

***ARUM ITALICUM* MILLER
ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Hale Gamze Ağalar
Doktora Tezi

**ARUM ITALICUM MILLER ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Hale Gamze Ağalar

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Mayıs 2016

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından maddi olarak desteklenmiştir (BAP No: 1206S100).

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Hale Gamze Ağalar'ın "Arum italicum Miller Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar" başlıklı, Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 30 Mayıs 2016 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Neşe Kırımer Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Erdal BEDİR İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	
Üye	Prof. Dr. Auhun Malyer Uludağ Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Gülhan TURAN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Betül Demirci Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
14.06.2016 tarih ve23..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Dilek AK



Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

- 1) Kıyan, H.T., **Duymuş, H.G.**, Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., Determination of Volatile Compounds of *Cymbopogon excavatus* Stapf., 8th Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (8th SCNC), Eskişehir-TURKEY, June 15-17, 2009.
- 2) **Duymuş, H.G.**, Kürkçüoğlu, M., Duran, A., Çetin, Ö., Başer, K.H.C., The Comparison of Volatile Compounds from Whole and Crushed Fruits of *Peucedanum chryseum* (Boiss. et Heldr.) Chamberlain, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (9th ISOPS), Ankara-TURKEY, June 23-26, 2009.
- 2) **Duymuş, H.G.**, Kürkçüoğlu, M., Başer, K.H.C., Turgut, K., Volatile Compounds of Three *Thymus sipyleus* Subspecies from Different Sites in Turkey, 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (57th GA), Geneva-SWITZERLAND, June 16-20, 2009.
- 3) Başer, K.H.C., **Duymuş, H.G.**, Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Demirci, B., The Comparison of Volatile Constituents of *Salvia ceratophylla* Collected from Different Regions in Turkey, 69th World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (69th FIP), İstanbul-TURKEY, September 3-8, 2009.
- 4) Demirci, F., **Duymuş, H.G.**, Kıyan H.T., Demirci, B., Başer, K.H.C., The *in vivo* Angiogenic Evaluation of Betulin, 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (58th GA), Berlin-GERMANY, August 28-September 2, 2010.
- 5) **Duymuş, H.G.**, Kıyan H.T., Goger, F., Demirci, B., Demirci, F., Baser, K.H.C., Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of *Vitex agnus castus* essential oils, 41th International Symposium on Essential Oils (41th ISEO), Wroclaw-POLAND, September 5-8, 2010.
- 6) Altıntaş, A., **Duymuş, H.G.**, Demirci, B., Başer, K.H.C., Essential Oil Compositions of Two *Chaerophyllum* Species Growing in Turkey, 42th International Symposium on Essential Oils (42th ISEO), Antalya-TURKEY, September 11-14, 2011.
- 7) **Duymuş, H.G.**, Göger, F., Demirci, B., Başer, K.H.C., Quantitative Analysis of Cyanidin-3-glycoside in Different Elderberry Extracts by HPLC, 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (59th GA), Antalya-TURKEY, September 4-9, 2011.
- 8) Altıntaş, A., Göger, F., **Duymuş, H.G.**, Kirimer, N., Baser, K.H.C., Quantitative Analysis of Rosmarinic Acid in *Rosmarinus officinalis* Growing in Turkey by LC-MS/MS, 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (59th GA), Antalya-TURKEY, September 4-9 2011.
- 9) **Duymuş, H.G.**, Göger, F., Demirci, B., Başer, K.H.C., Preliminary Chemical Studies on *Sambucus nigra* Fruits Growing in Turkey (Oral Presentation), 9th

Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (9th ISCNC), Urumçi-CHINA, October 16-19, 2011.

10) Duymuş, H.G., Akalın Çiftçi, G., Ulusoylar, Ş., Demirci, B., Kırimer, N., Evaluation of Cytotoxic Activity and Chemical Composition of *Vitex agnus castus* L. Essential Oil, International Workshop on Plant Products Chemistry and Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, İzmir-TURKEY, June 3-7, 2013.

11) Duymuş, H.G., Kırimer, N., Başer, K.H.C., The Ethnobotanical Importance of *Sambucus nigra* L., 11th International Ethnobotany Symposio, Antalya-TURKEY, November 2-5, 2013.

12) Duymuş, H.G., İşcan, G., Noma, Y., Demirci, F., Kırimer, N., Bioactive Metabolite of 2,5-Dimethyl-1,4-Benzoquinone, BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Symposium with Exhibition, Prag-CZECH REPUBLIC, June 11-14, 2014.

13) Duymuş, H. G., Şener, G., Dündar, E., Demirci, F., Büyükkılıç, B., Altıntaş, A., Demirci, B., Biological Evaluation of Grape Seeds from Wine Processing Industry Wastes and Chemical Characterization, 3th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Sarajevo-BOSNIA HERZEGOVINA, June 2-6, 2014.

14) Mokhtarzadeh, S., Demirci, B., **Duymuş, H.G.,** Khawar, K.M., Kırimer, N., Determination of Volatiles in *Lavandula stoechas* L. Under *in vitro* Conditions, 45th International Symposium on Essential Oils (45th ISEO), İstanbul-TURKEY, September 7-10, 2014.

15) Kurkcuoglu, M., İnceer, H., Ayaz, S., **Duymuş, H.G.,** Kırimer, N., Başer, K.H.C., Essential Oil Composition of Three Endemic *Tripleurospermum* Species from Turkey, 45th International Symposium on Essential Oils (45th ISEO), İstanbul-TURKEY, September 7-10, 2014.

16) Toplan Gulsoy, G., Kurkçuoglu, M., **Duymuş, H.G.,** Gurer, Ç., Mat, A., Baser, K.H.C., Sarıyar, G., Analysis of the Essential Oil Composition of *Anthemis tricolor* Boiss. from Cyprus, 45th International Symposium on Essential Oils (45th ISEO), İstanbul-TURKEY, September 7-10, 2014.

17) Toplan Gulsoy, G., Kurkçuoglu, M., **Duymuş, H.G.,** Baser, K.H.C., Koyuncu, M., Sarıyar, G., Composition of the Essential Oil from *Salvia veneris* Hedge Growing in Cyprus, 45th International Symposium on Essential Oils (45th ISEO), İstanbul-TURKEY, September 7-10, 2014.

18) Ağalar, H.G., Göger, F., Demirci, B., Malyer, H., Kırimer, N., Başer, K.H.C., The Essential Oil Composition of *Angelica sylvestris* var. *syvestris* L., Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia (ISPSA 2015), Tokushima-JAPAN, August 30- September 2, 2015.

19) Ağalar, H.G., Demirci, B., Demirci, F., Kırimer, N., The Volatile Compounds of the Elderflowers Extract and the Essential Oil, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia (ISPSA 2015), Tokushima-JAPAN, August 30-September 2, 2015.

20) Ağalar, H.G., Akalın Çiftçi, G., Kırimer, N., The Cytotoxic Activity Guided Fractionation of *Arum italicum* Miller Rhizomes (Oral Presentation), 15th

Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (15th SCNC), Antalya-TURKEY, October 11-4, 2015.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1) **Duymuş, H.G.**, Göger, F., İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Türkiye’de Yetişen *Sambucus nigra* L. Meyve Ekstrelerinin Biyolojik Aktivite Bakımından Araştırılması, XX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (XX. BİHAT), Antalya-Türkiye, 10-13 Ekim, 2012.

Araştırmacı Olarak Yer Aldığı Ulusal ve Uluslararası Projeler

Uluslararası Projeler

- 1) Güvenlik için Sağlıklı Yem, Yem Kalitesi Konusundaki AB Destekli Araştırma Sonuçlarının Yayınlanması, FEED-SEG, ABH 267710008, 16.03.2008-16.03.2009.
- 2) Hayvan ve İnsan Sağlığında Fonksiyonel Olarak Kullanılacak Bitkisel Kökenli Atık Maddelerin Değerlendirilmesi, PLANTY-ERA-NET NEW INDIGO-TÜBİTAK - 2233 BİDEB” 12.10.2010-12.10.2012.

Ulusal Projeler

- 1) *Physalis peruviana* L. Meyvesinin (Altın Çilek) Akut ve Subkronik Toksik Etkilerinin Değerlendirilmesi, BAP 1201S008, 2012-2013.
- 2) *Tripleurospermum* (Asteraceae) Cinsine ait Türlerin Uçucu Bileşiklerinin Belirlenmesi, BAP Proje No: 1306S231, 2013-2014.
- 3) *Arum italicum* Miller Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar, BAP Proje No:1206S100, 2013-Halen devam etmektedir.
- 4) Sarıcakaya (Eskişehir) İlçesi ve Köylerinde Etnobotanik ve Etnofarmakognozik Araştırmalar, BAP 1304S069, 2013- Halen devam etmektedir.
- 5) Doğal Ürünlerde Biyotografik YPİTK Metotlarının Uygulanması, BAP 1505S376, 2015- Halen devam etmektedir.
- 6) *Tribulus terrestris* L. Bitkisinin Fenolik Bileşiklerinin ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, BAP 1505S396, 2015- Halen devam etmektedir.
- 7) *Angelica sylvestris* var. *sylvestris* Uçucu Yağlarının Bileşimi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, BAP 1505S429, 2015- Halen devam etmektedir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamızda, ülkemizde toksik olarak bilinmesine rağmen gıda olarak ve tedavi amaçlı kullanılan *Arum italicum* Miller üzerinde *in vitro* biyolojik aktivite yöntemleri kullanarak bitkinin olası etkilerini belirlemeyi ve kimyasal bileşimini ortaya koymayı amaçladık. Elde ettiğimiz sonuçların ileriki çalışmalara kaynak oluşturacağı düşüncesini taşımaktayız.

Mesleki çalışmamı akademik hayatta ilerleyerek sürdürmem konusunda beni destekleyen, iyi bir akademisyen olma yolunda örnek olan, tez çalışmalarım sırasında sonsuz sabrı ve anlayışı ile katkılarını esirgemeyen ve danışmanlıktan öte bana annelik eden danışman hocam sayın Prof. Dr. Neş'e Kırimer'e,

Tez materyalimizi oluşturan *A. italicum*'un teşhisi ve toplanması için arazi çalışmalarının planlanmasında yardımlarını esirgemeyen, arazi çalışmalarında bizim kadar yorulan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hulusi Malyer'e,

Tez çalışmalarım sırasında sitotoksik aktivite çalışmalarını birlikte yaptığım ve deneylerin her aşamasında emek harcayarak bana destek olan çok sevgili hocam Doç. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi'ye;

Enzim inhibisyonları çalışmalarını birlikte yaptığım ve bu süreçte bilgilerini benimle paylaşan sayın hocam Doç Dr. Halide Edip Temel'e,

YBSK/KS-KS analizlerinde, her türlü yardımı esirgemeyen ve emek harcayan, bilgilerini paylaşan değerli ağabeyim Uzm. Dr. Fatih Göger'e,

Tez çalışmamızı maddi olarak destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Bilim yolunda adım atan genç insanları, kültürel ve bilimsel anlamda destekleyen ve her zaman takdire layık olan TÜBİTAK'a; Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)-2211 Yurt İçi Doktora Burs Programı ile doktora eğitimim süresince maddi olarak desteklediği için teşekkürü bir borç bilirim.

Bilgiye ve eğitime verdikleri değeri bizlere her zaman hissettiren ve aşıl原因an, hayatlarını bu yolda adanmış olan değerli eğitimciler babam ve anneme harcadıkları emek ve destekleri için minnettarım.

Sevgisi ve sabrı ile bu süreçte beni anlayışla idare eden, endişelerimi gidererek beni olumlu yönde motive eden sevgili eşim Yard. Doç. Dr. Şener Ağalar'a çok teşekkür ediyorum.

Uzm. Ecz. Hale Gamze AĞALAR

ARUM ITALICUM MILLER ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR

ÖZET

Günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan hastalıkların başında kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize kanser gelmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar kanserli hücreleri öldürmenin yanında sağlıklı hücrelere de sitotoksik etki göstermektedir. Hem kanserin oluşum mekanizmalarının kompleks oluşu hem de tedavide kullanılan ilaçların terapötik indekslerinin düşük oluşu nedeniyle tedavide kullanılabilir yeni maddelerin araştırılması önemini korumaktadır. Bu nedenle başta doğal kaynaklı maddeler olmak üzere çeşitli maddelerin olası antikanser etkileri araştırılmaya devam etmektedir.

Halk arasında kanserden korunma amacıyla yumruları tüketilen ve ‘yılan yastığı’ olarak bilinen *Arum italicum* Miller (Araceae) bitkisi dikkat çekmektedir. *A. italicum* bitkisi toksik olarak bilinmesine rağmen halk arasında gıda olarak ve tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kaynaklara göre, bazı yörelerde yumruların hazırlanan dekoksilyonun dâhilen kanser ve kadın hastalıklarında; balla karıştırılan dilimlenmiş yumruların ise peptik ülser ve kansere karşı kullanıldığı bilinmektedir. fitokimyasal araştırmalarda, saponin, alkaloid, steroidal bileşikler, neolignan ve furan türevi lignanlar gibi biyolojik olarak aktif sekonder metabolitleri *A. italicum*’dan tanımlanmıştır.

Bu bilgilerden hareketle, yumruların hazırlanan ekstre ‘biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama’ yöntemi kullanılarak fraksiyonlanmış ve meme (MCF-7) ve akciğer (A549) kanser hücre hatları sitotoksik aktivitenin araştırılmasında kullanılmıştır. Elde edilen alt fraksiyonların sitotoksik etkilerini açıklayabilmek amacıyla flow sitometri ile apoptotik ve BrdU kolorimetrik kit ile DNA sentez inhibisyonları üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, olası antioksidan, antikolinesteraz ve anti-LOX aktiviteleri *in vitro* olarak belirlenmiştir.

Bulgular değerlendirildiğinde, E2 kodlu alt fraksiyon pozitif kontrol olan mitoksantron ile kıyaslanabilir ölçüde A549 akciğer kanser hücre hatlarına karşı kayda değer sitotoksik etki göstermiştir. E3 ve E6 kodlu alt fraksiyonların meme ve akciğer kanser hücrelerine karşı iyi sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu üç alt fraksiyonun farklı konsantrasyonlarda DNA sentez inhibisyonu yaptıkları ve hücreleri apoptoza sürükledikleri görülmüştür. Diğer aktivite çalışmalarında kayda değer sonuçlar elde edilememiştir.

Her alt fraksiyonun kimyasal bileşimi YBSK/KS-KS yöntemi ile araştırılmıştır. Hidroksisinnamik asit türevleri, lignan türevleri, fenolik aminler, oksilipinler gibi sekonder metabolitler alt fraksiyonlarda belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Arum italicum*; Sitotoksik etki; Apoptoz; YBSK/KS-KS

PHARMACOGNOSTICAL INVESTIGATIONS ON *ARUM ITALICUM* MILLER

ABSTRACT

Recently, cancer that is characterized by unregulated cell proliferation is the second major cause of deaths after cardiovascular diseases. In cancer treatment, anticancer drugs used in therapy kill not only cancer cells but also healthy human cells. So, it is still popular to investigate new cytotoxic compounds because of the narrow therapeutic index and the complexity of cancer mechanisms. Therefore, compounds from natural sources are very important to research for their promising anticancer activities.

Arum italicum Miller known as ‘yılan yastığı’ in Turkey is a remarkable plant due to its rhizomes traditional use as anticancer agent. Although whole parts are toxic, the plant is used as food. In the literature, it is reported that the decoction of rhizomes is used to treat cancer and women disorders, as well sliced rhizomes with honey are used for peptic ulcer and cancer in traditional medicine. In phytochemical studies, biologically active secondary metabolites such as saponins, alkaloids, steroidal compounds, neolignan and furan-type lignans are identified from *A. italicum*.

Based on this knowledge, the extract obtained from rhizomes were fractionated by ‘biological activity guided fractionation’ method and MCF-7 breast and A549 non-small lung cancer cell lines were used to screen cytotoxic activity. To explain possible cytotoxicity mechanisms, the inhibition of DNA synthesis and apoptosis were investigated. At the same time, the possible antioxidant, anticholinesterases and anti-LOX activities were evaluated by *in vitro*.

When the results were compared, E2 subfraction showed noticeable cytotoxic activity against A549 cell lines comparable to the positive control, mitoxantrone. E3 and E6 subfractions showed good cytotoxic activities against both cancer cell lines. These three subfractions at different concentrations inhibited DNA synthases on both cancer cells and showed apoptotic effects. There were no noticeable results found at the other biological activities.

The chemical composition of each subfraction was determined by LC/MS-MS system. Secondary metabolites such as hydroxycinnamic acid derivatives, lignan derivatives, phenolic amines, oxylipins were identified in the subfractions.

Keywords: *Arum italicum*; Cytotoxic effect; Apoptosis; LC/MS-MS

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Araceae Familyası	2
<i>Araceae familyasına ait cinslerin tayin anahtarı</i>	2
<i>Arum L. Cinsi</i>	3
<i>Arum cinsine ait türlerin tayin anahtarı</i>	3
<i>Arum türlerinin bilinen yerel isimleri</i>	4
<i>Arum italicum</i> Miller	4
<i>Arum</i> Türlerinin Halk Arasında Kullanımı	5
<i>Arum italicum</i> Miller	6
<i>Arum palaestinum</i> Boiss.	7
<i>Arum dioscoridis</i> SM.	8
<i>Arum dioscoridis</i> SM. var. <i>dioscoridis</i> SM.	8
<i>Arum elongatum</i> Steven subsp. <i>detruncatum</i> (C.A. Meyer ex Schott) H. Riedl	9
<i>Arum maculatum</i> L.	9

<i>Arum elongatum</i> Steven subsp. <i>elongatum</i>	9
<i>Arum detruncatum</i> C.A. Mey. ex Schott subsp. <i>detruncatum</i>	9
Arum Türleri Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar	10
<i>Arum italicum</i> Miller	10
<i>Arum palaestinum</i> Boiss.	11
<i>Arum dioscoridis</i> SM.	12
<i>Arum korolkovii</i> Regel	12
<i>Arum orientale</i> BIEB	12
<i>Arum maculatum</i> L.	12
Arum Türleri Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları	13
<i>Arum italicum</i> Miller	14
<i>Arum palaestinum</i> Boiss.	15
<i>Arum maculatum</i> L.	17
<i>Arum dioscoridis</i> SM.	18
<i>Arum korolkovii</i> Regel	18
<i>Arum hygrophyllum</i> Boiss.	18
<i>Arum euxinum</i> R. MILL	18
Arum italicum Yumrularında Tanımlanmış Bileşikler ile İlgili Genel Bilgiler	19
Lignan ve glikozitleri	19
Fitosteroller	21
Biyolojik Aktiviteler ile İlgili Genel Bilgiler	23
Kanser	23
<i>Meme kanseri</i>	24
<i>Akciğer kanseri</i>	25
Sitotoksisite	27

Apoptoz	28
Mitoksantron	31
Tez Kapsamında Çalışılan Diğer <i>in vitro</i> Biyolojik Aktiviteler ile İlgili Bilgiler	32
Asetil- ve Bütirilkolinesteraz enzimleri	32
5-Lipoksijenaz (5-LOX) enzim inhibisyonu	33
Antioksidan aktivite	36
<i>Doğal kaynaklı antioksidanlar</i>	39
<i>Sentetik kaynaklı antioksidanlar</i>	42
GEREÇLER ve YÖNTEMLER	43
DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Madde ve Gereçler	43
Bitki materyali	43
Kullanılan enzim ve hücre hatları	44
Kullanılan kimyasallar	44
Kullanılan cihaz ve apareyler	46
Toz edilmiş yumrulara yapılan araştırmalar	46
<i>Mikroskopik inceleme</i>	46
<i>Sartur reaktifinin hazırlanışı</i>	47
<i>Kloralhidrat çözeltisinin hazırlanışı</i>	47
<i>Kalite kontrol yöntemleri</i>	47
<i>Nem miktar tayini</i>	47
<i>Bütün kül miktar tayini</i>	47
<i>Asitte erimeyen kül miktar tayini</i>	48
Ekstraksiyon Çalışmaları	48
Ekstraksiyon çalışmaları için çözücü ve metot seçimi	48

Ham ekstrenin hazırlanışı	48
Kaba fraksiyonların hazırlanışı	48
Alt fraksiyonların hazırlanışı	48
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Analiz	50
Alt fraksiyonların Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi-Kütle Spektroskopisi (YBSK/KS-KS) ile Analizleri	50
Biyolojik Aktivite Yöntemleri	51
Antikanser etkinin araştırılması	51
<i>Hücre kültürü ve ekstre uygulaması</i>	51
<i>Sitotoksik etki tayini için MTT metodu</i>	51
<i>DNA sentez analizi</i>	52
<i>'Flow sitometri' ile apoptozun araştırılması</i>	52
<i>Sağlıklı hücrelerde toksik etkinin hücre kültürü ile araştırılması</i>	53
Antioksidan etkinin araştırılması	53
<i>1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini</i>	53
<i>ABTS radikal süpürücü etki tayini</i>	54
<i>İndirgeme gücünün belirlenmesi</i>	54
<i>Lipit peroksidasyonunu inhibe edici etki tayini</i>	55
Lipoksijenaz (LOX) enzim inhibisyonu deneyi	55
Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyon deneyleri	56
İstatiksel analiz	56
BULGULAR ve TARTIŞMA	57
Toz edilmiş yumrulara yapılan araştırmalar	57
<i>Mikroskopik inceleme</i>	57
<i>Kalite Kontrol yöntemleri</i>	57

<i>Nem miktar tayini</i>	57
<i>Kül miktar tayini</i>	58
<i>Asitte erimeyen kül miktar tayini</i>	58
Ekstraksiyon Çalışmaları ve Verimleri	58
Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yöntemi	58
Antikanser etki çalışmalarına ait bulgular	59
<i>Sitotoksik aktivite sonuçlarına ilişkin bulgular</i>	60
<i>DNA sentez inhibisyonuna ilişkin bulgular</i>	61
<i>'Flow sitometri' ile apoptoza ilişkin bulgular</i>	63
<i>Toksik etki çalışmalarına yönelik bulgular</i>	64
Antioksidan Aktiviteye Yönelik Bulgular	67
<i>1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini</i>	68
<i>ABTS radikalini süpürücü etkiye ilişkin bulgular</i>	69
<i>İndirgeme gücüne ilişkin bulgular</i>	70
<i>Lipit peroksidasyonunu inhibisyonuna ilişkin bulgular</i>	71
Lipoksijenaz enzim inhibisyonuna yönelik bulgular	71
Asetil- ve bütrilkolinesteraz enzim inhibisyonlarına ilişkin bulgular	72
Biyolojik Aktivite Bulgularının Karşılaştırılması	73
İnce Tabaka Kromatografisi analizlerine ilişkin bulgular	74
Alt Fraksiyonların YBSK/KS-KS ile Analizlerine İlişkin Bulgular	74
YBSK/KS-KS analizi sonucu elde edilen spektrumların değerlendirilmeleri	75
<i>Purin bazlarına ait bulgular</i>	77
<i>Benzoik asit türevlerine ait bulgular</i>	78
<i>Fenolik aminlere ait bulgular</i>	80

<i>Flavon ve glikozitlerine ait bulgular</i>	85
<i>Hidroksisinnamik asit türevlerine ait bulgular</i>	89
<i>Karbonhidrat türevlerine ait bulgular</i>	94
<i>Lignan ve glikozitlerine ait bulgular</i>	95
<i>Monolignol/Dilignol türevlerine ait bulgular</i>	99
<i>Oksilipinlere ait bulgular</i>	101
<i>Diğer gruplarda yer alan maddelere ait bulgular</i>	111
<i>Tanımlanamayan maddelere ait bulgular</i>	117
YBSK kromatogramlarına ilişkin bulguların değerlendirilmesi	122
YBSK/KS-KS analizine ilişkin bulguların değerlendirilmesi	122
SONUÇLAR ve ÖNERİLER	126
KAYNAKLAR	130
EKLER	159
EK 1. E1 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)	159
EK 2. E1 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler	160
EK 3. E2 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)	161
EK 4. E2 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler	162
EK 5. E3 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)	164
EK 6. E3 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler	165
EK 7. E4 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)	166
EK 8. E4 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler	167
EK 9. E5 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)	168
EK 10. E5 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler	169
EK 11. E6 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)	170

EK 12. E6 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

171

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Serbest Radikallerin Yapıları ve Özellikleri	37
Çizelge 2 Sentetik Kaynaklı Antioksidan Maddeler ve Özellikleri	42
Çizelge 3 Deneylerde Kullanılan Enzim ve Hücre Hatları ile İlgili Bilgiler	44
Çizelge 4 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ile İlgili Bilgiler	44
Çizelge 5 Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Apareylere İlişkin Bilgiler	46
Çizelge 6 <i>Arum italicum</i> Yumrularına ait Nem Miktar Tayini Sonuçları	58
Çizelge 7 <i>Arum italicum</i> Yumrularına ait Kül Tayin Sonuçları	58
Çizelge 8 <i>Arum italicum</i> Yumrularına ait Ekstre ve Fraksiyonların Verimleri	59
Çizelge 9 <i>Arum italicum</i> Yumrularına ait Kaba Fraksiyonların Sitotoksik Aktivite Sonuçları	60
Çizelge 10 <i>Arum italicum</i> Yumrularına ait Alt Fraksiyonların Sitotoksik Aktivite Sonuçları	61
Çizelge 11 MCF-7 ve A549 Kanseri Hücrelerinde Flow Sitometrik Analiz	63
Çizelge 12 Ekstre ve Fraksiyonların Antioksidan Aktivitelerine İlişkin Bulgular	67
Çizelge 13 Ekstre ve Fraksiyonların Kolinesteraz Enzim İnhibisyonları	72
Çizelge 14 Alt Fraksiyonlarda Test Edilen Biyolojik Aktiviteler	73
Çizelge 15 <i>Arum italicum</i> Yumrularında Tanımlanan Maddeler	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	<i>Arum italicum</i> 'un Türkiye'de Yayılış Gösterdiği Kareler	5
Şekil 2	<i>Arum italicum</i> Bitkisinin Çiçekli ve Meyveli Dönemi	5
Şekil 3	Hücre Yaşam Çevriminde Evreler	24
Şekil 4	Apoptoz ile Nekroz	29
Şekil 5	LOX Yolağı ile Elde Edilen Ürünler ve Fizyolojik Etkileri	35
Şekil 6	Hücrede Oksidatif Stres	38
Şekil 7	Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması	39
Şekil 8	<i>Arum italicum</i> Bitki Örneği ve Yumrular	43
Şekil 9	Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama Metodu ile Tez Çalışma Planı	49
Şekil 10	Toz Edilmiş Yumruların Mikroskop ile Elde Edilen Görüntüleri	57
Şekil 11	Alt Fraksiyonların ve Mitoksantronun MCF-7 Kanseri Hücre Hatlarında DNA Sentez İnhibisyonları	62
Şekil 12	Alt Fraksiyonların ve Mitoksantronun A549 Kanseri Hücre Hatlarında DNA Sentez İnhibisyonları	62
Şekil 13	Alt Fraksiyonlar ve Mitoksantron ile Muamele Edilen MCF-7 Hücrelerinin Annexin V-FITC Propodyum İyodür ile Flow Sitometri Analizi	65
Şekil 14	Alt Fraksiyonlar ve Mitoksantron ile Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Annexin V-FITC Propodyum İyodür ile Flow Sitometri Analizi	66
Şekil 15	Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikali Süpürücü Etkileri	68
Şekil 16	Ekstre ve Fraksiyonların Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasiteleri	69
Şekil 17	Ekstre ve Fraksiyonların Askorbik Asit'e Eşdeğer İndirgeme Kapasiteleri	70
Şekil 18	Ekstre ve Fraksiyonların Lipit Peroksidasyonlarını İnhibisyon Yüzdeleri	71
Şekil 19	Adenin'e ait Kütle Spektrumu	77
Şekil 20	Bir Benzoik Asit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	78

Şekil 21	Bir Hidroksibenzoik Asit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	79
Şekil 22	Dikafeoil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu	80
Şekil 23	Dikumaroil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu	81
Şekil 24	Diferuloil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu	82
Şekil 25	Kafeoil-Kumaroil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu	83
Şekil 26	Kumaroil-Feruloil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu	84
Şekil 27	Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit'e ait Kütle Spektrumu	85
Şekil 28	Puerarin'e ait Kütle Spektrumu	86
Şekil 29	Bir Flavonoit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	87
Şekil 30	Viteksin/İzoviteksin'e ait Kütle Spektrumu	88
Şekil 31	Ferulik Asit'e ait Kütle Spektrumu	89
Şekil 32	Kafeik Asit'e ait Kütle Spektrumu	90
Şekil 33	Kafeik Asit Hekzozit'e ait Kütle Spektrumu	91
Şekil 34	Bir Kafeik Asit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	92
Şekil 35	<i>p</i> -Kumarik Asit'e ait Kütle Spektrumu	93
Şekil 36	Bir Disakkarit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	94
Şekil 37	Pinorezinol'e ait Kütle Spektrumu	95
Şekil 38	Hidroksipinorezinol'e ait Kütle Spektrumu	96
Şekil 39	Larisirezinol Glikozit'e ait Kütle Spektrumu	97
Şekil 40	Bir Furofuranolignan Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	98
Şekil 41	Koniferil Alkol'e ait Kütle Spektrumu	99
Şekil 42	Koniferil Alkol (8-5) Ferulik Asit Konjugasyonu'na ait Kütle Spektrumu	100
Şekil 43	9-Hidroperoksi-Oktadekenoik Asit'e ait Kütle Spektrumu	101
Şekil 44	9-okzo-Oktadekadienoik Asit'e ait Kütle Spektrumu	102
Şekil 45	15,16-Dihidroksi-9,12-Oktadekadienoik Asit'e ait Kütle Spektrumu	103
Şekil 46	Hidroperoksi-Oktadekenoik Asit İzomeri'ne ait Kütle Spektrumu	104

Şekil 47	Okzo-Dihidroksi Oktadekenoik Asit İzomeri'ne ait Kütle Spektrumu	105
Şekil 48	Trihidroksi-Oktadekadienoik Asit'e ait Kütle Spektrumu	106
Şekil 49	Trihidroksi-Oktadekadienoik Asit İzomeri'ne ait Kütle Spektrumu	107
Şekil 50	Trihidroksi Oktadekenoik Asit'e ait Kütle Spektrumu	108
Şekil 51	Trihidroksi-Oktadekenoik Asit İzomeri 1'e ait Kütle Spektrumu	109
Şekil 52	Trihidroksi-Oktadekenoik Asit İzomeri 2'ye ait Kütle Spektrumu	110
Şekil 53	10-Metoksidihidrofussin'e ait Kütle Spektrumu	111
Şekil 54	Dihidroksiat'a ait Kütle Spektrumu	112
Şekil 55	Gliserofosfoinozitol'e ait Kütle Spektrumu	113
Şekil 56	L-Malik Asit'e ait Kütle Spektrumu	114
Şekil 57	Metil-4-Kromanon Türevi'ne ait Kütle Spektrumu	115
Şekil 58	Paksanton'a ait Kütle Spektrumu	116
Şekil 59	Bilinmeyen 1 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu	117
Şekil 60	Bilinmeyen 2 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu	118
Şekil 61	Bilinmeyen 3 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu	119
Şekil 62	Bilinmeyen 4 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu	120
Şekil 63	Bilinmeyen 5 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu	121

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
AA	: Araşidonik asit
Abs	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AChE	: Asetilkolinesteraz
Amu	: Atomik kütle birimi
Anti-BrdU-POD	: Anti-bromodeoksiüridin-peroksidaz
AOX	: Alternatif oksidaz
AscAE	: Askorbik asit'e eşdeğer
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATCI	: Asetil tiyokolin iyodit
ATP	: Adenozin Trifosfat
BHA	: Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksitoluen
BrdU	: Bromodeoksiüridin
BTCI	: Bütiril tiyokolin iyodit
BuChE	: Bütirilkolinesteraz
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat
C	: Karbon
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
CO_2	: Karbondioksit
COX	: Siklooksijenaz

Cu	: Bakır
DeHA	: Dehidroaskorbik asit
DHA	: Dokosahekzaenoik asit
dk	: Dakika
DMEM: F12	: Dulbecco's Modified Eagle Kültür ortamı/ F12 Besin Karışımı
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
DTNB	: Ditiyobisnitrobenzoat
EC	: Enzim Komisyonu Kodu
ED ₅₀	: Maksimum etkinin %50'sini oluşturan doz
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Birimi
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmün Test
EMS	: Genişletilmiş kütle tarama
FDA	: Gıda ve İlaç Birimi
FeCl ₃	: Demir 3 klorür
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
FLAP	: Lipoksijenaz aktive edici protein
FRAP	: Demiri indirgeyici antioksidan güç
g	: Gram
GAE	: Gallik Asit'e Eşdeğer
GK/KS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
GLOBOCAN	: Dünya kanser veri tabanı
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon

GST	: Glutasyon-S-transferaz
h/h	: Hacim/hacim
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HDHA	: Hidroksidokosaheksaenoik asit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HEPE	: Hidroksieikosapentaenoik asit
HETE	: Hidroksieikosatetraenoik asit
HIV	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HMG-CoA	: 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A
HODE	: Hidroksioktadekadienoik asit
HPETE	: Hidroperoksieikosatetraenoik asit
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz
IU	: Uluslararası birim
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
kDA	: Kilodalton
KE	: Kersetin'e Eşdeğer
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
L	: Litre
LC ₅₀	: Maksimum öldürücü etkinin %50 sini oluşturan doz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOX	: Lipoksijenaz
LT	: Lökotrien
LX	: Lipoksin
m/z	: Kütle/yük

M.Ö.	: Milattan Önce
MA	: Molekül ağırlığı
mekiv	: Miliekivalan
mg	: Miligram
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
Mn	: Mangan
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Dihidronikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NDGA	: Nordihidroguayaretik asit
nm	: Nanometre
OBSK	: Orta Basınçlı Sıvı Kromatografisi
OG	: Oktilgallat
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PE	: Fikoeritrin
PerCP	: Peridinin klorofil
PG	: Propil gallat
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması
PS	: Fosfatidilserin
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitüsü Kùltür ortamı
Rt	: Tutunma zamanı
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismutaz
spp	: Latince'de 'tür' kelimesinin çoğul hali
Syn	: Sinonim
TBHQ	: <i>tert</i> -Bütihidrokinon
TCA	: Trikloroasetik asit
TEAK	: Toroloks'a Ekvilant Antioksidan Kapasite
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick end etiketleme
UV	: Ultraviyole
var	: Varyete
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YBSK/ KS-KS	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi/ Kütle Spektrometrisi/ Kütle Spektrometrisi
yy	: Yüzyıl
Zn	: Çinko

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, tedavi edilmesi en zor hastalıkların başında kanser gelmektedir. Kanser, insanların ölümüne neden olan ikinci hastalık olarak bilinmektedir. Bu hastalığın oluşum mekanizmalarının karmaşık ve tam aydınlatılmamış olması, aynı zamanda kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere çok benzer özellik göstermeleri nedeniyle ilaçla tedavide tam anlamıyla başarı sağlanamamaktadır. Bu bakımdan kanser tedavisinde etkin bir şekilde kullanılacak doğal kaynakların araştırılması popülerliğini sürdürmektedir. *Catharanthus roseus* L., *Podophyllum* spp., *Taxus brevifolia* Nutt., *Camptotheca acuminata* Decne., *Betula alba* L., *Cephalotaxus* spp., *Erythroxylum pervillei* Baill., *Curcuma longa* L., *Ipomoea batatas* L., *Centaurea schischkinii* Tzvelev gibi tıbbi bitkilerden izole edilen sekonder metabolitlerin antikanserojen olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Özellikle *Vinca* alkaloidleri, lignan türevi epipodofilotoksinler, diterpen taksanlar ile kinolin tipi bir alkaloid olan kamptotesin bu bileşiklerin başında gelmektedir (Kinghorn, 2000; Srivastava, 2005; Shoeb, 2006; Gordaliza, 2007; Karaca, 2008; Pan ve ark., 2010; Nirmala ve ark., 2011).

Son yıllarda farmakognozi alanında yapılan çalışmalarda etnobotanik alanında yayınlanmış makaleler önem kazanmıştır. Belli bir yörede kullanılan tıbbi bitkilerin hangi amaçla, hangi kısımlarının, ne şekilde hazırlanarak, ne kadar süre ile kullanıldığı ile ilgili bilgiler bu çalışmalarla kayıt altına alınmaktadır (Teklehaymanot ve Giday, 2007; Kendir ve Güvenç, 2010). Genç ve Özhatay (2006)'ın Çatalca yöresinde yaptıkları bir etnobotanik çalışmada 'yılan yastığı, yılanlık, yandıran' gibi isimlerle bilinen *Arum italicum* Miller yumrularının taze halde dilimlenip balla karıştırılarak kahvaltıda önce ya da dekoksiyonu hazırlanıp içilerek tüketildiği ve kanser, ekzema, peptik ülser ve kadın hastalıklarında kullanıldığını bildirmişlerdir (Genç ve Özhatay, 2006). Bitkinin tamamının toksik olduğu bilinmesine rağmen yapraklarından Adana yöresinde 'tırşık' adı verilen yöresel bir yemek yapılmaktadır. Kurutulmuş yumrular dâhilen ekspektoran ve müshil etkili; taze yapraklar ve taze yumruların haricen çıban açıcı, yara iyi edici ve cilde kan toplayıcı olarak kullanıldığı kayıtlıdır (Baytop, 1984). Ancak bitki üzerine yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ayrıca bazı sözlü kaynaklar tarafından, bazı kanser hastaları tarafından yumruların tüketildiği ve tedavilerine olumlu katkı verdiği ifade edilmektedir.

