tamponu (pH=5.25) ve 0.05 M demir-II-klorür'den oluşan çözelti eklenmiştir. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/20'sine tekabül edecek şekilde seyrelmiştir. Örneklerin absorbansı 505 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan etanole karşı spektrofotometrede (Unico UV-Visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Örneklerin DMPD serbest radikaline karşı %inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve referans olarak kersetin kullanılmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonun ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{İnhibisyon} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A_1 = DMPD stok çözeltisinin 505 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Örnek çözeltilerinin 505 nm dalga boyundaki absorbansı

3.2.3.3. Süperoksit (SO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Süperoksit (SO) radikalinin süpürülmesi esasına dayanan yöntemde, ekstrelerin SO radikal süpürücü aktiviteleri Kerri ve ark. tarafından geliştirilen yöntemle göre tayin edilmiştir.²³

Yönteme göre; ekstreler 62.5 µg/ml, 125 µg/ml ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış ve her örnekten deney tüplerine, mikropipet yardımıyla belli hacimlerde alınarak, üzerine 0.1 ml nitroblue tetrazolium (NBT) çözeltisi ile 5 mM sodyum hidroksit kullanılarak hazırlanan alkali DMSO'dan 1 ml ilave edilmiştir. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/4'üne tekabül edecek şekilde seyrelmiştir.

Örneklerin absorbansı 560 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan DMSO'ya karşı spektrofotometrede (Unico UV-Visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Örneklerin SO radikale karşı %inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmış ve referans olarak kersetin kullanılmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonun ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\% \text{Inhibisyon} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A_1 = SO stok çözeltisinin 560 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Örnek çözeltilerinin 560 nm dalga boyundaki absorbansı

3.2.3.4. Demir İyonu-Şelasyon Etkinin Tayini

Ekstrelerin demir iyonu-şelasyon etkilerinin tayin edilmesi amacıyla; Dinish ve ark.'nın yöntemi uygulanmıştır.²⁴ Referans olarak etilendiamin tetraasetik asit'in (EDTA) kullanıldığı deneylerde, ekstrelerden 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda dilüsyonlar etanol (%75) ile çözülerek hazırlanmıştır. Deneyde kullanılmak üzere 2 mM demir-II-klorür ile 5 mM ferrozin çözeltisi de hazırlanmıştır. Yönteme göre; her bir örnekten ve kontrol çözeltisini hazırlamak için çözücünden (etanol) 200 µl mikropipet ile alınarak deney tüplerine konulmuştur. Üzerlerine 50 µl demir-II-klorür ve ardından 200 µl ferrozin çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra, son hacim 4000 µl olacak şekilde etanol (%75) ilave edilmiştir. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/20'sine tekabül edecek şekilde seyrelmiştir.

Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve süre sonunda absorbans 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Unico UV-Visible spektrofotometre, A.B.D.) ölçülmüştür. Örneklerin %inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen %inhibisyonların ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir.

$$\%İnhibisyon = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A_1 = Kontrol çözeltisinin 562 nm dalga boyundaki absorbansı

A_2 = Örnek çözeltilerinin 562 nm dalga boyundaki absorbansı

3.2.3.5. Demir-İndirgeme Antioksidan Gücünün (FRAP) Tayini

Ekstrelerin demir-indirgeme antioksidan gücü (ferric-reducing antioxidant power, FRAP), Oyaizu'nun²⁵ yöntemine göre 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda tayin edilmiş ve referans olarak klorojenik asit kullanılmıştır.

Yönteme göre; örneklerden 1 ml alınarak, 2.5 ml fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 ml potasyum ferrisiyanür ilave edilmiş, elde edilen karışım 50°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 2.5 ml %10 trikloroasetik asit (TCA, Sigma) eklenmiştir. Karışım vorteks aracılığıyla homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra, içlerinden 2.5 ml alınarak üzerine distile su ve demir-III-klorür eklenmiştir. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/20'sine tekabül edecek şekilde seyrelmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika daha inkübasyona bırakıldıktan sonra absorbanlar kör olarak kullanılan etanole karşı 700 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Unico UV-visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen absorbanların ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir. Sonuçların yöntemine göre yorumlanması, artan absorbanların indirgeme gücünün arttığına işaret etmesi şeklindedir.

3.2.3.6. Fosfomolibdenyum-İndirgeme Antioksidan Gücünün (PRAP) Tayini

Ekstrelerin fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (phosphomolibdenum-reducing antioxidant power, PRAP), Falcioni ve ark.'nın²⁶ yöntemine göre 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda tayin edilmiş ve referans olarak kersetin kullanılmıştır.

Yönteme göre; örneklerden belli hacimde alınarak, üzerlerine %10 fosfomolibdik asit çözeltisi ilave edilmiş, elde edilen karışım 80°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Böylece final konsantrasyonlar başlangıç konsantrasyonlarının 1/4'üne tekabül edecek şekilde seyrelmiştir.

Süre sonunda absorbanslar kör olarak kullanılan etanole karşı 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Unico UV-visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Her örnek 3 paralel çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen absorbansların ortalaması±standart sapma olarak verilmiştir. Sonuçların yönteme göre yorumlanması, artan absorbansların indirgeme gücünün arttığına işaret etmesi şeklindedir.

3.2.4. X. *annuum* Ekstrelerinde Fitokimyasal Analizler

3.2.4.1. Toplam Fenol Miktar Tayini

Toplam fenol miktarını tayin etmek için Singleton ve Rossi tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır.²⁷ Bitki ekstresi belli miktarda tartılıp, etanolde (%75) çözülmüştür. Daha sonra her örnekten 20 µl alınıp, üzerine sırasıyla yöntemde verilen miktarlarda distile su, Folin-Ciocalteu reaktifi (Sigma) ve sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi eklenmiştir. Diğer taraftan kalibrasyon eğrisini oluşturabilmek için 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 250 mg/ml, 500 mg/ml konsantrasyonlarda gallik asit dilüsyonları hazırlanmış ve örnek yerine gallik asit dilüsyonları konularak diğer çözeltiler aynen ilave edilmiştir. Tüm çözeltiler 40°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda absorbanslar 765 nm dalga boyunda kör olarak kullanılan etanole karşı spektrofotometrede (Unico UV-Visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmıştır. Örneğin ortalama absorbansından, gallik asit kalibrasyon çözeltileri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre, toplam fenol konsantrasyonu gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmış ve ekstrenin toplam fenol miktarı mg/g ekstre±standart sapma olarak verilmiştir.