Bu bilgilerden hareketle *Arum italicum* yumrularından hazırlanan ekstrenin meme ve akciğer kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkilerinin belirlenerek bu etkiye paralel fraksiyonlanması, elde edilen fraksiyonların sitotoksik etkilerini açıklayabilmek amacıyla DNA sentezi üzerine olası inhibisyonları ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, antioksidan, antiinflamatuvar ve antikolinesteraz vb. etkili maddelerin bu aktiviteleri ile olası antikanser etkileri arasında pozitif korelasyon olabileceğine dair bulgular mevcuttur (Zakut ve ark., 1990; Barbosa ve ark., 2001; Tong ve ark., 2002; Ding ve ark., 2011; Sarveswaran ve ark., 2011; Kılıç, 2013; Dasgupta ve Kelin, 2014; Wang ve ark., 2014). Bu nedenle elde edilen fraksiyonların *in vitro* antioksidan etkileri, kolinesteraz ve LOX enzimi inhibisyonları araştırılarak sitotoksik etki ile ilişkileri araştırılmıştır. Son olarak etkiden sorumlu olabilecek bileşikler YBSK/KS-KS analizleri ile belirlenmeye çalışılmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Araceae Familyası

Yumrulu ya da rizomlu, genellikle tüysüz çok yıllık bitkilerdir. Yaprakların hepsi tabanda, belirgin biçimde saplı (*Acorus* hariç), sıklıkla ağsı damarlı. Çiçekler monoik ya da hermafrodit, yaprak-benzeri ya da petalsi büyük bir brakte tarafından taşınan spadiks şeklindedir. Spadiksin ekseni, sıklıkla çiçeklenme bölgesinin ötesinde bir apendiksin içine uzamış; appendiks saplı veya değil, çomaksızdan uzanmış silindiriğe kadar, genellikle mor ya da sarı renklidir. Monoik taksonlarda, dişi çiçekler spadiksin tabanına doğru, erkek çiçekler onların üzerinde, bitişik ya da izi kalmış biçimde ya da kalmamış aksis ile ayrılmış, kısır çiçekler ipliksi; kısır çiçekler bazen erkek çiçeklerin üzerinde bulunur. Çiçek örtüsü bulunur ve sepalimsi ya da genellikle bulunmaz. Stamenler 1-6. Ovaryum 1-3 lokuluslu. Meyveler üzüksü. Temel olarak tropikal familya; yukarıdaki tanımlama Türk örnekler için yapılmıştır (Davis, 1984).

Araceae familyasına ait cinslerin tayin anahtarı

1. Yapraklar ve spatalar benzer, kılıç biçiminde doğrusal; spadiks yaprak benzeri sap üzerinde yana doğru belirmiş, herhangi bir appendiks yok

1. *Acorus*

1. Yapraklar ve spatalar benzemez, yapraklar linear değil (*Biarum tenuifolium* hariç); spadiksin terminali stem-benzeri saplı, belirgin appendiksli

2. Spatanın kenarı tabanda üst üste fakat birleşik değil

3. Yapraklar üçgenimsi ok başı biçiminde (olgunlaştığında)

2. *Arum*

3. Yapraklar ayaksı biçimde çok sayıda segmentlere bölünmüş

6. *Dracunculus*

2. Spatanın kenarı tüp biçiminde tabandan bitişik

4. Erkek ve dişi çiçekler ardışık, kısır çiçek yok; sap uzun, çoğunlukla toprak üstünde

5. *Arisarum*

4. erkek ve dişi çiçekler, genellikle uzun kısır çiçeklerle ayrılmış; sap çoğunlukla toprağın altında, spata bu nedenle arazide köksüz görünür

5. yapraklar ovat-eliptik ya da düz, bütün, ovül 1 tane

3. *Biarum*

5. yapraklar 3-loblu, yan loblar sık doğrusal segmentlere bölünmüş, bu segmentler yukarı doğru kıvrılmış da olabilir; ovül 2 tane

4. *Eminium*

Arum L. Cinsi

(R. R. MILL)

Yumrulu çok yıllık bitkiler. Yapraklar petiolat, olgunlaştığında hastat-sagitat. Meyve olgunlaşmadan önce spatula kurur, alt kısım kenarlarla birlikte üst üste fakat birleşik değil, tüp şeklini alır; üst kısım (lamina) ovat-lanseolat, çoğunlukla iç kısım parlak ya da mat renkli. Spadiks uzun, konikal ile silindirik biçimde uzantılı. Çiçekler bir eşeyli, monoik. Çiçek yaprağı yok. Dişi ve erkek kısımlar, her biri farklı kısa kısır çiçeklerle genellikle ipliksi kısır çiçeklerle ayrılmış durumda; kısır çiçekler genellikle erkek bölge ile appendiksin tabanı arasında bulunur. Stamenler 3-4. Ovaryum 1-hücreli. Meyve kırmızı üzüksü ve 1-6 tohum içerir. Çoğu tür zehirlidir (Davis, 1984; Davis ve ark., 1988).

Arum cinsine ait türlerin tayin anahtarı:

1. Spadiks kısır çiçeklerle birlikte bulunmaz ya da çok az ve sadece erkek ve dişi çiçekler arasında **11. creticum**
1. Spadiks çok sayıda kısır çiçekle birlikte erkek çiçeklerin altında veya üzerinde
2. Spatanın laminası koyu lekeli ve içi noktalı (çoğunlukla mor bölge içine yakın) **10. dioscoridis**
2. Spatanın laminası çeşitli renklerde fakat içinde noktalar bulunmaz
3. Yumru dikey (filizler üst yüzeyin orta yanlarından uzamakta)
4. Spata tüpünün içi koyu mor; lamina iki renkli, beyaz ile mor sınırlı **6. euxinum**
4. Spata tüpü beyaz ya da beyazımsı (bazen mor bant ile); laminada kuvvetli iki renk görülmez
5. Kısır çiçekler beyazımsı-sarı
6. Spatanın laminası 14.5-30 x 4-7 cm, külahsız; spadiks 8-19 cm **5. orientale**
6. Spatanın laminası 7-10.5 x 1-3.5 cm, külahlı; spadiks 4-7 cm **7. balansanum**
5. Kısır çiçekler mor ya da menekşe
7. Spatanın laminası 1-3.5 cm genişlikte; appendiksin çomağı 1.3-7(-13) mm genişlikte **8. elongatum**
7. Spatanın laminası (2.5-)3.5-6.5(-8) cm genişlikte; appendiksin çomağı (5-)7-20(-25) mm genişlikte **9. detruncatum**
3. Yumru yatay (bir kenara yakın noktadan uzantılı)

8. Appendiks sarı

9. alt verimsiz kısım 2-2.5 mm, üst kısım 6-7 mm

2. nickelii

9. alt verimsiz kısım 3-7 mm, üst kısım 5-10 mm

1. italicum

8. Appendiks mor ya da kahverengimsi

10. Spata tüpü mor bantlı

4. maculatum

10. Spata tüpü mor bantsız

11. dişi kısım 8.5-16 mm; alt kısır bölge 3.5-5.5(-6) mm; erkek kısım 2.7-6 mm genişlikte; appendiks 2.8-5 cm, verrukuloz değil

3. byzantinum

11. dişi kısım 18-25 mm; alt kısır bölge 2-2.5 mm; erkek kısım 6.5-10 mm genişlikte; appendiks 7-12.5 cm, verrukuloz

2. nickelii

Arum türlerinin bilinen yerel isimleri

Acı manca (Bolu); ağı, ağu (Antalya); ağu kınası (Muğla); Ayı marlı, basır otu (Kütahya); bilakama (Balıkesir); dağ sorsalı (Muğla); domuz lahanası (Trabzon); domuz mancarı, domuz pancarı (Kocaeli); filkulağı (Diyarbakır); kabarcık (Burdur); kardi (Manisa); kari (Bitlis); livik (Sivas); nivik (Samsun, Tokat); tirşik otu (K. Maraş); ülevez (İstanbul); yaldıran (Tekirdağ); yılan ağusu (Muğla); yılan birçağı (Muğla); yılan burcu (Uşak); yılan burçağı (Adana, İzmir, Maraş, Muğla); yılan üzümü (Bursa); yılan yarpuzu (Bursa); yılan bacağı (Aydın); yilancık (İzmir); yilancık otu (Antalya); yılan dili (Kocaeli); yılan kavuzu (Balıkesir); yılanlı ağu (Muğla); yılanıyastığı (Bursa, Niğde) (Tuzlacı, 2006).

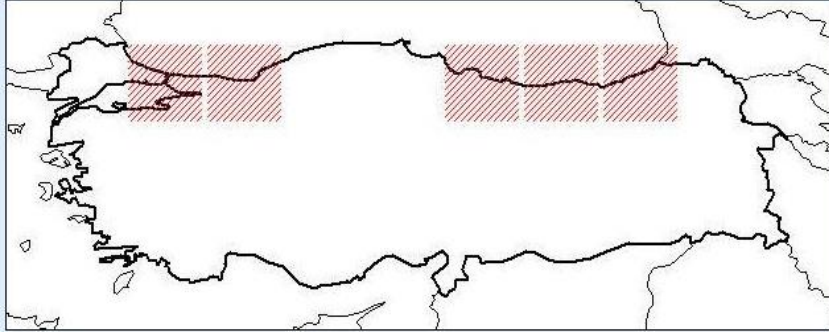
***Arum italicum* Miller**

Syn: *A. albipathum* Steven in Bull. Soc. Nat. Mosc. 66 (1857); *A. orientale* Bieb. var. *albipathum* (Steven) Engler in DC., Mon. Phan. 2:588 (1879) p.p.; *A. trapezuntinum* Schott in sched., nom. Nud. Ic:Reichb., IC. Fl. Germ. 7:t.11 (1845); Polunin, Fls. Europe t. 1830 no. (1816) (1969).

Yumru yatay, fakat *A. maculatum*'a göre daha kısa. Yaprak petiolleri (22-)26-40(-50) cm. Lamina büyük, genişçe mızrak şeklinde, 11.5-30 x 10-23.5 cm, akut ya da kısa akuminat, üstüste yan loblar ile birlikte, koyu yeşil, beyazımsı damarlarla birlikte ya da Türkiye'deki gibi damarsız. Sap 12-20 cm, petiollerden daha kısa. Spata açık yeşilimsi-sarıdan transparan beyaza doğru, tepeden sarkık, (13-)20-40 x (2.5-)4.5-12 cm; tüp (2.5-)3.5-8.5 cm, iç kısım beyazımsı, mor bant taşımaz, şişkin, uç kısımda daralmış. Spadiks (5.5-)6.5-13.5 cm, laminadan biraz daha kısa, bazen tüpten çıkıntı biçiminde. Dişi bölge 16-26 mm; kısır bölgeden aşağıda 3-7 mm;

erkek bölge 2.2-6 x 4.5-7 mm; yukarı kısır bölge 5-15 mm. Verimsiz filamentler sarımsı-beyaz, alt 3.5-6 mm, üst 2.5-6 mm. Apendiks sarı, saplı, kalın, 3-7.5 cm; çomak elipsoidal, 1.5-6.5 x (2-)3-11 mm (Davis, 1984) (Şekil 2).

Güney ve Batı Avrupa, Balkanlar, Kuzey Afrika, Kafkasya ve Irak, Türkiye’de yayılış gösterdiği iller; İstanbul, Bursa, Yalova, Kocaeli, Ordu, Rize, Samsun, Trabzon (Şekil 1).



Şekil 1. *Arum italicum* ‘un Türkiye’de Yayılış Gösterdiği Kareler (TÜBİVES)

Arum italicum’un ülkemizde şu yerel isimlerle bilinmektedir; arko lahanası (Trabzon); domuz yandıran, gabarcık, yandıran, yılcık, yılcıkçı (İstanbul); yılan bıçağı (Kırklareli, Trabzon); yılanıyastığı (İstanbul, Kırklareli, Trabzon) (Baytop, 1999; Tuzlacı, 2006).



Şekil 2. *Arum italicum* Bitkisinin Çiçekli ve Meyveli Dönemi

***Arum* Türlerinin Halk Arasında Kullanımı**

Bazı *Arum* türlerinin (*A. dioscoridis*) yapraklarından Güney Anadolu bölgesinde etli dolması ve Tırşik adı verilen yemek yapılır. Bu cinsin birçok türü spata ve spadiks’inin renkli olması nedeniyle süs bitkisi olarak yetiştirilir ve yurt dışına satılır.

A. italicum ve *A. maculatum* türleri bahçelerde turuncu meyvelerinin güzel duruşundan dolayı yetiştirildiği kayıtlıdır. Avrupa’da yumru ve yapraklarının sabun olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yumrular yüksek miktarda şeker ve nişasta içermektedir (özellikle 2-yıllık *A. italicum* yumruları %20’ye kadar nişasta içerir). Kaynatılan yumrular, özellikle 1800’lerin ortalarında İrlanda’da yaşanan ciddi patates kıtlığı zamanlarında büyük miktarlarda tüketilmiştir. Fransa’da ise unlu mamül yapımında kullanılmıştır. İspanya ve İtalya’da nişasta üretimi için tercih edilmiştir. Tarihsel süreçte, ince taneli ve pirinç nişastasına oldukça benzer oluşundan dolayı *Arum* nişastası, İngiltere’de Elizabeth döneminde oldukça popüler bir nişasta kaynağı olarak kullanılmıştır. 18. yy’da Fransa’da *Arum* yumrularından nişasta üretimi sürdürülürken, İngiltere’de Elizabeth çevrelerinde popüleritesini kaybetmiştir (Halevy, 1989).

***Arum italicum* Miller**

Dioscorides’in eserlerinde bitkinin yumrularının çiğ ya da pişilerek tüketildiği ayrıca Balearik Adaları’nda yumruların balla karıştırıldığı ve kek yapımında kullanıldığı kayıtlıdır (Wright, 2001).

Bitki taze iken zehirli olup, kurutulup kaynatılınca zehirli maddelerin etkileri kaybolur. Taze bitkinin yenmesi bulantı, kusma, ishal ve kalpte ritim bozuklukları ile karakterize olup ölüme sebebiyet verebilecek zehirlenmelere neden olabilir.

Arum italicum bitkisinin yumruları, yaprakları ve meyveleri halk ilacı olarak ülkemizde kullanılmaktadır. Kurutulmuş köklerin müshil ve balgam söktürücü olarak, hemoroit tedavisinde ve öksürüklü hastalarda göğüs yumuşatıcı olarak günde 1-2 g yutulması önerilmektedir. Toz haldeki yumrular bal ile karıştırıldıktan sonra mide ülserinin tedavisinde kullanılır. Ayrıca yumru tozu, süt verimini arttırdığından hayvanların yiyeceklerine katılır. Taze yumruları, küçük parçalara ayrılıp günde 4 veya 5 parça yutularak ayak çatlakları, meme başı çatlakları ve ekzema tedavisinde kullanılır. Taze yumruları küçük parçalara ayrılıp kurutulduktan sonra, dâhilen 3 gün boyunca yutularak karaciğer tedavisi için kullanılabilir. Yumrusu kabuklu halde suda haşlanıp kabuğu soyulup yenerek ekzema tedavisinde, ezilip özü çıkartılarak ve bir iki damla buruna çekilerek sarılık tedavisinde kullanılır (Karabudak, 2013).

Taze yaprak ve yumrular haricen çiban açıcı, yara iyileştirici olarak kullanılır. Olgun meyveleri ise 40 gün boyunca sabahları aç karına yutularak hemoroit tedavisinde kullanılır. Bitki yaprakları haşlanıp kas ağrılarında lapa haline getirilerek ağırlı bölgeye sarılır. Haşlanıp lapa haline getirilmiş yapraklar ekzema olan bölgeye de uygulanabilir. Pirinç ve bulgurla lapa yapılıp, doğum yapan kadınlarda doğum sancısını azaltmak amacıyla verilir. Meyveleri kötü kokusundan dolayı sineklerle biyolojik mücadele için kullanılır. Ayrıca akrep ve yılan sokmalarında kullanıldığı bilinir (Baytop, 1984; Kandemir, 2008; Karabudak, 2013).

Genç ve Özhatay (2006)’ın Çatalca yöresinde yaptıkları bir etnobotanik çalışmada ‘yılan yastığı, yilancık, yandıran’ gibi isimlerle bilinen *Arum italicum* yumrularının taze halde dilimlenip balla karıştırılarak kahvaltıdan önce yenildiği ya da dekoksasyonu hazırlanıp içilerek tüketildiği ve kanser, ekzema, peptik ülser ve kadın hastalıklarında kullanıldığını bildirmişlerdir (Genç ve Özhatay, 2006).

Babaeski (Kırklareli)'de 'yılanyastığı, yılanbıçağı' isimleriyle bilinen *A. italicum* yumruları küçük parçalara kesilerek; olgun meyveleri 40 gün boyunca kahvaltıda önce 3-4 tane yenerek hemoroide karşı kullanılır. Küçük dilimlere ayrılan yumrular taze halde 3 gün tüketilerek karaciğer rahatsızlıklarında; 4-5 dilim yenerek ekzemaya karşı ve ayak çatlaklarına karşı tüketilir (Tuzlacı ve Alparslan, 2007).

İtalya'da 'Lügu, lügea, lügai' isimleriyle bilinen bitkinin yaprakları, yumruları ve çiçek durumu kullanılmaktadır. Yumru ve yapraklar veterinerlikte domuzları beslemek için; çiçek durumları ise ekolojik indikatör olarak kullanılmaktadır (Cornara ve ark., 2009). İtalya'nın Latium bölgesinde *A. italicum* pişirilmiş ya da çiğ yumruları ile yaprakları kış döneminde özellikle domuzlarda yem olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *Silybum marianum* (L.) Gaertner bitkisinin yaprak ve kökleri kaynatılıp *A. italicum* ile karıştırılarak da yem olarak kullanılmaktadır (Guarrera ve ark., 2005). Veterinerlikte, tavuklarda hastalıkları önleyici yem katkısı olarak kullanılmaktadır (Viegi ve ark., 2003). İtalya'nın Potenza bölgesindeki bir inanışa göre *A. italicum*'un çiçeklenme ile döllenme ve meyve verme döneminin gözlenmesinin gelecekte iyi bir hasat dönemine işaret ettiği düşünülmektedir. Aslında, insanlar bitkinin meyve, spadiks, yaprak ve yumrularının sırasıyla mısır, tahıl, sebze ve patatesi simgelediğini düşünmektedirler. Bu döllenme işareti, temel bitkilerin bolluğu ve gelişmeleri için gerekli olan nem düzeylerinin sağlandığını göstermektedir. Ayrıca bitkinin dini ritüellerde kullanımından bahsedilmektedir (Guarrera ve ark., 2006).

İtalya'nın Castelmezzano bölgesinde 'a nzalé' ismiyle bilinen *Arum italicum*, yaprak sapı siğil tedavisinde lokal olarak uygulanmaktadır (Pieroni ve ark., 2004). İtalya, Montecorvino bölgesinde ise 'Lanzani' yerel ismiyle bilinen bitkinin yumruları küçük dilimler halinde kesilir, lokal olarak sıyrık, çürük tedavisinde kullanılır (De Natale ve Pollio, 2007).

Bosna-Hersek in Capljina bölgesinde yapılan bir çalışmada, 'kazalac, kozlac' yerel isimleriyle bilinen bitkinin 2. Dünya Savaşı sırasında yaşanan kıtlıkta nişastaca zengin yumrularının kaynatılarak ya da kızartılarak yenildiği kaydedilmiştir. Bitkide çok yüksek oranda bulunan kalsiyum okzalat kristallerinden dolayı sindirim sistemine zarar verdiği bilinmekle birlikte, okzalatların neden olduğu toksik etkilerden kurtulmanın oldukça güç olduğu, bu nedenle çiğnmeden yutmanın tercih ettikleri belirtilmiştir (Luczaj ve Dolina, 2015).

İtalya'da Mainarde Dağları'nda yetişen bitkinin yapraklarının doğrudan yaraların üzerine yerleştirilerek kullanıldığı kayıtlıdır (Fortini ve ark., 2016).

***Arum palaestinum* Boiss.**

Türkiye Florası'nda kayıtlı olmayan bu tür ile ilgili bilgilere, üzerinde en çok çalışılan tür oluşu nedeniyle bu bölümde ve sonraki bölümlerde verilmiştir.

Ürdün'de geleneksel şifacıların kanser tedavisinde kullandığı bitkiler arasında *Arum palaestinum* bulunmaktadır (Abu-Dahab ve Afifi, 2007). Etnobotanik bir çalışmada bitkinin yaprak deoksiasinin antimikrobiyal ve antikanser olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Aburjai ve ark., 2007). Aynı ülkede 'Luf' yerel ismiyle bilinen bitkinin gövde soğanı, obezite ve inflamasyon tedavisinde herbalistler tarafından kullanılmaktadır (Afifi ve Abu-Irmaileh, 2000).

Fas'ta ise 'louf' olarak bilinir, halk arasında kanser tedavisinde, ağrı ve inflamasyonda, iç infeksiyonlarda kullanılmaktadır; bu amaçla çiçekler taze iken yumurta ile pişirilir ve özellikle kadınlar tarafından tüketilir. Ayrıca yapraklardan dekoksion hazırlanarak benzer amaçlarla tüketilir (Hudaib ve ark., 2008).

Filistin'de *A. palaestinum*'un toprak üstü kısımları kurutularak ya da tuzlu su ile haşlandıktan sonra gıda olarak tüketildiği kayıtlıdır. Ayrıca halk arasında aşırı mide asidi artışında ve gıda zehirlenmesi gibi durumlarda, ateroskleroz, kanser ve diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Husein, 2010; Farid ve ark., 2015). Aynı bölgede alternatif ve tamamlayıcı tedavide en çok kullanılan bitkiler arasında bulunan ve Arapça 'lufe' ismiyle bilinen bitkinin toprak üstü kısımları ve yaprakları ham, pişmiş veya dekoksion şeklinde kullanılmaktadır (Ali-Shtayeh ve ark., 2011). Yine aynı grubun 2012'de yaptığı bir çalışmada, diyabet hastalarının yaprak ve tohumları pişirerek ya da infüzyon hazırlayarak kullandıkları kayıtlıdır (Ali-Shtayeh ve ark., 2012). Aynı yörelerde kesilmiş yapraklar su ile kaynatılır ve suyu atılarak, toksik maddelerden kurtarılır. Ardından zeytinyağı ile kavrulur ve limon ile tüketilir. Zeytinyağı ile kavrulmuş tüketilmesinin kolon kanserini önlediği düşünülmektedir. Ayrıca bitkiden hazırlanan çayın sindirime yardımcı olarak kullanımı kayıtlıdır (Ali-Shtayeh ve ark., 2008). Filistin'de yapraklar, bakteriyel enfeksiyonlar ve kanser tedavisi amacıyla halk arasında kullanılmaktadır (Kaileh ve ark., 2007).

Geleneksel Arap Tıbbı'nda bitkinin çiçeklerinden hazırlanan dekoksion bakteriyel infeksiyonlarda, zehirlenmelerde ve dolaşım sistemi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Said, 2013). Ayrıca kansere karşı kullanımı da kayıtlıdır (Saad ve ark., 2005). İsrail'de çiçeklerinden 50 g tartılır, 1 L su ile 15-30 dk süre ile dekoksionu hazırlanır, günde 3 defa 30 mL içilir. Bu tedaviye, iyileşme gözlenene kadar devam edilir. Bakteriyel enfeksiyonlarda, kanser, zehirlenme ve dolaşım sistemi rahatsızlıklarında kullanılır (Said ve ark., 2002).

***Arum dioscoridis* SM.**

Theophrastus'un (M.Ö. 370-287) eserlerinde, bitkinin yaprak ve yumrularının sirkede bekletilerek gıda olarak tüketildiği kayıtlıdır (Wright, 2001).

Kilis ve Gaziantep çevresinde 'gavur pancarı, sülüklü pancar' olarak bilinen *Arum dioscoridis* yaprakları çorba ve salatalarda kullanılmaktadır. Yaprakların hazmı kolaylaştırıcı etkisi bilinmekte ve ayrıca kaynatılarak sivilce tedavisinde pansuman şeklinde uygulanmaktadır (Akgünlü, 2012).

Fas'ın Mujib bölgesinde yapılan bir çalışmada *A. dioscoridis* ile *A. palaestinum*'un insanlar arasında çeşitli hastalıklarda kullanıldığı kayıtlıdır. *A. dioscoridis* 'rqeita' (Arapça) olarak bilinmekte ve dekoksionu hazırlanarak ya da yumurta ile pişirilerek kanserde kullanılması tavsiye edilmektedir (Hudaib ve ark., 2008). Janakat ve Al-Thnaibat (2008) çalışmalarında 'benekli yılanıyastığı' olarak bilinen *A. dioscoridis*'in Fas'ta yöresel yiyecekleri olan 'Cha'acheel' yapımında kullanıldığı kayıtlıdır. Ayrıca Filistin'de halk arasında kanser ve prostat rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Janakat ve Al-Thnaibat, 2008).

***Arum dioscoridis* SM. var. *dioscoridis* SM.**

Özhatay ve Koçak (2010) tarafından yapılan bir etnobotanik çalışmada, Karaman'da yetiştirildiği belirtilen *Arum dioscoridis* var. *dioscoridis* köklerinden

hazırlanan lapa haricen inflamasyonlu yaralarda; meyveleri ise dâhilen hemoroit tedavisinde kullanılmaktadır (Özhatay ve Koçak, 2010).

***Arum elongatum* Steven subsp. *detruncatum* (C.A. Meyer ex Schott) H. Riedl**

Solhan (Bingöl)'da 'kardun, kardü, kardı' yerel isimleriyle bilinir, yaprakları karın ağrıları, hipertansiyon, diyabet, guatr ve romatizma hastalıklarında kullanılır. Uygulama şekilleri, sabahları aç karnına bir fincan çay şeklinde içilerek ya da kompres halindedir (Polat ve ark., 2013).

***Arum maculatum* L.**

Bulgaristan'da uygulanan fitoterapide, yumruların hazırlanan maseratı sindirime yardımcı olarak, hemoroit tedavisinde, karaciğer rahatsızlıklarında ve midede aşırı asit artışı gibi durumlarda kullanılmaktadır (Ivancheva ve Stantcheva, 2000).

Kuzey Fas'ta Taounate bölgesinde, 'ayerna' ismiyle bilinen bitki, kökleri toz edilerek ağız yoluyla mide rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (El-Hilaly ve ark., 2003). Sakarya civarında 'mayasıl kökü' olarak bilinen bitkinin taze kökleri fungal enfeksiyon tedavisinde kullanılır (Uzun ve ark., 2004).

Ürdün'de genellikle 'arun' ismiyle bilinen bitkinin yapraklarının, insanlarda haricen ya da dâhilen kullanıldığında deride iritasyon ve kalp problemlerine neden olduğu kayıtlıdır (Al-Qura'n, 2005).

Kırklareli bölgesinde ise 'yılanotu, yılanıyastığı' isimleri ile bilinen *A. maculatum* yumrularının dekoksasyonu hazırlanarak bir hafta boyunca günde 3 defa bir fincan içilerek hemoroit tedavisinde kullanılmaktadır (Kültür, 2007). Lübnan'da halk arasında romatizma ve nevrolojiye karşı *A. maculatum* yaprakları, alkolde bekletilir, hazırlanan maserat haricen kullanılır (Marc ve ark., 2008). Malatya'da yapraklarından hazırlanan infüzyonu kompres halinde romatizmaya karşı kullanılmaktadır (Tetik ve ark., 2013).

Arum elongatum* Steven subsp. *elongatum

Tuzlacı ve Aymaz (2001) tarafından yapılan bir etnobotanik çalışmada, Gönen (Balıkesir) civarında yetiştiği belirtilen *Arum elongatum* subsp. *elongatum* 'yılanıyastığı, yılan bıçağı, yılan cücüğü' isimleriyle bilinir, yumrular suda kaynatılarak, dilimlenip balla karıştırılarak hemoroit tedavisinde kullanılır. Meyveler de aynı tedavide kullanılır (Tuzlacı ve Aymaz, 2001).

Arum detruncatum* C.A. Mey. ex Schott subsp. *detruncatum

Eğirdir (Isparta)'de bitki 'ihan bıçağı, ilhan burçağı, yılan bıçağı, yılan burçağı' isimleriyle bilinir. Yumruları toz edilir, sıcak su eklenir ve yemeklerden önce içilerek ülser tedavisinde kullanılır. Bronşit tedavisi için toz edilmiş yumrulara su eklenerek tablet haline getirilir, günde 1-2 tablet tüketilir. Dilimlenen yumrular ise hemoroit tedavisinde yenir (Tuzlacı ve Erol, 1999). Kürecik'te 'nıvik' olarak bilinen bitkinin yaprakları kadınların doğum sonrası sancılarında kullanılır, ayrıca taze/kurutulmuş yapraklar haşlanarak gıda olarak tüketilir (Yeşil, 2007). Sivas ve Yozgat civarında ise 'livik' olarak bilinir, yaprakları soğan ve et ile pişirilerek gıda olarak tüketilir. Ayrıca hazırlanan bu karışım, nefes darlığı ve ağrıda kullanılmaktadır (Özüdoğru ve ark., 2011). Doğu Anadolu civarında 'navic' yerel

ismiyle bilinen bitkinin yaprak infüzyonu dâhilen midevi olarak, böbrek taşlarının tedavisinde ve diyareye karşı kullanılmaktadır (Altundag ve Ozturk, 2011).

Arum Türleri Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Araceae türlerinin çiçek durumlarında hidrokisinnamoil asit-amin türevleri önemli bileşiklerdir. Bu bileşikler, erkek ve dişi çiçeklerde, spatada yüksek miktarlarda bulunurken steril çiçeklerde hiç bulunmamaktadır (Ponchet ve ark., 1982). Hidrokisinnamik asit ile amin grubunun amit bağları ile bağlanması ile oluşan bu maddelerin 2 tipi mevcuttur: bazik ve nötral grup. Bazik grup suda çözünür ve güçlü iyonlaşma özelliği gösterir. Bazik grup, putresin, kadaverin, spermidin ve spermin gibi alifatik di- ve poli-amin gruplarını içerir. Nötral grup suda çözünmez, güçlü iyonlaşma göstermez, tiramin, dopamin, triptamin gibi hem alifatik hem de aromatik aminleri içerir (Halevy, 1989).

Arum maculatum ve *A. italicum* ile ilgili kayıtlarda, 1897 yılında 'arin' isimli bir saponin ile Sokrat'ın ölümüne neden olan alkaloit yapısındaki 'koniin' maddesinin, her iki türün yumrularında bulunduğu belirtilmiştir (Halevy, 1989).

Arum türlerinden glukomannan O1 ve glukomannan M1 tanımlanmıştır. Glukomannan O1, D-glukopiranoz ve D-mannopiranoz (2:2.8) ve eser miktarda D-glukuronik asit ünitesi taşımaktadır. Glikozidik bağlar β -konfigürasyona sahiptir. Glukomannan M1 ise D-glukopiranoz ve D-mannopiranoz (2:3.2) ve eser miktarda L-arabinoz ile D-glukuronik asit taşımaktadır. β -1,4-glikozidik bağ, doğrusal konumda ve D-mannopiranoz kalıntısı indirgen-bağlarda değildir (Koleva ve ark., 1980).

Arum italicum, *A. maculatum*, *A. creticum*, *A. nigrum*, *A. alpinum*, *A. orientale*, *A. cyrenaicum*, *A. dioscoridis*, *A. pictum* gibi *Arum* türlerinin tohumlarından elde edilen yağ örneklerinde major yağ asiti olarak 13-feniltridekanoik asit tanımlanmıştır (Schmid ve ark., 1997).

Arum italicum Miller

Kurutulmuş yumrular, su-aseton (1:1) karışımı ile 50 °C'de 2 hafta boyunca perkolasyona tabi tutulmuştur. Perkolat, vakum altında kurutulduktan sonra elde edilen bakiye su-eter fazlarında disperse edilmiştir. Sulu faz, Amberlit XAD kolonda fraksiyonlanmıştır. Elde edilen metanol fazı silika jel kolonda tekrar fraksiyonlanmıştır. Saflaştırma işlemlerinin ardından (+)-larisirezinol 4'-O- β -D-glukopiranozit, (+)-larisirezinol 9-O- β -D-glukopiranozit, ferulik asit, koniferil alkol 4-O- β -D-glukopiranozit, *p*-kumaril alkol 4-O- β -D-glukopiranozit, (+)-pinorezinol-O- β -D-glukopiranozit, (+)-şiringarezinol-O- β -D-glukopiranozit, (+)-larisirezinol ve (+)-larisirezinol 4-O- β -D-glukopiranozit bileşikleri tanımlanmıştır (Della Greca ve ark., 1993a). Organik faz (eter) ise nötral ve asidik fraksiyonlara ayrılarak çeşitli saflaştırma işlemleri yapılmıştır. (24S) 5 α ,6-epoksi-24-etil-kolestan-3 β -ol ve (24S) 5 β ,6-epoksi-24-etil-kolestan-3 β -ol bileşikleri ile daha polar (24R) 5 α ,6-epoksi-24-metil-kolesta-8,22-dien-3 β ,7 α -diol izole edilmiştir (Della Greca ve ark., 1993b).

Aynı ekibin 1994'de yine yumrularla yaptıkları çalışmada ise, yumrular aseton:su (1:1) karışımı ile oda sıcaklığında perkolasyona tabi tutulmuştur. Fraksiyonlama ve saflaştırma işlemlerinin ardından, dihidrobenzofuran neolignan türevi olan 8-O-3' neolignan ve 8-O-4' neolignan tanımlanmıştır. Ayrıca enantiyomerik karışım olan

dehidrokoniferil alkolün 4-O- β -D-glukopiranozit ve 9-O- β -D-glukopiranozit türevleri elde edilmiştir (Della Greca ve ark., 1994a). Hazırlanan eter ekstresinden, uygun kromatografik ve spektrometrik yöntemler kullanılarak oksijenli stigmasterol türevleri elde edilmiştir: β -sitosterol, (24K) 24-etil-kolest-6-en-3 β ,5 α -diol, (24R) 24-etil-5 α -hidroperoksi-kolest-6-en-3 β -ol, (24R) 24-etil-7 β -hidroperoksi-kolest-5-en-3-ol, (24R) 24-etil-7 α -hidroperoksi-kolest-5-en-3 β -ol, (24R) 24 etil-6 β -hidroperoksi-kolest-4-en-3-on, (24R) 24-etil-6 α -hidroperoksi-kolest-4-en-3-on (Della Greca ve ark., 1994b).

Gellerstedt ve ark. (1995) *treo*-guayaçilgliserol- β -koniferil eter-4- β -D-glukopiranozit isimli neolignan türevinin yanısıra doğada nadir bulunan 8-O-3' neolignan yapısını tanımlamışlardır.

Olgun A. *italicum* meyvelerinden ayrılan tohumlar 40-60 °C'de 4 saat boyunca petrol eteri ile maserasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen yağ asitlerinin belirlenmesi amacıyla GK ve GK/KS analizleri sonucu major yağ asitleri oleik asit (%27.19), linoleik asit (%15.48), palmitik asit (%13), 13-feniltridekanoik asit (%19.13), palmitoleik asit (%9.64) ve stearik asit (%4.91) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca miktarları %0.11-1.42 aralığında 11 yağ asidi, <%0.01'den düşük 3 yağ asidi belirlenmiştir (Sağlık ve ark., 2002).

Bienz ve ark. (2002), bitkide fenolik aminler grubundan N^1, N^6 -diferuloil putressin bulunduğunu kaydetmişlerdir (Bienz ve ark., 2002).

***Arum palaestinum* Boiss.**

Açık havada kurutulmuş yapraklar, 80 °C'de 3 saat boyunca su ile ekstre edilmiştir. Yapılan fraksiyonlama işlemleri ardından tanımlanan 6 bileşik şunlardır; kafeik asit, izoorientin, luteolin, 3,6,8-trimetoksi, 5,7,3',4'-tetrahidroksi flavon, apigenin 6,8-di-C-glikozit (visenin II) ve (S)-3,4,5-trihidroksi-1H-pirol-2(5H)-on (El-Desouky ve ark., 2007a).

El-Desouky ve ark. (2007b)'nın açık havada kurutulmuş yapraklarla yaptıkları diğer çalışmada su ekstresi, etilasetat ve *n*-butanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. *n*-Butanol fraksiyonundan seskiterpenik bir alkaloid olan piperazirum tanımlanmıştır.

A. palaestinum'un çoğunlukla yaprak içeren toprak üstü kısımları etanol ile ekstre edilmiş ve ekstreten 2 adet flavon-C-glikozit tanımlanmıştır: izoorientin (luteolin-6-C-glikozit) ve viteksin (apigenin-8-C-glikozit) (Afifi ve ark., 1999).

Tohumların hücre kültürü ortamında köklendirilmesi ile elde edilen sürgün, kök, kallus ve tohum örneklerinde yapılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) analizlerinde, sürgünlerde: apigenin, apigenin-6,8-diglikozit, izoorientin, kersetin, kafeik asit; köklerde: apigenin-6,8-C-diglikozit, izoorientin, orientin, kersetin; kalluslarda: apigenin-6,8-C-diglikozit ve izoorientin tanımlanmıştır (Farid ve ark., 2014).

Yapraklardan hazırlanan su ekstresinde izoorientin, viteksin, apigenin-6,8-C-diglikozit ve 2 tane yeni diketopiperazin grubu alkaloid tanımlanmıştır: 3-hidroksipiperazin-2,5-dion ve piperazin-2,5-dion (El-Desouky ve ark., 2014).

Filistin'de kansere karşı tüketilen yapraklarından hazırlanan sulu metanol ekstresinde 53 flavonoid, 33 fenolik asit, 10 terpenoid, 7 iridoid ve 6 aminoasit grubu

olmak üzere 180 tane bileşiğin ultra hızlı sıvı kromatografisi/kütle spektroskopisi-kütle spektroskopisi ile aydınlatıldığı belirtilmiştir (Abu-Reidah ve ark., 2015).

Kurutulmuş toprak üstü kısımlardan hazırlanan %70 metanol ekstresinden hazırlanan dietil eter ve etil asetat fraksiyonlarından luteolin, krizoeriyol, izoviteksin ve izoorientin izole edilmiştir. Ayrıca dietil eter fraksiyonunda GK/KS analizi ile fraksiyonun %95'ini temsil eden 15 bileşik tanımlanmıştır. Fraksiyonda yüksek oranda bulunan bileşikler; fitol, fitol asetat, linolenik asit, linoleik asit, hegzadekanoik asit, hegzahidrofarnesil asetondur (Farid ve ark., 2015).

***Arum dioscoridis* SM.**

Tohumlar temizlenip kurutulduktan sonra metanol, aseton ve hekzan kullanılarak 30 °C'de 6 saat boyunca çalkamalı maserasyona tabi tutulmuştur. Hazırlanan ekstrelerde toplam fenol ve toplam flavonoit miktarları spektrofotometrik olarak; her bir fenolik bileşik ise YBSK ile analiz edilmiştir. Ekstrelerdeki toplam fenol ve toplam flavonoit miktarları hekzan (33.5 mgGAE/g, 19.5 mgKE/g); aseton (40.1 mgGAE/g, 21.5 mgKE/g); metanol (56.8 mgGAE/g, 45.6 mgKE/g) olarak hesaplanmıştır. YBSK analizi ile *p*-kumarik asit, naringin ve ferulik asit metanol ve aseton ekstresinde; viteksin metanol ve hekzan ekstresinde; eriodiktiyol ise her üç ekstrede tanımlanmıştır (Uğuzlar ve ark., 2012).

***Arum korolkovii* Regel**

Türkiye Florası'nda kayıtlı olmayan *Arum korolkovii* yumrularından, 1:1.6 oranında glukoz ve mannoz ünitelerinin β -(1→4) bağları taşıyan aldoheksopiranoz ünitelerinden oluşan ve O-asetil-grubu içeren glukomannan türevi polisakkaritler izole edilmiştir (Khodzhaeva ve Ismailov, 1976).