3.2.4.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Toplam flavonoit miktarını tayin etmek için Woisky ve Salatino'nun geliştirdiği alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik yöntemi uygulanmıştır.²⁸ Bitki ekstresi belli miktarda tartılıp, etanolde (%75) çözülmüştür. Daha sonra örnekten deney tüplerine belli hacimlerde konularak, üzerine sırasıyla yöntemde verilen miktarlarda etanol (%75), %10'luk AlCl₃, 1 M sodyum asetat çözeltisi ve distile su eklenmiştir. Diğer

tarafından kalibrasyon eğrisini oluşturabilmek için 0.125 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml, 1.0 mg/ml konsantrasyonlarda kersetin kalibrasyon çözeltileri hazırlanmış ve örnek yerine kersetin dilüsyonları konularak diğer çözeltiler aynen ilave edilmiştir. Karışımlar 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda absorbanslar 415 nm dalga boyunda kontrol olarak kullanılan etanol'e karşı spektrofotometrede (Unico UV-Visible spektrofotometre, A.B.D.) okunmuştur. Her örnek 3 paralel deney halinde çalışılmıştır. Örneğin ortalama absorbansından, kersetin kalibrasyon çözeltileri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre, toplam flavonoid konsantrasyonu kersetin eşdeğeri olarak hesaplanmış ve ekstrenin toplam flavonoid miktarı mg/g ekstre±standart sapma olarak verilmiştir.

3.2.4.3. Ekstrelerin İnce Tabaka Kromatografisi İle Analizi

X. annuum çiçek ve kök-gövde örneklerinden hareketle hazırlanan *n*-hekzan, kloroform, etil asetat, etanol ve su ekstralarının kimyasal profili, *n*-hekzan ekstresi için hekzan:kloroform (90:10), diğer ekstralar için ise kloroform:metanol:su (61:32:7) ve kloroform:metanol:su (80:20:2) solvan sistemleri kullanılarak ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi ile 254 ile 366 nm dalga boylarında incelenmiştir. Daha sonra plaklar vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile revele edilerek 105°C'de bir süre bekletilmiş ve spotların renklenmesi sağlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Ekstre Verimlerine Ait Bulgular

X. annuum çiçek ve kök-gövde örneklerinden hareketle hazırlanan *n*-hekzanlı, kloroformlu, etil asetatlı, etanollü ve sulu ekstrelerin % verimleri (a/a) Tablo 3'te verilmektedir.

Tablo 3: *X. annuum* çiçek ve kök-gövde örneklerinden elde edilen ekstrelerin %verimleri (a/a)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	%Verim (a/a)
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	5.14
	Kloroform	7.14
	Etil asetat	1.14
	Etanol	3.71
	Su	14.29
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	2.06
	Kloroform	1.75
	Etil asetat	0.32
	Etanol	5.01
	Su	15.89

4.2. *X. annuum* Ekstrelerinin Kolinesteraz Enzim İnhibisyonu Tayinine Ait Bulgular

4.2.1. Asetilkolinesteraz Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin ELISA mikroplak okuyucuda 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml final konsantrasyonlarda test edilerek (Resim 4), AChE'a karşı inhibisyon oluşturmadığı tespit edilmiştir.



Resim 4: Versamax ELISA mikroplak okuyucu

4.2.2. Bütirikolinesteraz Enzim İnhibisyonuna Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin 25 µg/ml, 50 µg/ml ve 100 µg/ml final konsantrasyonlarda BChE inhibisyonuna ait bulgular Tablo 4'te verilmektedir.

Tablo 4: *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin BChE inhibitör etkileri (% İnhibisyon±S.S.*)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	BChE'a karşı inhibisyon (%İnhibisyon±S.S.*)		
		25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE**	TE	TE
	Kloroform	80.12±1.12	94.28±3.14	97.85±0.94
	Etil asetat	72.66±0.43	85.09±1.02	89.00±2.24
	Etanol	50.74±2.95	60.75±3.03	92.41±1.97
	Su	-***	80.58±3.04	82.39±2.85
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	-	4.34±1.59	67.54±3.59
	Kloroform	33.27±2.05	77.67±2.67	87.62±3.01
	Etil asetat	79.71±2.78	90.49±0.99	96.89±1.09
	Etanol	64.36±3.12	82.63±2.95	90.47±1.98
	Su	78.01±3.05	82.71±1.55	90.06±2.92
Galantamin (Referans)		89.95±0.87 (25 µg/ml)		

* Standart Sapma, ** Test edilmedi, *** İnhibisyon gözlenmedi

4.2.3. Tirozinaz Enzim İnhibisyonu Tayinine Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin 62.5 µg/ml, 125 µg/ml ve 250 µg/ml final konsantrasyonlarda tirozinaz enzimin inhibe etmediği tespit edilmiştir.

4.3. *X. annuum* Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulgular

4.3.1. 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürücü Aktivite Tayinine Ait Bulgular

X. annuum bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda DPPH radikal süpürücü etkilerine ait bulgular Tablo 5'te verilmektedir.