***Arum orientale* BIEB.**

Yumrulardan glukomannan A ve B gibi polisakkarit türevleri izole edilmiştir. Glukomannan B bileşiği, D-glukoz, D-mannoz ve uronik asit ünitelerinden oluşmaktadır (Archardjiev ve Koleva, 1973).

Yapraklarının etil asetat fraksiyonunda preparatif kâğıt kromatografisi ve ardından poliamit kolon kullanılarak yapılan ayırmda polifenolik yapıda 6 bileşik tanımlanmıştır. Bu bileşikler orientin, izoorientin, apigenin, kersetin, kersitrin ve rutin olarak belirlenmiştir (Koleva, 1984).

Chopin ve Dellamanica (1988), bitkinin flavon-C-glikozitleri bakımından zengin olduğunu bildirmişlerdir (Chopin ve Dellamanica, 1988).

***Arum maculatum* L.**

Bitkide 'triglokinin' isimli bir siyanojenetik glikozit türevi tanımlanmıştır (Nahrstedt, 1975).

Bitkinin yumruları %3.60-3.82 protein, %0.60-0.82 yağ, %0.67-2.02 şeker, %77.05-81.18 nişasta, %1.70-1.89 kül, %1.56-2.86 ham selüloz ve %67.03 oranında su içermektedir. Total, bağlı ve serbest asitlik oranı ise sırasıyla 11.07-11.88, 9.35-10.38 ve 1.50-1.72 mekiV/100 g katıdır. Majör yağ asitleri, linoleik ve palmitik asit olarak tanımlanmıştır. Suda çözünür şeker grubundan rafinoz, sakkaroz, glukoz ve fruktoz; ayrıca galaktoz ve ksiloz tanımlanmıştır. Yumrularda

16 serbest aminoasit belirlenmiş olup total protein miktarı 6.76-7.27 g lizin/100 g olarak hesaplanmıştır (Stanimirovic ve ark., 1978).

Yumrularından aktif karbon-selit kolonda su-etanol elüsyonu ile 7 oligosakkarit ve *Aspergillus oryzae* kültüründen elde edilen selülaz ile enzimatik hidroliz sonucu 10 farklı oligosakkarit elde edilmiştir (Koleva, 1981).

Yumrularından izole edilen <2 D-glukopiranoz ve <4 mannopiranoz kalıntısı ile eser miktarda D-glukuronik asit vb içeren glukomannan M2 hidroliz edilmiştir. Hidroliz ürünleri karbon-selit (1:1) kolonda sulu etanol kullanılarak lineer gradiyent (%0-15) ile fraksiyonlanmıştır. Bu fraksiyonlardan 5 adet di- ve 5 adet trisakkarit elde edilmiştir. Disakkaritler: 4-O-β-D-mannopiranozil-D-mannopiranoz, 4-O-β-D-mannopiranozil-D-gluko-piranoz, 4-O-β-D-glukopiranozil-D-mannopiranoz, 4-O-β-D-glukopiranozil-D-glukopiranoz ve 3-O-β-D-mannopiranozil-D-mannopiranoz. Ayrıca iki adet oligosakkarit türeği belirlenmiştir (Koleva, 1983).

A. maculatum and *A. orientale* türlerinden 4 asetilli-mannan, 6 uçucu bileşik ve 8 polifenolik bileşik tanımlanmıştır (Akhtardzhiev ve ark., 1984).

Yumrularından *N*-asetillaktozamin'e spesifik bir lektin türeği izole edilmiştir. Lektinin sadece glukoprotein yapısı taşımadığı 14600 molekül ağırlığında alt ünite taşıdığı belirtilmiştir (Allen, 1995).

Bienz ve ark., (2002), bitkide fenolik aminler grubundan *N*¹,*N*⁶-dikumaroil putressin, *N*¹,*N*⁵-dikumaroil spermidin, *N*¹,*N*¹⁰-dikumaroil spermidin olduğunu kaydetmişlerdir (Bienz ve ark., 2002).

Tohumları izohekzan ile Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmuş ve triaçilgliseroller ekstre edilmiştir. Yağ asitlerinin pikolinil esterleri oluşturularak GK/KS ile analiz edilmiştir. 13-Feniltridek-9-enoik asit (total yağ asitlerinin %0.4'ü) ile 15-fenilpentadek-9-enoik asit (total yağ asitlerinin %1'i) tanımlanmıştır (Christie, 2003).

Taze yumrularından hazırlanan ekstre, %4 agaroz üzerine α-D-mannoz emdirilmiş kolonda afinite-kromatografisi uygulanarak fraksiyonlanmıştır. Saflaştırma işleminin ardından, SDS-PAGE analizi yapılarak yaklaşık 50 kDA homotetramerik lektin tanımlanmıştır (Majumder ve ark., 2005). Alencar ve ark. (2005) yumrularında 'Arum maculatum aglütinin (AMA)' isimli monokot lektin izole etmişlerdir. AMA, oligo-mannozidik-tip ve *N*-asetillaktozaminik-tip gluklan içermektedir. Yapılan başka bir çalışmada yumrularında afinite-kromatografisi kullanılarak lektin türeği bir bileşik tanımlanmıştır. Arum lektin adı verilen bu tetramer 12 kD alt üniteleri içermektedir (Van Damme ve ark., 1995).

Arum Türleri Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Literatür bilgileri incelendiğinde *Arum* türleri üzerine yapılan aktivite çalışmalarının sınırlı olduğu görülmektedir. Halk arasında çeşitli kullanımının olmasına rağmen bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmalar oldukça yetersizdir. Filistin ve Ürdün civarında *Arum palaestinum* ile ilgili çalışmalar çoğunluktadır. Çalışılan diğer türler ise *A. maculatum*, *A. dioscoridis*, *A. hygrophyllum* ve *A. euxinum* olarak belirlenmiştir. Tez materyalini oluşturan *A. italicum* ile ilgili çok az farmakolojik çalışma yapılmıştır. Bu tür üzerine yapılan araştırmalar ağırlıklı olarak botanik çalışmalarıdır.

***Arum italicum* Miller**

Güney İtalya bölgesinde deri ve yumuşak doku infeksiyonlarında kullanılan 31 bitkiden hazırlanan ekstrelerin metisiline-dirençli *Staphylococcus aureus*'a (ATCC 33593) etkileri araştırılmıştır. *Arum italicum* kök, meyve, yaprak sapı ve yapraklarından hazırlanan etanol ekstrelerinde herhangi bir etkiye rastlanmamıştır (Quave ve ark., 2008).

Ordu/Fatsa civarından toplanan bitkinin toprak üstü kısımlarının %2'lik infüzyonu ile metanol ekstresi hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrelerinin antioksidan etkilerini belirlemek amacıyla DPPH, indirgeme gücü yeteneği, hidrojen peroksit (H₂O₂) temizleme yeteneği, metal şelatlama aktivitesi araştırılmıştır. 0.5 g/L konsantrasyondaki metanol ekstresinin %56 oranında DPPH süpürücü etki ve hidrojen peroksit temizleme yeteneği ile düşük indirgeme özelliği belirlenmiştir. Ayrıca 0.1 g/L konsantrasyonda %82 oranında metal şelatlama kapasitesi göstermiştir (Yılmaz, 2008).

Arum italicum ile ilgili yapılan diğer çalışmalar ise aşağıda özetlenmiştir:

Arum italicum, *Solanum tuberosum* L. ve *Ipomaea batatas*'tan izole edilen mitokondrilerde bulunan kinon havuzunun redoks durumu ile elektron akışı arasındaki ilişki (Van den Bergen ve ark., 1994);

Lemna minor L., *Brassica oleracea* L., *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Phaseolus vulgaris* L. ve *A. italicum* gibi bitki türlerinde UV radyasyonunun (UV-A, -B, -C) ribuloz bifosfat karboksilaz enzimi üzerine etkisi (Ferreira ve ark., 1996);

A. italicum yaprak sapsarı ile *Glycine max* (L.) Merr. kotiledonlarında alternatif oksidaz kinetiğinin (AOX) hem intakt mitokondrilerde hem de kısmen saflaştırılmış enzimle araştırılması (Hoefnagel ve ark., 1997); termojenik (*A. italicum* yaprak sapsarı) ve non-termojenik (*Glycine max* kotiledonları) gibi yüksek bitki mitokondrilerinde pirüvat varlığında, indirgenmiş durumdaki ubikinon havuzu ile AOX aktivasyonu (Hoefnagel ve Wiskich, 1998);

Monoik *A. italicum*'un üç popülasyonunda fenotipik ve fonksiyonel cinsiyet modifikasyonu (Mendez, 1998);

A. italicum meyvelerinde, çeşitli olgunlaşma aşamaları esnasında oluşan pigmentlerin kökeni ve kompozisyon değişiklikleri ile plastitlerin yapısal modifikasyonları arasındaki ilişki (Bonora ve ark., 2000);

Monoik *A. italicum* çiçeklerinde seksüel kütle lokasyonu ve cinsiyet bakımından yakın akrabası olan *Arisaema dracantium* (L.) Schott ile karşılaştırılması (Mendez, 2001);

A. italicum'un iki popülasyonunda çiçeklenme özellikleri (çiçeklenme senkronu) ve döllenme durumunun, çiçeklenme ve meyve oluşumundaki etkileri (Mendez ve Diaz, 2001);

Doku lokasyonuna bağlı olarak *A. italicum* yaprak kloroplastlarında fotosistem II organizasyonu, tilakoit membranlarda bulunan plastitlerdeki farklılıkların protein-protein etkileşimleri ile karakterize olup olmadığının araştırılması (Pantaleoni ve ark., 2009);

A. italicum yapraklarında çeşitliliğin, yapısal ve fonksiyonel olarak incelenmesi (La Rocca ve ark., 2011);

A. italicum meyvelerinde fotosistem II organizasyonunda meydana gelen değişikliklerin fotosentetik aktiviteye etkileri, özellikle fotosentez merkezinin yetersizliği ile düşük fotosentez aktivitesi arasındaki ilişkinin araştırılması (Ferroni ve ark., 2013).

***Arum palaestinum* Boiss.**

Ağırlıklı olarak yapraklardan oluşan toprak üstü kısımlardan hazırlanan etanol ekstresi uygun ayırma yöntemleri kullanılarak fraksiyonlanmış, izoorientin (luteolin-6-C-glikozit) ve viteksin (apigenin-8-C-glikozit) isimli iki adet karbon glikoziti izole edilmiştir. İzoorientin'in sıçan aort, ileum, trake, uterus ve kobay uterusu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu bileşiğin doza-bağlı olarak uterusun fazık kasılma sıklığını ve genişleme özelliğini inhibe ederek miyolitik etki gösterdiği belirtilmiştir (Afifi ve ark., 1999).

Yapraklardan hazırlanan etanol ekstresinin meme (MCF-7) kanser hücrelerine karşı etkisi *in vitro* hücre kültürü yöntemleri ile araştırılmıştır. 50 µg/mL konsantrasyondaki ekstre ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinin 72 saat sonrasında %99 oranında yaşadığı görülmüştür, bu nedenle ileri çalışmalara devam edilmemiştir (Abu-Dahab ve Afifi, 2007).

Filistin'de geleneksel tıpta, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan 24 bitkiden hazırlanan ekstrelerin olası antitümör etkileri sıçan kökenli fibrosarkoma (L929sA) ve insan meme (MDA-MB231 ve MCF-7) kanser hücrelerine karşı *in vitro* denenmiştir. Halk arasında *A. palaestinum* yapraklarının kanser tedavisinde kullanımına karşın ekstrenin herhangi bir sitotoksik etkisine rastlanmamıştır (Kaileh ve ark., 2007).

El-Desouky ve ark. (2007a) tarafından kuru yapraklar 80 °C'de 3 saat boyunca su ile 2 defa ekstre edilmiş, bu ekstreten sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen etil asetat fraksiyonunun *in vitro* meme (MCF-7, IC₅₀-59 µg/mL) ve lenfosit kökenli lösemi (1301, IC₅₀-53 µg/mL) kanser hücrelerinin proliferasyonunu doza bağlı olarak baskıladığı görülmüştür. Aynı fraksiyon güçlü DPPH radikali süpürücü etki göstermiştir (SC₅₀ 3.1 µg/mL). Bu fraksiyonda şu bileşikler tanımlanmıştır: (S)-3,4,5-trihidroksi-1H-pirol-2(5H)-on, kafeik asit, izoorientin, luteolin, visenin II ve 3,6,8-trimetoksi-5,7,3',4'-tetrahidroksi flavon. Aynı ekibin yayınladıkları diğer çalışmada ise yaprak su ekstresinin *n*-butanol fraksiyonundan izole edilen seskiterpenik alkaloid olan 'piperazirum' aşağıda belirtilen insan kanser hücrelerine karşı güçlü inhibisyon göstermiştir: akciğer (A549, ED₅₀= 4.26 µM), ovaryum (SK-OV-3, ED₅₀=1.38 µM), melanoma (SK-MEL-2, ED₅₀=0.51 µM), kolon (HCT-15, ED₅₀=2.47 µM) (El-Desouky ve ark., 2007b).

Ürdün'de diyabet hastaları tarafından kullanılan 21 bitkiden hazırlanan metanol ve su ekstrelerinin antioksidan etkileri,

DPPH ve ABTS metotları kullanılarak araştırılmıştır. *A. palaestinum* yaprak metanol ekstresinin orta düzeyde antioksidan etki (24.3 mg/g DPPH-TEAK ve 116 µg/mL, ABTS-IC₅₀) gösterdiği belirtilmiştir (Al-Mustafa ve Al-Thunibat, 2008).

Toprak üstü kısımlar, 24 °C'de 72 saat boyunca etanol ile maserasyona bırakılmıştır. Bu ekstrenin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser etkileri araştırılmıştır. Kabul edilebilir DPPH süpürücü etki (IC₅₀, 380 µg/mL) ile antioksidan etki (β-karoten/linoleik asit deneyi) göstermiştir. Antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi amacıyla, disk difüzyon yöntemi seçilerek *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ve *Escherichia coli* (JM109) gibi bakteriler ile *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum*, *T. violaceum* ve *Microsporum canis* gibi funguslar kullanılmıştır. Ekstrenin *T. tonsurans*'a karşı güçlü antifungal etki (IC₅₀, 37.5-50 µg/mL) gösterdiği belirtilmiştir. *In vitro* hücre kültürü ile meme (MCF-7) ve prostat (PC3) kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki araştırılmıştır. Ekstrenin 500-600 µg/mL konsantrasyonlarda meme kanserine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Husein, 2010).

Bitkiden hazırlanan kloroform, etilasetat ve metanol ekstrelerinin antioksidan etkilerinin (FRAP, DPPH) fenolik ve flavonoid içerikleri ile pozitif korelasyon gösterdikleri, 48 saatte T hücre lenfoblastik lösemi, Jurkat hücre proliferasyonunu azalttıkları belirlenmiştir. Etil asetat, metanol ve kloroform ekstrelerinin IC₅₀ değerleri sırasıyla 17.5±2.1 µg/mL, 19.7±2.8 µg/mL ve 23.3±2.8 µg/mL olarak verilmiştir. Antiproliferatif etkinin doza bağlı olarak arttığı kaydedilmiştir (Diab-Assaf ve ark., 2012).

Kuru yapraklardan 10 dk suda kaynatılarak hazırlanan ekstrenin 1000 µg/mL konsantrasyonda, prostat (PC3), kolon (HCT116) ve akciğer (A549) kanser hücrelerine karşı herhangi bir sitotoksik etkisine rastlanmamıştır. Ayrıca apoptoz üzerine etkisi gözlenmemiş ve hücrelerde herhangi bir morfolojik değişime rastlanmamıştır (Said, 2013).

Yaprak su ekstresinden izole edilen diketopiperazin yapısındaki 3-hidroksipiperazin-2,5-dion, multi-ilaç direnci kazanmış insan uterus karsinoma (MES-SA/DX5) hücrelerine karşı ED₅₀ 3.44 µM dozu ile sitotoksik etki göstermiştir (El-Desouky ve ark., 2014).

Kurutulmuş toprak üstü kısımlardan hazırlanan %70 metanol ekstresinin larinks epiderma karsinoma (Hep2), serviks (HeLa), karaciğer (HepG2) ve meme (MCF7) insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkisinin araştırıldığı güncel bir çalışmada, tedavide kullanılan doksorubisin ile kıyaslanabilir düzeyde etki görülmüştür. Çalışma kapsamında izole edilen luteolin (Hep2, IC₅₀-9.98 µg/mL; HeLa, IC₅₀-16 µg/mL; HepG2, IC₅₀-17.8 µg/mL; MCF-7, IC₅₀-21.8 µg/mL), krizoeriyol (Hep2, IC₅₀-12.2 µg/mL; HeLa, IC₅₀-16.4 µg/mL; HepG2, IC₅₀-23 µg/mL; MCF-7, IC₅₀-18.2 µg/mL), izoorientin (Hep2, IC₅₀-18.8 µg/mL; HeLa, IC₅₀-32.3 µg/mL; HepG2, IC₅₀-20 µg/mL; MCF-7, IC₅₀-19.9 µg/mL) ve izoviteksin (Hep2, IC₅₀-22.7 µg/mL; HeLa, IC₅₀-20.5 µg/mL; HepG2, IC₅₀-21.7 µg/mL; MCF-7, IC₅₀-18.5 µg/mL) kanser hücrelerine karşı dikkate değer sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca ham ekstreten hazırlanan dietil eter fraksiyonunun (Hep2, IC₅₀-3.83 µg/mL; HeLa, IC₅₀-4.13 µg/mL; HepG2, IC₅₀-3.68 µg/mL; MCF-7, IC₅₀-3.53 µg/mL) doksorubisin (Hep2, IC₅₀-3.73 µg/mL; HeLa, IC₅₀-4.19 µg/mL; HepG2, IC₅₀-4.28 µg/mL; MCF-7, IC₅₀-4.43 µg/mL) kadar etkili olduğu belirlenmiştir. Dietil eter fraksiyonunda GK/KS analizi ile fitol (%25.3), fitol asetat

(%5.1), linolenik asit (%22.4), linoleik asit (%6.5), hegzadekanoik asit (%21.9) tanımlanmıştır ve güçlü sitotoksik etkiden sorumlu bileşikler olduğu düşünülmüştür (Farid ve ark., 2015).

***Arum maculatum* L.**

Sakarya civarında ‘mayasıl kökü’ olarak bilinen bitkinin kökleri mantar enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. Köklerinden hazırlanan petrol eteri ve etanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerini belirlemek amacıyla *Staphylococcus aureus* (ATCC 6558), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1539), *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis* ve *Candida albicans* (ATCC 10231) kültürleri kullanılmıştır. Petrol eteri ekstraktının test edilen mikroorganizmalardan *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. typhi*’ye karşı etkili olduğu agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ancak en yüksek etkiyi *S. epidermidis*’e (MİK, 39.1 mg/mL) karşı göstermiştir (Uzun ve ark., 2004).

Yumrularından izole edilen mannoz-bağlı yaklaşık 50 kDa homotetramerik lektinin, insektisidal etkisini belirlemek amacıyla ekonomik olarak önemli *Lipaphis erysimi* (Kalt.) ve *Aphis craccivora* (Koch) isimli pestlerin diyetlerine lektin ilave edilmiştir. LC₅₀ değerleri, *L. erysimi* ve *A. craccivora* için sırasıyla 21 µg/mL ve 16 µg/mL olarak hesaplanmıştır. α-D-mannozun *L. erysimi* ve *A. craccivora* bağırsaklarındaki mikrovilluslarda bulunan proteinlere bağlanabildiği gözlenmiştir (Majumder ve ark., 2005).

Yumrularından izole edilen ve bir monokot lektin olan ‘*Arum maculatum* aglütinin’ (AMA), oligo-mannozidik ve N-asetillaktozaminik tip glukan olmak üzere 2 farklı zincir taşımaktadır. Alencar ve ark. (2007), AMA’nın immün sistem hücreleri üzerine etkisini araştırmıştır. AMA’nın intraperitoneal olarak ratlara uygulandıktan 4 saat sonra, önemli ölçüde ve doza-bağlı olarak nötrofil göçünü indüklediği belirtilmiştir. Ayrıca makrofaj ve nötrofilleri aktive ettiği kaydedilmiştir.

Kurutulmuş yapraklar toz edilerek su ekstresi hazırlanmış ve 0.1 mL/kg kütle ağırlığında farelere uygulanmıştır. Farelerde ciddi ölçüde kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksin düştüğü belirtilmiştir. Ekstrenin mitotik yollarda anomalilere yol açtığı ve bu etkilerin de şu şekilde gerçekleştiği belirtilmektedir: mikro ve çoklu çekirdekli, anormal profaz, C-metafaz, yapışkan kromozomlar, fragmentler, bağlar, toplanamama ve gecikmeler. Asıl etkinin interfaz safhasında olduğu görülmüştür (Nabeel ve ark., 2008).

Kahramanmaraş civarından toplanan bitkinin yapraklarından petrol eteri, %70 metanol ve etil asetat kullanılarak Soxhlet aparatı ile ekstraktlar hazırlanmıştır. Ekstrelerin antimikrobiyal etkileri agar-well difüzyon yöntemi kullanılarak gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler, küf ile mayalara karşı araştırılmıştır. Her üç ekstrenin de *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas phaseolicola*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter aerogenes*, *Aspergillus niger* mikroorganizmalarına karşı iyi aktivite gösterdiği, en yüksek etkinin ise *B. cereus*’a karşı olduğu belirlenmiştir (Çolak ve ark., 2009).

Osmaniye’den toplanan bitkinin toprak üstü kısımları kurutulduktan sonra 30 °C’de 24 saat boyunca su ile çalkalamalı maserasyona bırakılmış, elde edilen su ekstresi liyofilize edilmiştir. Ekstrenin olası antioksidan, antimikrobiyal ve DNA koruyucu

etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. β -karoten/linoleik asit metodunda ekstrenin linoleik asit oksidasyonunu %88 oranında engellediği ve bu etkinin bütillenmiş hidoksianisol (BHA)'den daha yüksek olduğu görülmüştür. DPPH radikal süpürücü etkisi çok düşük; indirgeme gücü ise BHA ve BHT (bütillenmiş hidroksitoluen)'ya göre düşük olmakla birlikte kayda değer bir etki bulunmuştur. Ekstrenin DNA koruyucu etkisinin en az 70 mg/mL konsantrasyonlarda mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır. *Shigella boydii*, *S. dysenteriae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*'ye karşı antimikrobiyal etkilerinin 72 $\mu\text{g/mL}$ 'den daha yüksek konsantrasyonlarda görülebileceği kaydedilmiştir (Berk, 2012).

***Arum dioscoridis* SM.**

Ürdün'de bir marketten temin edilen bitkinin yapraklarından hazırlanan sulu ve metanollü ekstrelerin lipit peroksidasyonu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla sıçan karaciğer homojenatları ile çalışılmış, sulu ekstrenin yaklaşık %60 oranında inhibisyon sağladığı belirtilmiştir. Bu etkinin de okzalik asitten kaynaklandığı, okzalıkların membrandaki çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonunu indüklediği ve dokulara zarar verdiği düşünülmektedir (Janakat ve Al-Thnaibat, 2008).

Antalya'dan toplanan bitkiden tohumlar ayrılarak, metanol, aseton ve hekzan ekstreleri hazırlanmış, bu ekstrelerin β -karoten/linoleik asit sistemi ve DPPH süpürücü etkiye dayanarak olası antioksidan etkileri araştırılmıştır. Metanol ekstresinin diğer ekstrelerle oranla her iki sistemde daha güçlü antioksidan etki gösterdiği görülmüştür. Etkiden sorumlu bileşikler ise ferulik asit, naringin, eriyodiktiyol ve *p*-kumarik asit olarak belirlenmiştir (Uguzlar ve ark., 2012).

***Arum korolkovii* Regel**

Kırgızistan florasında bulunan çeşitli bitkilerden hazırlanan ekstrelerin belirlenen 3 tarımsal peste karşı insektoakarizidal ve yıldırıcı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *A. korolkovii*'nin toprak üstü kısımlardan etanol ile hazırlanan ekstrenin %67 oranında yıldırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir (Chermenskaya ve ark., 2010).

***Arum hygrophyllum* Boiss.**

'Yeşil arum' ismiyle bilinen *A. hygrophyllum* bakteriyel enfeksiyonlar, kanser, zehirlenme ve dolaşım sistemi rahatsızlıklarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Khalil ve ark. (2009) bitkinin toprak üstü kısımlarından %95 etanolla hazırladıkları ekstrede 'hole-plate difüzyon' metodu ile *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı etkileri incelemişlerdir. Ancak ekstrenin bu mikroorganizmalar üzerinde herhangi bir etkisine rastlanmamıştır.

***Arum euxinum* R. MILL**

Endemik bir tür olan *A. euxinum*'un toprak üstü kısımları Bolu'dan toplanmış ve su, etanol ve metanol ekstreleri hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstrelerin agar difüzyon metodu ile antibakteriyel; 'patates disk' metodu ile de antitümör etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda ekstrelerin zayıf antitümör (%36-52) etki gösterdiği; denenen *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Serratia marcescens* (ATCC 8100), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Enterobacter cloacae* (ATCC 23355) ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) mikroorganizmalarına karşı tüm ekstrelerin etkisiz olduğu görülmüştür (Türker ve Yıldırım, 2013).

***Arum italicum* Yumrularında Tanımlanmış Bileşikler ile İlgili Genel Bilgiler**

Bu başlık altında literatür bilgileri göz önüne alınarak *A. italicum* yumrularında tanımlanan lignan türevleri ve fitosteroller ile ilgili bilgiler özetlenmiştir.

Lignan ve glikozitleri

Lignanlar, bitkiler âleminde özellikle gıda olarak kullanılan cinslerde bulunan fenilpropanoit kökenli sekonder metabolitlerin bir grubunu oluşturur. Lignanlar, şikimat yolağı ile iki fenilpropanoitin C8 (C8-C8) zincirlerinden ve bazen eter, lakton ya da karbon bağları ile oluşurlar (Aehle ve ark., 2011; Masuda ve ark., 2010; Penttinen-Damdimopoulou ve ark., 2009; Rahman ve ark., 2007).

Hücrede, ferulik, *p*-kumarik, sinapik asit gibi hidroksisinnamik asit türevi olan monolignollerin dimerizasyonu ile lignanlar ya da hücre duvarında polimerizasyonu sonucu ile ligninler meydana gelmektedir. Bu oluşan bileşiklerin, antioksidan, biyosit, fitoaleksin olarak rol oynadıkları, pestlere ve diğer hastalıklara karşı korudukları ve bitkinin büyüme faaliyetlerine katıldıkları bilinmektedir. Lignanlar bitkilerde serbest halde ya da glikozit formunda bulunmaktadırlar. Pinorezinol, sekoizolarisirezinol, şiringarezinollerin diglikozit formları yaygındır. Ayrıca bazen daha kompleks glikozitlerine rastlanmaktadır (Fischer ve ark., 2012; Peterson ve ark., 2010; Rahman ve ark., 2007; Schroeder ve ark., 2006).

Özellikle yüksek miktarlarda meyve, tohum, sebzelerde ayrıca bira, şarap, kahve ve meyve suyu gibi içeceklerde bulunmaktadırlar. Keten tohumu, lignanlar bakımından en zengin kaynaklardan biridir; sekoizolarisiresinol majör bileşiktir ve glikozit olarak depolanır. Gıdalar içinde total lignan içeriği bakımından en zengin olan susamdır. Lipofilik karakterli sesamin ve sesaminol başlıca lignan türevi bileşiklerdir (Sok ve ark., 2009).

Lignanların yeterli miktarlarda tüketilmesi sonucunda yararlı etkilerinin olduğu ve çeşitli rahatsızlıkları önledikleri bilinmektedir. Ateroskleroz riskinin azaltılması, kanserin önlenmesi, platelet aktive edici faktörün inhibisyonu, inflamasyonun önlenmesi, felç ve oksidatif stres riskinin önlenmesinde rol oynamaktadırlar (Chen, Y.C. ve ark., 2007; Kupeli ve ark., 2003; Wu ve Wu, 2006; Xu ve ark., 2006; Yoshikawa ve ark., 2006). Bu özelliklerinin bazıları lignanların antioksidan etkileri ile ilişkilendirilmektedir.

Matairezanol, sekoizolarisirezinol, larisirezinol ve pinorezinol gibi basit lignanların fitoöstrojen olarak rol oynadıkları, bu etkilerinin ise memeli bağırsak mikroflorası tarafından östrojenik ya da antiöstrojenik etkili olan enterolakton ve enterodiole dönüştürülmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Lignan glikozitleri, bağırsak bakterileri tarafından metabolize edildikten sonra gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilirler. Siklolarisirezinol, larisirezinol, matairezanol, pinorezinol, sekoizolarisirezinol ve şiringarezinol gibi metabolize edilemeyen

lignanlar ise aglikon halinde bağırsaklardan absorbe edildiğinden idrarda tayin edilebilmektedirler.

Keten tohumu ile zengin diyetle beslenme sonrasında serum enterolakton düzeylerinde artış gözlenmektedir, ancak keten tohumu ilk tüketildiği zaman enterodiol konsantrasyonu da artmaktadır. Lignanların tüketiminden 8-10 saat aralığında plazmada sadece enterolakton gözlenmektedir. Bu nedenle lignanlarla ilgili çalışmalarda enterolakton 'biyomarker' olarak kullanılmaktadır. Lignanlar, idrar veya safra ile atılmaktadır ya da tekrar bağırsaklardan emilerek, enterohepatik sıklusa katılmaktadırlar (Jin ve ark., 2007; Sonestedt ve Wirfalt, 2010).

Yapılan *in vitro*, *in vivo* ve bazı epidemiyolojik çalışmalar doğrultusunda, lignanlarca zengin diyetin yapılması ya da gıda desteklerinin kullanımının menopozal semptomların, osteoporoz, kanser ve diğer östrojen-ilişkili rahatsızlıkların önlenmesinde önemli rol oynadıkları belirtilmektedir (Chen, L.H. ve ark., 2007; Duncan ve ark., 2003; McCann ve ark., 2006; Power ve ark., 2007; Webb ve ark., 2005). Lignanlar, insan ve hayvanlarda östrojen benzeri aktivite gösterdikleri için hormon-bağımlı meme ve kolon kanserlerinde etkili oldukları epidemiyolojik çalışmalarla açıklanmaktadır (Chen, J. ve ark., 2007; Saarinen ve ark., 2007; Travis ve ark., 2009; Wu ve ark., 2007).

Touillaud ve ark. (2007)'de yaptıkları bir çalışmaya göre, soya ile beslenmeyen Batı toplumlarında, östrojen ve progesteron-pozitif postmenopozal meme kanseri riskinin, yüksek miktarda lignan içeren diyet ve enterolignanlara bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Aehle ve ark., 2011; Blitz ve ark., 2007; Bobe ve ark., 2012; Bonzanini ve ark., 2009; Bravi ve ark., 2011; Corsini ve ark., 2010; Cosentino ve ark., 2007; Cukelj ve ark., 2011; Dachtler ve ark., 2003; Kikuzaki ve ark., 2004; Kuhnle ve ark., 2009; Lee ve Yen, 2006; Lindahl ve ark., 2011; Mabrok ve ark., 2012; Miura ve ark., 2007; Penttinen-Damdimopoulou ve ark., 2009; Peterson ve ark., 2010; Saggat ve ark., 2010; Sonestedt ve Wirfalt, 2010; Tominaga ve ark., 2012; Touillaud ve ark., 2007; Velentzis ve ark., 2009; Yamashita ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2011).

Lignanlar üzerine yapılan çalışmalarda, sitotoksik ve antitümör/antikanser aktivitelerinin yanında hepatoprotektif, antiviral, antifungal, antileşymanyal, antianjiyojenik, hipolipidemik, antidiyabetik, antiromatik etkileri ve ayrıca kolinesteraz, 5-lipoksijenaz, fosfodiesteraz IV ve V gibi bazı spesifik enzimlere karşı inhibisyon etkileri görülmektedir (Song ve Fischer, 1999; Akiyama ve ark., 2007a; Akiyama ve ark., 2007b; Azhar-Ul-Haq ve ark., 2004; Bodiwala ve ark., 2007; Boluda ve ark., 2007; Y. L. Chen ve ark., 2007; Cho ve ark., 2007; Gan ve ark., 2005; Gao ve ark., 2003; Jasemine ve ark., 2007; Jeong ve ark., 2007; Kucukboyaci ve ark., 2010; Li ve ark., 2005; Lima ve ark., 2007; Maruyama ve ark., 2007; Sonestedt ve Wirfalt, 2010; Topcu ve Demirkiran, 2007; Tuntiwachwuttikul ve ark., 2006; Xu ve ark., 2008; Zheng ve ark., 2009).

Sekoizolarisirezinol diglikozit, anjiyojenik ve antiapoptotik etkili olduğundan kardiyoprotektif olarak iskemik kalp hastalığında etkilidir (Penumathsa ve ark., 2007; Prasad, 2009). Ayrıca sekoizolarisirezinol diglikozit ve sekoizolarisirezinol kuvvetli antioksidan etki ve DPPH süpürücü etki göstermektedir (Fuchs ve ark., 2007; Hosseinian ve ark., 2007; Hu ve ark., 2007).

Susam çekirdeklerinde bulunan sesamin ve sesaminol, susam yağından izole edilmiş lignan türevi iki bileşiktir. Sesaminin antioksidan, antikarsinojen, kan basıncını düşürücü ve serum lipitlerini düşürücü etkileri kayıtlıdır. Sesamin'in serum ve karaciğer lipit oksidasyonunu önleyici etkisinin sesaminol'e kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Lim ve ark., 2007).

Podofilotoksin, ilk olarak *Podophyllum* cinsinden izole edilen antimitotik etkili siklolignan türevi bileşik olup, yeni antikanser ilaçların sentezlenmesine öncülük etmiştir. Yarısentetik türevleri olan tenipozit ve etopozit, çeşitli kanser türlerinin klinikte tedavisinde hala kullanılmaktadırlar (Magedov ve ark., 2007). Güneybatı Amerika'da halk arasında deri iritasyonları ve ağrılarda kullanılan *Larrea tridentata* (DC) Coville bitkisinden elde edilen nordihidroguyaretik asit (NDGA), lignan türevi bir bileşik olup lipofilik özelliktedir. NDGA, bilinen bir lipoksijenaz enzim inhibitörüdür (Billinsky ve ark., 2007; Culver ve ark., 2005; Lambert ve ark., 2004).

Bitkisel kaynaklardan lignanların izolasyonu için geleneksel yöntem çözücü ekstraksiyonudur. Çözücü olarak genellikle aseton, etanol ve metanol seçilir. Ancak glikozit formundaki lignanların da ekstraksiyonu için çözücüye belli oranda su ilave edilerek polarite artırılabilir. Ayrıca bazı lignanlar için sıcakta çözücü ekstraksiyonu daha uygun olmaktadır. Uygun çözücü ekstraksiyonundan sonra normal faz silika kolon ile flaş kromatografisi uygulanarak ya da kristalizasyon ile lignanlar saflaştırılabilir. Ayrıca kolon kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi (OBSK), yarı-preparatif YBSK, preparatif ince tabaka kromatografisi (İTK) gibi yöntemler de lignanların izolasyonunda kullanılmaktadır. Lignan tipine göre ters faz ya da normal faz kromatografisi uygulansa da silikajel ile daha iyi bir ayırım yapılabilmektedir (Sok ve ark., 2009).

Fitosteroller

Bitki sterolleri, biyoaktif bileşikler olup 28 ya da 29 karbonlu triterpenik alkollerdir. Fonksiyonları (bitkisel hücre membranlarının fosfolipit tabakalarının kararlılığının sağlanması) ve kimyasal yapıları (steroit çekirdeği, 3- β -hidroksil grubu, 5,6 çifte bağ) bakımından kolesterole oldukça benzemektedirler. Kolesterolden farklı olarak daha fazla etil ya da metil grubu veya çifte bağ içerirler, yan zincirlerinde 9-10 karbon atomu taşırlar. Fitosteroller kolestan serisinin 4-demetilsterol sınıfı olarak tanımlanmakta ve halka sistemindeki 5. karbonlarında çifte bağ içermektedirler. Kimyasal yapıları ve biyosentez yollarına bağlı olarak fitosteroller, 4-desmetil sterol, 4 α -monometil sterol ve 4,4-dimetilsteroller olarak alt gruplara ayırmak mümkündür.

Bitkilerde, 250'den fazla farklı tipte fitosterol tanımlanmıştır, en çok bulunanlar ise β -sitosterol (24- α -etilkolesterol), kampesterol (24- α -metilkolesterol) ve stigmasteroldür (Δ^{22} , 24- α -etilkolesterol). Ergosterol ($\Delta^{7,22}$, 24- α -etilkolesterol) ise mayaların temel sterolü olup mısır, pamuk tohumu, fıstık ve keten tohumlarında bol miktarda bulunmaktadır (Kritchevsky ve Chen, 2005; Lagarda ve ark., 2006; Brufau ve ark., 2008).

Doğada steroller serbest halde ya da konjuge halde bulunurlar. Sterollerin 3 β -hidroksil gruplarının bir yağ asidi ya da hidroksisinnamik asit esterleri ve hekzozlarla (genellikle glukoz) oluşturduğu glikozitlerine rastlamak mümkündür. Glikozit formları daha çok tahıllarda bulunmaktadır. Fitostanoller ise fitosterollerin

tamamen doymuş altgruplarıdır (Lagarda ve ark., 2006). Triterpenik bileşiklerin biyosentezi, 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A (HMG-CoA)'nın (6 karbonlu) mevalonata (5 karbonlu) indirgenmesi ile başlamaktadır. Altı mevalonat ünitesi iki farnesil difosfat molekülüne dönüşür, bundan hareketle de 30 karbonlu skualen sentezlenmektedir. Enzimatik reaksiyonlarla triterpenler, triterpenlerden de fitosteroller üretilmektedir (Moreau ve ark., 2002).

Temel fitosterol kaynakları, bitkisel yağlar, kuru meyveler, tahıllar, tahıl ürünleri ayrıca lahana, brüksel lahanası, karnıbahar, yeşil ve siyah zeytindir. Batı tarzı beslenmede yumurta sarısı, karaciğer ve kabuklu hayvanlar da en önemli fitosterol kaynaklarıdır. Ticari çam sakızı yağı, %80 oranında β -sitosterol içermektedir. Dünya genelinde fitosterollerin tüketimi farklılık göstermekle birlikte günlük alım miktarları 167 mg/gün ile 375 mg/gün arasında değişmektedir. Stanollerin tüketimi ise 50 mg/gün olarak belirtilmektedir (Marangoni ve Poli, 2010). Fitosteroller insanlar tarafından üretilemezler, bu nedenle diyetle alım ve absorpsiyon özelliklerine göre günlük tüketim miktarı bireysel değişmektedir. Kolesterolün insanlarda absorpsiyonu %30-60 oranında değişirken fitosterollerin emilimi oldukça düşüktür. Kampesterolün emilim düzeyi %9.4-14.8 oranında olup β -sitosterolün (%3.1-4.5) emilim düzeyinin yaklaşık 3 katı kadardır ve stigmasterolün emilimi ise yaklaşık %4 civarındadır. Steroller vücutta emildikten sonra, intestinal enterositlere gönderilir ve sirkülasyona (şilomikron olarak) katılır. %69-70 oranında düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), % 24 oranında yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve %6 oranında çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) kolesterole dağılır. Safra yolu ile vücuttan atılırlar (Garcia-Llatas ve Rodriguez-Estrada, 2011).

Steroller, farmasötik endüstride (steroidal ilaçların üretimi), gıdalarda (fonksiyonel gıdalarda kolesterol düşürücü etkili katkı maddesi) ve kozmetik alanda (krem, dudak koruyucular vb) kullanılmaktadır (Abdallah ve ark., 2015). Fitosterollerin ana rolleri ise kolesterolün düşürülmesidir. Bilindiği üzere, LDL-kolesterol ya da total kolesterolün serum düzeylerinde aşırı artışı kalp-damar hastalıkları için büyük risk oluşturmaktadır. Bu riskin minimuma indirilmesi için serum kolesterol düzeyinin istenilen aralıklarda tutulması gerekmektedir. 4-desmetil steroller (β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol) güçlü hipokolesterolemik etki göstermektedir. Bu etkilerini ise diyetle ve safrayla alınan kolesterolün ince bağırsaklardan absorpsiyonunu engelleyerek göstermektedirler. Bunun aksine, 4,4-dimetil steroller (lupeol, α -amirin, sikloartenol vb) serum kolesterol düzeylerini minimum düzeyde düşürmektedirler (Fernandez ve Cabral, 2007; Brufau ve ark., 2008). Fitosterollerin antioksidan aktiviteleri, antikanser etkileri, antiinflamatuvar etki ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine olumlu etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Moreau ve ark., 2002; Quilez ve ark., 2003; Kritchevsky ve Chen, 2005; Lagarda ve ark., 2007; Chen ve ark., 2015).

Biyolojik Aktiviteler ile İlgili Genel Bilgiler

Kanser

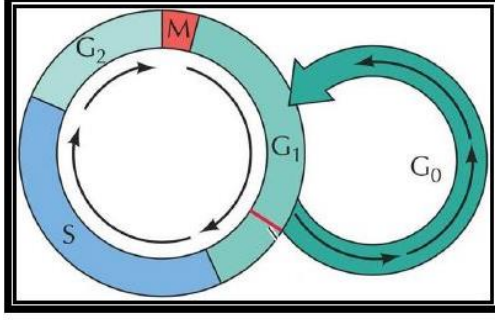
Kanser, Latince kökenli bir kelime olan ve yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiştir. Yunanlı hekim Hipokrat, hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek bu tanımlamayı yapmıştır. Kanser ve karsinoma kelimeleri ilk olarak M.Ö. 460-370 yıllarında Hipokrat tarafından ‘karsinoma ve karsinoz’ ile ifade edilirken, M.Ö. 130-200 yıllarında Galen tarafından şişlik anlamına gelen “onkos” terimi kullanılmıştır.

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda meydana gelmektedir. Normalde hücrelerin büyümesi ve çoğalması bir düzen içerisinde olmaktadır. Ancak hücrelerin anormal şekil ve hızla büyümeye ve çoğalmaya başlamaları, tümör adı verilen kitlenin oluşumuna yol açar. Tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilir ya da tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir. Vücutta en çok kanlanan akciğer, beyin, karaciğer gibi organlar en çok metastaz gerçekleşen organlardır. Ancak anormal hücreler hangi organdan köken alıyorsa hastalık buna göre isimlendirilir (Güran, 2005; Karaca, 2008; Kara, 2012; Mrsny, 2013; Kumar ve Kumar, 2014).

Kanser oluşum etiyojisini, edinsel ya da genetik mutasyona bağlı olarak birtakım farklılaşmalar şekillendirir. Bu gelişimde, hücreye dışardan etki edebilecek bazı dış genotoksik faktörler (sigara, iritasyon, virüs) ya da bazı iç faktörler (kalıtsal mutasyonlar, kendini onarma mekanizması ve hormonlar gibi) etkin rol almaktadır. Kansere neden olan bu maddelere kanserojen denilmektedir. Kanser oluşumunda, çevresel faktörler %90-95 oranında, genetik faktörler ise %5-10 oranında etki etmektedir. Hücrelerin sürekli mutasyonel faktörlere ya da kanserojenlere maruz kalmaları, hücrelerde anormal bir karakteristiğin ortaya çıkmasına ve hücre büyümesinde rol oynayan bazı genlerin ekspresyonlarında anormalliklere sebep olmaktadır. Bu anormal değişimler, dokularda amaçsız çoğalan ve bölünmesi hücresel sinyal mekanizmalarının kontrolü dışında gerçekleşen kanser türlerinin oluşmasına sebep olmaktadır (Preston-Martin ve ark., 1993; Aiello-Laws, 2011; Eggert, 2011; Kumar ve Kumar, 2014).

Tümör hücrelerinin çevre dokulara yayılış özellikleri isimlendirmede önemli bir kriter olup, yayılış özelliğine göre iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) tümörler olarak adlandırılır. Benign tümörler çevre dokulara metastaz yapmaz ve cerrahi yolla uzaklaştırılabilmektedirler. Oysa malign tümörler, tümöral bölgeden vücudun çeşitli organ ve dokularına metastaz yapabilme, sürekli çoğalabilme, anjiyojenez (yeni damar oluşumu) özelliğine sahip, apoptozdan korunan ve anti-büyüme sinyallerine duyarlılık göstermeyen kanser çeşididir (Kara, 2012).

Normal hücre siklusu **Şekil 3**'de şematize edilmiştir:



Şekil 3. Hücre Yaşam Çevriminde Evreler (Yerdelen, 2009)

1. G0 evresi (dinlenme evresi): Hücre henüz bölünmeye başlamamıştır.
2. G1 evresi: DNA senteziyle ilgili enzimlerin ve RNA'nın sentezlendiği dönemdir.
3. S evresi: DNA içeriği kopyalanır. Böylece oluşan her iki yeni hücre aynı DNA içeriğine sahip olur.
4. G2 evresi: Hücre DNA kopyalarını kontrol eder ve bölünmeye hazırlanır.
5. Mitoz evresi (M): Hücre içindeki bütün bileşenler çiftlenmiştir ve bölünmeyle iki yeni hücre oluşur.

Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın fonksiyonudur. Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazdan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktive edilir ve ardından inaktifleştirilirler (Karaca, 2008).

Meme kanseri

Meme kanseri gelişmiş ülkelerde kadınlarda en sık görülen kanserdir. Mortalite ile sonuçlanan kadın kanserlerinde, akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Meme kanseri dünyadaki her altı kadından birinde, invaziv meme kanseri ise her sekiz kadından birinde gelişebilmektedir (Bulut, 2012).

Meme kanseri risk faktörlerinden en önemlileri cinsiyete bağlı olarak östrojene uzun süre maruz kalma ve ileri yaştır. Erken yaşta adet görme ya da geç (> 55) menopoza girme durumlarında östrojene maruziyet artmakta ve kanser riski artmaktadır. Ayrıca menopoz şikâyetlerinde kullanılan hormon ilaçları 5 yıldan fazla süre ile kullanılıyorsa risk daha çok artmaktadır. Genç yaşta ve 10 yıldan uzun süreli doğum kontrol haplarının kullanılması da meme kanseri riskini arttırmaktadır. Anne, kız kardeş, teyze gibi aile öyküsünde kanser olan kişilerde risk yüksek olmakla birlikte bazı durumlarda genetik mutasyonlara bağlı olarak da kanser görülmektedir. Meme kanserinin görülmesinde diyetin etkisi önemlidir. Lifli gıdalarla beslenme bu riski azaltırken, yüksek oranda yağ içeren besinlerin tüketilmesi riski arttırmaktadır. Ayrıca günde 1 bardaktan fazla alkol tüketimi, östrojen seviyelerini arttırdığından riski yükseltmektedir (Yeğin, 2009; Bulut, 2012).

Meme kanserinin insidansı ve mortalite verileri ülkelerin coğrafi konumlarına, etnik kökenlere, sosyoekonomik durumlarına göre değişiklik göstermekle birlikte, dünya genelinde meme kanseri insidansında artış, mortalitesinde ise azalma izlenmektedir. Meme kanseri dünyada yıllık 1 milyon yeni tanı ve yaklaşık 373.000 ölüm vakasıyla kadınlarda en önemli kanser nedenleri arasındadır. Meme kanserinden ölüm oranları 1990'dan beri azalma göstermektedir ve bu oran 50 yaşından genç kadınlarda yılda %3.3, 50 yaş ve üstünde %2 azalma olarak görülmektedir. Bu azalma erken tanı ve tedavinin gelişmesine bağlanmaktadır (Korkmaz, 2012).

Ülkemizde Kanser Daire Başkanlığı'nın yaptığı taramalara göre 2013 yılı verileri 2012 yılı ile kıyaslandığında meme kanseri taramaları yurt genelinde %9 artış göstererek 1.700.000'e; mamografi sayısı %63 artış ile 240.000'e ulaşmıştır. Yine bu kurumun yayımladığı 2009 yılı istatistik verilerine göre, kadınlarda yaşa göre meme kanser hızının %40.6 oranında olduğu, kanser evrelerinin dağılımı ise şu şekilde sıralanmıştır: %47.6 lokalize, %44.0 bölgesel ve %8.4 oranında ise uzak yayımlı olduğu görülmüştür ([http-1](http://1)).

Erken tanı ile tedavide başarıya ulaşma şansı artmaktadır. Meme kanserinde kemoterapi, hormonoterapi, monoklonal antikorla tedavi ya da radyoterapi tedavi seçeneklerindedir. Kemoterapötik ajanların en önemli etki mekanizması apoptozdur (Demirci, 2010).

Tez çalışması kapsamında ilk olarak **MCF-7** kanser hücre dizileri seçilmiştir. Bu hücre dizileri, 1970'lerde metastatik meme kanseri olan bir hastadan pleval efüzyon ile izole edilmiştir. Meme kanseri ile ilgili çalışmalarda en çok tercih edilen hücre dizisi MCF-7'dir. Östrojen reseptörü pozitif, kaspaz-3 negatiftir. Daha az oranda invazivdir.

Akciğer kanseri

Akciğerler, yaklaşık 140 m²'lik iç yüzey alanına sahip ve vücudumuzda çevre ile temas eden en büyük organdır. Her nefes alışveriş ile çevreden birçok partikül akciğerlere taşınır, bir kısmı akciğerlerde depolanırken, bir kısım da dışarı atılır (Koparal, 2001).

Akciğer kanseri, solunum epitelinin bulunduğu bronş, bronşiyol ve alveollerden köken alan, gelişiminde multipl preneoplastik yolaklar, multipl genlerde mutasyonlar içeren, genetik olarak heterojen, instabil ve yüksek derecede kompleks klonal bir hastalıktır. Mezotelyoma, lenfoma ve stromal tümörler (sarkomalar), epitelyal tümörler dışında değerlendirilmektedirler (Arslan, 2011).

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarına kadar nadir görülen bir hastalık iken tütün kullanımının artması ve toplumda alışkanlık haline dönüşmesine paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada erkek ve kadınlarda kanserle ilişkili ölümlerin en yaygın nedenlerinden biri haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılmış olan GLOBOCAN (2008) kanser çalışmasının verilerine göre, tüm dünyada yeni tanı konulan akciğer kanseri vaka sayısı 1.608.000 olarak tespit edilmiş ve bu sayı tüm yeni tanı alan kanser vakalarının %12.7'sini oluşturmaktadır. Bu vakaların 723.000 (%44.9)'i gelişmiş ülkelerde, 885.000 (%55.1)'i gelişmemiş ülkelerde tespit edilmiştir. Yeni tanı konulan 1.608.000 vakanın, 1.095.000 (%68)'i erkek, 513.000 (%32)'i kadındır. Yine dünyada 2008 yılındaki akciğer kanser tanısı

ile olan ölümlerin toplam sayısı 1.378.000 olarak tespit edilmiş ve bu sayı tüm kanser ölümlerinin %18.2'sini oluşturmaktadır. Bu vakaların 599.000 (%43.5)'i gelişmiş ülkelerde 779.000 (%56.5)'i gelişmemiş ülkelerde tespit edilmiştir. Bu sayının 951.000 (%69)'i erkek, 427.000 (%31)'i kadındır. Mevcut veriler ışığında kanser görülme sıklığı açısından akciğer kanserleri erkeklerde birinci sırada (%16.5), kadınlarda dördüncü sırada (%8.5) kanser tipi olarak tespit edilmiştir. Kansere bağlı mortalite oranları açısından da erkeklerde birinci, kadınlarda ikinci en sık neden olarak tespit edilmiştir (Arslan, 2011). Kanser Daire Başkanlığı tarafından yayınlanan 2009 yılı verilerine göre erkeklerde %66, kadınlarda %8.1 oranında akciğer kanserinin (trake, bronş, akciğer) görüldüğü belirtilmiştir ([http-1](http://)).

Akciğer kanseri etiyolojisinde tütün, çevresel toksinler, pulmoner fibroz, HIV enfeksiyonu, diyet alışkanlığı, mesleki maruziyet (radon, berilyum, asbeste maruziyet), hava kirliliği, başka kanser tedavi öyküsü ile genetik geçiş sorumlu tutulmaktadır. Ancak en önemli risk faktörü olarak, tütün kullanımı gösterilmektedir (Koparal, 2001; Aydın-Acar, 2005; Arslan, 2011).

Akciğerlerde başlayan kanserler mikroskop altındaki görünümüne dayanılarak küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere başlıca iki gruba ayrılır. Akciğer kanserinin her tipinin büyümesi ve yayılımı farklılık gösterir ve tedavisi de farklıdır. KHAK, akciğer kanserinin en agresif tipidir. Bu tümörün vasküler infiltrasyon, yoğun hiler, mediastinal ilerleme ve erken hematogen yayılma özellikleri nedeniyle hastaların beş yıl yaşama oranı %1'den azdır. Hücreler küçüktür, yoğun olarak birarada bulunurlar. Sarkoma veya lenfomaya benzeyen bu küçük hücreler füziform, poligonal, yulaf şeklindedir. Bu hücreler farklılaşmamıştır, ilgili doku hücrelerinden ve birbirinden ayrılmaları güçtür. Sigara içilmesiyle yakın ilişkisi vardır (Aydın-Acar, 2005).

KHDAK'ın ise yassı epitel hücreli (epidermoit) karsinoma (%25), adenokarsinoma (%30) ve büyük hücreli karsinoma (%15) olmak üzere üç alt tipi mevcuttur. Epidermoit karsinoma: skuamöz hücre karsinoma adı ile de bilinir. Erken tanı, rezeksiyon endikasyonu ve beş yıllık sağkalım oranı diğer üç gruba göre daha yüksek olduğu gibi uzak metastaz olasılığı da en azdır. Çoğunlukla santral lokalizasyonlu olup, periferik lokalizasyona da sahiptir. Erkeklerde daha fazla görülen, sigara ile kesin ilişkisi bulunan, ülkemizde en sık rastlanan akciğer kanseri tipidir. Adenokarsinoma: bu kanser tipinin 3/4'ü akciğerde periferel lokalizasyonludur. Bu tümörün küboit ve silindir hücreleri glandüler bir görünüm oluşturur. Kadınlarda daha sık görülen kanser tipidir. Büyük hücreli karsinoma: epidermoit, adeno ve küçük hücreli karsinom özelliklerinden hiçbirini göstermeyip, büyük nükleuslu, iyi sınırlı ve farklılaşmamış epitelyal kökenli malign tümörler olarak tanımlanırlar. Son yıllarda bazı araştırmacılar bu tipi adenokarsinom ve skuamöz karsinomun değişik bir biçimi olarak görme eğilimindedirler. Sigara ile yakın ilişkisi vardır (Aydın-Acar, 2005).

Akciğer kanserine karşı günümüzde uygulanan tedavi yöntemlerinden, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapideki gelişmelere rağmen, tanı konduktan sonra akciğer kanserli bireylerin ancak %15'i beş yıldan fazla yaşayabilmektedir. Bu nedenle, akciğer kanserine karşı acil olarak yeni ve radikal bir tedavi şekline ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan ikinci hücre kültürü olan **A549** akciğer adenokanser hücre kültürü; ilk defa 1972 yılında, akciğer adenokanser tanısı konulan Kafkas ırkına mensup 58 yaşında erkek hastanın akciğer kanser epitel hücrelerinden elde edilmiştir. Bu hücreler, skuamöz ve 66 kromozomlu adenokarsinomik alveoler kökenli epitelyal hücrelerdir. Normal fonksiyonlara sahip akciğerde, bu hücreler suyun, elektrolitlerin ve diğer maddelerin alveollerin yüzeyinden difüzyonunu sağlamakla yükümlüdürler. Skuamöz epitelyal hücreler, imünoperoksidaz temelli, keratin pozitif hücrelerdir. Ayrıca, doymamış yağ asitlerince zengin bir içeriğe sahip olduklarından sitidin-difosfokolin yolağında rol oynarlar, membran fosfolipitlerinin tamirinde gereklidirler ve lesitin sentezlerler (Arslan, 2011; http-2).

Sitotoksisite

Sitotoksite, moleküler olaylar sonucu çeşitli makromoleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (Tuncer, 2010).

Sitotoksisite testleri, hücre canlılığı ve ölümü, hücre membranı, hücre organelleri, protein ve DNA sentezi ve hücre bölünmesi ile ilgili detaylı bilgiler vermektedir.

Sitotoksisite testlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Tuncer, 2010):

- ✓ Test edilecek malzemenin, diğer metabolik olaylardan bağımsız olarak, hücre metabolizmasındaki spesifik bir fonksiyon üzerindeki etkisi değerlendirilebilmektedir.
- ✓ Aynı anda çok sayıda örnek, kısa zamanda test edilebilmektedir ve diğer testlere oranla daha ekonomiktir.
- ✓ Deneysel sonuçlarda kantitatif sonuçlara ulaşılmaktadır.
- ✓ Materyallerin toksisitesi kullanım testlerine oranla daha hassas şekilde değerlendirilebilmektedir.
- ✓ Deneysel sırasında test koşulları standardize edilebilmektedir.

Her test için tek bir hücre tipi kullanılması, kültür hücrelerin konak hücrelerden farklılaşma göstermeleri ve *in vivo* etkilerin tam olarak gözlenmemesi gibi dezavantajları da unutmamak gerekir.

Hücre kültürlerinde gerek deney kurarken, gerekse çeşitli kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların sitotoksik etkilerini belirlemek için hücreye ait birtakım canlılık parametrelerinin ölçülmesi gerekir. Bunlar içerisinde öncelikle hücrelerin yaşadığını ifade eden canlılık testlerinin yapılması gerekir. Canlılık, hücre zarının bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini test ederek belirlenir. Canlılık gösteren hücreler membran bütünlüğü bozulmamış hücrelerdir. Örneğin, tripan mavisi membran bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini belirlemede sıklıkla kullanılır. Canlı hücreler boyayı dışarı atarken, bütünlüğünü ve seçici geçirgenliğini kaybeden hücreler boyayı içeri alır. Bu yöntemle hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısı, dolayısıyla toplam hücre sayısı belirlenebilir (Berridge ve Tan, 1993).

Kolorometrik olan ve metabolizma redüktaz aktivitesi ile hücre canlılığının değerlendirilmesinin yapıldığı yöntemler arasında en yaygın kullanılanları

tetrazolyum ve resazurin azalmasının değerlendirilmesidir. Tetrazolyum tuzları ancak metabolik olarak aktif hücreler tarafından indirgenebilirler (Butler, 2004).

3-(4,5-dimetiltiyazol-il)-2,5-Difenil tetrazolyum bromit (MTT) ölçümü *in vitro* koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksitesiyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Brunner, 1998). Bu yöntem hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Çalışmada hedef Krebs döngüsü enzimlerinden biri olan ve mitokondrilerin matriksinde bulunan süksinat dehidrogenazdır. Bir tetrazolyum tuzu olan sarı renkli MTT, canlı hücrelerdeki süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenerek suda çözünmeyen koyu mavi formazan kristallerine dönüşür. Organik çözücülerde kolay çözünen formazan kristalleri, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans verir. Absorbans değerlendirilerek, dolaylı olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülür. Ölçülen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Butler, 2004; Barile, 1994).

Bu yöntem, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkân verir. Apoptozun erken dönemlerinde hücrelerin metabolik etkinliklerinde bir değişiklik olmadığı ve kimyasal tarafından arttırılmış olabilecek efektör hücrelerdeki metabolik etkinliğin, hedef hücrelerdeki sitotoksik etkiyi maskeleyebileceği gibi dezavantajları bulunmakla birlikte, MTT yöntemi günümüzde birçok kaynakta referans gösterilmektedir (Fotakis ve Timbrell, 2006).

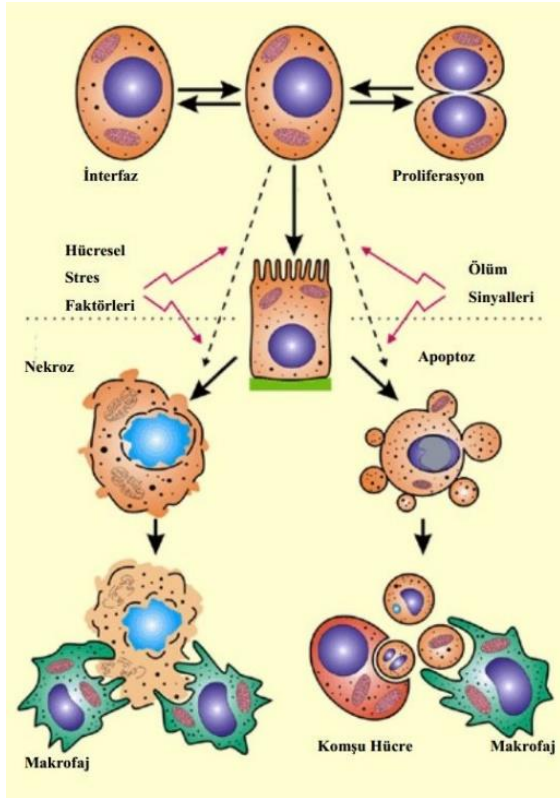
Sitotoksitesiyi belirlemede kullanılan diğer yöntem ise adenzin trifosfat (ATP) konsantrasyonunu ölçmeye yarayan testlerdir. ATP ölü hücrelerde bozulurken, zarar görmüş hücrelerde hızla azalır. Bu yüzden hücrelerdeki ATP miktarı kültürdeki canlı hücre miktarı ile orantılı olarak değişir. Bu testler ile hücredeki ATP miktarı lusiferin-lusiferaz reaksiyonu sonucu oluşan biyoluminesans ile ölçülür (Wang ve ark., 2010). Fakat hücrede ATP konsantrasyonu, yaşlanma ve açlığa bağlı olarak üremenin durması, mitokondriyal solunumun inhibe edilmesi gibi ölümcül olmayan durumlardan dolayı da azalabilir. Bu nedenle ATP konsantrasyonunun ölçülmesi her zaman doğrudan hücre canlılığı ile ilişkili olmayabilir (Galluzzi ve ark., 2009; Kepp ve ark., 2011). Buna rağmen ATP miktarını ölçmeye yarayan yöntemler çok hassastır ve tekrarlanabilir olmaları nedeniyle hücre çoğalmasını ve canlılığını değerlendirmede kullanılan yöntemlerdir (Wang ve ark., 2010).

Apoptoz

Apoptoz, klasik bir hücre ölümünden (nekroz) birçok yönden ayrılır. Apoptoz terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. 1983 yılında ise Duke ve arkadaşları tarafından yapılan jel elektroforezi çalışmaları ile apoptoz biyokimyasal olarak kanıtlanmıştır (Demirci, 2010; Simstein ve ark., 2013).

Ökaryotik canlılarda hücreler doğarlar, belli bir süre yaşarlar ve ölürlür. Yaşam süreleri, hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Zamanı gelince ölen hücreler (fonksiyonlarını kaybeden, fazla üretilen, yaşlanan, düzensiz gelişen), daha önceden programlanmış şekilde, genetik olarak kontrol edilerek fizyolojik şartlarda ölürlür. Bu olay “apoptoz” olarak adlandırılır. Virüsler veya çevresel etkenlerle DNA’sı zarar görmüş hücreler, doku homeostazını sağlamak ve organizmanın daha

fazla zarar görmesini engellemek için apoptoza uğrarlar. Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimler ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. Hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda görülen apoptotik hücre ölümü sürecine giren bir hücrede sırası ile, yüzey adezyon kaybı nedeniyle hücre şeklinin yuvarlaklaşması ve komşu hücrelerle temas kaybı, hücre hacminde azalma ve sitoplazma yoğunluğunda artış, kromatinin nukleus membranına yönelmesi ve kondensasyonu, plazma membranında kabarcık şeklinde girinti çıkıntıların oluşumu, hücrenin “apoptotik cisimcikler” adı verilen membranla çevrili hücresel yapılardan oluşan parçalara ayrılması meydana gelmektedir. Apoptozda, apoptotik cisimciklerin oluşumuna kadar tüm hücresel yapılar, hücre membranı yapısı bozulmadan tamamen hücre içerisinde yıkıma uğramaktadırlar. Apoptoz ile ölen hücrelerin artıkları fagositler ve çevre hücreler tarafından fagositoz ile yok edilmektedirler. Böylece dokuda inflamatuvar yanıt oluşması engellenmektedir. Buna karşın bir diğer hücre ölüm tipi olan ve yalnız patolojik şartlarda görülen nekrozda ise, hücresel stres nedeni ile membrandan sıvı girişi artmakta ve hücre şişmekte, kromatin ise değişime uğramadan normal hücrelerdeki gibi kalmaktadır. Plazma membranı bütünlüğünü kaybedince hücre sıvısı dış ortama dağılmaktadır (Şekil 4). Bu durum dokuda inflamatuvar yanıt oluşumuna sebep olmaktadır (Serbes, 2009; Korkmaz, 2012).



Şekil 4. Apoptoz ile Nekroz (Serbes, 2009).

Apoptoz, organizmanın bazı dokularında sürekli olarak görülmekte ve bu olay yaşam boyu devam etmektedir. Doku homeostazının devamlı sağlanması için apoptoz ve mitoz (yeniden oluşum) dinamik ve dengeli bir biçimde devam etmektedir (Korkmaz, 2012).

Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Mitoz ile apoptoz arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozun lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Anlaşıldığı üzere, apoptoz organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptoz veya hızlanmış ya da tam tersine yavaşlamış apoptoz, organizma için tehlikelidir. Apoptozun gereksiz yere olduğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek olarak otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir.

Apoptoz çok sayıda ve çeşitte mediyatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramit), genler (c-myc), proteinler (p53) ve organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediyatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler (Danial ve Korsmeyer, 2004; Scwerk ve Scholze-Osthoff, 2005).

Apoptotik ölüm aşamaları şu şekilde sıralanabilir: iç veya dış faktörler etkisi ile apoptozun başlatılması, sitokrom c'nin salınması, hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin meydana gelmesi, fagositoz (Burlacu, 2003; Simstein ve ark., 2013).

Organizmanın gelişimi, hastalık oluşumu veya hücre dışı uyarılara cevap olarak gerçekleşen apoptoz mekanizmalarının hem temel hem de klinik alanlarda daha fazla çalışılmaya başlanmasıyla, hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemler geliştirilerek apoptoz ve diğer hücre ölüm türleri arasında ayırım yapılabilmesi önem kazanmıştır. Ayrıca, ilaç araştırmalarında da apoptotik etki yollarının belirlenmesi gerekmektedir.

Günümüzde apoptozun araştırılmasında morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesi önemlidir.

Apoptozun varlığını belirlemek amacıyla 1972'den bu yana çeşitli *in vitro* yöntemler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır:

1. Morfolojik görüntülemeye dayalı yöntemler (ışık, floresan, elektron, faz-kontrast mikroskopları ile incelemeler)
2. İmmünohistokimyasal yöntemler (Anneksin V, TUNEL, M30 ve Kaspaz-3 yöntemleri)
3. Biyokimyasal yöntemler (Agaroz jel elektroforezi, western blotting metodu, Flow sitometri)
4. İmmünolojik yöntemler (ELISA, fluorimetrik yöntem)
5. Moleküler biyoloji yöntemleri (DNA microarrays)

Apoptozun belirlenmesinde yukarıdaki yöntemler etkin bir şekilde kullanılmakla birlikte apoptozun türüne özgü herhangi bir hücresel aktivitenin ya da olayın belirlenmesi amacıyla birden fazla yöntem uygulanabilmektedir.

Tez çalışması kapsamında apoptozun belirlenmesi amacıyla biyokimyasal yöntemlerden ‘flow sitometri’ ve immünohistokimyasal yöntemlerden Annexin V metodundan yararlanılmıştır.

‘Flow sitometri’ yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikör kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından kullanışlı bir metottur. Özellikle iki şekilde apoptoz belirlenebilir: a. floresan bir madde olan propidyum iyodür kullanılarak, b. Anneksin V kullanılarak. Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanır, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır. “Flow” sitometri grafiklerinde sağ-alt kadrandaki popülasyon Anneksin V’nin pozitif ve propidyum iyodür’ün negatif olduğu apoptotik hücrelerin bulunduğu bölgedir.

“Anneksin V” yöntemi ise immünohistokimyasal boyamaya dayalı bir yöntemdir. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS’ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (Ulukaya ve ark., 2011).

Mitoksantron

Aminoalkilamino-disübstitüe antrakınon yapısında (1,4-dihidroksi-5,8-bis-[[2-(2-hidroksietil)-amino]-etil]-amino]-antirakinon) bir bileşiktir (Fox ve ark., 1986). 1970’lerin sonuna doğru geliştirilen antineoplastik bir ajandır. Meme kanseri, ileri aşamadaki prostat kanserinde, lenfoma ve lösemi gibi çeşitli malign kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Shenkenberg ve Von Hoff, 1986). Bu kanser türlerinin tedavisinde diğer sitotoksik ilaçlar ile kombine formülasyonlarda kullanılır, ayrıca yumurtalık, prostat ve akciğer kanserlerinin tedavisinde kullanılır. Mitoksantron topoizomerez-2 enzimine bağlanarak inhibe eder, DNA’nın bağlanmasını engeller ve sonrasında hücre siklusunun ilerleyişini geciktirir (Faulds ve ark., 1991). Sitotoksik etkisinin yanı sıra immunosupresif, antiviral, antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir. Makrofaj, B lenfosit ve T lenfositlerin proliferasyonlarını engelleyerek immunosupresif etkisini gösterir. Düşük konsantrasyonlarda apoptotik yüksek dozlarda ise hücrenin parçalanmasına neden olduğu bilinmektedir. Uzun süreli maruziyet ile antijen-üreten hücrelerin programlı hücre ölümlerini indükler (Scott ve Figgitt, 2004; Neuhauser ve ark., 2006). Tez kapsamında, sitotoksik etki, apoptoz ve antiproliferatif etkinin araştırılması amacıyla yapılan *in vitro* çalışmalarda pozitif kontrol olarak mitoksantron ile çalışılmış, ekstre ve fraksiyonlarda belirlenen etkiler mitoksantron ile karşılaştırılmıştır.

Tez Kapsamında Çalışılan Diğer *in vitro* Biyolojik Aktiviteler ile İlgili Bilgiler

Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzimleri

Kolinesteraz enzimlerinin varlığı ilk olarak 1914 yılında Dale tarafından ön görülen ve detaylı çalışmaları 1930'lardan bu yana devam eden serin hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Aktif bölgede yer alan reaktif serin'in ve aktif bölgenin aminoasit diziliminin belirlenmesi ise 1959 yılının başlarına rastlamaktadır. İnsan kökenli bütirilkolinesteraz (BuChE) enziminin tam olarak dizilimi ise 1987 yılında Lockridge tarafından belirlenmiştir (Özer, 2012).

Kolinesterazlar, substrat spesifitelerine, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere olan hassasiyetlerine göre iki ana sınıfa ayrılırlar. Asetilkolinesteraz (AChE), EC 3.1.1.7 kodu verilmiş asetilkolinasetilhidrolaz enzimidir ve gerçek kolinesteraz olarak isimlendirilir. Asetilkolin, merkezi ve çevresel sinir sisteminde nikotinik ve muskarinik reseptörler aracılığı ile kontrol edilen, parasempatik sistemde "nörotransmitter" olarak rol oynamaktadır.

Bütirilkolinesteraz ise EC 3.1.1.8 kodu ile bilinen açilkolinaçilhidrolaz enzimidir ve "serum kolinesterazı, psödokolinesteraz, spesifik olmayan kolinesteraz" olarak adlandırılır. AChE, akciğer, dalak, beyin, kas ve eritrosit membranlarında, sinir uçlarında yaygın olarak bulunurken; BuChE'nin, karaciğerde sentezlendikten sonra plazmaya yüksek oranda salınarak geniş bir organ dağılımı (karaciğer, düz kas, ince barsak, pankreas, kalp, beyaz beyin cevheri) ile yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir (Çokuğraş, 2003; Yaren, 2006; Reid ve ark., 2013). Kolinesterazlar, neoplazi, nörodejenerasyon ve embriyonun gelişimi sırasında sinaps dışı olarak salgılanmaktadır. Bu nedenle, nöroblastom hücrelerinin adezyonunda, sinir hücresi aksonlarının dışarıya doğru gelişmesinde rol oynamaktadır (Johnson ve Moore, 2000).

AChE'nin bilinen en hızlı enzimlerden biri olup, etkin görevinin kolinerjik sinapslarda asetilkolinin hidrolizini katalizlemek olduğu bildirilmektedir. BuChE'nin temel fizyolojik fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemekle beraber enzim, süksinilkolin, karbamatlar, aspirin, kokain gibi ester yapıdaki ilaçları, organofosfat pestisitleri, amitriptilin, sertralin gibi antidepresan ilaçları ve kimyasal savaş ajanlarını parçalama özelliği (detoksifikasyon) nedeniyle hem farmakolojik hem de toksikolojik açıdan önem taşımaktadır. Kolinesterazların klasik fonksiyonlarının yanında hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynadığı ile ilgili çalışmalar artmaktadır. Çeşitli tümör hücrelerinde kolinesteraz genlerinin yapısal olarak değiştiği ya da enzimatik ürünlerinin anormal olarak arttığı görülmektedir. AChE ve BuChE'nin menenjiyom, glioma, akciğer kanserleri, lösemi ve yumurtalık tümörleri gibi birçok patolojik durumda da ekspresyonlarının arttığı bildirilmektedir (Zakut ve ark., 1990; Saez-Valero ve ark., 1996; Saez-Valero ve Vidal, 1996; Brass ve ark., 1997; Garcia-Ayllon ve ark., 1999; Barbosa ve ark., 2001; Çokuğraş, 2003; Doctor ve Saxena, 2005; Bernardi ve ark., 2010). Battisti ve ark. (2012) yaptıkları klinik bir çalışmada, 66 prostat kanserli hastanın kolinesteraz seviyeleri ve diğer biyokimyasal parametreleri incelemiştir. Çalışma sonucunda, AChE ve BuChE seviyelerinin hastalarda kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiştir. Enzim seviyelerinin düşmesinin asetilkolin seviyelerini arttıracak dolayısıyla prostat kanser hücrelerinde kolinerjik aşırı-uyarımının ve proliferasyonun fazla olacağı sonucuna varılmıştır (Battisti ve ark., 2012).

Kolinesteraz enzimleri, Alzheimer hastalığının teşhisinde ‘biyomarker’ olarak rol oynarlar. Alzheimer hastalığı, beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde nöron kaybı ile ortaya çıkan, geri dönüşümsüz, ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Hastalığın yaygınlığı ve sıklığı yaşın ilerlemesi ile artar. 65 yaşa kadar %1-2 oranında ortaya çıkan hastalığın görülme sıklığı 85 yaş ve üzerinde %35’lere kadar yükselir. Serebral kortekste kolinerjik hasar, hastalıkta gelişen bilişsel ve davranışsal rahatsızlıklara neden olur. Semptomlar hafıza kaybı, konuşma, yön bulma, karar verme, düşünme ve yorumlamada zorluklar; kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterizedir (Çokuğraş, 2003; Özer, 2012). Hastalığın kesin bir tedavisi olmamakla birlikte semptomlarını ortadan kaldıracak ve ilerleyişini durduracak ilaçlar kullanılmaktadır.

Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisi için FDA tarafından onaylanmış iki farklı mekanizma ile etki gösteren birkaç ilaç bulunmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri: takrin, donepezil, rivastigmin, galantamin; *N*-metil-D-aspartat reseptör antagonisti: memantin. Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin farmakolojik etkisi kolinerjik nörotransmitter sistemin hipofonksiyonuna bağlı olarak oluşan bilişsel fonksiyonlardaki azalmanın düzeltilmesi şeklindedir. Bu amaçla kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörleri merkezi sinir sisteminin önemli bir nöromedyatörü olan asetilkolini hidroliz eden ve dolayısıyla miktarının azalmasına sebep olan asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek, hastanın davranış bozukluklarında anlamlı bir gerileme sağlamaktadır (Giacobini, 1998; Wilkinson ve ark., 2004; Birks, 2006; Parlar, 2012). Yeni geliştirilen kolinesteraz inhibitörleri ise fenserin, tolserin, esolerin, tesofensin gibi fizostigmin türevleri, alkaloit yapısındaki Huperzin A ve B bileşikleri, flavonol türevi galangin ile izoprenoit yapıda olmayan fenolik lipit yapısındaki kardonol türevleri örnek verilebilir (Mehta ve ark., 2012). Bilindiği üzere, kolinesteraz inhibitörü olarak tanımlanan ilk bileşik fizostigmin (eserin), yüksek etki potansiyeline rağmen düşük tolere edilebilirliği yüzünden kullanımdan kaldırılmıştır. Yeni geliştirilen fizostigmin türevlerinden olan fenserin ise Faz II çalışmaları sonucunda başarısız bulunmuştur (Coelho Filho ve Birks, 2001; Mehta ve ark., 2012). Doğal ya da sentetik bazı bileşikler *in vitro* olarak etkili bulunsa da birçoğu ile hayvan deneyleri ya da klinik çalışmaları henüz yapılmamış ya da tamamlanmamıştır. Bu nedenle kolinesteraz inhibitörleri üzerinde yapılan çalışmalar önemini korumakla birlikte yeni araştırmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez kapsamında elde edilen ekstre ve fraksiyonların olası asetil- ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonlarının belirlenmesi amacıyla Ellman metodundan yararlanılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak galantamin tercih edilmiştir. Galantamin, doğal kaynaklı, seçici, yarışmalı, geri dönüşümlü bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür, az da olsa bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi göstermektedir (Olin ve Schneider, 2002).