Tablo 5: *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin DPPH radikal süpürücü etkileri (%İnhibisyon±S.S.*)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	DPPH radikal süpürücü aktivite (% İnhibisyon±S.S.*)		
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE**	TE	TE
	Kloroform	***	-	1.33±0.21
	Etil asetat	1.77±0.01	2.67±0.42	3.84±1.05
	Etanol	2.81±0.21	4.29±0.21	13.37±0.31
	Su	3.03±0.52	3.33±0.11	19.58±3.66
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	1.40±0.31	2.51±0.01	2.74±0.93
	Kloroform	1.92±0.01	2.67±0.02	2.66±0.42
	Etil asetat	5.62±0.21	7.39±0.22	17.06±0.52
	Etanol	11.45±1.97	28.44±1.77	77.33±1.99
	Su	4.38±0.34	9.97±0.31	23.93±0.42
Gallik asit (Referans)		85.97±0.56	92.19±0.14	92.88±0.19

* Standart Sapma, ** Test edilmedi, *** Aktivite gözlenmedi

4.3.2. *N,N*-Dimetil-*p*-Fenilendiamin (DMPD) Radikal Süpürücü Aktivite Tayininine Ait Bulgular

X. annuum bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda DMPD radikal süpürücü etkilerine ait bulgular Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6: *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin DMPD radikal süpürücü etkileri (%İnhibisyon±S.S.*)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	DMPD radikal süpürücü aktivite (% İnhibisyon±S.S.*)		
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE**	TE	TE
	Kloroform	4.02±0.58	5.72±0.42	7.32±0.34
	Etil asetat	TE	TE	TE
	Etanol	7.92±1.40	8.80±1.76	8.50±0.35
	Su	3.74±1.37	3.85±0.09	7.70±2.45
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	TE	TE	TE
	Kloroform	2.98±0.23	2.97±0.28	6.88±1.32
	Etil asetat	TE	TE	TE
	Etanol	30.64±0.91	37.40±1.81	39.05±0.25
	Su	2.48±0.23	7.18±1.05	23.10±1.40
Kersetin (Referans)		TE	18.03±0.52	41.54±0.71

* Standart Sapma, ** Test edilmedi

4.3.3. Süper oksit (SO) Radikal Süpürücü Aktivite Tayininine Ait Bulgular

X. annuum çiçek ve kök-gövde kısımlarından elde edilen ekstrelerin 62.5 µg/ml, 125 µg/ml ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda SO serbest radikal süpürücü etkileri test edilmiş ve sadece kök-gövdeye ait kloroformlu ekstrenin 625 µg/ml, 1250 µg/ml ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarda, sırasıyla, %2.85±0.57, %10.69±0.64 ve %11.41±3.92 oranında süpürücü etki gösterdiği saptanmıştır. Referans olarak kullanılan kersetin'in, 1250 µg/ml konsantrasyonda %74.96±0.91 SO serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

4.3.4. Demir İyonu-Şelasyon Etkinin Tayinine Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* çiçek ve kök-gövde kısımlarından elde edilen ekstrelerin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda tayin edilen demir iyonu-şelasyon etkilerine ait bulgular Tablo 7'de verilmektedir.

Tablo 7: *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin demir iyonu-şelasyon etkileri (%Şelasyon±S.S.*)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	Demir iyonu-şelasyon aktivite (%Şelasyon±S.S.*)		
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE**	TE	TE
	Kloroform	39.91±1.92	50.34±1.59	67.80±5.77
	Etil asetat	44.56±5.28	51.49±4.48	58.05±3.21
	Etanol	13.60±1.21	16.55±0.24	21.62±0.86
	Su	37.53±1.12	41.27±0.99	65.06±2.86
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	45.03±3.99	57.15±3.53	72.79±0.33
	Kloroform	48.64±5.29	46.19±2.09	49.89±0.64
	Etil asetat	18.03±2.09	21.99±1.28	50.58±4.48
	Etanol	8.17±0.64	13.83±0.67	13.38±0.64
	Su	-***	37.87±3.84	55.10±4.75
EDTA (Referans)		TE	34.36±1.22	54.67±1.09

* Standart Sapma, ** Test edilmedi, *** Aktivite gözlenmedi

4.3.5. Demir-İndirgeme Antioksidan Gücüne (FRAP) Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda tayin edilen demir-indirgeme antioksidan gücüne ait bulgular Tablo 8'de verilmektedir.

Tablo 8: *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin demir-indirgeme antioksidan gücü (Absorbans±S.S.*)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	Demir-indirgeme antioksidan gücü (Absorbans±S.S.*)		
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE**	TE	TE
	Kloroform	0.134±0.003	0.177±0.002	0.339±0.006
	Etil asetat	0.131±0.001	0.200±0.009	0.312±0.077
	Etanol	0.175±0.002	0.273±0.011	0.565±0.022
	Su	0.153±0.015	0.211±0.059	0.276±0.005
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	0.153±0.001	0.214±0.001	0.402±0.029
	Kloroform	0.153±0.008	0.186±0.001	0.325±0.026
	Etil asetat	0.182±0.006	0.272±0.005	0.585±0.033
	Etanol	0.294±0.004	0.628±0.016	1.126±0.021
	Su	0.198±0.065	0.274±0.017	0.745±0.031
Klorojenik asit (Referans)		2.955±0.092	3.547±0.063	3.618±0.018

* Standart Sapma, ** Test edilmedi

4.3.6. Fosfomolibdenyum-İndirgeme Antioksidan Gücüne (PRAP) Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin 250 µg/ml, 500 µg/ml ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda tayin edilen fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücüne ait bulgular Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9: *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (Absorbans±S.S.*)

Bitki kısmı	Ekstre tipi	Fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (Absorbans±S.S.*)		
		250 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE**	TE	TE
	Kloroform	0.128±0.010	0.132±0.037	0.216±0.078
	Etil asetat	TE	TE	TE
	Etanol	0.304±0.025	0.365±0.010	0.563±0.086
	Su	0.138±0.015	0.142±0.021	0.165±0.018
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	TE	TE	TE
	Kloroform	0.126±0.006	0.135±0.016	0.171±0.042
	Etil asetat	TE	TE	TE
	Etanol	0.399±0.042	0.465±0.015	0.904±0.208
	Su	0.228±0.027	0.282±0.040	0.798±0.371
Kersetin (Referans)		TE	TE	0.819±0.001

* Standart Sapma, ** Test edilmedi

4.4. Toplam Fenol Miktar Tayini Bulguları

Tez gereçlerimizi teşkil eden *X. annuum* bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerde, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak, gallik asit eşdeğeri (mg/g ekstre) olarak bulunan toplam fenol miktarları Tablo 10'da verilmektedir:

Tablo 10: *X. annuum* ekstrelerinde toplam fenol miktarları

Bitki kısımları	Ekstre tipi	Toplam fenol miktarları* (mg/g ekstre±S.S.**)
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE***
	Kloroform	-****
	Etil asetat	14.36±1.17
	Etanol	71.27±0.01
	Su	68.38±0.58
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	5.28±0.02
	Kloroform	76.63±1.08
	Etil asetat	46.52±3.00
	Etanol	145.51±3.67
	Su	173.56±2.16

* Gallik asit eşdeğeri, ** Standart sapma, *** Test edilmedi, ****Saptanmadı

4.5. Toplam Flavonoit Miktar Tayini Bulguları

X. annuum bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerde, $AlCl_3$ yöntemi kullanılarak kersetin eşdeğeri olarak (mg/g ekstre) olarak bulunan toplam flavonoit miktarları Tablo 11’de verilmektedir:

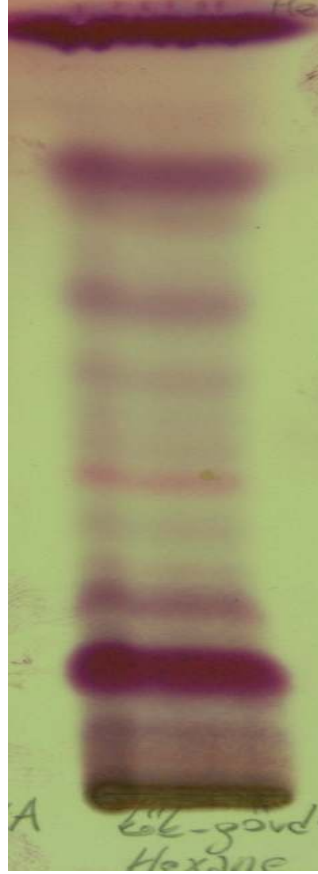
Tablo 11: *X. annuum* ekstrelerinde toplam flavonoit miktarları

Bitki kısımları	Ekstre tipi	Toplam flavonoit
		miktarları* (mg/g ekstre±S.S.**)
Çiçek	<i>n</i> -Hekzan	TE***
	Kloroform	9.16±2.98
	Etil asetat	6.14±0.52
	Etanol	14.55±1.03
	Su	12.36±0.26
Kök-gövde	<i>n</i> -Hekzan	25.08±4.12
	Kloroform	62.23±1.68
	Etil asetat	40.36±6.99
	Etanol	30.84±1.56
	Su	10.37±0.02

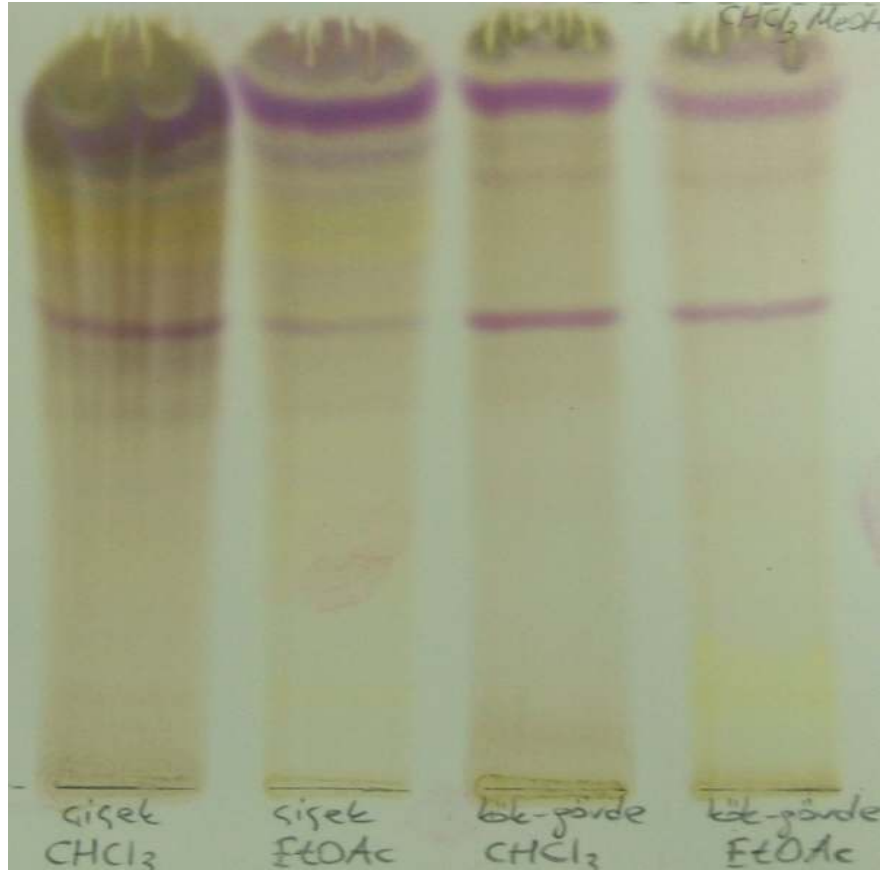
*Kersetin eşdeğeri, ** Standart sapma, *** Test edilmedi