5-Lipoksijenaz (5-LOX) enzim inhibisyonu

Lipoksijenazlar (LOX; EC 1.13.11.) memeli, fungus, bitki ve omurgasızlarda bulunan (*Z,Z*)-1,4-pentadien yapısı taşıyan çoklu doymamış yağ asitlerine, stereo ve regiospesifik oksijen katılımını katalizleyerek, hidroperoksi türevleri oluşturan dioksijenazlardır. Her molekül için “hem” yapısında olmayan bir demir atomuna gerek duyarlar (Ergün, 2008; Reddy ve ark., 2010).

İnsanlarda, çeşitli LOX izoformları, 5S-LOX, 12S-LOX, 12R-LOX, 15S-LOX-1, 15-LOX-2 ve eLOX-3 olarak bilinen 6 gen tarafından kodlanırlar (Czapski ve ark., 2012). İnsan hücrelerinde genellikle 4 tip LOX enzimi salınmakta ve dokuya özgü sentezlenmektedir: 5-, 12-, 15-LOX-1 ve 15-LOX-2. 5-LOX, lökositlerden; 12-LOX plateletlerden, 15-LOX ise retikülosit, özönofiller ve makrofajlar tarafından salgılanırlar (Hyde ve Missailidis, 2009; Khilil-Drori ve Ariel, 2013). LOX enzimlerinin memelilerdeki temel substratları, serbest ya da membrana-bağlı araşidonik asit (AA), dokosaheksaenoik asit (DHA) ve diğer çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)'dir. LOX tarafından katalizlenen reaksiyonlarda oluşan ilk bileşikler hidroperoksieikosatetraenoik asit (HPETE) ve hidroksieikosatetraenoik asit (HETE)'tir; lipoksin, lökotrien ve diğer uyarıcı moleküllerin sentezinde kullanılırlar (Vincent ve ark., 2008).

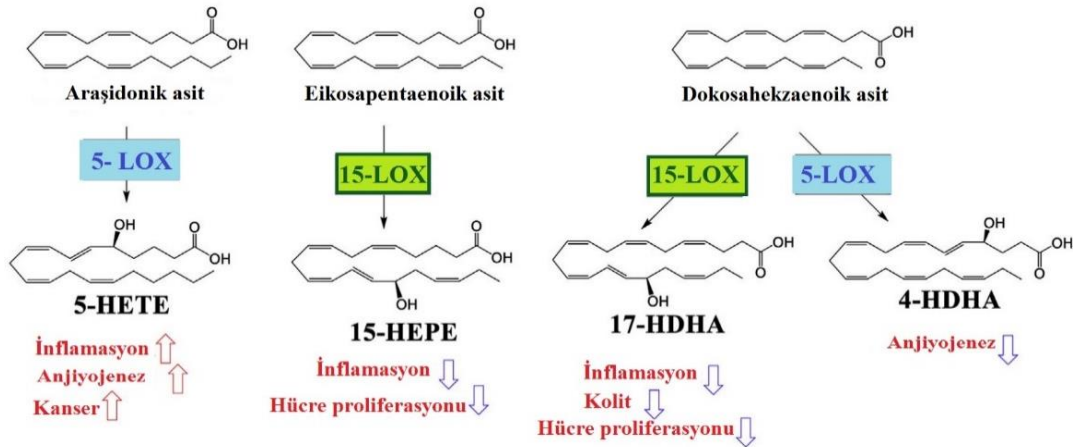
15-LOX yolağı, iki izoformu tarafından yürütülmektedir. 15-LOX-1 enzimi, linoleik asidin 13S-hidroksioktadeka-9Z,11E-dienoik aside (13S-HODE) dönüştürülmesinde; 15-LOX-2 ise 15S-HPETE'den 15S-HETE'nin üretilmesinden sorumludur (Hyde ve Missailidis, 2009).

5-LOX metabolik yolağının ilk enzimatik basamağı, araşidonik asit ile kalsiyum ve ATP-bağımlı 5-LOX aktive edici proteinin varlığına ihtiyaç duymaktadır. LOX yolağı çok karmaşık olmakla birlikte 5-, 12-, ve 15-LOX sentezine bağlı olarak çeşitli eikosanoit ürünleri üretilmektedir. 5-LOX yolağında, lipoksin A₄ (LXA₄) ve B₄ (LXB₄) üretimi için 12-LOX aktivitesi gereklidir. LTA₄, lökotrien B₄'ün (LTB₄) üretiminde prekürsör olarak rol oynar ve reaksiyon için LTA₄ hidrolaz enzimi gereklidir. Sisteinil lökotrienlerden (LTC₄, LTD₄, LTE₄), LTC₄ ise spesifik bir glutasyon transferaz enzimi tarafından sentezlenmektedir. 5-okzo-7E,9E,11Z,14Z-eikosatetraenoik asit (5-okzo-7,9,11,14-ETE) formasyonu ise enzimatik olmayan bir metabolik olay ile gerçekleşir (Kuhn ve Thiele, 1999; Coy ve ark., 2009; Hyde ve Missailidis, 2009; Reddy ve ark., 2010). 5-LOX enzimi son yıllarda, pro-inflamatuvar mediyatörlerin (lökotrienler) sentezinde rol oynadığı için hedef ilaç olarak dikkat çekmektedir. Lökotrienler, romatoit artrit, psöriazis, alerjik rinit, bronşiyal astım, ateroskleroz, inflamasyon kaynaklı bağırsak hastalıkları ve çeşitli kanserlerde mediyatör olarak rol oynamaktadır. LTB₄ nötrofil adezyonu ve agregasyonunu indükler, bakterilerin fagositozunda rol oynar ve granüler enzim salgılar. LTC₄, LTD₄ ve LTE₅ ise bronkokonstrüksiyon ve hipersensivite reaksiyonlarında mediyatör maddelerdir (Ribeiro ve ark., 2014).

LOX tarafından katalizlenen reaksiyonlarda, peroksil radikal formasyonu meydana gelir. Aşırı miktarda LOX aktivasyonunun Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. 5-LOX'un klasik inflamasyon yolağından farklı olarak γ -sekretaz aktivitesi üzerinde rol oynayarak Alzheimer hastalığının patolojisinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle LOX inhibitörlerinin birçok patolojik durumda nöroprotektif etki gösterebileceği fakat moleküler düzeyde etkilerinin tam olarak anlaşılamadığı belirtilmektedir. Bu nedenle fizyolojik/patolojik inflamasyon, iskemi, hipoksi, reoksijenasyon, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında LOX inhibitörlerinin olası etkilerinin çalışılması yaygındır (Manev ve ark., 2011; Czapski ve ark., 2012; (Kang ve ark., 2013). Alerjik hastalıkların ve astım tedavisinde 5-LOX inhibitörleri önerilmektedir. 5-LOX, ayrıca gastro özofajiyal reflü hastalığı ile ilişkilidir. Romatoit artritli hastaların kan ve eklem sıvısı örneklerinde, Crohn hastalığı ya da ülseratif kolitli

hastaların kolon mukozalarında LTB₄ seviyeleri yüksektir (Reddy ve ark., 2010). Ayrıca COX/5-LOX inhibitörlerinin kombinasyonu, güçlü antiinflamatuvar etki göstermekle birlikte ratlarda ülserojenik etkiyi ortadan kaldırmaktadır (Fiorucci ve ark., 2001).

Kanserde, LOX yolları ise LOX enzimlerinin izoformlarının çeşitliliği nedeniyle oldukça karmaşıktır. Genel bir kaniya göre, 5-LOX ve 12-LOX enzim metabolitlerinin kanser oluşumunu desteklediği; 15-LOX-1 ve 15-LOX-2 enzimlerinin ise antitümör etkili olduğu düşünülmektedir. Araşidonik asitten 5-LOX enzim yolağı ile elde edilen 5-HETE anjiyojenez, inflamasyon ve tümör gelişimini indüklemektedir. 5-LOX enzim inhibitörlerinin ise hayvan modelleri ile tümör gelişimini baskıladığı ortaya konulmuştur. Bir 5-LOX inhibitörünün, farelerde akciğer karsinogenezini önlediği rapor edilmiştir (Reddy ve ark., 2010). Ayrıca COX-2 ve 5-LOX enzim inhibitörlerinin birlikte kullanımının antitümör etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2014). 5-LOX ve 12-LOX enzimlerinin inhibisyonlarının, insan meme kanseri hücrelerinin apoptoza uğramalarını arttırdığı ve proliferasyonlarını engellediği kaynaklarda belirtilmektedir. Tong ve ark. (2002), LOX inhibitörlerinin sitokrom c salınımını sağlayarak apoptozu indüklediğini, kaspaz-9 aktivasyonunu sağladıklarını ortaya koymuşlardır. Ayrıca pro-apoptotik protein bax'ı indükleyerek etki gösterdikleri belirtilmiştir (Tong ve ark., 2002). 5-LOX ve 12-LOX enzimlerinin ekspresyonlarının çeşitli katı tümörlerdeki karsinogenez ile ilişkili olabileceğini ortaya koyan bir çalışmada, malign plöral mezotelyoma hücrelerindeki bu enzim ekspresyonları ölçülmüştür. Bu çalışma sonucunda 5-LOX enzimi ile COX-2 enzimi arasında; 12-LOX ile de 5-LOX enzim ekspresyonlarında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu enzimlerin tedavide hedef olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Agarwal ve ark., 2011) (Şekil 5).



Şekil 5. LOX Yolağı ile Elde Edilen Ürünler ve Fizyolojik Etkileri (Wang ve ark., 2014).

Anormal araşidonik asit metabolizmasının, pankreas karsinogenezinde rol oynadığına işaret eden çalışmalar mevcuttur. COX-2 enziminin aşırı ekspresyonunun kolon, prostat ve pankreatik kanser gibi tümör tiplerinde görüldüğü bilinmektedir. Ayrıca 5-LOX enzim yolağının up-regulasyonu da pankreatik kanser tedavisinde önem taşımaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, COX-2 inhibisyonunun meme, prostat ve kolon kanseri riskini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ayrıca COX-2 ve 5-LOX inhibitörlerinin birlikte

kullanımının kolon kanserine karşı antitümör etkiyi aditif olarak arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ding ve ark., 2011).

Araşidonik asitin, 5-LOX yolağı ile oluşan metabolitleri, prostat kanser hücrelerinin gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle 5-LOX yolağının bloke edilmesi, bu metabolitlerin üretimine engel olarak androjen-duyarlı hem de androjen-bağımlı olmayan prostat kanser hücrelerinin apoptozunu tetiklemektedir. 5S-HETE ve dehidrojenaz türevi olan 5-okzo-HETE, prostat hücrelerinin apoptoza gitmelerini engelleyen bileşiklerdir, böylelikle kanser hücrelerinin ayakta kalmalarını sağlamaktadırlar. Prostat kanseri tedavisinde, 5-LOX'un hedef enzim olabileceği düşünülmektedir (Sarveswaran ve ark., 2011). Kronik inflamasyonun metastaz, invazyon ve anjiyogenez ile ilişkili olduğu bilinmekte ve 5-LOX inhibisyonu ile prostat kanser hücrelerinin hücrel transformasyonu, çoğalması ve gelişmesinin önlenilebileceği düşünülmektedir. Yapılan fare deneyleri ile 5-LOX inhibitörü olan Zileuton'un, prostat kanser hücrelerinin metastazını baskıladığı belirtilmiştir (Meng ve ark., 2013).

5-LOX enzimi epitel kökenli kanser hücrelerinde salgılanır. 5-LOX ürünleri hem kanser hücreleri hem makrofajlarla ilişkili diğer tümörlerde, kanser hücrelerinin çoğalmasını, ayakta kalmasını ve göçünü düzenleyerek tümör gelişimine katkıda bulunurlar. Kanserli hücrelerde hem lökotrienler (LTB₄ ve LTD₄) hem de monohidroksiasit 5-HETE bulunmaktadır. Lösemi kök hücrelerinde ise 5-LOX geni kaybı gözlenirken, normal sağlıklı kan kök hücrelerinde böyle bir durum söz konusu değildir (Radmark ve ark., 2014). İnsan kan hücrelerinden karakteristik olarak salgılanan 5-LOX, 12-LOX ve 15-LOX-1 enzimlerinin, kolon, meme, akciğer, prostat ve mesane kanserleri gibi epitel-kaynaklı malign durumlarda ekspresyonları değişmektedir. Bronşiyal epitel hücrelerden 15-LOX-1 salgılanır ve akciğer kanser hücrelerinde ekspresyonları artış göstermektedir (Gonzalez ve ark., 2004).

5-HETE türevlerinin membran degradasyonuna uğratarak malign hücrelerin uzak bölgelere yayılmasını kolaylaştırdığı tartışma konusudur. Böylece lökotrienlerin pankreas kanser hücrelerinin karaciğere metastazını arttırabileceği düşünülmektedir. COX-2 ve 5-LOX inhibitörlerinin kombinasyonunun pankreas kanser hücrelerinin karaciğer metastazını engellediği ratlarda yapılan deneyler ile ortaya konulmuştur (Gregor ve ark., 2005).

Özefagus kanserlerinde 5-LOX protein ekspresyonunun arttığı, bu nedenle 5-LOX inhibitörlerinin özefagus kanser hücrelerinin apoptoza uğramalarını indüklediği ortaya konulmuştur. Özefagal skuamöz hücre karsinomalarının ilk evresinde 5-LOX inhibitörlerinin kullanılmasının kanser gelişimini önlediği belirtilmiştir (Hai-Yun ve ark., 2011).

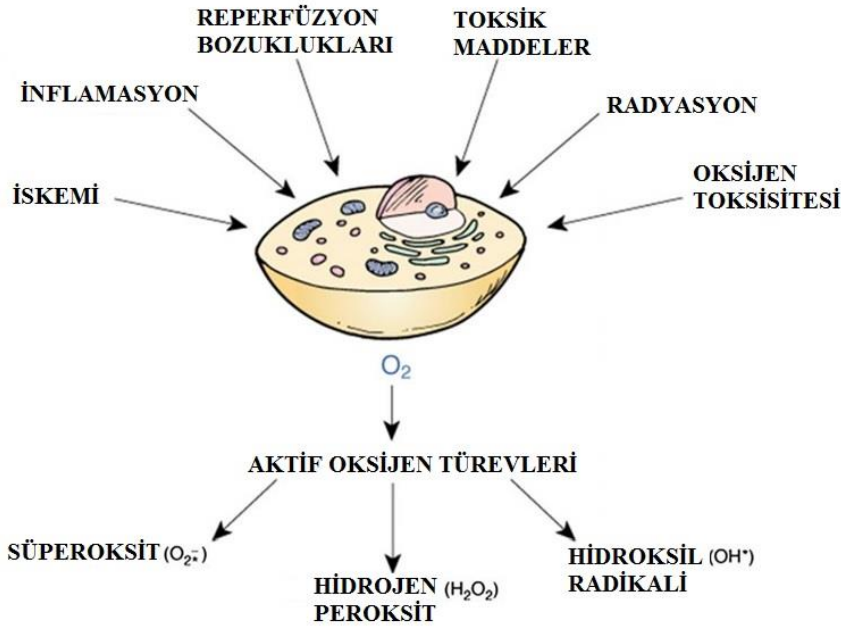
Antioksidan aktivite

Serbest radikaller, yapılarında bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü atom veya atom gruplarıdır (**Çizelge 1**). Kararsız yapılarından dolayı oldukça aktif olup diğer moleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek daha kararlı hale gelirler. Bu bileşikler, tek bir elektronunu başka bir moleküle vererek yükseltgenirler veya bir elektron alarak indirgenirler, böylece oksido-redüksiyon reaksiyonlarına katılırlar (Kepekçi, 2011; Yalçın, 2012; Arıdurdu, 2013; Kılıç, 2013).

Çizelge 1. Serbest Radikallerin Yapıları ve Özellikleri (Arıduru, 2013)

Radikalın ismi ve simgesi	Özellikleri
Hidrojen radikali H [·]	Bilinen en basit radikal
Hidroksil radikali OH [·]	En reaktif oksijen metaboliti radikali olup insan vücudundaki tüm moleküllere saldırır
Süperoksit radikali O ₂ ^{·-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidrojen peroksit H ₂ O ₂	Reaktifliği düşük, moleküler hasar özelliği zayıf
Singlet oksijen O ₂	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali HO ₂ ^{·-}	Lipitlerde hızlı çözünerek lipit peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali ROO ^{·-}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkilidir, lipitlere lokalize
Triklorometil radikali CCl ₃	CCl ₄ metabolizması ürünüdür, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali RS [·]	Sülfürlü ve eşleşmemiş elektron içeren türlerin genel isim
Alkoksil radikali RO [·]	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit NO	<i>L</i> -argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir. Kirli hava, sigara dumanı vb'de bulunur.

Serbest radikaller organizmada genelde oksijenin kullanıldığı elektron transport sisteminde oluşmaktadır. Bunun dışında siklooksijenaz yolu, lipooksijenaz yolu, savunma sisteminde yer alan fagositik hücrelerde de oluşabilmektedir. Yaşamsal faaliyetler sırasında veya solunum, enzimatik reaksiyonlar ve otooksidasyon reaksiyonları 'endojen kaynaklar' olarak ifade edilmektedir. 'Ekzojen kaynaklı' etmenler arasında stres, virüsler, enfeksiyonlar, parakuat, alloksan gibi kimyasallara maruziyet, pestisitler, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, sisplatin, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, hiperbarik oksijen, trisiklik antidepressanlar, demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, civa gibi metal iyonları, asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, silika, aflatoksin B1 sayılabilir. En önemli ekzojen kaynağı ise güneş ışığı ve sigaradır. Oluşan serbest radikaller oldukça reaktif olduklarından dolayı hücre, hücre organelleri ve hücre dışı sıvıda bol miktarda bulunmaktadır (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006; Kılçksız ve Demirel, 2008; Atmaca ve Aksoy, 2009; Kılıç, 2013; Gagne, 2014; Yan, 2014) (**Şekil 6**).



Şekil 6. Hücrede Oksidatif Stres (Mekha ve ark., 2014)

Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak ifade edilmektedir. Pro-oksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise lipitler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Özellikle serbest oksijen ve nitrojen türevlerin aşırı artışı, hücre hasarının oluşmasında anahtar rol oynar. Serbest radikallerin dış atomik orbitallerinde bulunan eşlenmemiş elektronları hücrede bulunan lipitler, proteinler, karbonhidrat ve diğer moleküller ile etkileşime girerek oksidatif hasara yol açarlar. Nükleik asitlerde meydana gelen oksidatif stres DNA mutasyonlarına yol açmaktadır. Serbest radikallerden dolayı çoğu proteinde oluşan major değişiklikler hücre disfonksiyonu, apoptoz ve nekroza neden olmaktadır. Oluşan hasarlar, ateroskleroz ve buna bağlı vasküler hastalıklar, nörodejenerasyon (Alzheimer, Parkinson hastalıkları), immünolojik bozukluklar, yaşlanma, osteoartrit, kanser gibi kronik hastalıkların görülmesinde önemli yer tutar (Kılıç, 2013; Dasgupta ve Klein, 2014; Belviranlı ve Okudan, 2015; Kanamaru ve ark., 2015; Masoud ve ark., 2015; Mei ve ark., 2015; Sies, 2015; Varga ve ark., 2015).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir. Antioksidanlar, yükseltgenen substratlara oranla daha düşük derişimlerde, substratın pro-oksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engeller ya da geciktirirler (Yavaşer, 2011; Yalçın, 2011).

Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından dört ayrı şekilde etki ederler (Güngör, 2014):

i-) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, katalaz, GSH-Px vb.) bu şekilde etkilidir.

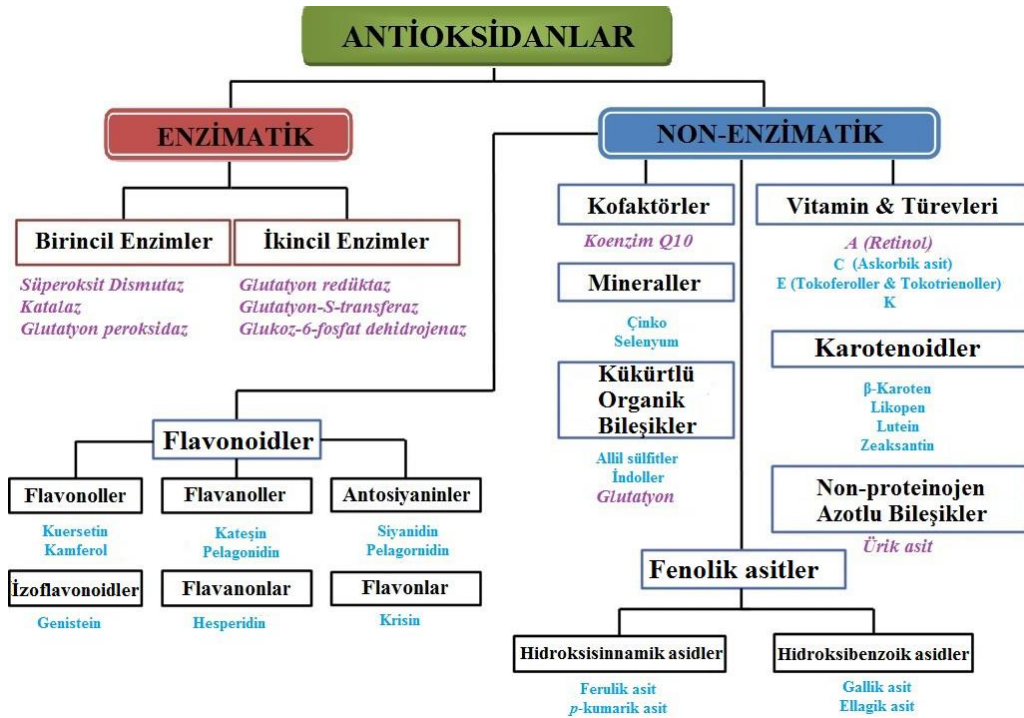
ii-) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, “bastırıcı” etkidir. Askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), flavonoidler (kersetin, kateşin vb.) bu tarz bir etkiye sahiptirler.

iii-) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki, “zincir kırıcı” etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, albumin gibi bileşikler bu şekilde etki ederler.

iv-) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması, “onarıcı” etkidir.

Antioksidanlar, sentetik ya da doğal kaynaklı olabilir (Şekil 7). Doğal kaynaklı antioksidanları, enzimatik ve non-enzimatik olarak 2 ana sınıfta toplamak mümkündür.

Doğal kaynaklı antioksidanlar



Şekil 7. Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması (Carocho ve Ferreira, 2013)

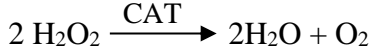
Enzimatik antioksidanlar: Hücrede birçok enzim doğrudan ya da dolaylı olarak serbest radikalleri önleyebilmektedir. Bu enzimlerden en çok bilinenleri aşağıda listelenmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksitin hidrojen peroksit ve oksijene tek elektronlu dismutasyonuna katalizler. İnsanda, süperoksit dismutaz 2 izoenzimi bulunmaktadır: sitozolde bulunan Cu-Zn-SOD ve mitokondriyal Mn-SOD.

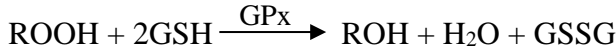
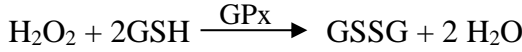


Katalaz (CAT) enzimi, her aerobik hücrede bulunan ve ‘hem’ yapısı taşıyan tetramerik bir proteindir. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositler katalazın en fazla aktivite gösterdiği yerlerdir. CAT, %80 oranında peroksizomlarda ve %20 oranında sitozolde bulunur.

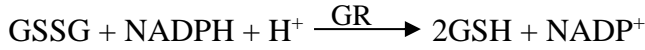
Katalaz enzimi hidrojen peroksidi, su ve oksijene dönüştürerek etkisiz hale getirir.



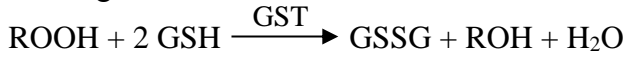
Glutasyon peroksidaz (GPx) enzimi, H_2O_2 varlığında hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Bu reaksiyonda hidrojen peroksit suya ve organik hidroperoksitler alkole indirgenirken, glutasyon (GSH) ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir.



Glutasyon redüktaz (GR) enzimi, GPx vasıtasıyla oluşan okside glutasyonun tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşümünü katalize eder.



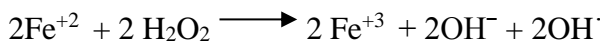
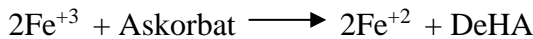
Glutasyon-S-Transferaz (GST) enzimi ise, özellikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri başta olmak üzere lipit peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar. Bunlar hem detoksifikasyonda rol oynar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı olarak görev alır.



Non-enzimatik antioksidanlar: Enzim yapısında olmayan doğal antioksidanlar ise bitki ve hayvanlarda bulunan bileşiklerdir. Bu gruptaki antioksidanların çoğu fenolik bileşiklerdir.

En çok bilinen ve kullanılan, enzimatik yapıda olmayan antioksidanları ise şu şekilde özetlemek mümkündür:

Askorbik asit (C vitamini), suda çözünür, iki tane iyonlaşabilen hidroksil grubu taşıyan ketolakton türevi bir vitamindir (Du ve ark., 2012). Askorbik asitin açık formülü 2-okzo-L-treoheksano-1,4-lakton-2,3-endiol olup 2 formu vardır: indirgenmiş formu L-askorbik asit ve okside formu dehidroaskorbik asit (DeHA). Askorbik asit kuvvetli bir antioksidan ya da indirgeyici ajan olup, reaktif oksijen ve nitrojen türevlerini süpürücü etkisi bulunmaktadır. Reaktif oksijen türevlerine saldırarak onları daha zayıf yarı-hidroaskorbat radikaline dönüştürür, böylece nükleik asit hasarını ve karsinogenezin oluşumunu engeller. Askorbik asitin bilinen antioksidan etkisinden ayrı olarak, pro-oksidan özelliği bulunmaktadır. Fe^{+3} ve Cu^{+3} metal iyonlarının indirgenmesini sağlar. Fenton reaksiyonu olarak adlandırılan bu reaksiyon sırasında yüksek etkili serbest radikaller oluşur.



Oluşan bu serbest radikaller, fosfodiester bağları kırarak DNA mutasyonuna sebep olurlar. Askorbik asitin bu pro-oksidan özelliği sayesinde sitotoksiste indüklenir

ve doza-bağılı olarak kanser oluşumu ve gelişimi önlenmiş olur (Putchala ve ark., 2013).

Tokoferoller (E vitamini), doğal olarak bulunan E vitaminin sekiz adet formu bulunmaktadır: tokoferoller (α , β , γ ve δ) ve tokotrienoller (α , β , γ ve δ). İnsan ve hayvanlarda baskın olarak bulunan E vitamini formu α -tokoferoldür (Nadeem ve ark., 2012). Tokoferoller, antioksidan etkilerinden dolayı gıda katkısı olarak geniş bir kullanıma sahiptir ve yağda çözünür bileşiklerdir. Serbest radikal varlığında ve lipit peroksidasyonunda zincir-kırıcı kapasitelerinden dolayı oksidasyon reaksiyonlarını durdurucu etkileri mevcuttur (Barbosa-Pereira ve ark., 2013).

Karotenoitler, 40 karbonlu izoprenoitler ya da tetraterpenler olarak bilinirler. Karotenoitler, bazı bakteriler, funguslar ve fotosentez yapabilen algler ve bitkiler tarafından üretilen lipofilik, doğal pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlarda ise, dışarıdan beslenme ile alınan karotenoitler A vitaminin biyosentezinde prekürsör olarak kullanılır. A vitaminin antioksidan etkisi oldukça yüksektir. Antioksidan aktiviteleri, singlet oksijeni söndürme ve peroksil radikallerini yakalama özelliklerinden ileri gelmektedir. Antioksidan kapasiteleri ise uzun zincirli yapılarında bulunan konjuge çifte bağlarından kaynaklanmaktadır. Bu sayede, kimyasal yapılarında hızlı bir rotasyon ve titreşim sağlayarak singlet oksijeni söndürme özelliği göstermektedirler. Doğal karotenoitler içerisinde en kuvvetli söndürme etkisi likopende görülür, bunun sebebi ise yapısında 11 konjuge çifte bağ bulunmasıdır. Düşük oksijen geriliminde ise β -karoten kuvvetli peroksil radikal süpürücü etki göstermektedir. β -karoten, peroksil radikallerine bağlanarak kararsız ve inaktif radikal β -karoten ürünlerine dönüşür ve bu sayede etki gösterir (Cazzonelli, 2011; Dimakou ve Oreopoulou, 2012; Latowski ve ark., 2014; Woodside ve ark., 2015).

Polifenoller, bitkiler aleminde oldukça geniş yer tutan, aromatik halkalarında bir ya da birden fazla hidroksil taşıyan sekonder metabolitlerdir. Polifenoller, flavonoitler ve flavonoit yapısı taşımayan fenolikler olarak ikiye ayırmak mümkündür. Flavonoitler, 15 karbon atomlu (C15) flavan çekirdeği taşımaktadırlar. Bu grup, flavanol (kateşin vb), flavonol (kersetin, mirsetin, kamferol vb), antosiyanidinler (siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin vb), flavon (apigenin, diosmin vb), flavonon (hesperidin, naringenin vb), kalkon (floretilin vb) olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Flavonoit yapısında olmayan polifenolikleri ise, stilbenler (*trans*-stilben, rezveratrol vb), fenolik asitler (sinnamik asit, gallik asit, kafeik asit vb), saponinler (ginsenositler), tanenler, kurkuminoitler olarak özetlemek mümkündür (Stagos ve ark., 2012). Diyetle alınan polifenoller kuvvetli antioksidan olup serbest radikalleri tutar ve süpürücü etki gösterir, hücre moleküllerinin zarar görmesini engeller. Antioksidan aktiviteleri sadece süpürücü etkiden ibaret değildir, antioksidan ve detoks enzimlerinin arttırılması, hücre sinyali ve gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ile diğer antioksidan yollarına sinerjik katkıda bulunarak etki gösterirler (de Mello Andrade ve Fasolo, 2014). Ayrıca, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu şelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar.

Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük derişimlerde bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir.
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır.

Sentetik kaynaklı antioksidanlar

Standart antioksidan aktivite çalışmalarında doğal antioksidanların karşılaştırılabilmesi için sentetik antioksidan maddeler geliştirilmiştir. Bu saf haldeki bileşikler gıdalara koruyucu olarak ilave edilmekte ve raf ömrünü uzatmaktadır. Sentetik antioksidan maddeler ve kullanım amacı **Çizelge 2**'de özetlenmiştir.

BHA, (2-terşiyer-bütıl-4-hidroksianisol ve 3-terşiyer-butıl-4-hidroksianisol karışımı; C₁₁H₁₆O₂), beyaz, mumsu katı bir yapıya sahip, hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilen ancak suda çözünmeyen bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır. BHT, yağlar ve yağ asitlerinin oksidasyonunda okside olmuş lipitlerle verdiği reaksiyon sonucu peroksit radikallerinin etkisini yok eder (Yavaş, 2011). 2011-2012 yılları arasında, Avrupa Gıda Güvenliği Birimi (EFSA), bu antioksidanların günlük kullanım dozlarını yeniden düzenlemiştir. Bu düzenlemeye göre günlük alım miktarları, BHT için 0.25 mg/kg/vücut ağırlığı/gün, BHA için 1.0 mg/kg/vücut ağırlığı/gün olarak belirlenmiştir. TBHQ ise hayvansal gıdaların renk, tat ve besin değerlerini korur, taze kalmalarını sağlar. Oktil gallat ise güvenli gıda katkısı sınıfına girmektedir, çünkü metabolize edildiğinde gallik asit ve oktanola parçalanır ve insan sağlığını olumsuz etkilemez (Carocho ve Ferreira, 2013).

Çizelge 2. Sentetik Kaynaklı Antioksidan Maddeler ve Özellikleri (Carocho ve Ferreira, 2013).

Bileşik	Özellikleri
BHA (Bütillenmiş Hidroksi Anisol)	Gıda antioksidanı
BHT (Bütillenmiş Hidroksi Toluen)	Gıda antioksidanı
TBHQ (<i>tert</i> -Bütılhidrokinon)	Hayvansal gıda antioksidanı
PG (Propil Gallat)	Gıda antioksidanı
OG (Oktil Gallat)	Gıda ve kozmetikte antioksidan olarak kullanılır, antifungal etkisi vardır.
2,4,5-Trihidroksi Bütirofenon	Gıda antioksidanı
NDGA (Nordihidroguayaretik asit)	Gıda antioksidanı
4-Hekzilrezorsinol	Gıdalarda meydana gelen esmerleşme reaksiyonlarını önleyici olarak kullanılır.

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyaller, Kimyasal Madde ve Gereçler

Bitki materyali

Arum italicum Miller A2 Bursa: Armutlu Mezarlığı çevresinden 4 Temmuz 2013 tarihinde toplanmıştır. Bitkinin teşhisi Prof. Dr. Hulusi Malyer (Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 16059-Görükle/Bursa) tarafından yapılmıştır. Toprak üstü kısımlarından ayrılan yumrular, serin ve havadar kapalı bir alanda kurutulmuştur. Herbaryum örnekleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi herbaryumunda (ESSE no:14620) saklanmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. *Arum italicum* Bitki Örneği ve Yumrular

Kullanılan enzim ve hücre hatları

Çizelge 3. Deneylerde Kullanılan Enzim ve Hücre Hatları ile İlgili Bilgiler

Enzim/ Hücre hattı	Kaynak	Firma
A549 (Akciğer karsinoma)	İnsan	ATCC® CCL-185™
MCF-7 (Meme adenokarsinoma)	İnsan	ATCC® HTB-22™
L929 (Normal fibroblast)	Fare	ATCC® CCL-1
LOX (Lipoksijenaz)	<i>Glycine max</i>	Sigma
BuChE (Bütirikolinesteraz)	İnsan serumu	Sigma
AChE (Asetilkolinesteraz)	İnsan	Sigma

Kullanılan kimyasallar

Çizelge 4. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler ile İlgili Bilgiler

Kimyasal madde	Firma
1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)	Aldrich
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum bromit (MTT), ~%98 (TLC)	Sigma
2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), ≥ %98 (HPLC)	Sigma
Anilin	Riedel
Annexin V-FITC apoptoz ölçüm kiti	BD Pharmingen
Asetiltiyokolin iyodit (ATCI)	Fluka
Aseton Chromasolv	Riedel
Asetonitril	Sigma-Aldrich
BRdU kolorimetrik kit	Roche
Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)	Sigma
Bütiril tiyokolinyodit (BTCl)	Fluka
C18 kolon dolgu materyali	Macherel Nagel
Demir (III) klorür	Sigma
Diklorometan ≥ %99.8	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojenfosfat	Merck
Distile su	
Dulbecco's Modified Eagles Medium/Nutrient Mixture	Sigma
F-12 Ham (DMEM:F12) besiyeri	
Dimetil sülfoksit (DMSO) ekstra saf	Sial
5,5-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) DTNB, %99.0	Aldrich
Etanol absolü	Riedel
Fetal bovine serum	Sigma
Formik asit, ≥%95	Sigma-Aldrich

Çizelge 4 (devamı). Deneysel Aşamalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ile İlgili Bilgiler

Galantamin	USP Reference Standard
Gallik asit	Sigma
Hidroklorik asit, % 37 ekstra saf	Riedel
İyot	Carlo Erba
Kloralhidrat	Merck
Kloroform Chromasolv	Riedel
Laktik asit	Ak Kimya
L-askorbik asit, >= %99.0	Sigma
Linoleik asit, >= %99	Sigma
Metanol Chromasolv - HPLC grade	Sigma Aldrich
Mitoksantron	Sigma
n-Hekzan	Sigma Aldrich
Nordihidroguyaretik asit (NDGA) >=%97.0 (YBSK)	Fluka
PBS çözeltisi	Sigma
Penisilin/streptomisin çözeltisi	Sigma
Potasyum dihidrojenfosfat	Merck
Potasyum ferrisiyanit	Sigma Aldrich
Potasyum fosfat	Merck
Potasyum heksasiyanoferrat	LaborTeknik
Potasyum iyodür	Kimetsan
RPMI-1640 medium	Sigma-Aldrich
RP-18 F254s kaplı İTK plağı	Merck
Silikajel kolon kromatografisi için	Merck
Silikajel GF 254 alüminyum destekli İTK plağı	Merck
Sodyum bikarbonat	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum persülfat	Sigma
Sudan III (1-[4-(Fenilazo)fenilazo]-2-naftol)	Himedia
Sülfürik asit, ACS %95-98	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit, ACS reagent, % 99.0	Sial
Tris-HCl	Sigma
Trolox, %97	Aldrich
Tween 20	Sial
β -karoten, >= % 95 (HPLC)	Sigma
Vanilin, %99	Sigma-Aldrich

Kullanılan cihaz ve apareyler

Çizelge 5. Deneylerde Kullanılan Cihaz ve Apareylere İlişkin Bilgiler

Cihaz/malzeme	Firma
Analitik terazi	Mettler Toledo-MS204S
Desikatör	Ildam
ELISA Okuyucu	ELx808 IU
Etüv	WTB BINDER
Bilgisayara bağlı Inverted Mikroskop	IBM marka Bilgisayar-Olympus CKX1 Mikroskop
Flow sitometri cihazı	BD Facs Aria
Kaba terazi	Sartorius BP3100S
Karbondioksit inkübatörü	Heraeus INSTRUMENTS
Kuvartz küvet	Isolab
Kül fırını	Nabertherm P330 (30-3000°C)
LC/MS-MS	Shimadzu HPLC Sistem/ 3200 Q TRAP AB Sciex mass spektrometre
Liyofilizatör	Labconco
Manyetik karıştırıcı ısıtıcı	Heidolph MR 3001
Mikroplaka ısıtıcı karıştırıcı	BIOSAN Thermoshaker PST 100HL
Mikroplaka okuyucu	BioTek Power Wave XS
pH Metre	WTW- Inolab pH 720
Rotavapor	Heidolph
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5804 ve Heraeus (Seoatech) Biofuge 17RS
Soxhlet apareyi	Ildam
Steril kabin	Holten LaminAir (HV ³ ++)
Su banyosu	GFL 1086 ve BM402 Nüve
Trino Araştırma Mikroskopu	Olympus BX51T-32H01
Ultrasonik banyo	ELMA S100H (Elmasonic)
UV-spektrofotometre	Shimadzu PharmaSpec UV-1700
Vorteks	Heidolph reaxtop

Toz edilmiş yumrularda yapılan araştırmalar

Mikroskopik inceleme

Kapalı ve havadar, serin yerde kurutulan yumrular, ince toz haline getirilmiştir. Mikroskopik inceleme için, su, Sartur Reaktif ve kloralhidrat çözeltileri ile preparatlar ayrı ayrı hazırlanmıştır. Olympus marka Torino araştırma mikroskopu ile inceleme yapılarak elde edilen görüntüler kaydedilmiştir.

Sartur reaktifinin hazırlanışı

Sartur Reaktifi, Farmasötik Botanik Bilim adamları Prof. Dr. Turhan Baytop ile Prof. Dr. Sarım Çelebioğlu tarafından ilk defa hazırlanan bir reaktiftir ve aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.

Saf laktik asit	60 mL
Soğukta Sudan III ile doyurulmuş laktik asit	45 mL
Saf anilin	2 g
İyot	0.2 g
Potasyum iyodür	1 g
Alkol (%95)	10 mL
Distile su	80 mL

1) Soğukta Sudan III ile doyurulmuş laktik asit hazırlamak için, asit, çözebileceği miktardan biraz fazla Sudan III ile beraber ara sıra çalkalamak şartı ile birkaç gün kendi haline bırakılmış ve sonra cam pamuğundan süzülmüştür.

2) 60 mL laktik asit içine 2 g anilin konularak çalkalanmış ve üzerine Sudan III ile doyurulmuş 45 mL laktik asit eklenmiştir.

3) 1 g potasyum iyodür, 10 mL alkol (%95) ve 0.2 g iyot eklenmiş, iyot tamamen çözüldükten sonra, bu solüsyon laktik asitli solüsyona eklenerek üzerine 70 mL distile su ilave edilmiştir.

Kloralhidrat çözeltisinin hazırlanışı

Kristal haldeki kloralhidrat 1 g tartılarak distile su ile %50'lik çözeltisi hazırlanmıştır.

Kalite kontrol yöntemleri

Nem miktar tayini

Önceden sabit ağırlığa getirilmiş camdan yapılmış tartım kabı içerisine 1 g civarında toz edilmiş yumru tam olarak tartılarak 100-105°C'lik etüvde 1 saat süreyle tutulmuştur. Etüvden çıkartılarak desikatörde belirli bir süre soğuması için bekletildikten sonra tartılmıştır. Bu işlemlere son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edilerek, droğun yüzde nem miktarı hesaplanmıştır.

Bütün kül miktar tayini

600 °C'ye ayarlanmış Nabertherm yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kroze içerisine 1 g civarında toz edilmiş yumru tam olarak tartılmıştır. Öncelikle 100-105 °C'lik etüvde 1 saat süreyle kurutulmuş, daha sonra 600 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakılmıştır. Fırından çıkartılarak desikatörde soğuması için bekletildikten sonra tartılmıştır. Bu işlemlere külü içeren krozenin ağırlığında son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edilerek, droğun içerdiği total kül miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır.

Asitte erimeyen kül miktar tayini

Bütün kül miktar tayini için elde edilen kül üzerine, distile su (15 mL) ve HCl (10 mL) ilave edilerek krozenin ağzı saat camıyla kapatılmış ve tablalı ısıtıcı üzerinde ısıtılıp 10 dk hafif bir şekilde kaynaması sağlanmıştır. Soğuduktan sonra, kül bırakmayan süzgeç kâğıdı (Macherel Nagel marka) kullanılarak süzölmüştür. Süzöntü nötr oluncaya kadar, sıcak distile suyla süzgeç kâğıdı yıkanmıştır. Üzerinde kalan bakiyeyle birlikte süzgeç kâğıdı tekrar krozenin içerisine konulmuş ve son iki tartım arasındaki fark 1 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar yakma işlemine devam edilmiştir. Böylece droğun yüzde olarak hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı hesaplanmıştır.

Ekstraksiyon Çalışmaları

Ekstraksiyon çalışmaları için çözücü ve metot seçimi

Literatür bilgileri göz önünde tutularak, kurutulmuş yumruların çeşitli ekstraktörler hazırlanmıştır. 5 g'lık yumru materyalleri ayrı ayrı *n*-hekzan, diklorometan, etanol, etanol:su (1:1) karışımı ve aseton:su (1:1) karışımının 100'er mililitresi ile 3 kez 48 saat çalkalamalı maserasyona tabi tutulmuştur. Ayrıca ekstraksiyona sıcaklığın da etkisini araştırmak amacıyla aseton:su (1:1) karışımı ile 10 g yumru, 6 saat Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Ekstreler rotavapor (<40°C) kullanılarak yoğunlaştırılmıştır.

Ham ekstrelerin hazırlanışı

Kurutulmuş ve kaba toz edilmiş yumrular, 792.7 g tartılarak, büyük ölçekli Soxhlet aparatına yüklenmiştir. Çözücü olarak, aseton:su (1:1) karışımı kullanılmıştır. 8 saat süreyle devamlı ekstraksiyona tabi tutulan ekstre, rotavapor kullanılarak (<40 °C) yoğunlaştırılmıştır.

Kaba fraksiyonların hazırlanışı

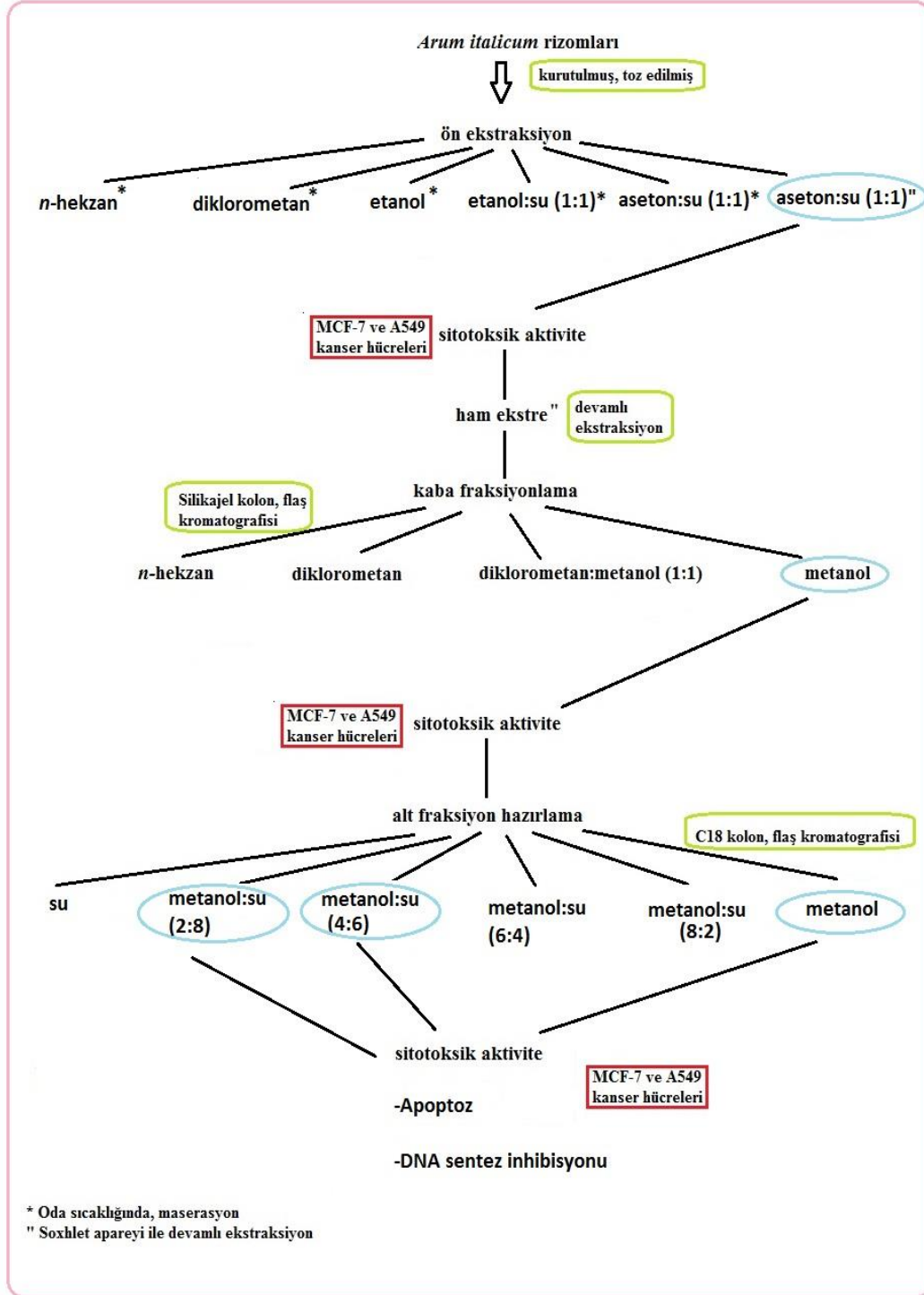
Kaba fraksiyonlama için silikajel (Silikajel 60, 0.063-0.2 mm partikül boyutlu, Merck), *n*-hekzan ile süspand edilerek ıslak olarak kolona doldurulmuştur. 50 g ham ekstre tartılarak 200 mL *n*-hekzan ile süspand edilmiştir. Elde edilen karışım, sırasıyla *n*-hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol (1:1) ve metanol çözücüleri ile flaş kromatografisine tabi tutulmuştur. Elde edilen fraksiyonlar, rotavapor (<40°C) ile yoğunlaştırılmıştır.

Alt fraksiyonların hazırlanışı

Alt fraksiyonların hazırlanması amacıyla 13.05 g metanol fraksiyonu tartılarak 15 mL %20'lik metanol ile çözülmüş ve ardından 5 g C18 dolgu materyali ile bulamaç haline getirilmiştir. Ayrımın yapılacağı uygun boyuttaki kolon 100 g C18 dolgu materyali ile kuru olarak doldurulmuştur. Metanol fraksiyonun alt fraksiyonları sırasıyla 500'er mL su, metanol:su (2:8), metanol:su (4:6), metanol:su (6:4), metanol:su (8:2) ve metanol ile vakum altında ayrılmıştır. Elde edilen alt fraksiyonlar ya dondurularak kurutulmuş ya da rotavapor altında yoğunlaştırılmıştır.

Ekstre ve fraksiyonların hazırlanışında 'biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama metodu' esas alınmıştır. Bu doğrultuda, ekstraktörlerin fraksiyonlaması

için MCF-7 (meme) ve A549 (akciğer) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etki sonuçları belirleyici olmuştur (Şekil 9).



Şekil 9. Biyolojik Aktivite Yönlendirmeli Fraksiyonlama Metodu ile Tez Çalışma Planı

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Analiz

Yumrulardan hazırlanan ekstre ve fraksiyonların karşılaştırılması amacıyla ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılmıştır. Silikajel GF 254 ve RP-18 F254s kaplı plaklarda aşağıda sıralanan çözücü sistemleri denenmiştir. Dvelopman sonrası plakların değerlendirilmesi 254 ve 366 nm UV dalga boylarında tarama ile yapılmış, ayrıca vanilin-sülfürik ve %5 sülfürik asit (etanolda) reaktifleri kullanılarak plaklar renklendirilmiştir.

Kullanılan çözücü sistemleri:

Kloroform:Aseton (4:1)

Etilasetat:Metanol (3:1)

Diklorometan:Etanol (97:3)

Etilasetat:Metanol:Su (77:13:10)

Kloroform:Metanol:Su (62:31:7)

Asetonitril:Metanol:Su (30:70:1)

Diklorometan:Metanol (97:3)

Kloroform:Metanol (9:1)

Etilasetat:Metanol:Su:Formik asit (77:13:10:1)

Alt fraksiyonların Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi-Kütle Spektroskopisi (YBSK/KS-KS) ile Analizleri

Cihaz: Shimadzu 20A Prominace Sıvı Kromatografisi sistemi ve dedektör olarak kütle spektroskopisi Applied Biosystems 3200 Q-Trap MS/MS

Kolon: GL Science Intersil ODS 4.6 x 250, 5 µ

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Akış hızı: 0.7 mL/dk

Hareketli faz A (metanol: su: formik asit) (10:89:1 h/h/h)

Hareketli faz B (metanol: su: formik asit) (89:10:1 h/h/h)

Gradyent akış programı:

Zaman (dk)	B konsantrasyonu
0	% 10
40	% 100

Kütle spektroskopisi için;

Yöntem: Genişletilmiş kütle tarama (EMS)

Polarite: Negatif mod

Kütle aralığı: 100-1200 amu

Collision gas: azot

Collision energy (CE): 50

Collision energy spread (CES): 0

Declostiring potential (DP): 40

Enterance potential (EP): 10

Curtain gas (CUR): 20

Gas Source 1 (GS1):50

Gas Source 2 (GS2):50

CAD: Yüksek

İhe: on

Temperature (TEM): 500

Her bir alt fraksiyon için total iyon kromatogramı ve 280 nm’de elde edilen kromatogramlardaki pikler, tutunma zamanları (Rt) ve kütle spektrumları ile değerlendirilerek literatür ile karşılaştırılmıştır.

Biyolojik Aktivite Yöntemleri

Antikanser etkinin araştırılması

Hücre kültürü ve ekstre uygulaması

A549 insan akciğer adenokarsinoma ve insan meme kanser hücreleri (MCF-7), DMEM:F12 (1:1 *h/h*) besiyeri ile %10 fetal bovin serum içeren %90 RPMI ortamında inkübasyona bırakılmıştır. Tüm besiyerleri 100 IU/mL penisilin-streptomisin ile muamele edilerek ve hücreler 37 °C’de %95 oranında nem ve %5 CO₂ ortamında geliştirilmiştir. Gelişen hücreler 2x10⁴ hücre/mL konsantrasyonda 96-kuyucuklu doku kültürü mikrolakalarına örnek uygulama yapılmadan 24 saat önce inkübe edilmiştir. Ekstreler, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmış, hücrelerin yaşayabilirliğine etki etmeyecek şekilde ve son kültür ortamındaki konsantrasyonu %0.1’den düşük olacak şekilde yine DMSO kullanılarak uygun seyreltmeler yapılmıştır.

Sitotoksik etki tayini için MTT metodu

3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tetrazolyum tuzunun mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi ile hücrel redüksiyonu sonucu formazan türevi oluşur, buradan hareketle kolorimetrik olarak ölçüm yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ekstreler ve mitoksantron (pozitif kontrol), hücreler ile son konsantrasyon 4-2000 µg/mL aralığında olacak şekilde uygun konsantrasyon belirlendikten sonra 24 saatliğine inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, MTT son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde ilave edilerek hücreler 4 saat süreliğine 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Kültür ortamının uzaklaştırılmasının ardından formazan kristalleri 200 µL DMSO ile çözülmüş, spektrofotometrik mikrolaka okuyucu kullanılarak 540 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Test edilen tüm konsantrasyonlar için 3 tekrar yapılmış ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

DNA sentez analizi

MTT metodu ile belirlenen IC₅₀ dozlarına bağlı olarak, DNA sentez analizi Cell Proliferation ELISA, BrdU (kolorimetrik) kit kullanılarak ölçülmüştür. Bu immünohistokimyasal boyamaya dayalı bir yöntem olup, spesifik bir anti-BrdU kullanılarak hücre siklusunun S-fazı süresince timidin yerine bromodeoksiuridinin (BrdU) nükleer DNA'ya katılımının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Böylece, bu metot karsinojenik hücrelerde DNA sentezinin inhibisyonu oranının kolorimetrik olarak ölçülmesini sağlamaktadır. Hücrelerin 2x10³ yoğunlukta olacak şekilde 96'lık düztabanlı mikropalakalara ekilmesinden sonra, çeşitli konsantrasyonlarda ekstreler ve mitoksantron kanser hücrelerine ilave edilmiş, mikropalakalar 37 °C'de 24 saat boyunca %5 CO₂ ve %95 nem taşıyan ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 2 saat süresince hücreler 10 µL BrdU çözeltisi ile işaretlenmiş ve sonrasında karıştırılmıştır. Anti-BrdU-POD (100 µL) ilave edilerek 90 dk inkübasyona bırakılmıştır. 1xPBS çözeltisi ile yıkama yapıldıktan sonra hücreler substrat (TMP) ile muamele edilmiş ve örneklerin absorpsiyon değerleri 492 nm'de okunmuştur. Deneyler iki kez tekrar edilerek ayrıca her dozdaki örnek için ikili kuyucuklar kullanılmıştır.

'Flow sitometri' ile apoptozun araştırılması

1950'li yıllarda geliştirilen ve 'akım, akış sitometrisi' olarak tanımlanan bu yöntem, günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır (Azkur ve Aslan, 2012). Flow sitometre, lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometri, süspansiyon halinde hazırlanmış bir sıvı içerisinde hücre veya partiküllerin, kantitatif ve kalitatif özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile süspansiyonu hazırlanan hücre veya partiküller, lazer ışığı yansıtılan bir bölmeden geçirilir. Bu bölmeden tek tek geçen hücrelerin, lazer ışığı ile aydınlatılması sonrasında, üstünden yansıyan ışınlar ait sinyaller, uygun detektör ve filtreler tarafından tespit edilir, bu ışınlar toplanır ve analiz edilir (Güleş ve Eren, 2008; Azkur ve Aslan, 2012).

Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor FITC, PE, PerCP gibi floresan boya ile işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir. Hücrelerin taşıdıkları hücre içi enzimlerin, DNA, RNA miktarlarının da uygun florokromlar ile işaretlenerek belirlenmesi mümkündür. Akım sitometrik incelemede farklı florokromlar ile işaretlenen hücreler, basınç altında "flow cell" denilen kısımdan geçerler ve burada lazer ışınına maruz kalırlar. Hücrelerin üzerine bağlanan monoklonal antikorlar lazer ışınına absorbe ederek üzerlerindeki florokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçarlar, her hücreden saçılan ışınlar çoklu dedektörler yardımı ile her hücre için ayrı ayrı belirlenir ve bu bilgiler bilgisayar ortamına aktarılır. Florokromların saçtığı ışınlar yanı sıra, hücreye çarpıp ileri doğru saçılan ve hücrenin büyüklüğü ile ilgili olan lazer ışınları hücreden 90° açıyla yana saçılan ve hücrenin granülaritesi/kompleks yapısı ile ilgili olan ışınlarla ilgili veriler de aktarılmaktadır. Her hücre ile ilgili depolanan tüm bilgiler, analiz için hazırlanmış programlar yardımı ile birçok parametreyi bir arada değerlendirecek şekilde analiz edilir. Bu sayede, neoplastik olayların biyolojik davranışlarını önceden belirlemek,

prognoz ve tedavide anlamlı bilgiler toplamak mümkündür (Dalva ve Gülbaş, 2006; Safalı ve ark., 1992).

Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır (Güleş ve Eren, 2008).

MTT metodu ile ekstrelerin IC₅₀ dozlarının hesaplanmasından sonra, ekstreler ve pozitif kontrol belirlenen IC₅₀ dozlarında hücrelerle 24 saatliğine inkübasyona bırakılarak, Annexin V boyama protokolü uygulanmıştır. İlk olarak, hücreler soğuk PBS ile yıkanarak ve bağlayıcı tampon çözeltisi ile yaklaşık 1 x 10⁶ hücre/mL konsantrasyonda olacak şekilde süspanse edilmiştir. Bu çözeltiden ~1 x 10⁵ hücre olacak şekilde 100 µL alınarak 5 mL'lik test tüplerine aktarılmıştır. 5 µL Annexin-V ve PI ilave edilerek, hücreler 15 dk boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiş, ardından 400 µL 1x bağlayıcı tampon çözeltisinden her tübe ilave edilerek hücreler flow sitometrisi ile analiz edilmiştir.

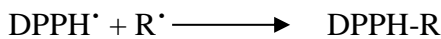
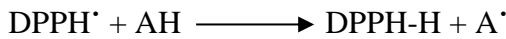
Sağlıklı hücrelerde toksik etkinin hücre kültürü ile araştırılması

Alt fraksiyonların olası toksik etkilerini belirlemek amacıyla L929 normal fare fibroblast hücre hatları kullanılmıştır. Toksik etki testleri için uygulanan metotlar, hücre kültürünün hazırlanması ve MTT deneyi başlıklarındaki prosedürler ile aynı yol izlenmiştir. E1, 0.244-125 µg/mL; diğer alt fraksiyonları ise 0.181-80 µg/mL dozları arasında çalışıldı.

Antioksidan etkinin araştırılması

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

DPPH radikali çalışılmasının, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonlarına göre bazı avantajları bilinmektedir: metal-iyon şelasyonları veya enzim inhibisyonları sırasında meydana gelen zincir reaksiyonlarından etkilenmemesi, hızlı sonuç alınması ve substrata ihtiyaç duymaması. Taze hazırlanan DPPH çözeltisi koyu mor renklidir ve 517 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. Eğer ortama antioksidan bir madde ilave edilirse koyu mor renk kaybolur ve renksiz bir görünüm oluşur. Böylece antioksidan moleküller, hidrojen veya elektron vererek DPPH molekülüne atak eder ve onu renksiz 2,2-difenil-1-hidrazin ya da başka bir süstitüye hidrazin analoguna dönüştürür. Bu dönüşüm 517 nm'lik bantta absorpsiyon düşüşüne neden olur. Bu durumdan faydalanarak, hızlı bir şekilde bileşiklerin/ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri belirlenmektedir.



(A, antioksidan madde; R, radikal madde)

Ancak bu test sadece serbest radikal süpürücü etki hakkında bilgi verir, pro-oksidan aktiviteyi belirlemez (Amarowicz ve ark., 2004).

Örneklerin DPPH• radikalini süpürücü etkileri, Kumarasamy ve ark. (2007)'nin yönteminde birtakım değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Ekstre ve fraksiyonların uygun konsantrasyonlardaki stok çözeltileri DMSO ile hazırlanmış

olup stok çözeltilerden her biri 96 kuyucuklu mikropalakalara 200 µL olacak şekilde aktarılmış ve bir sonraki kuyucukta konsantrasyon yarıya düşecek şekilde bir seri seyreltmeler metanol ile yapılmıştır. DPPH'ın %0.02'lik metanol çözeltisi taze hazırlanarak her bir kuyucuğa 100 µL ilave edilerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübe edilmiş, daha sonra absorbanslar 517 nm'de okunarak ve inhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 13. version, SPSS Inc., Chicago, IL) belirlenen değerler dört paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

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

ABTS radikal süpürücü etki tayini

Maddelerin total antioksidan aktivitelerini ölçmede kullanılan spektrofotometrik metotlardan biri ABTS^{•-} (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu) radikal katyonu ile yapılan deneylerdir. ABTS deneyi, metmiyoglobinin ABTS^{•-} varlığında hidrojen peroksit ile aktivasyonu ve radikal katyonunun üretilmesi esasına dayanmaktadır. Ancak antioksidan maddelerin hızlı bir şekilde atağı ile ferril miyoglobin radikalinin redüksiyonuna neden olabileceği tartışma konusudur. Bu nedenle yeni bir teknik geliştirilmiştir. Bu yöntem ile potasyum persülfat ve ABTS^{•-} in reaksiyonu sonucu mavi/yeşil ABTS^{•+} kromoforu meydana gelmektedir. Bu madde, 645, 734 ve 815 nm dalga boylarında maksimum absorbans vermektedir. Ortama antioksidan ilavesiyle okside haldeki mavi/yeşil ABTS^{•+} antioksidan tarafından zaman ve konsantrasyona bağlı olarak redüklenir. Böylece renk düşüşüne bağlı olarak absorbans değerlerinde azalma kaydedilir. Vitamin E analogu olan Troloks pozitif kontrol olarak aynı koşullarda çalışılır ve sonuçlar Troloks'a eşdeğer olarak verilir. Bu metot, yağda ve suda çözünür bileşiklerin total antioksidan kapasitelerinin ölçülmesine olanak sağlamaktadır (Re ve ark., 1999).

Bu deney, antioksidan etkili Troloks (Vitamin E'nin suda çözünen analogu) ile örneklerin stabil ABTS radikalini süpürücü kapasitelerini karşılaştırma esasına dayanmaktadır. Mavimsi-yeşil ABTS, son konsantrasyonları 2.5 mM sodyum persülfat ile 7 mM ABTS'in oda sıcaklığında karanlıkta ve kullanılmadan 12-16 saat önce reaksiyonu sonucu hazırlanmıştır. Konsantre haldeki ABTS çözeltisi, 734 nm'deki absorbans değeri 0.7-0.8 olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. 10 µL örnek (0.6, 0.3 ve 0.1 mg/mL konsantrasyonlarda) çözeltisi 990 µL ABTS çözeltisine ilave edilerek, Troloks standardı (son konsantrasyon 1-20 µM) ve örnek çözeltileri ilave edildikten birinci dakikadan itibaren 40 dk boyunca UV/spektrofotometre cihazı ile kinetik ölçüm yapılarak absorbans değerlerindeki düşüş kaydedilmiştir. Troloks'un stok çözeltisi etanolde ve 2.5 mM konsantrasyon olacak şekilde hazırlanmıştır. Troloks'un çeşitli konsantrasyondaki çözeltilerine kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve örneklerin ABTS radikal süpürücü etkileri Troloks'a eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

İndirgeme gücünün belirlenmesi

Ekstre ve fraksiyonların indirgeme kapasitelerinin belirlenmesi deneyi, potasyum ferrisiyanit (Fe⁺³) ile reaksiyonları sonucu potasyum ferrosiyanit (Fe⁺²)'e indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan potasyum ferrosiyanit çözeltisi 700 nm'de absorbans vermektedir.

Potasyum ferrisiyanit + Ferriklorit $\xrightarrow{\text{Antioksidan}}$ Potasyum ferrosiyanit + Ferrozklorit

Başlangıçta sarı renkli çözelti, ortama ilave edilen antioksidan maddenin indirgeme gücüne bağlı olarak yeşil/mavi rengine döner. Antioksidanlar, Fe⁺³/ferrisiyanit kompleksinin ferroz formlara dönüşmesine neden olur. Oluşan yeşil/mavi renkli çözeltinin 700 nm'deki absorbans değerleri kaydedilir. 700 nm'de absorbans değerlerinin artışı oluşan Fe⁺² konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu metot, madde/ekstrelerin hidrojen verebilme kapasiteleri dolayısıyla da antioksidan aktiviteleri hakkında fikir vermektedir (Arulpriya ve ark., 2010).

Tez kapsamında örneklerin demir (III)' ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu, (1986) yönteminde yapılan bazı değişikliklerle belirlenmiştir. 1 mL örnek çözeltisi 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1'lik potasyum heksaziyanoferrat çözeltisi ile karıştırılmıştır. 50 °C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10'luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş ve karışım 10 dk santrifüj edilerek üst kısım alınmıştır. Son olarak, 2.5 mL üst kısım 2.5 mL su ve 0.5 mL %0.1'lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm'de absorbansları okunmuştur. Örneklerin indirgeme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak hesaplanmıştır. Tüm analizler, dört paralel tekrarlı ve ortalama değerler olarak verilmiştir.

Lipit peroksidasyonunu inhibe edici etki tayini

β -karoten soldurma deneyi olarak adlandırılan bu metot, 50 °C'de termal indüksiyon ile yağ asitlerinin serbest radikaller tarafından oksidasyonu sonucu β -karoten ve linoleik asit içeren sulu emülsiyonunun renksizleşmesi esasına dayanır. Renk değişimi 470 nm'de ölçülerek kantitatif bir hesaplama yapılır (Prieto ve ark., 2012).

Tez kapsamında örneklerin antioksidan aktivitesi β -karoten soldurma deneyine göre araştırılmıştır (Oomah ve Mazza 1996, Velioğlu ve ark., 1998). β -karoten'in kloroformdaki çözeltisi 0.2 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmış ve 1 mL'si, linoleik asit (40 mg) ve Tween 20 (400 mg) bulunan armudi balona ilave edilmiştir. Çözeltideki kloroform azot altında yoğunlaştırılmış ve ardından 50 mL distile su ilave edilerek hızla çalkalanarak emülsiyon hazırlanmıştır. Kontrol numunesi, örnek ve pozitif kontrol konulmadan, şahit numuneler ise β -karotensiz olarak aynı protokol ile hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm numuneler, 470 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Daha sonra, numuneler termal otooksidasyon için 50 °C'de 105 dk su banyosunda bekletilerek β -karoten'in solma derecesi 15 dakikalık aralıklarla örnek alınarak izlenmiştir. Antioksidan aktivite aşağıdaki eşitlik kullanılarak ve üç deneyin ortalaması olarak verilmiştir (Oomah ve Mazza 1996, Velioğlu ve ark., 1998).

$$AA\% = [1 - (Ab_{0\text{örnek}} - Abs_{105\text{örnek}}) / (Ab_{0\text{kontrol}} - Abs_{105\text{kontrol}})] \times 100$$

Lipoksijenaz (LOX) enzim inhibisyonu deneyi

5-LOX enzimi bilindiği gibi, araşidonik asidi lökotrienlere dönüştürerek kronik inflamasyon ve alerjik reaksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. 5-LOX, 1,4-dien bağı içeren doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu ve linoleik asit modifikasyonunu (1,4-dien'den 1,3-dien) katalizler, böylece oluşan ürünler 234 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Mogana ve ark., 2013).

Örneklerin LOX inhibisyon aktiviteleri, Baylac ve Racine (2003) tarafından tanımlanan metodun modifiye edilmesi ile spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Potasyum fosfat tamponu (1.94 mL; 100 mM; pH 9.0), 40 µL örnek çözeltisi ve 20 µL LOX çözeltisi karıştırılarak 25 °C'de 10 dk boyunca inkübasyona bırakılmış, ardından 10 µL linoleik asit ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. 234 nm'de 10 dk boyunca absorbans değişimi kaydedilmiştir. Örnekler ve nordihidroguayaretik asit (pozitif kontrol) uygun konsantrasyonlarda uygun çözücüde çözülerek hazırlanmıştır. Deneydeki kinetik ölçümler için kuvarz küvet kullanılmıştır. Tüm ölçümler üç kez tekrar edilerek ortalama yüzde değerler verilmiştir.

Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyon deneyleri

Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzimleri, asetil- ve bütiriltiyokolin substratlarını tiyokolin olarak hidrolize uğrattır. Bu reaksiyon, tiyol ile 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoat iyonları arasında devam eder ve sarı renkli anyon (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) meydana gelir. Bu ürün 412 nm'de absorbans verir. Ortama enzim inhibitörü bir madde ilave edildiğinde, enzimi bloke edeceğinden sarı renkli ürün oluşmaz ve 412 nm'de absorbans değeri düşer, düşme derecesine bağlı olarak inhibitörün yüzde etkisi ölçülmektedir (Ellman ve ark., 1961).

Asetiltiyokolin \longrightarrow tiyokolin + asetat

Tiyokolin + ditiyobisnitrobenzoat \longrightarrow 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (sarı renkli)

Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonlarının belirlenmesi amacıyla Ellman tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Örnekler %10'luk DMSO ile çözülerek hazırlanmıştır. 20 µL enzim çözeltisi (AChE ya da BuChE, 1 U/mL) ile 10 µL örnek çözeltisi 2.4 mL tampon çözeltisine ilave edilerek vortekslenmiş ve 15 dk boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 50 µL DTNB ve 75 mM ATCI çözeltisi ya da 10 mM BTCİ çözeltisinden 20 µL ilave edilerek karışım oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Kontrol grubu için tüm protokoller aynı olmak koşuluyla sadece örnek çözeltisi yerine 10 µL %10 DMSO ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımın absorbans değerleri 412 nm'de 37 °C'de polistirol kuvvetler kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmış ve yüzde sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. AChE ya da BuChE enzimlerinin inhibisyon yüzdeleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - (\text{Abs}_{\text{numune}} - \text{Abs}_{\text{kontrol}}) \times 100$$

İstatiksel analiz

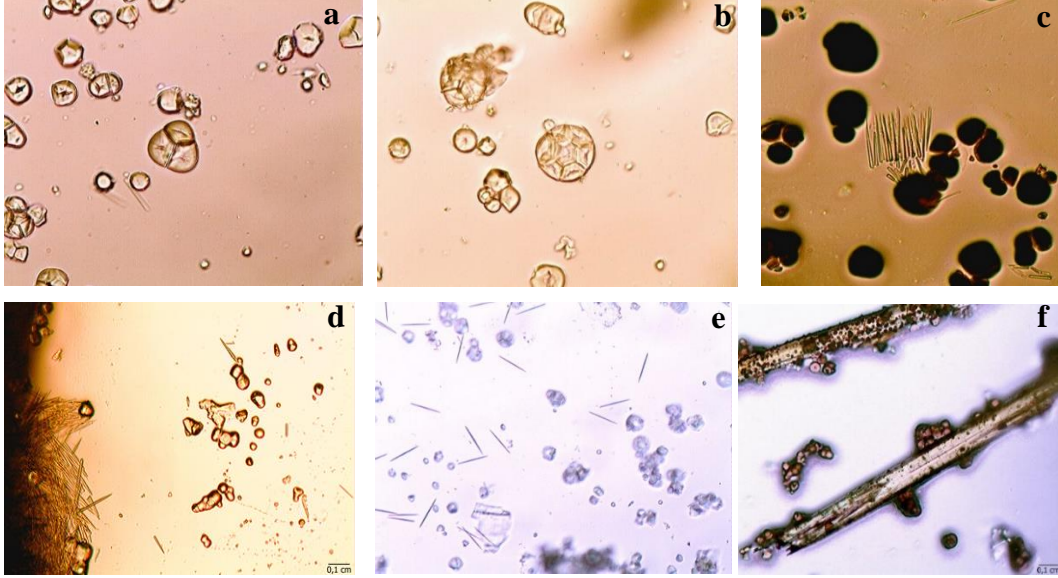
SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanılmış ve veriler ortalama \pm standart sapma olarak özetlenmiştir. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları ANOVA testi ile yapılmıştır. Varyanslar homojen grupların çoklu karşılaştırılmalarında TUKEY HSD, Normal dağılım göstermeyen verilerin analizinde parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis One way ANOVA testi kullanılmıştır. Flow sitometri ile apoptotik etki sonuçlarının (Annexin V-FITC) değerlendirilmesinde FACS Diva Versiyon 6.1.1. yazılımı kullanılarak apoptotik hücreler, tüm hücrelerin yüzdesi şeklinde sayılmıştır. $p < 0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Toz edilmiş yumrularda yapılan araştırmalar

Mikroskopik inceleme

Arum italicum toz edilmiş yumrularından su, kloralhidrat ve Sartur reaktifi ile hazırlanan preparatlar Trino araştırma mikroskopu ile incelenmiş ve elde edilen görüntüler IBM marka bilgisayar ortamında kaydedilmiştir.



Şekil 10. Toz Edilmiş Yumruların Mikroskop ile Elde Edilen Görüntüleri

(a), su preparatında basit ve birleşik nişasta taneleri; (b), su preparatında gözlenen beşli ve yedili birleşik nişasta taneleri; (c), Sartur reaktifi ile mor renkli nişasta taneleri ve rafitler; (d), kloralhidrat preparatında rafitler; (e), dağılmış halde rafit kristalleri; (f), sklerenkima lifleri (20x).

Elde edilen bulgulara göre, yumrularda basit ve birleşik nişasta taneleri, rafit demetleri (kalsiyum okzalat kristalleri) ve sklerenkima lifleri gözlenmiştir (**Şekil 10**).

Nişasta taneleri, köşeli, hilum ortaya yakın, ışınal veya çizgi şeklinde. İkili, üçlü, beşli ve yedili birleşik.

Rafit demetlerine bol miktarda; sklerenkima lifleri mevcut.

Kalite kontrol yöntemleri

Nem miktar tayini

Serin ve kapalı, havadar bir yerde kurutulan yumrular toz edildikten sonra, drogta bulunan nem miktarı Avrupa Farmakopesi esas olarak gravimetrik olarak ölçülmüştür. Deneyler 3 paralel ölçüm şeklinde yürütülmüş ve ortalama yüzde nem miktarı hesaplanmıştır. Sonuçlar **Çizelge 6**'da verilmiştir.

Çizelge 6. *Arum italicum* Yumrularına ait Nem Miktar Tayini Sonuçları

Örnek	Nem miktarı (g)	Nem miktarı (%)
1.018 g	0.092	9.04
1.028 g	0.091	8.85
1.009 g	0.088	8.72
Ortalama Nem Miktarı: %8.87		

Kül miktar tayini

Toz drogta bulunan inorganik maddelerin belirlenmesi amacıyla Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen metot esas alınmış olup, deneyler 3 paralel ölçüm şeklinde yürütülmüş ve sonuçlar yüzde bütün kül olarak **Çizelge 7**'de verilmiştir.

Asitte erimeyen kül miktar tayini

Toz drogta mevcut asitte erimeyen ağır metal gibi inorganik maddeler, 3 paralel ölçüm şeklinde araştırılmış ve sonuçlar yüzde asitte erimeyen kül miktarı olarak **Çizelge 7**'de verilmiştir.

Çizelge 7. *Arum italicum* Yumrularına ait Kül Tayin Sonuçları

Örnek	Bütün kül (g)	Bütün kül (%)
1.0187 g	0.0472	4.63
1.0684 g	0.0466	4.36
1.010 g	0.0467	4.62
Ortalama Bütün Kül Miktarı: %4.54		
	Asitte erimeyen kül (g)	Asitte erimeyen kül (%)
1.0187 g	0.0075	0.74
1.0684 g	0.0091	0.85
1.010 g	0.0065	0.64
Ortalama Hidroklorik Asitte Erimeyen Kül Miktarı: %0.74		

Ekstraksiyon Çalışmaları ve Verimleri

Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yöntemi

Ekstraksiyon ve fraksiyonlama çalışmaları biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama metodu esas alınarak yapılmıştır. Ön ekstraksiyona tabi tutulan yumru örneklerinin, MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri *in vitro* ortamda araştırılmıştır.

Literatür bilgileri göz önünde tutularak, kurutulmuş yumrulardan çeşitli ekstratlar hazırlanmıştır. 5 g'lık yumru materyalleri, ayrı ayrı *n*-hekzan, diklorometan, etanol, etanol:su (1:1) ve aseton:su (1:1) çözücülerinin 100'er mililitresi ile 3 kez 48 saat çalkalamalı maserasyona tabi tutulmuştur. Ayrıca ekstraksiyona sıcaklığın da etkisini araştırmak amacıyla aseton:su (1:1) ile 10 g yumruyla, 6 saat Soxhlet ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstreler rotavapor (<40°C) kullanılarak yoğunlaştırılmış ve verimleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, aseton:su

(1:1) karışımı ile Soxhlet apareyinde elde edilen ekstrenin her iki kanser hücre hattına karşı en güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Bu bulgudan hareketle ham ekstrenin hazırlanışında, Soxhlet apareyi kullanılarak aseton:su (1:1) karışımı ile devamlı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ham ekstrenin kaba fraksiyonlara ayrılmasında flaş kromatografisinden yararlanılmış ve normal faz kromatografisi ile çalışılmıştır. Silikajel doldurulmuş kolonda, sırasıyla *n*-hekzan, diklorometan, diklorometan:metanol (1:1) ve metanol elüsyonları yapılarak elde edilen fraksiyonlar vakum altında yoğunlaştırılmıştır.