4.6. Ekstrelerin İnce Tabaka Kromatografisi İle Analizine Ait Bulgular

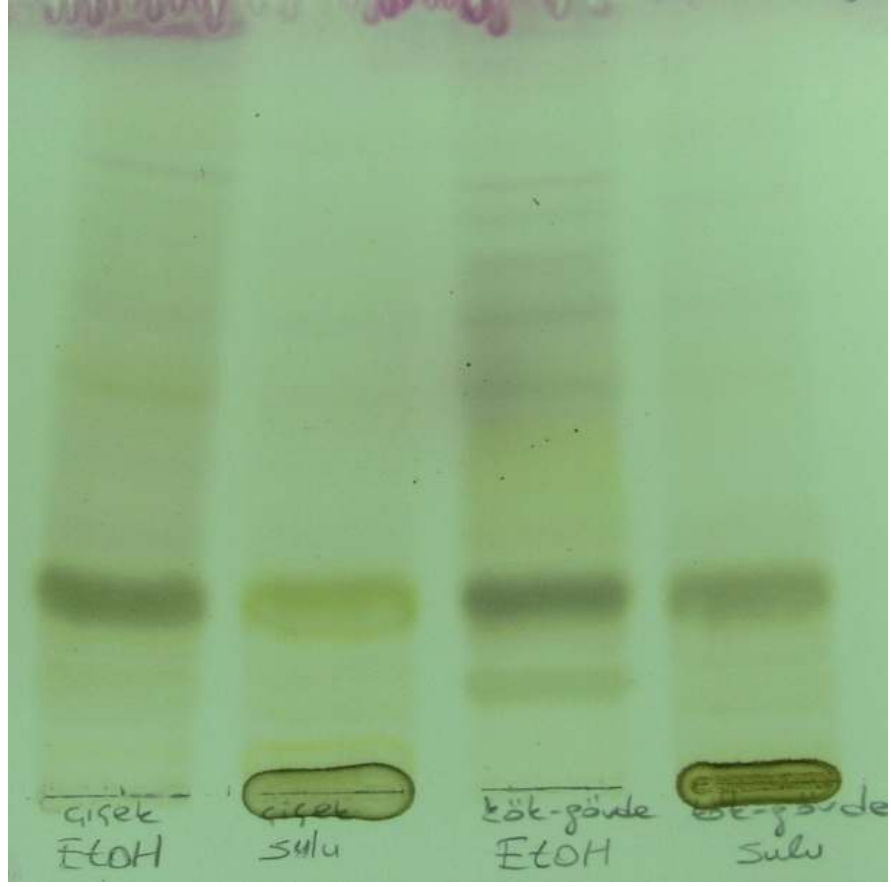
X. annuum bitki kısımlarından elde edilen ekstrelerin İTK analizi sonucunda elde edilen kromatogramların 254 nm dalga boyunda ve vanilin/H₂SO₄ reaktifi püskürtüldükten sonraki görünüşleri Resim 5-7'de verilmektedir.



Resim 5: *X. annuum*'un kök-gövde kısımlarından elde edilen *n*-hekzan ekstrelerine ait İTK kromatogramı (*n*-hekzan:kloroform - 90:10)



Resim 6: *X. annum*'un çiçek ve kök-gövde kısımlarından elde edilen kloroform ve etil asetat ekstrilerine ait İTK kromatogramı (kloroform:metanol:su - 80:20:2)



Resim 7: *X. annuum*'un çiçek ve kök-gövde kısımlarından elde edilen etanol ve su ekstrilerine ait İTK kromatogramı (kloroform:metanol:su - 61:32:7)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkçe’de “ölmez ot, kağıt otu”, İngilizce’de ise “immortelle, everlasting flower” olarak bilinen *Xeranthemum annuum* L., Asteraceae familyasına mensup bir bitki türüdür. Ülkemizde 4 tür ile temsil edilen *Xeranthemum* L. cinsine³ ait türler üzerinde fitokimyasal içerik ve biyolojik aktivite açısından bugüne kadar yayınlanmış bilimsel bir çalışma mevcut değildir. Diğer ülkelerde yetişen *X. annuum* örnekleri üzerinde de fitokimyasal alanda yapılmış sadece üç adet bilimsel çalışma bildirilmiştir.^{8,10,15} Bu nedenle tez materyali olarak seçilen ve Mardin-Batman illeri arasında yol kenarlarından toplanan *X. annuum* bitki örneği, “çiçek” ve “kök-gövde” olmak üzere 2 kısma ayrılmıştır. Kurutulup toz edilen bitki kısımlarından hareketle hazırlanan *n*-hekzan, kloroform, etil asetat, etanol ve distile su ekstralarının nöroprotektif etkisi, Alzheimer hastalığında rol oynayan asetilkolinesteraz (AChE), bütirikolinesteraz (BChE) ile Parkinson hastalığında yer alan tirozinaz enzimlerinin inhibisyonu ve nörodejenarasyonu meydana getiren faktörlerden biri olan oksidatif hasar da göz önüne alınarak antioksidan aktiviteleri temel alınarak incelenmiştir.

Ekstreler, AChE ve tirozinaz enzimlerine karşı test edilen konsantrasyonlarda inhibitör etki göstermemiş, ancak BChE’ya karşı çiçek ekstreleri %50.74±2.95 ile %97.85±0.94 arasında; kök-gövde ekstreleri ise %4.34±1.59 ile %96.89±1.09 arasında olmak üzere, oldukça yüksek inhibisyona yol açmışlardır (Tablo 4). Hatta 100 µg/ml konsantrasyonda ekstrelerin çoğu, referans olarak kullanılan galantamin’in 25 µg/ml konsantrasyondaki inhibisyon oranına (%89.95±0.87) eşit veya daha yüksek inhibitör etki sergilemişlerdir. En yüksek BChE inhibitör etkiye 100 µg/ml’de bitkinin çiçek kısmına ait kloroformlu ekstresinin sahip olduğu (%97.85±0.94) saptanmıştır (Tablo 4).

Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri ile ilgili sonuçlarımız göz önüne alındığında; kök-gövde kısmına ait etanol ekstresi hariç diğer ekstreler test edilen konsantrasyonlarda %25'in altında 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite göstermiştir (Tablo 5).E yüksek DPPH radikal süpürücü etkiye ise 1000 µg/ml konsantrasyonda kök-gövde etanol ekstresinin (%77.33±1.99) sahip olduğu bulunmuştur.

Yaptığımız literatür taraması sonucunda, bitkilerin genellikle *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) radikal süpürücü aktivite yönünden diğer antioksidan aktivite yöntemlerine göre, çok daha az incelendiği görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgulara göre; en yüksek DMPD radikal süpürücü aktiviteye sahip ekstreler olarak; 1000 µg/ml konsantrasyonda kök-gövdeye ait etanol (%39.05±0.25) ve su (%23.10±1.40) ekstreleri belirlenmiştir (Tablo 6). Diğerleri ise %10'un altında bir etkiye yol açmıştır. Ancak kök-gövde etanol ekstresi, 1000 µg/ml'de referans olarak kullanılan kersetin'e (%41.54±0.71) oldukça yakın etki göstermiştir.

X. annuum ekstrelerinden sadece kök-gövde kloroform ekstresinin düşük oranda süperoksit (SO) radikal süpürücü etki gösterdiği saptanmıştır. Bu ekstrenin SO radikal süpürücü etkisi 625, 1250 ve 2500 µg/ml konsantrasyonlarda, sırasıyla %2.85±0.57, %10.69±0.64 ve %11.41±3.92 olarak tayin edilmiştir. Diğer ekstreler ise bu testte hiç aktivite göstermemiştir.

Ekstrelerin demir iyonu-şelasyon aktivite sonuçlarına göre; 250, 500 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarda çiçek ekstreleri %13.60±1.21 ile %67.80±5.77; kök-gövde ekstreleri ise %13.38±0.64 ve %72.79±0.33 arasında aktivite göstermişlerdir (Tablo 7). Bu testte; 1000 µg/ml konsantrasyonda çiçek kısmına ait kloroform, etil asetat ve su ekstreleri ile kök-gövde kısmına ait *n*-hekzan ve su ekstrelerinin, referans olarak

kullanılan etilendiamin tetraasetik asit'den (EDTA) daha yüksek şelasyon yapıcı etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Demir-indirgeme antioksidan gücüne (FRAP) ait deneysel bulgularımıza göre; referans olarak kullanılan klorojenik asit'e (3.618 ± 0.018) göre oldukça düşük olmasına rağmen, en yüksek etkiye kök-gövde kısmına ait etanollü ekstrenin (1.126 ± 0.021) yol açtığı bulunmuştur (Tablo 8). Bu ekstreyi müteakiben, 2. yüksek etkiyi ise yine kök-gövde kısmına ait sulu ekstre (0.745 ± 0.031) göstermiştir.

Fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (PRAP) deney modelinde; benzer sonuçlar elde edilmiş ve en yüksek etkiye sahip iki ekstre olarak, yine kök-gövde kısmına ait etanol (0.904 ± 0.208) ve su (0.798 ± 0.371) ekstreleri saptanmıştır (Tablo 9). Bu testte, 1000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kök-gövde kısmına ait etanollü ekstre, referans olarak kullanılan kersetin'den de (0.819 ± 0.001) daha iyi etki göstermiştir.

Genellikle bitki ekstrelerinde fenolik maddelerin miktarı ile antioksidan aktiviteleri arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Sonuçlarımız göz önüne alındığında; uygulanan antioksidan aktivite test yöntemlerinde en yüksek aktiviteyi bitkinin kök-gövde kısımlarından hazırlanan etanol ve su ekstrelerinin gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm ekstrelerin toplam fenol miktarlarının gallik asit eşdeğeri olarak tayin edilmesi sonucunda, en yüksek toplam fenol içeriğine sahip ilk iki ekstre olarak; yine kök-gövde kısmına ait etanol (145.51 ± 3.67 mg/g ekstre) ve su (173.56 ± 2.16 mg/g ekstre) ekstrelerinin olduğu görülmüş ve böylece bulgularımız arasında bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (Tablo 10). Ekstrelerde kersetin eşdeğeri olarak tayin edilen toplam flavonoit miktarı bulgularımıza göre; en yüksek toplam flavonoit içeren ekstreler ise kök-gövde kısımlarına ait kloroform (62.23 ± 1.68 mg/g ekstre) ve etil asetat (40.36 ± 6.99 mg/g ekstre) ekstreleridir (Tablo 11). Kök-gövde kısmına ait

etanol ekstresi (30.84 ± 1.56 mg/g ekstre), toplam flavonoit miktarı açısından 3. sırada yer alırken, su ekstresi (10.37 ± 0.42 mg/g ekstre) 5. sırada bulunmuştur. Bu da, en yüksek antioksidan etkiye sahip olan kök-gövde etanol ve su ekstralarının, flavonoit yapısına sahip olmayan diğer fenolik bileşiklerce daha zengin olduğuna işaret etmektedir.

Ekstrelerin İTK analizi sonucunda ise; kök-gövde kısmına ait *n*-hekzan ekstresinin nonpolar bileşiklerce zengin olduğu görülmüştür (Resim 5). *X. annuum* tohumlarında daha önce yapılan bir çalışmada da, palmitik ve stearik asit gibi doymuş yağ asitleri ile oleik, linoleik ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitlerinin yanı sıra, bazı epoksi ve hidroksi yağ asitlerinin mevcudiyeti bildirilmiştir.⁸

Çiçek ve kök-gövde kısımlarına ait kloroform ve etil asetat ekstralarının İTK kromatogramında ise, bu 4 ekstrede de ortak olan ve vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile revele edildikten sonra mor renkli hale gelen en az 3 bileşiğe ait bantlar tespit edilmiştir (Resim 6). Bileşiklere ait bantların mor renkli olması, bize bu maddelerin terpenik yapıda olabileceğini düşündürmüştür. Bu türden daha önce de, başta ursolik asit olmak üzere bazı triterpen türevlerinin izolasyonu bildirilmiştir.^{9,10} Ayrıca, bu ekstraların İTK profilinde görülen sarı renkli bantlar, flavonoit türevlerinin varlığına da işaret etmektedir. Çünkü vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile flavonoitler sarı renklerini muhafaza etmektedirler. Nitekim, bitkiden kersetin ve luteolin adlı flavonoit türevleri daha önce izole edilmiştir.¹⁰

Bitkinin çiçek ve kök-gövde kısımlarının etanol ve su ekstralarının İTK kromatogramlarında da, bu 4 ekstrede ortak olan majör bir bileşiğin olduğu gözlenmiştir. Bileşiğin vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile revele edildikten sonra sarı renk alıp, bir süre sonra kahverengiye dönmesi (Resim 7) ve R_f değerinin İTK plağında start çizgisine yakın olması gibi nedenlerle, bu bileşiğin fenolik bir bileşik olabileceği düşünülmektedir.