Kaba fraksiyonlar 45-60 mg aralığında olacak şekilde tartılarak hazırlanan stok çözeltilerin olası sitotoksik etkileri konsantrasyonları ayarlanarak araştırılmıştır. Metanol fraksiyonunun her iki kanser hücresine karşı diğer fraksiyonlardan yüksek aktivite göstermesi üzerine bu fraksiyonun, alt fraksiyonlara ayrılmasına karar verilmiştir. C18 doldurulmuş kolona yüklenen metanol fraksiyonunun, sırasıyla su, metanol:su (2:8), metanol:su (4:6), metanol:su (6:4), metanol:su (8:2) ve metanol çözücülerini ile vakum altında elüe edilerek alt fraksiyonları hazırlandı. Alt fraksiyonlar ya liyofilize edilmiş ya da rotavaporda yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen alt fraksiyonlar 3-5 mg aralığında tartılarak stok çözeltileri hazırlanmış ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyon ile elde edilen fraksiyonların verimleri **Çizelge 8**'de verilmiştir.

Çizelge 8. *Arum italicum* Yumrularına ait Ekstre ve Fraksiyonların Verimleri

Kod	Ekstre/ Fraksiyon	Verim (%)
Ham ekstre		
A	Aseton:su (1:1)	9.08
Kaba fraksiyonlar		
B	<i>n</i> -Hekzan	0.005
C	Diklorometan	0.40
D	Diklorometan:metanol (1:1)	11.84
E	Metanol	45.11
Alt fraksiyonlar		
E1	Su	83.9
E2	Metanol:su (2:8)	0.51
E3	Metanol:su (4:6)	0.25
E4	Metanol:su (6:4)	0.16
E5	Metanol:su (8:2)	0.22
E6	Metanol	0.36

Antikanser etki çalışmalarına ait bulgular

Tez kapsamında çalışılan *Arum italicum* yumrularından elde edilen ekstre ve fraksiyonların MCF-7 (meme) ve A549 (akciğer) kanser hücrelerine karşı olası sitotoksik ve apoptotik etkilerini belirlemek amacıyla *in vitro* metotlardan yararlanılmıştır.

MTT sonuçlarına göre, BrDu kolorimetrik kit kullanılarak her bir örneğin DNA sentezi üzerine olası inhibisyonları, MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarına karşı araştırılmıştır. Sonrasında, flow sitometri metodu ile her bir örneğin olası apoptotik etkisi incelenmiştir. Deneylede pozitif kontrol olarak mitoksantron kullanılmıştır.

Sitotoksik aktivite sonuçlarına ilişkin bulgular

İlk olarak, *Arum italicum* yumrularından ön ekstraksiyon çalışmasıyla elde edilen çeşitli ekstrelerin doza-bağlı sitotoksik etkileri MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* MTT metodu ile incelenmiştir. Buradan elde edilen bulgular doğrultusunda, pozitif kontrol ile kıyaslanabilir en yüksek etki Soxhlet apareyinde hazırlanan ekstrede görülmüştür. Ham ekstrenin hazırlanışında, Soxhlet apareyi kullanılarak aseton:su (1:1) ile devamlı ekstraksiyon yöntemi tercih edilmiş ve elde edilen ekstre liyofilize edilerek kurutulmuştur. Ham ekstreten hareketle elde edilen kaba fraksiyonların MCF-7 ve A549 kanser hücrelerine karşı olası sitotoksik etkileri araştırılmıştır. MTT sonuçlarına göre her bir fraksiyonun IC₅₀ değerleri hesaplanmış ve en etkili fraksiyon belirlenmiştir. **Çizelge 9**'da kaba fraksiyonların IC₅₀ değerleri verilmiştir.

Çizelge 9. *Arum italicum* Yumrularına ait Kaba Fraksiyonların Sitotoksik Aktivite Sonuçları

Kod	Kaba fraksiyon	Sitotoksik etki (IC ₅₀ - µg/mL)	
		MCF-7	A549
B	<i>n</i> -Hekzan	-	-
C	Diklorometan	416.67±28.87	286.67±77.67
D	Diklorometan:metanol (1:1)	296.67±90.77	44.0±5.29
E	Metanol	58.33±7.64	32.33±2.52
Mito	Mitoksantron	22±6.56	15.33±6.11

B kodlu, *n*-hekzan fraksiyonunun verimi çok düşük olduğu için sitotoksik etkisine bakılmamıştır. **Çizelge 9**'da verildiği üzere, fraksiyonların polariteleri arttıkça etkinin de arttığı görülmektedir. Diklorometan fraksiyonunun sitotoksik etkisinin oldukça zayıf olduğu belirlenmiştir. Mitoksantron ile kıyaslanabilir etki, D ve E kodlu fraksiyonlarda gözlenmiştir. D kodlu fraksiyonun MCF-7 (IC₅₀-296.7 µg/mL) kanser hücrelerine karşı zayıf sitotoksik etki gösterirken, A549 (IC₅₀-44.0 µg/mL) kanser hücrelerine karşı iyi sitotoksik etki göstermiştir. E kodlu fraksiyonun ise hem MCF-7 (IC₅₀-58.3 µg/mL) hem de A549 (IC₅₀-32.3 µg/mL) kanser hücrelerine karşı mitoksantron ile kıyaslanabilir ölçüde kayda değer sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. A549 kanser hücrelerinin fraksiyonlara karşı daha duyarlı olduğu anlaşılmıştır.

Bu verilerden hareketle, E kodlu metanol fraksiyonun, C18 doldurulmuş kolona yüklenerek sırasıyla su, metanol:su (2:8), metanol:su (4:6), metanol:su (6:4), metanol:su (8:2) ve metanol çözücüleri ile elüe edilerek alt fraksiyonlarına vakum altında ayrılmasına karar verilmiştir. Elde edilen alt fraksiyonların MCF-7 ve A549 kanser hücrelerine karşı olası sitotoksik etkileri aynı koşullarda *in vitro* olarak araştırılmıştır. **Çizelge 10**'da elde edilen bulgular verilmiştir.

Sonuçlar kıyaslandığında, A549 kanser hücrelerinin alt fraksiyonlara karşı daha hassas olduğu görülmüştür. A549 kanser hücrelerine karşı en yüksek sitotoksik etki

E2 kodlu alt fraksiyonda (IC₅₀: 13.67 µg/mL) gözlenmiş ve IC₅₀ değerinin pozitif kontrol olarak kullanılan mitoksantrona (IC₅₀: 10.33 µg/mL) yakın bulunmuştur. A549'a karşı sitotoksik etki bakımından E3 (IC₅₀: 26.67 µg/mL) ve E6 (IC₅₀: 26.33 µg/mL) kodlu alt fraksiyonları birbirine yakın sonuçlar vermiştir. E1 kodlu (IC₅₀: 31 µg/mL) fraksiyonunda ise etki daha az olmakla birlikte, E5 (IC₅₀: 56.67 µg/mL) ve E4 (IC₅₀: 63.33 µg/mL) kodlu alt fraksiyonlardan daha iyi etki göstermiştir. Alt fraksiyonların MCF-7 meme kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri ise şu şekilde sıralanmaktadır: E6> E2> E3> E5> E1> E4. Mitoksantronun, MCF-7 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi IC₅₀ değeri 22.33 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Mitoksantrona en yakın etkiye, IC₅₀ değerleri sırasıyla 28 µg/mL ve 33.67 µg/mL olarak E6 ve E2 kodlu alt fraksiyonlarında ulaşılmıştır.

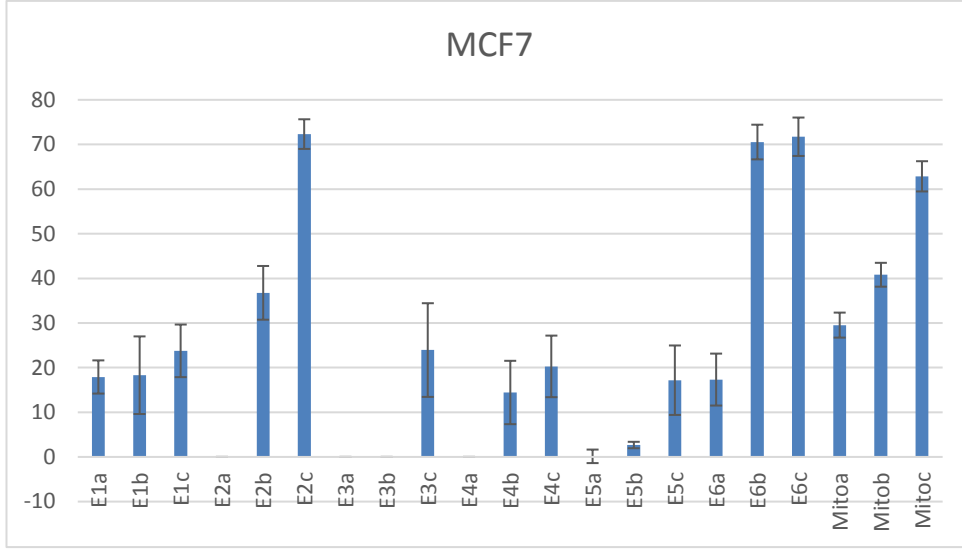
Çizelge 10. *Arum italicum* Yumrularına ait Alt Fraksiyonların Sitotoksik Aktivite Sonuçları

Kod	Kaba fraksiyon	Sitotoksik etki (IC ₅₀ - µg/mL)	
		MCF-7	A549
E1	Su	65 ±15	31 ± 3.6
E2	Metanol:su (2:8)	33.67 ±3.2	13.67 ± 1.5
E3	Metanol:su (4:6)	51.67 ±12.6	26.67 ±7.4
E4	Metanol:su (6:4)	90 ±10	63.33 ±18.9
E5	Metanol:su (8:2)	63.33 ±12.6	56.67 ± 10.4
E6	Metanol	28 ±2	26.33 ± 1.5
Mito	Mitoksantron	22.33 ±2.1	10.33 ± 1.5

DNA sentez inhibisyonuna ilişkin bulgular

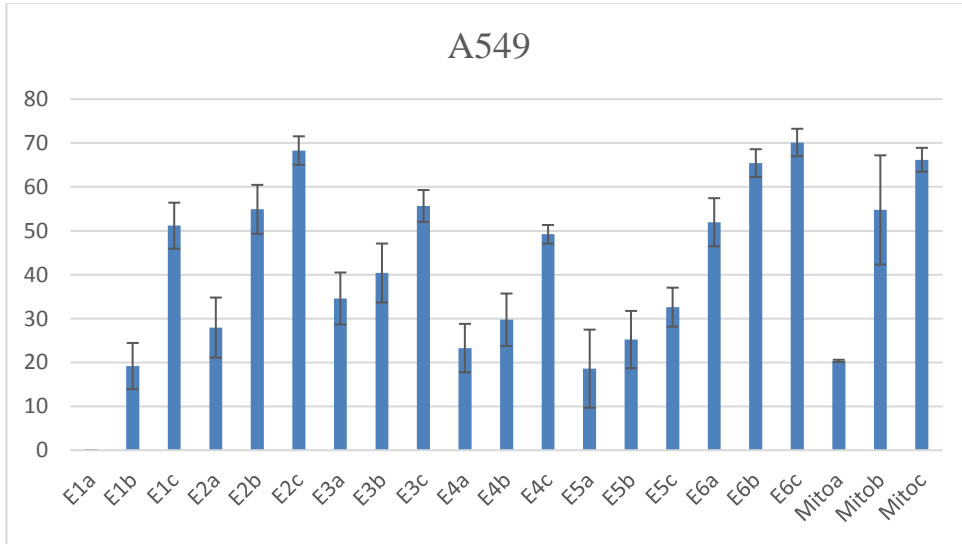
Alt fraksiyonların olası DNA sentez inhibisyonları Roche Cell Proliferation ELISA, BrdU (Kolorimetrik) kit ile ölçüldü. A549 ve MCF-7 kanser hücre hatları, alt fraksiyonların IC₅₀ değerlerine göre belirlenen üç farklı konsantrasyon ile inkübe edilmiştir. Sonuçlar, birbirinden bağımsız iki deney ve birbirinden bağımsız dört kuyucuğun sonuçları olarak hesaplanmış ve ortalaması alınmıştır.

Mitoksantron 22.33 µg/mL konsantrasyonda yaklaşık %41 oranında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde DNA sentez inhibisyonu gösterirken, 33.5 µg/mL konsantrasyonda bu oran %63 olarak bulunmuştur. Alt fraksiyonlarda da genel olarak doza bağlı bir inhibisyon artışı gözlenmiştir. Alt fraksiyonların MCF-7 kanser hücrelerinde DNA sentez inhibisyonlarına dair bulgular **Şekil 11**'de verilmiştir. Alt fraksiyonlardan E2 ve E6 kodlu fraksiyonların MCF-7 meme kanser hücrelerinde yüksek DNA sentez inhibisyonu göstermiştir. E2 kodlu alt fraksiyon 33.67 µg/mL'de yaklaşık %37 oranında, 50.51 µg/mL konsantrasyonda ise %72.3 oranında yüksek inhibisyon sağlamıştır. E6 kodlu alt fraksiyonun IC₅₀ değeri ve üzeri konsantrasyonda %70 civarında inhibisyon sağladığı ve bu etkinin mitoksantrondan da yüksek olduğu görülmüştür. Diğer alt fraksiyonlarda ise önemli bir bulguya rastlanmamıştır.



Şekil 11. Alt Fraksiyonların ve Mitoksantronun MCF-7 Kanser Hücre Hatlarında DNA Sentez İnhibisyonları

(Kontrol grubunun absorbans değeri 0 olarak alınmıştır; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (Mito), Mitoksantron; Alt fraksiyonların 3 farklı konsantrasyonları şu şekilde verilmiştir: E1a 32.5 µg/mL; E1b 65 µg/mL; E1c 97.5 µg/mL; E2a 16.84 µg/mL; E2b 33.67 µg/mL; E2c 50.51 µg/mL; E3a 25.84 µg/mL; E3b 51.67 µg/mL; E3c 77.51 µg/mL; E4a 45 µg/mL; E4b 90 µg/mL; E4c 135 µg/mL; E5a 31.67 µg/mL; E5b 63.33 µg/mL; E5c 95 µg/mL; E6a 14 µg/mL; E6b 28 µg/mL; E6c 42 µg/mL; Mitoa 11.17 µg/mL; Mitob 22.33 µg/mL; Mitoc 33.5 µg/mL. p < 0.05).



Şekil 12. Alt Fraksiyonların ve Mitoksantronun A549 Kanser Hücre Hatlarında DNA Sentez İnhibisyonları

(Kontrol grubunun absorbans değeri 0 olarak alınmıştır; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (Mito), Mitoksantron; Alt fraksiyonların 3 farklı konsantrasyonları şu şekilde verilmiştir: E1a 15.5 µg/mL; E1b 31 µg/mL; E1c 46.5 µg/mL; E2a 6.84 µg/mL; E2b 13.67 µg/mL; E2c 20.51 µg/mL; E3a 13.34 µg/mL; E3b 26.67 µg/mL; E3c 40.01 µg/mL; E4a 31.67 µg/mL; E4b 63.33 µg/mL; E4c 95 µg/mL; E5a 28.34 µg/mL; E5b 56.67 µg/mL; E5c 85.01 µg/mL; E6a 13.17 µg/mL; E6b 26.33 µg/mL; E6c 34.5 µg/mL; Mitoa 5.17 µg/mL; Mitob 10.33 µg/mL; Mitoc 15.5 µg/mL. p < 0.05)

Alt fraksiyonların A549 akciğer kanser hücrelerinin DNA sentezleri üzerine inhibisyonları incelendiğinde çalışılan IC₅₀ değeri ve üzeri konsantrasyonlarda %10'nun üzerinde etkiye rastlanmakla birlikte, konsantrasyona bağlı artış gözlenmiştir. Mitoksantron IC₅₀ dozunda (10.33 µg/mL) %56.7 ve 15.5 µg/mL'de %66.2 oranında DNA sentez inhibisyonu yapmıştır. E2 kodlu alt fraksiyonun DNA sentez inhibisyon sonuçları, IC₅₀ -13.67 µg/mL dozunda %54.9 ve 20.51 µg/mL konsantrasyonda ise %68.3 oranındadır. E2 kodlu alt fraksiyonun mitoksantron ile kıyaslanabilir ölçüde A549 hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği görülmüştür. E6 kodlu fraksiyonda, 26.33 µg/mL (IC₅₀ dozunda) ve 34.5 µg/mL konsantrasyonlarda sırasıyla %65.4 ve %72.1 oranında DNA sentez inhibisyonu belirlenmiştir. E3 kodlu alt fraksiyon 26.67 µg/mL IC₅₀ dozunda %40.4 ve 40.01 µg/mL konsantrasyonda %55.7 oranında etki göstermiştir (**Şekil 12**).

Bu bulgular incelendiğinde E2 ve E6 kodlu fraksiyonların MCF-7 kanser hücrelerinde, E2, E3 ve E6 kodlu fraksiyonların A549 kanser hücrelerinde IC₅₀ dozu ve üstü konsantrasyonlarda DNA sentezini önemli ölçüde inhibe ettiği ve böylece antiproliferatif etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bu fraksiyonların DNA sentezini inhibe ederek sitotoksik etki gösterdiklerini söylemek mümkündür.

'Flow sitometri' ile apoptoza ilişkin bulgular

Tez kapsamında, MCF-7 ve A549 kanser hücreleri, IC₅₀ dozlarındaki alt fraksiyonlar ve mitoksantron ile 24 saat inkübasyona bırakılarak Annexin V boyama protokolü uygulanmıştır. Her bir örnek için en az 10.000 hücre analiz edilmiş ve 4 tekrarlı deneyler yapılmıştır. Elde edilen sayısal bulgular **Çizelge 11**'de verilmiştir.

Çizelge 11. MCF-7 ve A549 Kanser Hücrelerinde Flow Sitometrik Analiz

Grup	MCF-7			A549		
	% EAH	% GAH	% YH	% EAH	% GAH	% YH
Kontrol	1.4	1.2	91.0	0.1	1.6	91.0
E1	13.1	6.8	71.6	4.2	5.1	82.9
E2	11.0	9.3	68.6	9.7	14.8	71.9
E3	12.4	7.5	70.6	5.9	7.6	83.0
E4	17.2	6.1	70.6	2.7	5.2	83.7
E5	11.4	12.2	65.0	2.1	7.0	85.3
E6	19.3	10.1	63.3	11.6	43.9	40.4
Mito	10.5	6.7	74.1	5.4	39.9	46.3

(EAH), erken apoptotik hücreler; (GAH), geç apoptotik hücreler; (YH), yaşayan hücreler; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (Mito), Mitoksantron.

Alt fraksiyonların MCF-7 kanser hücrelerinde apoptotik etkileri incelendiğinde, E6 kodlu fraksiyonun 28 µg/mL konsantrasyonda MCF-7 hücreleri ile inkübasyonu sonucunda %19.3 oranında hücreleri erken apoptoza sürüklediği görülmüş ve bu etki mitoksantron ile kıyaslanabilir düzeydedir. Mitoksantron 22.33 µg/mL konsantrasyonda hücreleri %10.5 oranında erken apoptoza sürüklemiştir. Diğer alt

fraksiyonların çalışılan IC₅₀ dozlarında MCF-7 hücrelerini %10'dan fazla erken apoptoza sürüklediği belirlenmiştir. Genel olarak %5 ve üzeri bulgular, apoptotik etki olarak değerlendirilmektedir. **Şekil 13**'de MCF-7 hücrelerinin flow sitometri ile 'quadrant' analiz sonuçları verilmiştir.

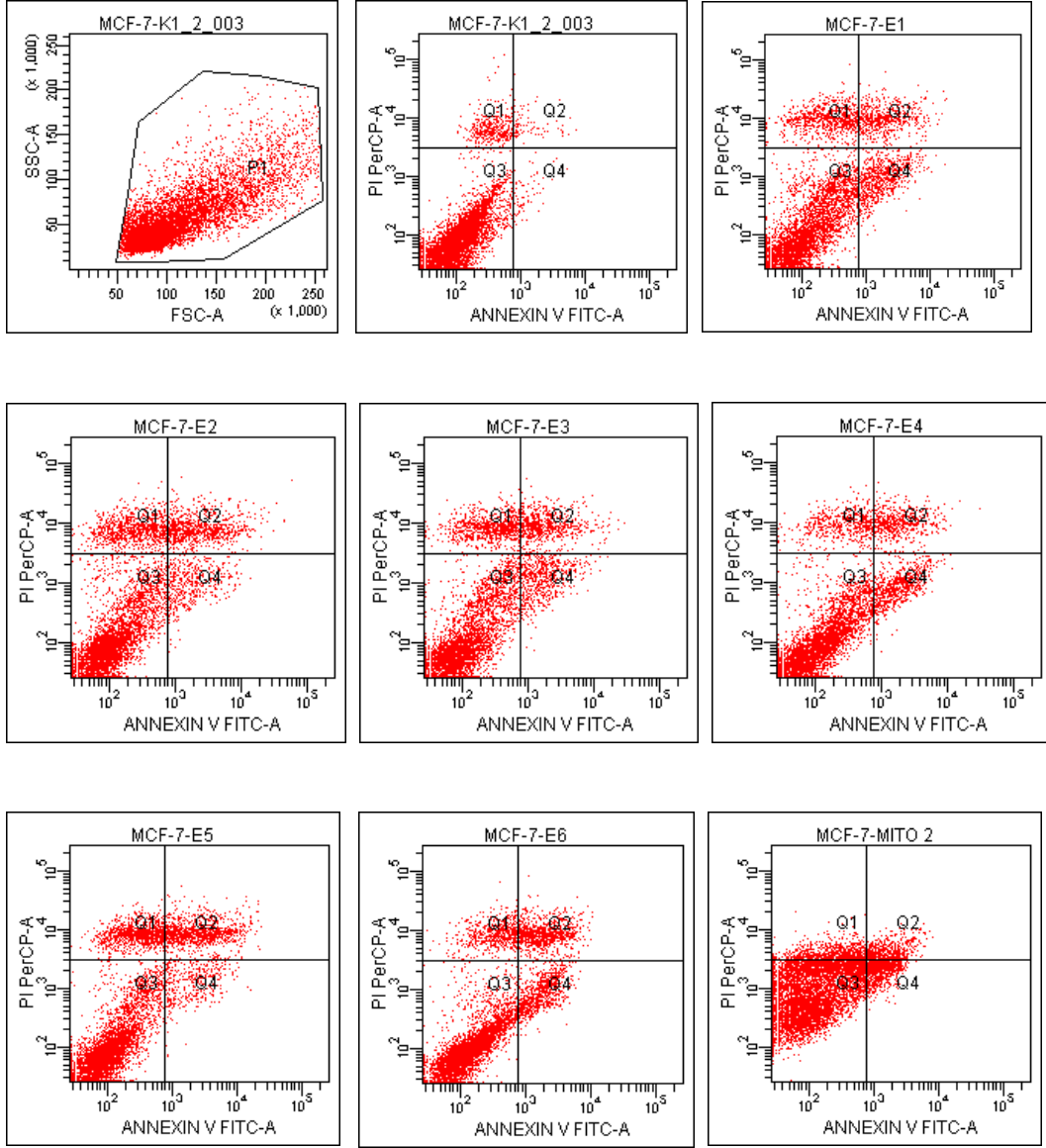
Toplam apoptotik etki, erken ve geç apoptoza giden hücrelerin yüzdelerin toplamını ifade etmektedir. Alt fraksiyonlardaki toplam apoptotik etki şu şekilde sıralanmıştır: E6 (%29.4) > E5 (%23.6) > E4 (%23.3) > E2 (%20.3) > E3 (%19.9) = E1 (%19.9) > Mito (%17.2).

Alt fraksiyonların A549 kanser hücreleri üzerine apoptotik etkileri incelendiğinde, çalışılan IC₅₀ dozlarında E2, E3 ve E6 kodlu fraksiyonlarda erken apoptotik etkinin %5'den fazla olduğu görülmüştür. Mitoksantron 10.33 µg/mL dozda %5.4 oranında etki gösterirken, E2 kodlu alt fraksiyon 13.67 µg/mL dozda %9.7 oranında hücreleri apoptoza sürüklemiştir. E6 kodlu fraksiyonu IC₅₀ dozunda %11.6 oranında erken apoptotik etki göstermiştir. **Şekil 14**'de A549 hücrelerinin flow sitometri ile 'quadrant' analiz sonuçları verilmiştir.

Toplam apoptotik etki sıralaması şu şekilde belirlenmiştir: E6 (%55.5) > Mito (%45.3) > E2 (%24.5) > E3 (%13.5) > E1 (%9.3) > E5 (%9.1) > E4 (%7.9).

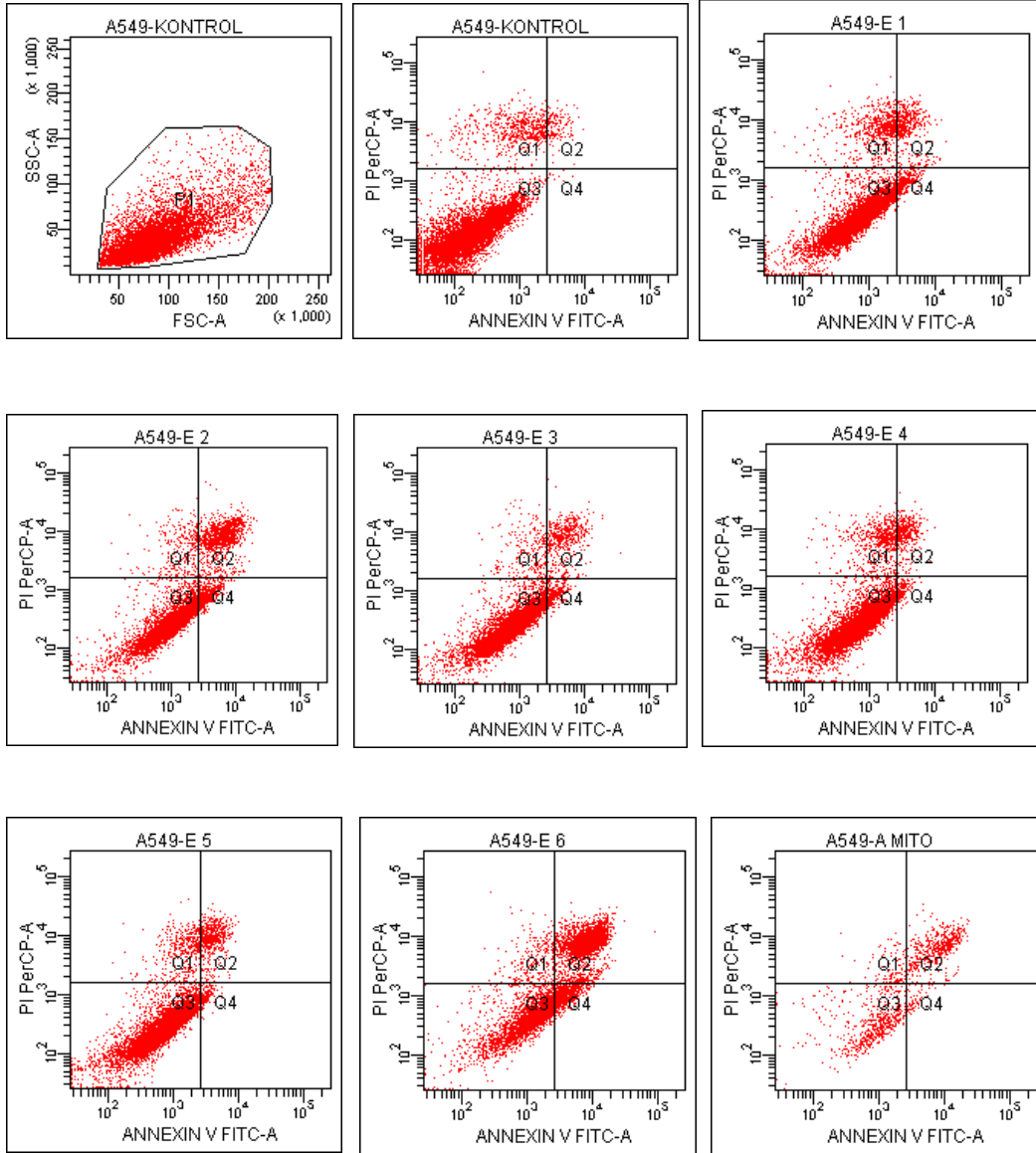
Toksik etki çalışmalarına yönelik bulgular

Yapılan toksisite deneyleri sonucunda, E1 ve E4 kodlu alt fraksiyonlar sırasıyla 106.7 ve 68.3 µg/mL IC₅₀ dozlarında, L929 normal fare fibroblast hücrelerine karşı toksik etkili bulunmuştur. Diğer alt fraksiyonlardan hazırlanan ve en yüksek konsantrasyonun 80 µg/mL olduğu dozlarda IC₅₀ değerlerine ulaşamamış, bu nedenle IC₅₀ değerlerinin 80 µg/mL den yüksek olduğu düşünülmüştür. Bu bulgular değerlendirildiğinde, MCF-7 ve A549 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri dikkate değer bulunan E2, E3 ve E6 alt fraksiyonların kanser hücre hatlarına sitotoksik etki gösterdikleri IC₅₀ dozlarında normal hücrelere karşı toksik etki göstermemeleri dikkat çekici bulunmuştur. Etkili alt fraksiyonların kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili oldukları dozlarda sağlıklı hücrelere toksik etki göstermeyecekleri düşünülmüştür.



Şekil 13. Alt Fraksiyonlar ve Mitoksantron ile Muamele Edilen MCF-7 Hücrelerinin Annexin V-FITC Propodyum İyodür ile Flow Sitemetri Analizi

(Q1), nekrotik hücreler; (Q2), geç apoptotik hücreler; (Q3), yaşayan hücreler; (Q4), erken apoptotik hücreler; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (Mito), Mitoksantron.



Şekil 14. Alt Fraksiyonlar ve Mitoksantron ile Muamele Edilen A549 Hücrelerinin Annexin V-FITC Propodyum İyodür ile Flow Sitometri Analizi

(Q1), nekrotik hücreler; (Q2), geç apoptotik hücreler; (Q3), yaşayan hücreler; (Q4), erken apoptotik hücreler; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (Mito), Mitoksantron.

Antioksidan Aktiviteye Yönelik Bulgular

Antioksidan aktivitenin *in vitro* olarak belirlenmesinde serbest radikal süpürücü etki ile antioksidan kapasitenin belirlenmesine yönelik olarak 4 farklı metot seçilmiştir. Ham ekstre ve fraksiyonların antioksidan etkilerini belirlemek için DPPH radikalini süpürücü etki, Troloks'a ekivalan antioksidan kapasiteyi belirlemek amacıyla ABTS radikali süpürücü etki, indirgeme kapasitesinin belirlenmesi ve β -karoten/linoleik asit sistemi ile lipit peroksidasyonunu önleyici etki araştırılmıştır.

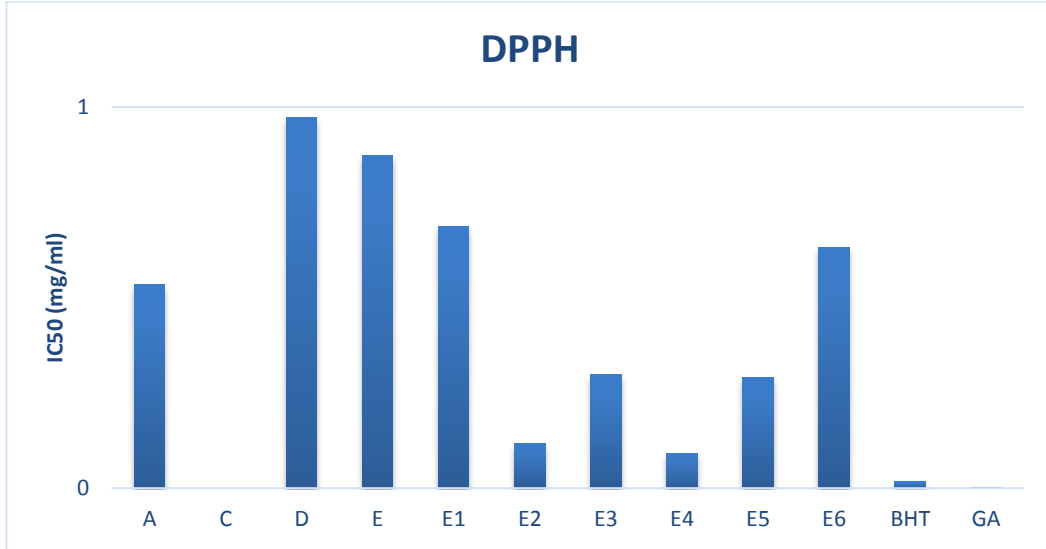
Çizelge 12. Ekstre ve Fraksiyonların Antioksidan Aktivitelerine İlişkin Bulgular

Kod	DPPH (IC ₅₀ -mg/mL)	TEAC (mM)	İndirgeme gücü (mmol/g AscAE)	β -karoten soldurma (%)
A	0.535±0.02	-	1.22±0.03	34.23±3.65
C	>21	-	0.67±0.01	32.33±5.38
D	0.973±0.01	-	1.22±0.08	28.99±4.53
E	0.873±0.007	-	1.31±0.02	21.25±10.31
E1	0.687±0.04	-	1.47±0.03	36.39±3.20
E2	0.117±0.004	1.24±0.04	2.61±0.09	39.51±7.32
E3	0.298±0.001	1.75±0.06	2.93±0.12	48.01±0.27
E4	0.091±0.001	1.35±0.03	2.46±0.06	41.68±4.15
E5	0.290±0.008	0.75±0.07	1.45±0.06	35.91±2.32
E6	0.632±0.016	0.23±0.03	1.02±0.04	31.12±2.61
GA	0.002±0.0001	2.29±0.06	40.04±0.08	54.32±4.73
BHT	0.017±0.001	1.97±0.06	4.25±0.15	84.38±1.44

(-), etki gözlenmemiştir; (A), aseton:su (1:1) ekstresi; (C), diklorometan kaba fraksiyonu; (D), diklorometan:metanol (1:1) kaba fraksiyonu; (E), metanol kaba fraksiyonu; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (BHT), Bütillenmiş hidroksitoluen; (GA), Gallik asit.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

Ekstre ve fraksiyonların radikal süpürücü etkileri, stabil serbest radikal DPPH'nin metanoldeki çözeltisi ile muamele edilerek, Kumarasamy ve ark. (2007)'nin yönteminde birtakım değişiklikler yapılarak araştırılmıştır. Ham ekstre ve fraksiyonların DPPH radikal süpürücü etkileri, IC₅₀ değerleri (µg/mL) ile birlikte **Çizelge 12**'de verilmiştir.



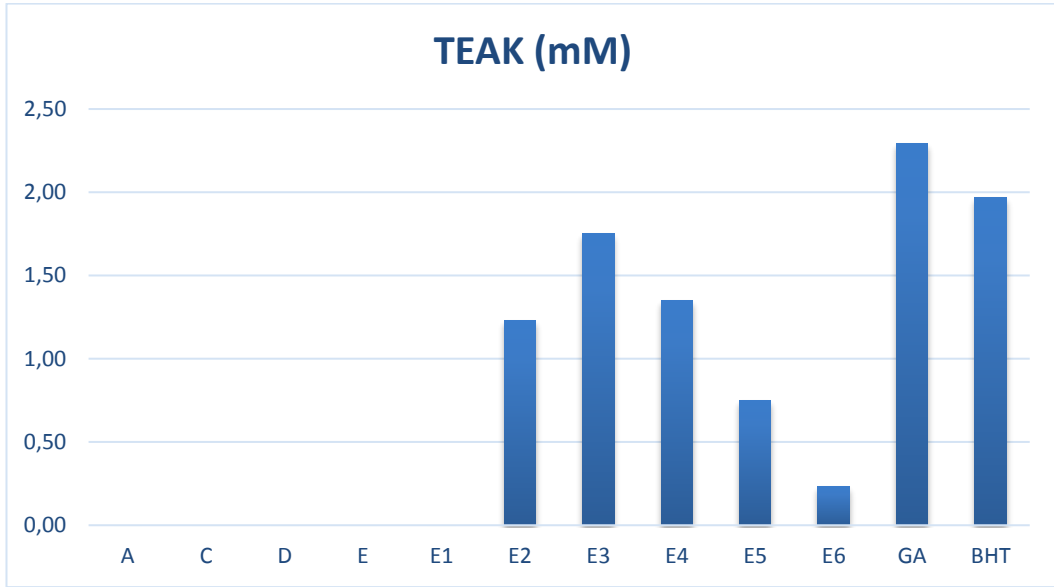
Şekil 15. Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikalini Süpürücü Etkileri

(A), aseton:su (1:1) ekstresi; (C), diklorometan kaba fraksiyonu; (D), diklorometan:metanol (1:1) kaba fraksiyonu; (E), metanol kaba fraksiyonu; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (BHT), bütillenmiş hidroksitoluen; (GA), gallik asit.

Elde edilen bulgular incelendiğinde, tüm örneklerin pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit (IC₅₀ 0.002 mg/mL) ve BHT (IC₅₀ 0.017 mg/mL)'den oldukça düşük radikal süpürücü etki gösterdiği görülmüştür. Test edilen örneklerden en yüksek etki E4 kodlu alt fraksiyonda (IC₅₀ 0.091 mg/mL) belirlenmiştir. Ham ekstre ve fraksiyonların DPPH radikalini süpürücü etkileri sırasıyla şu şekilde sıralanmıştır: E4> E2> E5> E3> A> E6> E1> E> D> C (Şekil 15).

ABTS radikalini süpürücü etkiye ilişkin bulgular

Ekstre ve fraksiyonların Troloks'a eşdeğer total antioksidan kapasitelerine ilişkin bulgular **Çizelge 12**'de verilmiştir. Troloks'un 0-3 mM konsantrasyonlardaki hazırlanan çözeltilerden elde edilen kalibrasyon denklemi $y= 25.879x+10.571$ olarak (R^2 0.9932) hesaplanmıştır. 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan örnekler Troloks ile aynı koşullarda çalışılmıştır.