Diğer yandan, daha önce *X. annuum*'dan izole edilen ve majör bir bileşik olan ursolik asit'in, bizim ekstrelerimizde de bulunabileceği ihtimal dâhilindedir. Ayrıca, 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada, *Micromeria cilicica*'dan izole edilen ursolik asit'in AChE'a karşı inhibitör etki göstermemesine rağmen, BChE'ı inhibe etme özelliğinin olduğu bildirilmiştir.²⁹ Bu bulgu, bizim ekstrelerimizde de ursolik asit'in, ekstrelerin BChE inhibe edici etkisinden sorumlu olabileceği veya inhibisyona katkıda bulunan bileşiklerden biri olduğu olasılığını düşündürülebilir. Ancak, Kore'de yetişen *Origanum majorana*'nın yüksek AChE inhibitör etkisinden sorumlu bileşikleri aydınlatmak için yapılan fraksiyonlama sonucunda da; inhibitör etkiden sorumlu bileşik olarak ursolik asit belirlenmiştir.³⁰ Bu sonuç, ursolik asit'in aslında her iki kolinesteraz enzimini de değişen oranlarda inhibe edebildiğine işaret etmektedir.

Elde ettiğimiz bulguların genel bir değerlendirmesi yapılırsa; *X. annuum*'un kök-gövde kısmına ait etanol ve su ekstralarının hem yüksek BChE inhibitör etki, hem de en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermesi nedeniyle, nöroprotektif etki açısından ileri aşamada çalışmaya değer olduğu sonucuna varılmıştır. Bu iki ekstrede de ortak olan majör bir bileşiğin olduğu da İTK kromatogramında net olarak görülmektedir (Resim 6). Bundan sonraki aşamada, çalışmalarımıza *X. annuum*'un kök-gövde kısımlarına ait etanol ve su ekstralarının aktiviteden sorumlu bileşik veya bileşiklerinin aydınlatılması şeklinde devam edilmesi planlanmaktadır.

Tez çalışmamız, Türkiye'de yetişen *X. annuum* L. bitkisi üzerinde yapılmış ilk biyolojik aktivite ve fitokimyasal çalışmayı kapsamaktadır. Bilimsel literatürde ise bitki, bahsigeçen enzim inhibisyonları ve antioksidan aktiviteleri yönünden ilk defa tez çalışmalarımız dâhilinde incelenmiştir.

6. ÖZET

XERANTHEMUM ANNUUM L. ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK YÖNDE ARAŞTIRMALAR

Gülyurdu, Fulya

Yüksek Lisans Tezi, Farmakognozi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: İlkay Erdoğan Orhan

ANKARA / Nisan-2011

Xeranthemum annuum L. (Asteraceae), ülkemizde “ölmez ot, kağıt otu”, İngilizce’de ise “immortelle, everlasting flower” isimleriyle bilinen bir bitki türüdür. Tez çalışmalarımızda, *X. annuum*’un çiçek ve kök-gövde kısımlarından hazırlanan değişik polaritedeki ekstrelerin nöroprotektif etkisi, asetilkolinesteraz (AChE), bütirikolinesteraz (BChE) ve tirozinaz enzim inhibitör aktiviteleri ile 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD) ve süperoksit (SO) radikal süpürücü aktivite, demir iyonu-şelasyon etki, demir-indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve fosfomolibdenyum-indirgeme antioksidan gücü (PRAP) yöntemleri ile antioksidan aktivitesi kullanılarak tayin edilmiştir. Ayrıca toplam fenol ve flavonoit miktarları spektrofotometrik olarak hesaplanmış ve ince tabaka kromatografisi ile ekstrelerin fitokimyasal profilleri incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre; ekstreler AChE ve tirozinaz’a karşı etkisiz iken, en yüksek BChE inhibitör ve antioksidan aktiviteye kök-gövde etanol ve su ekstrelerinin sahip olduğu bulunmuştur. Bu tez, Türkiye’de yetişen *X. annuum* üzerinde biyolojik aktivite ve fitokimyasal içerik açısından yapılmış ilk çalışmayı teşkil etmektedir.

Anahtar kelimeler: *Xeranthemum annuum*, Asteraceae, Nöroprotektif etki, Kolinesteraz inhibisyonu, Tirozinaz inhibisyonu, Antioksidan aktivite

7. SUMMARY

PHARMACOGNOSTIC RESEARCHES ON XERANTHEMUM ANNUUM L.

Gülyurdu, Fulya

Graduate Degree, Pharmacognosy Department

Thesis Advisor: İlkey Erdoğan Orhan

ANKARA / April-2011

Xeranthemum annuum L. (Asteraceae) is a plant species known as “ölmez ot, kağıt otu” in our country and “immortelle, everlasting flower” in English. In our thesis studies, neuroprotective effect of the extracts in various polarities prepared from the flower and root-stem parts of *X. annuum* was established using acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), and tyrosinase inhibitory activities as well as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), *N,N*-dimethyl-*p*-phenylendiamine (DMPD), and superoxide (SO) radical scavenging activity, ferric ion-chelating effect, ferric-reducing antioxidant power (FRAP), and phosphomolibdenum-reducing antioxidant power (PRAP) methods. Besides, total phenol and flavonoid contents were calculated spectrophotometrically and phytochemical profiles of the extracts were investigated by thin layer chromatography. According to data we obtained, while the extracts were inactive against AChE and tyrosinase, the ethanol and water extracts of the root-stem parts of the plant were found to possess the highest BChE inhibitory and antioxidant activity. This thesis has constituted the first study on *X. annuum* growing in Turkey in terms of biological activity and phytochemical content.

Key words: *Xeranthemum annuum*, Asteraceae, Neuroprotective effect, Cholinesterase inhibition, Tyrosinase inhibition, Antioxidant activity

8. KAYNAKLAR

1. Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: Lead finding and biotechnology. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52: 253-62.
2. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharm* 1961; 7: 88–95.
3. Davis PH (Editor). *Xeranthemum* L. In: “Flora of Turkey and East Aegean Islands”, Vol. 5, Edinburgh University Press, Edinburgh, 604-6, 1975.
4. Heywood VH, Brummit RK, Culham A, Serberg O. Flowering Plant Families of the World, Firefly Books, Canada, 207-8, 2007.
5. Baytop A. Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3637, Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 58, İstanbul Üniversitesi Matbaası, İstanbul, 255-60, 1996.
6. Karagyoz MD. Anatomic structure of involucre of capitula of *Xeranthemum annuum* L. *Dokl Bolg Akad Nauk* 1972; 25: 1407-10.
7. Gomez-Campo C, Herranz-Sanz J.M. Conservation of Iberian endemic plants: The botanical reserve of La Encantada (Villarrobledo, Albacete, Spain). *Biol Conservation* 1993; 64: 155-60.
8. Powell RG, Smith CR, Wolff IA. *Cis*-5, *cis*-9, *cis*-12-Octadecatrienic and some unusual oxygenated acids in *Xeranthemum annuum* seed oil. *Lipids* 1967; 2: 172-7.
9. Serkerov SV, Tairov IT. A triterpene alcohol from *Xeranthemum cylindricetum*. *Chem Nat Compds* 1978; 14: 696.
10. Zemtsova GN, Molchanova LP. Flavonoids and triterpenoids of *Xeranthemum annuum*. *Chem Nat Compds* 1980; 15: 762.
11. Huebel W, Nahrstedt A, Fikenscher LH, Hegnauer R. Zierinxlyloside, a new cyanogenic glycoside from *Xeranthemum cylindraceum*. *Planta Med* 1982; 44: 75-8.

12. Schwind P, Wray V, Nahrstedt A. Structure elucidation of an acylated cyanogenic triglycoside, and further cyanogenic constituents from *Xeranthemum cylindraceum*. *Phytochemistry* 1990; 29: 1903-11.
13. Schwind P, Nahrstedt A. Biosynthetic studies on *meta*-hydroxylated mandelonitrile glycosides of *Xeranthemum cylindraceum*. *Planta Med* 1990; 56: 611.
14. Nahrstedt A, Schwind P. Phenylalanine is the biogenetic precursor of *meta*-hydroxylated zierin, the aromatic cyanogenic glucoside of unripe akenes of *Xeranthemum cylindraceum*. *Phytochemistry* 1992; 31: 1997-2001.
15. Skaltsa HD, Lazari DM, Constantinidis T. Composition of the essential oil of *Xeranthemum annuum* L. from Greece. *J Ess Oil Res* 2000; 12: 742-4.
16. Jaric S, Popovic Z, Macukanovic-Jocic M, Djurdjevic L, Mijatovic M, Karadzic B, Mitrovic M, Pavlovic P. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 160-75.
17. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa S. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 175-9.
18. Csupor-Löffler B, Hajdu Z, Rethy B, Zupko I, Mathe I, Redei T, Falkay G, Hohmann J. Antiproliferative Activity of Hungarian Asteraceae Species against Human Cancer Cell Lines. Part II. *Phytother Res* 2009; 23: 1109-15.
19. Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 197-201.
20. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1119-200.

21. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species - Tannins and related polyphenols. *Nat Med* 1995; 49: 357-63.
22. Schlesier K, Harvat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Rad Res* 2002; 36: 177-87.
23. Kerry E, Rao MNA. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int J Pharm* 1990; 58: 237-40.
24. Dinish TCP, Madiera VMC, Almedia MLM. Action of phenolic derivatives (acetoaminophem salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; 315: 161-9.
25. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr* 1986; 44: 307-15.
26. Falcioni G, Fedeli D, Tiano L, Calzuola I, Mancinelli L, Marsili V, Gianfranceschi G. Antioxidant activity of wheat sprouts extract *in vitro*: Inhibition of DNA oxidative damage. *J Food Sci* 2002; 67: 2918-22.
27. Singleton VL, Rossi JAJr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungtic acid reagents. *Am J Enol Viticult* 1965; 16: 144-58.
28. Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicol Res* 1998; 37: 99-105.
29. Öztürk M, Kolak U, Topçu G, Öksüz S, Choudhary MI: Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chem* 2011; 146: 31-8.

30. Chung YK, Heo HJ, Kim EK, Kim HK, Huh TL, Lim Y, Kim SK, Shin DH: Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. Mol Cells 2001; 11: 137-43.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım sırasında engin bilgi ve görüşleriyle çalışmalarımı en doğru ve başarılı bir şekilde yürütmemi sağlayan; manevi olarak da desteğini ve anlayışını üzerimden esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof.Dr. İlkay ORHAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince ilgi ve desteklerini gördüğüm Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dekanı ve Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Turhan BAYKAL'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında kıymetli vakitlerini benim için harcayan Arş.Gör. Sayın Uzm.Ecz. Fatma Sezer ŞENOL'a ve Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalı'nın diğer öğretim üyeleri ve yardımcılara teşekkür ederim.

Fitokimyasal analiz çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. İ. İrem TATLI ÇANKAYA'ya, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı İlaç-Kozmetik Araştırma Müdürlüğü personeli Sayın Bil.Uzm. Kim. Soner BAY'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmam sırasında fikirlerinden yararlandığım, sevgi ve anlayışlarıyla bana sonsuz destek olan babam Bil.Uzm. Sayın Türkan GÜLYURDU ile matematik öğretmeni annem Sayın Perihan GÜLYURDU'na teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Tez çalışmalarım sırasında anlayış, hoşgörü ve sabırlarını eksik etmeyen Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı İlaç-Kozmetik Araştırma Müdürü Sayın Bil. Uzm. Birsal Subaşı'na, Müdür Yardımcıları Sayın Nur Bölükbaşı ile Sayın Sıddıka Kalem'e ve laboratuvar şefim sayın M. Filiz YURTSEVER'e teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Fulya

Soyadı Gülyurdu

Doğum yeri ve Tarihi 28.04.1978 – Malatya/ Hekimhan

Eğitimi

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001)

Edremit Lisesi (1994)

Edremit M. Akif Ersoy Ortaokulu (1991)

Edremit Cumhuriyet İlkokulu (1988)

Yabancı dil İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

-

Bilimsel Etkinlikler

-