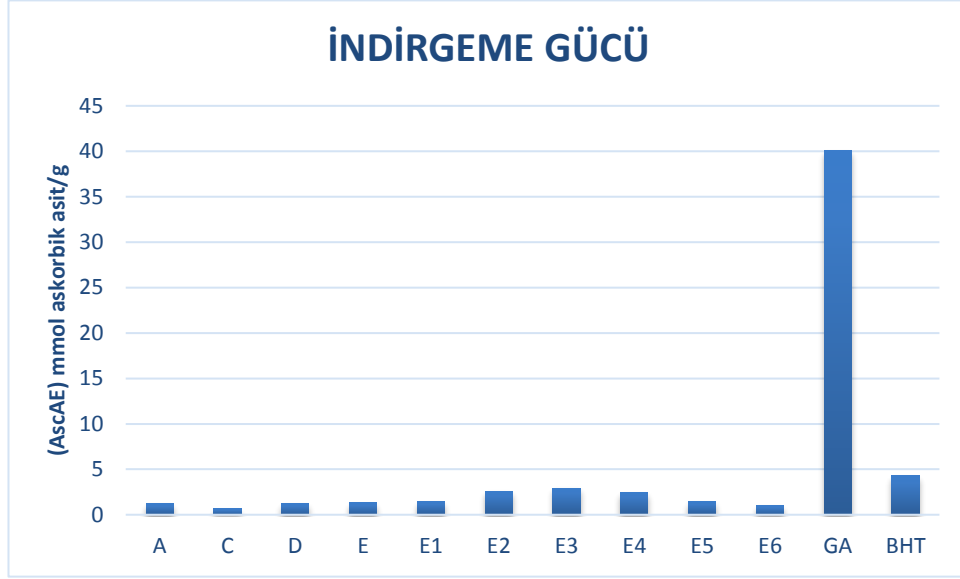
Şekil 16. Ekstre ve Fraksiyonların Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasiteleri

(A), aseton:su (1:1) ekstresi; (C), diklorometan kaba fraksiyonu; (D), diklorometan:metanol (1:1) kaba fraksiyonu; (E), metanol kaba fraksiyonu; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (BHT), bütillenmiş hidroksitoluen; (GA), gallik asit.

Deney sonuçlarına göre A, C, D, E ve E1 kodlu örneklerde etkiye rastlanmamıştır. Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite pozitif kontrollerde şu şekilde verilmiştir: gallik asit (2.29 mM) ve BHT (1.97 mM). En yüksek TEAK değeri, E3 kodlu alt fraksiyonda 1.75 mM olarak hesaplanmıştır. Örneklerin total antioksidan kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır: E3> E4> E2> E5> E6 (**Şekil 16**).

İndirgeme gücüne ilişkin bulgular

Ekstre ve fraksiyonların indirgeme kapasiteleri, Oyaizu (1986) tarafından verilen metotta bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Tüm örnekler 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Askorbik asidin 0.008-1 mg/mL aralığında çeşitli konsantrasyonları hazırlanarak kalibrasyon denklemi elde edilmiştir ($y=2.7064x+0.3033$, $R^2 0.9924$). Her bir örneğin indirgeme kapasiteleri askorbik aside eşdeğer mmol/g olarak hesaplanarak **Çizelge 12**'de verilmiştir.



Şekil 17. Ekstre ve Fraksiyonların Askorbik Asit'e Eşdeğer İndirgeme Kapasiteleri

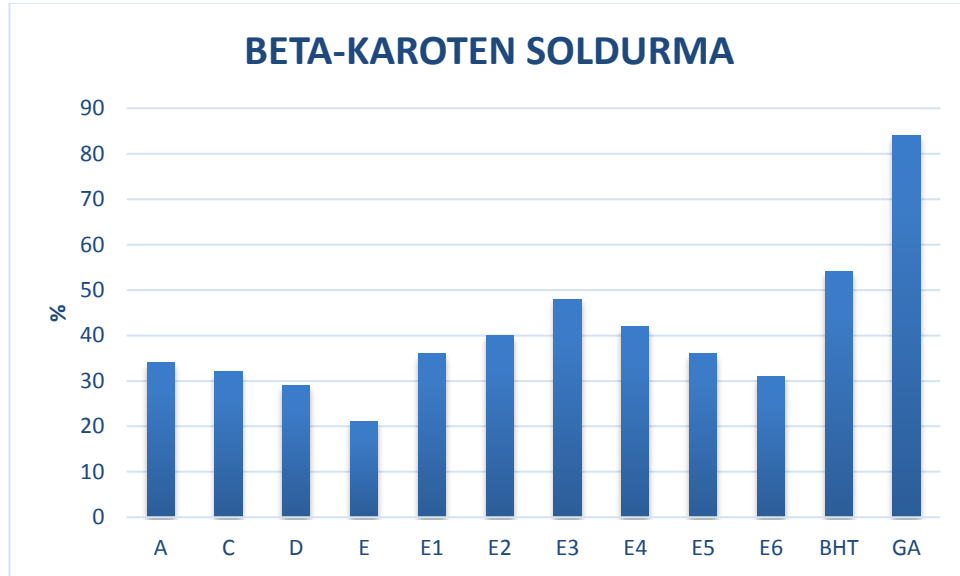
(A), aseton:su (1:1) ekstresi; (C), diklorometan kaba fraksiyonu; (D), diklorometan:metanol (1:1) kaba fraksiyonu; (E), metanol kaba fraksiyonu; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (BHT), bütillenmiş hidroksitoluen; (GA), gallik asit.

Şekil 17'de görüldüğü gibi gallik asit, 40.04 mmol/g askorbik aside eşdeğer indirgeme kapasitesine sahip iken BHT için bu değer onda biri kadar hesaplanmıştır (4.25 mmol/g AscAE). Ekstre ve fraksiyonların indirgeme kapasiteleri pozitif kontrollerden düşük olmakla birlikte en yüksek indirgeme kapasitesi E3 kodlu alt fraksiyonda 2.93 mmol/g AscAE olarak belirlenmiştir. Bu etkiye en yakın sonuç E2 kodlu alt fraksiyonda görülmüştür (2.61 mmol/g AscAE). İndirgeme kapasiteleri $E3 > E2 > E4 > E1 > E5 > E > D > A > E6 > C$ şeklinde sıralanmaktadır.

Lipit peroksidasyonu inhibisyonuna ilişkin bulgular

Örneklerin β -karoten/linoleik asit oksidasyonu üzerine inhibisyonları, 2 saat boyunca 15 dk aralıklar ile 470 nm’de spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, **Çizelge 12** ve **Şekil 18**’de verilmiştir.

Hazırlanan sulu emülsiyonlarda linoleik asit oksidasyonunu %84.4 oranında BHT’nin önlediği, gallik asidin ise %54.3 oranında bir koruma sağladığı belirlenmiştir. Ham ekstrenin (%34.2) kaba fraksiyonlarında polarite arttıkça lipit oksidasyonunu koruyucu etkinin azaldığı gözlenmiştir: C (%32.3) > D (%28.9) > E (%21.3). E kodlu metanol kaba fraksiyonunun alt fraksiyonlara ayrıldığında ise lipit oksidasyonunu koruyucu etkinin arttığı görülmüştür. Ancak bu etkideki artış, polariteye bağlı olarak değişmemektedir. E1, E2 ve E3 kodlu alt fraksiyonlarda sırasıyla %36.4, %39.5, %48 oranında koruyucu etki gözlenmiştir. Bu üç örnekte polarite düşüşüne bağlı olarak lipit koruyucu etki artarken; E4 kodlu örnekte %41.7 oranında, E5 kodlu örnekte %35.9 ve E6 kodlu örnekte ise %31.1 oranında koruyucu etki belirlenmiştir.



Şekil 18. Ekstre ve Fraksiyonların Lipit Peroksidasyonlarını İnhibisyon Yüzdeleri

(A), aseton:su (1:1) ekstresi; (C), diklorometan kaba fraksiyonu; (D), diklorometan:metanol (1:1) kaba fraksiyonu; (E), metanol kaba fraksiyonu; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu; (BHT), bütillenmiş hidroksitoluen; (GA), gallik asit.

Lipoksijenaz enzim inhibisyonuna yönelik bulgular

Tez kapsamında LOX enzim inhibisyonu, hem antiinflamatuvar etkinin ortaya konulması hem de antikanser ve antioksidan aktivite ile ilişkisini ortaya koymak amacıyla çalışılmıştır.

Örneklerin LOX inhibisyon aktiviteleri, Baylac ve Racine (2003) tarafından tanımlanan metodun modifiye edilmesi ile spektrofotometrik olarak yapılmıştır. 234 nm’de 10 dk boyunca absorbans değişimi kinetik olarak kaydedilmiştir. Örnekler ve NDGA uygun konsantrasyonlarda %10’luk DMSO’da çözülerek

hazırlanmıştır. Deneydeki kinetik ölçümler için kuvarz küvet kullanılmıştır. Örnekler 20-200 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanarak enzim inhibisyonları yüzde olarak hesaplanmıştır. Ancak iyi bir etkiye rastlanmadığı için IC₅₀ değerleri belirlenememiştir. NDGA, 5-LOX enzimini %96.6 oranında inhibe etmiştir. E3 kodlu alt fraksiyon 42 µg/mL konsantrasyonda %11 ve E4 kodlu alt fraksiyon 36 µg/mL konsantrasyonda %1'lik bir inhibisyon sağlamıştır. Diğer örneklerde ise herhangi bir etkiye rastlanmamıştır.

Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonlarına ilişkin bulgular

Asetil- ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonları, Ellman ve ark. (1961) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle göre belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak galantamin tercih edilmiştir. Örnekler ve pozitif kontrol 80 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde DMSO ile hazırlanmıştır. Elde edilen bulgular yüzde inhibisyon olarak **Çizelge 13**'de verilmiştir.

Çizelge 13. Ekstre ve Fraksiyonların Kolinesteraz Enzim İnhibisyonları

Madde (80µg/mL)	AChE % İnhibisyon	BuChE % İnhibisyon
	Ortalama±standart hata	Ortalama±standart hata
A	-	-
C	-	-
D	4.77±0.22	21.78±0.66
E	-	-
E1	-	-
E2	6.93±0.81	15.74±2.30
E3	-	39.13±1.27
E4	-	37.36±1.06
E5	-	36.41±2.23
E6	-	37.33±1.17
Galantamin	97.43±0.84	86.38±0.55

(-), etki gözlenmemiştir; (A), aseton:su (1:1) ekstresi; (C), diklorometan kaba fraksiyonu; (D), diklorometan:metanol (1:1) kaba fraksiyonu; (E), metanol kaba fraksiyonu; (E1), su alt fraksiyonu; (E2), metanol:su (2:8) alt fraksiyonu; (E3), metanol:su (4:6) alt fraksiyonu; (E4), metanol:su (6:4) alt fraksiyonu; (E5), metanol:su (8:2) alt fraksiyonu; (E6), metanol alt fraksiyonu.

Asetilkolinesteraz enzimi üzerine galantamin %97.4 oranında inhibisyon sağlarken, örneklerin çoğunun etkisiz olduğu belirlenmiştir. D kodlu fraksiyon yaklaşık %5 oranında, E2 kodlu alt fraksiyon %7 oranında inhibisyon sağlamıştır.

Bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonu üzerine bulgular incelendiğinde ise bütirilkolinesterazın örneklere daha duyarlı olduğu görülmüştür. A, C, E, E1 kodlu örneklerde etkiye rastlanmamıştır. Galantamin, bütirilkolinesterazı %86.4 oranında inhibe ederken fraksiyon/alt fraksiyonların (A, C, E, E1 hariç) %40'ın altında inhibisyona neden oldukları görülmüştür. Örneklerin bütirilkolinesteraz enzim inhibisyonları E3 > E4 ≈ E6 > E5 > D > E2 şeklinde sıralanmıştır.

Biyolojik Aktivite Bulgularının Karşılaştırılması

Arum italicum rizomlarından elde edilen alt fraksiyonların aktiviteleri **Çizelge 14**'de özetlenmiş olup elde edilen sonuçlar, etki yok, hesaplanabilir düzeyde zayıf etki, orta etki, iyi etki ve dikkate değer etki şeklinde sınıflandırılmaya çalışılmıştır.

Çizelge 14. Alt Fraksiyonlarda Test Edilen Biyolojik Aktiviteler

Aktivite (<i>in vitro</i>)	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Sitotoksik etki						
MCF-7	+	++	+	+	+	+++
A549	++	++++	+++	+	+	+++
DNA sentez inhibisyonu						
MCF-7	++	+++	+	+	+	++++
A549	++	++++	+++	++	+	++++
Apoptotik etki (Erken+Geç apoptoz)						
MCF-7	++	++	++	+++	+++	++++
A549	+	+++	++	+	+	++++
Antioksidan etki						
DPPH radikalini süpürücü etki	+	+++	++	+++	++	+
ABTS radikalini süpürücü etki	-	++	+++	++	+	+
İndirgeme kapasitesi	+	++	++	++	++	+
Linoleik asit peroksidasyonunu önleyici etki	++	+++	+++	+++	++	++
Enzim inhibisyonu						
Lipoksijenaz	-	-	+	+	-	-
Asetil kolinesteraz	-	+	-	-	-	-
Bütiril kolinesteraz	-	+	++	++	++	++

(-), etki gözlenmedi; (+), etki zayıf ancak hesaplanabilir düzeyde; (++) , orta derecede etki; (+++), iyi etki; (++++), dikkate değer etki. (E1), su; (E2), metanol:su (2:8); (E3), metanol:su (4:6); (E4), metanol:su (6:4); (E5), metanol:su (8:2); (E6), metanol.

MCF-7 meme kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri incelendiğinde E2 ve E6 kodlu alt fraksiyonlar dikkat çekmektedir. Her iki alt fraksiyonun meme kanser hücre hatlarında DNA sentezini inhibe ederek bu etkiyi gösterdiği söylenebilir. Deneyler sonucunda, A549 akciğer kanser hücrelerinin alt fraksiyonlara daha duyarlı olduğu görülmüştür. E3 ve E6 kodlu alt fraksiyonlarda belirlenen iyi sitotoksik etkinin hem DNA sentez inhibisyonu hem de hücreleri erken apoptoza sürükleyerek oluştuğunu söylemek mümkündür. E1 kodlu alt fraksiyonda hesaplanan sitotoksik etkinin iyi olduğu, bu etkiyi muhtemelen farklı yollar üzerinden gösterdiği söylenebilir. Ancak E2 kodlu alt fraksiyonda belirlenen sitotoksik etkinin oldukça dikkat çekici olduğu görülmektedir. Pozitif kontrol olan ve tedavide kullanılan mitoksantron ile çok benzer etki göstermekle birlikte akciğer kanser hücrelerinde yüksek DNA sentez inhibisyonu sağlamış ve hücreleri erken apoptoza sürüklemiştir.

Alt fraksiyonların sağlıklı fare fibroblast hücrelerine olan sitotoksik etkileri araştırılmış ve sağlıklı olan hücrelerde seçiciliği hakkında fikir edinilmiştir. Çalışılan dozlarda E1 ve E4 kodlu alt fraksiyonlar toksik etki gösterirken, diğer alt fraksiyonlarda toksik etkiye rastlanmamıştır. Bu bulgular, E2, E3 ve E6 kodlu alt fraksiyonlar açısından önem taşımaktadır.

Antioksidan etki bakımından sonuçlar karşılaştırıldığında çalışılan her aktivite için elde edilen bulguların pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit ve BHT'den daha düşük olduğu görülmektedir. Radikal süpürücü etkileri incelendiğinde, DPPH süpürücü etki E4 kodlu alt fraksiyonda; ABTS radikalini süpürücü etki ise E2, E3 ve E4 kodlu alt fraksiyonlarda BHT'ye yakın olarak belirlenmiştir. Demiri indirgeme kapasiteleri E1, E2 ve E3 kodlu alt fraksiyonlarda BHT'ye yakındır. Lipit peroksidasyonunu önleyici etki bakımından gallik asit'e en yakın etki E3'de görülmüştür.

Lipoksijenaz enzimi üzerine inhibisyonları değerlendirildiğinde sadece E3 ve E4 kodlu alt fraksiyonlarda hesaplanabilir zayıf etki gözlenmiştir. Kolinesteraz enzim inhibisyonları incelendiğinde ise alt fraksiyonlarda belirlenen etkinin galantaminden düşük olduğu ayrıca bütirilkolinesteraz enziminin alt fraksiyonlara daha duyarlı olduğu görülmüştür. E2-E6 kodlu alt fraksiyonların bütirilkolinesteraz enzimini yaklaşık %40'dan daha az oranda inhibe ettikleri belirlenmiştir.

Elde edilen biyolojik etkilerin değerlendirilmesi açısından, her bir alt fraksiyonun kimyasal bileşimlerinin YBSK/KS-KS ile belirlenmesi önem taşımaktadır. Analiz sonucu elde edilen kromatogram ve spektrumlar incelenerek literatürde mevcut çalışmalarla kıyaslanarak belirlenmeye çalışılmıştır.

İnce Tabaka Kromatografisi analizlerine ilişkin bulgular

İnce tabaka kromatografisi ile elde edilen plaklar değerlendirildiğinde, örneklerde iyi bir ayırım sağlanamamış ve sağlıklı bir yorum getirilememiştir. Bu nedenle, fraksiyonlama çalışmalarında, İTK'dan faydalanılamamıştır.

Alt Fraksiyonların YBSK/KS-KS ile Analizlerine İlişkin Bulgular

Bu kapsamda sitotoksik etkisi belirlenen E2, E3 ve E6 kodlu alt fraksiyonlar başta olmak üzere alt fraksiyonların bileşiminde bulunan maddelerin yapıları, YBSK/KS-KS analizlerinden elde edilen spektrumları, kaynak bilgileri ışığında yorumlanarak, aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yapıları belirlenebilen bileşikler anayapılarına göre sınıflanarak **Çizelge 15**'te verilmiştir.

Yorumlamaların açıklanabilmesi için her bir bileşiğin bulunduğu fraksiyon/lar'ın kodu (Rt değeri, dakika) ve bağıl yüzdesi, molekül ağırlığı (MA) ve kapalı formülü, elektronegatif iyon modunda çalışıldığı için $[M-H]^-$ değeri, temel piki, fragmentleri ve kütle spektrumları sırasıyla verilmiştir. Bu bölümde yapıları ile ilgili yorumlar yapılan ve isimlendirilen tüm bileşikler doğal olup kaynak taramalarında tanımlamalarına rastlanan bileşiklerdir. Yapısı tanımlanamayan maddelere ilişkin veriler ise bu bölümün son kısmında verilmiştir.

E1-E6 fraksiyonlarına ait her bir kromatogram ile genel tabloları anlatım bütünlüğünü bölmemeleri için EK 1-12'de sıralanmıştır.

YBSK/KS-KS analizi sonucu elde edilen spektrumların değerlendirmeleri

Çizelge 15. *Arum italicum* Yumrularında Tanımlanan Maddeler

Madde	Molekül ağırlığı	Bulunduğu fraksiyon
<i>Pürin bazı</i>		
Adenin	135	E1
<i>Benzoik asit türevleri</i>		
Hidroksibenozik asit türevi	138	E3
Benzoik asit türevi	188	E2, E3
<i>Fenolik aminler (Hidroksisinnamik asit- Spermidin konjugasyonu)</i>		
Dikafeoil spermidin	469	E2, E3, E4
Dikumaroil spermidin	437	E1-E6
Diferuloil spermidin	497	E2
Kafeoil kumaroil spermidin	453	E2
Kumaroil feruloil spermidin	467	E2
<i>Flavon glikozitleri</i>		
Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit	564	E1, E2, E3, E4
Puerarin	416	E1
Bir flavonoit türevi	330	E3, E4, E5
Viteksin/izoviteksin	432	E3
<i>Hidroksisinnamik asit türevleri</i>		
Ferulik asit	194	E1, E2, E3, E4
Kafeik asit	180	E1, E2
Kafeik asit hekzozit	342	E1
Kafeik asit türevi	358	E4
<i>p</i> -Kumarik asit	164	E1, E2, E3
<i>Karbonhidrat</i>		
Disakkarit türevi	342	E1, E2
<i>Lignan ve glikozitleri</i>		
Pinorezinol	358	E3
Hidroksipinorezinol	374	E2, E3, E4
Larisirezinol glikozit	522	E1, E2, E3
Furofuranolignan türevi	344	E2, E3
<i>Monolignol/Dilignol</i>		
Koniferil alkol	180	E3
Koniferil alkol (8-5) ferulik asit	372	E2
<i>Oksilipinler</i>		

Çizelge 15 (devamı). *Arum italicum* Yumrularında Tanımlanan Maddeler

9-Hidroperoksi-oktadekenoik asit	314	E6
9-Okzo-oktadekadienoik asit	294	E6
15,16-Dihidroksi-9,12-oktadekadienoik asit	312	E5, E6
Hidroperoksi-oktadekenoik asit izomeri	314	E5
Okzo-dihidroksi-oktadekenoik asit izomeri	328	E2, E4
Trihidroksi-oktadekadienoik asit	328	E2, E3, E4, E5
Trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri	328	E3
Trihidroksi-oktadekenoik asit	330	E4
Trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri (1)	330	E4, E5
Trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri (2)	330	E5
<i>Diğer</i>		
10-Metoksidihidrofussin	308	E2, E3, E4
Dihidroksiapsiat	308	E3
Gliserofosfoinozitol	334	E5
<i>L</i> -Malik asit	134	E3
Metil-4-kromanon	162	E2, E3, E4
Paksanton	340	E2

(E1), su; (E2), metanol:su (2:8); (E3), metanol:su (4:6); (E4), metanol:su (6:4); (E5), metanol:su (8:2); (E6), metanol.

Purin bazlarına ait bulgular;

Adenin (Vitamin B4):

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E1 (3.01), %31.23

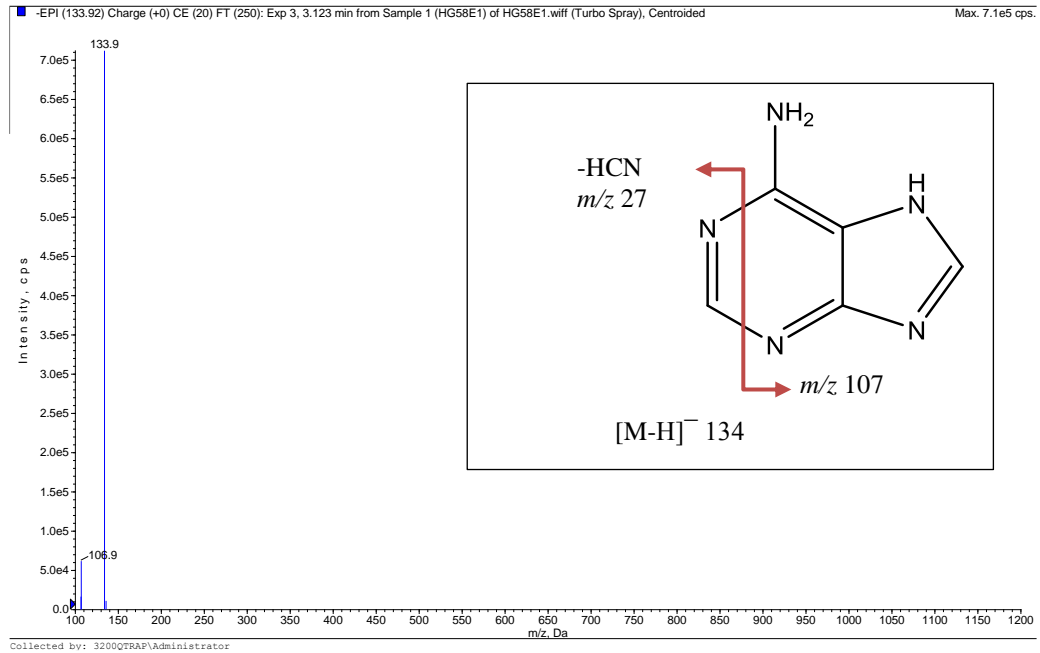
MA: 135 (C₅H₅N₅)

[M-H]⁻: 134

Temel pik: 134

Fragmentler: 107

Molekül ağırlığı 135 olan bu madde literatür verilerine dayanarak adenin olarak belirlenmiştir (Ito ve ark., 2000; Srivasta ve ark., 2005). Adenin, pürin türevi bir bileşik olup her organizmanın DNA ve RNA nükleotitleri, ATP ve NAD üretimleri gibi biyokimyasal süreçlerinde rol oynamaktadır. Ayrıca bitki hücrelerinde sitokininler gibi bitki hormonlarının üretiminde temel teşkil etmektedir (Wroblewska, 2012).



Şekil 19. Adenin'e ait Kütle Spektrumu

Benzoik asit türevlerine ait bulgular;

Bir Benzoik asit türevi:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E2 (13.66), %0.47; E3 (13.66), %1.35

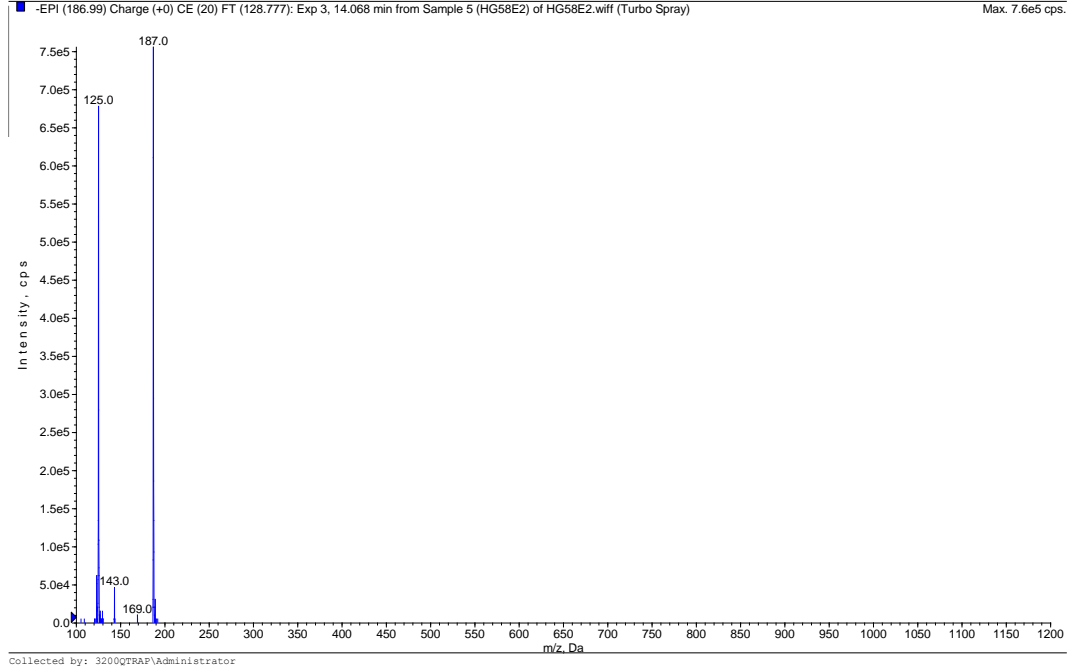
MA: 188

[M-H]⁻: 187

Temel pik: 125

Fragmentler: 169, 143

Maddenin yapısı tanımlanamamakla birlikte moleküler iyon piki m/z 187 [M-H]⁻ ve fragment iyonlar m/z 143 [M-H-44]⁻ ve m/z 125 [M-H-44-18]⁻ olarak spektrumda gözlenmiştir. Literatür bilgilerine göre floroglüsinol (1,3,5-trihidroksibenzen) negatif iyonizasyon modunda m/z 125 [M-H]⁻ moleküler iyon piki vermektedir (Kim ve ark., 2003). Ayrıca spektrumda gözlenen m/z 169 ve 125 pikleri, gallik asit'i çağrıştırmaktadır (Basu ve ark., 2013). Bu fikirden hareketle, maddenin bir benzoik asit türevi olma olasılığı yüksektir.



Şekil 20. Bir Benzoik Asit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu

Bir hidroksibenzoik asit türevi:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E3 (9.17), % 1.09

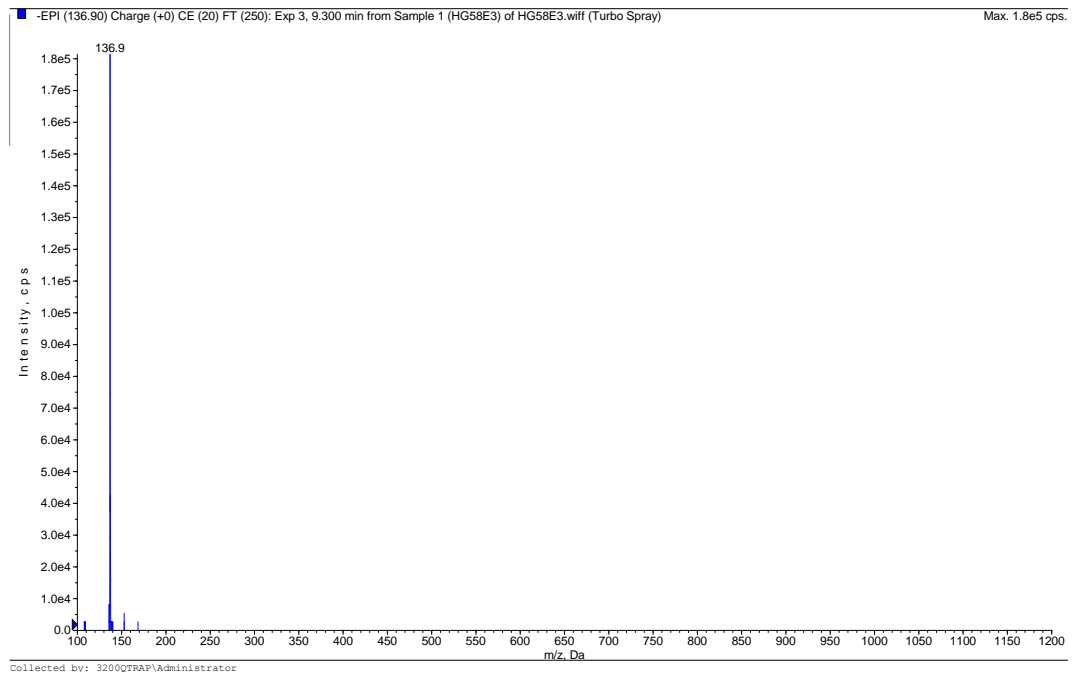
MA: 138

$[M-H]^-$: 137

Temel pik: 137

Fragmentler: -

Maddeye ait spektrum incelendiğinde moleküler iyon pikinin m/z 137 $[M-H]^-$ olduğu görülmektedir. Bu karakteristik iyonun *p*-hidroksibenzoik asit/salisilik asit gibi hidroksibenzoik asit türevi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Blazics, 2010).



Şekil 21. Bir Hidroksibenzoik Asit Türevi'ne ait Kütle Kpektrumu

Fenolik aminlere ait bulgular;

Alt fraksiyonlarda rastlanan bileşiklerin, hidrokisisinnamik asit türevleri ile spermidin konjugasyonları ile oluştuğu düşünülmektedir. Elde edilen moleküler iyonlardan hareketle belirlenen molekül ağırlıklarının tek sayı oluşu ‘N kuralı’ na uymaktadır.

Dikafeoil spermidin:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağlı yüzde: E2 (5.46), %2.82; E3 (5.44), %1.66; E4 (5.47), %1.82

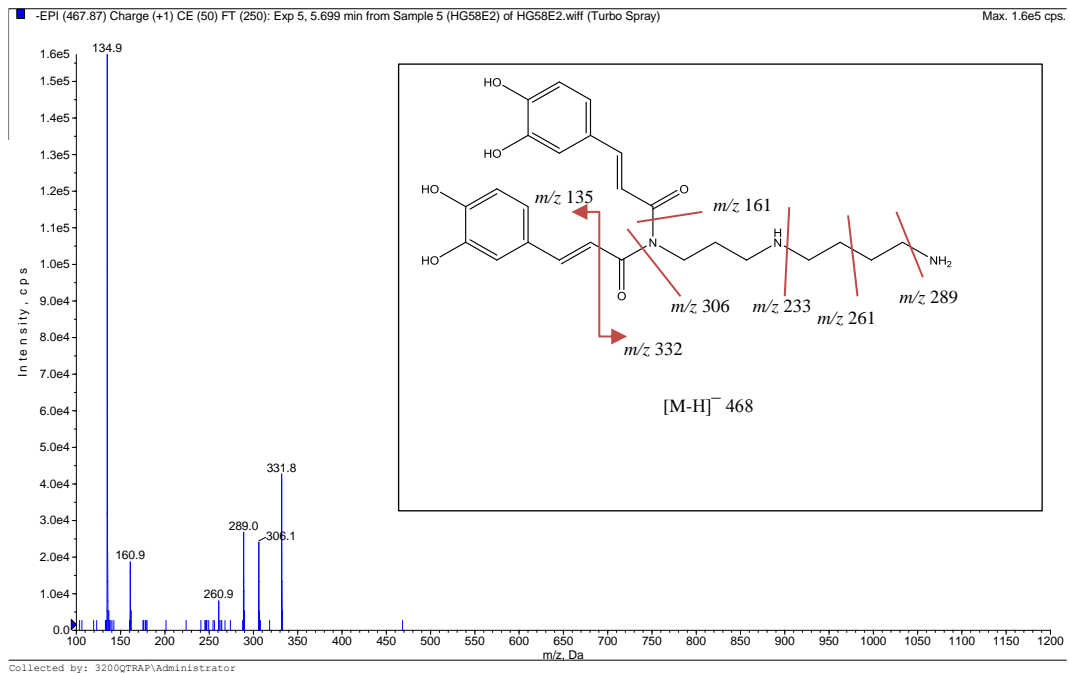
MA: 469 (C₂₅H₃₁N₃O₆)

[M-H]⁻: 468

Temel pik: 135

Fragmentler: 332, 306, 289, 261, 161

Moleküler iyon piki m/z 468 [M-H]⁻ olan maddenin temel piki 135 olarak gözlenmekle birlikte, spektrum incelendiğinde m/z 332 [M-H-136]⁻, m/z 306 [M-H-162]⁻ ve diğer fragmentler m/z 289, 261, 161 olarak kaydedilmiştir. *Phalaris canariensis* L. ve *Triticum aestivum* L. polar ekstralarında daha önce aynı moleküler iyon ve benzer parçalanmalara sahip maddenin tanımlanamadığı görülmektedir. (Li ve ark., 2011; Levandi ve ark., 2014). Singh ve ark. (2009) ise moleküler iyon piki m/z 468 olan ve parçalanmaları m/z 307, 290, 233 ve 161 olan maddeyi *N,N'*-dikafeoil spermidin olarak tanımlamışlardır. Güncel bir çalışmada ise, m/z 332, 306, 289 parçalanmaların *N,N*-dikafeoil spermidine ait karakteristik olduğu belirtilmiş ve bu bulgu, elde ettiğimiz spektrum ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği için bu maddenin *N,N*-dikafeoil spermidin olabileceği düşünülmektedir (Garcia-Salas ve ark., 2014; Wu ve ark., 2016).



Şekil 22. Dikafeoil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu

Dikumaroil spermidin:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E1 (7.28), %2.12; E2 (7.25), %14.8; E3 (7.58), %1.12; E4 (7.28), %0.92; E5 (7.31), %7.36; E6 (7.42), %5.09

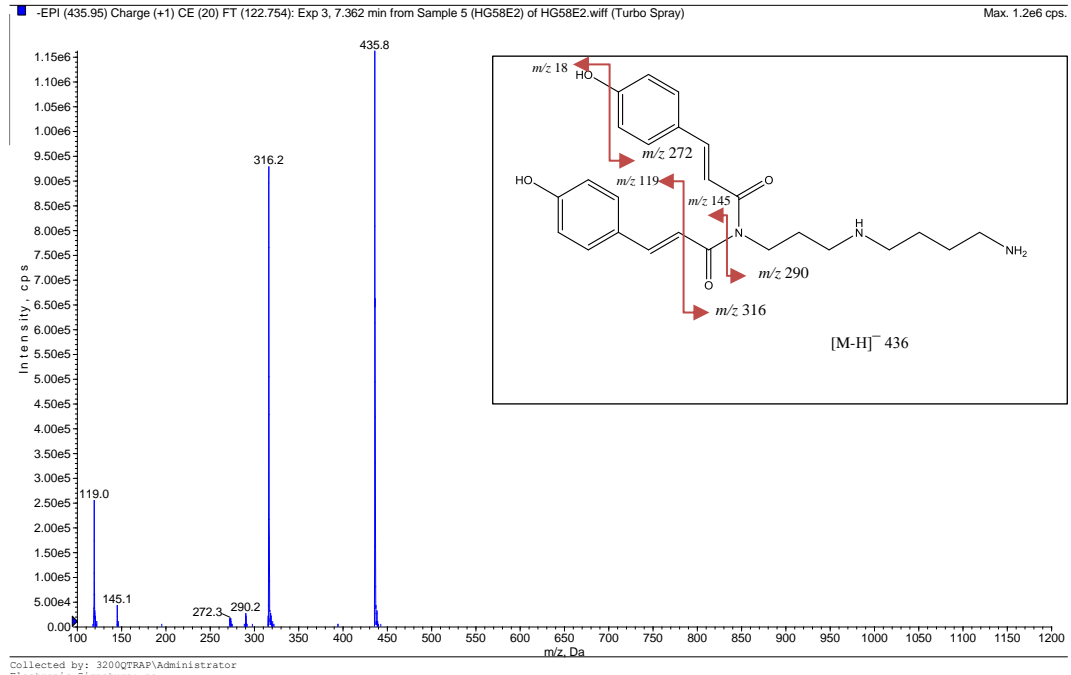
MA: 437 (C₂₅H₃₁N₃O₄)

[M-H]⁻: 436

Temel pik: 436

Fragmentler: 316, 290, 272, 145, 135, 119

Maddenin moleküler iyon pikinin m/z 436 ve temel pikin m/z 119, diğer fragment iyonların m/z 316, 273, 231, 174, 145 olduğu görülmektedir. Maddenin hidroksisinnamik asit türevlerinin spermidin ile oluşturduğu konjugatlardan biri olabileceği düşünülmüştür. Spektrumda gözlenen moleküler iyonun ait temel pik m/z 436 [M-H]⁻ ve diğer fragmentler m/z 316 [M-H-119]⁻, m/z 290 [M-H-145]⁻, m/z 272 [M-H-163]⁻, m/z 145 ve m/z 119 amu olarak yorumlandı. Bu maddenin *N,N*-dikumaroil spermidin olabileceği düşünülmektedir (Collision ve ark., 2015). Bienz ve ark., (2002) *Arum maculatum*'da N¹,N⁶-dikumaroil putresin, N¹,N⁵-dikumaroil spermidin, N¹,N¹⁰-dikumaroil spermidin'i tanımlamışlardır. Ayrıca Araceae türlerinin çiçek durumlarında hidroksisinnamik asit amit türevleri önemli bileşiklerdir (Ponchet ve ark., 1982).



Şekil 23. Dikumaroil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu

Diferuloil spermidin:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E2 (7.90), %7.21

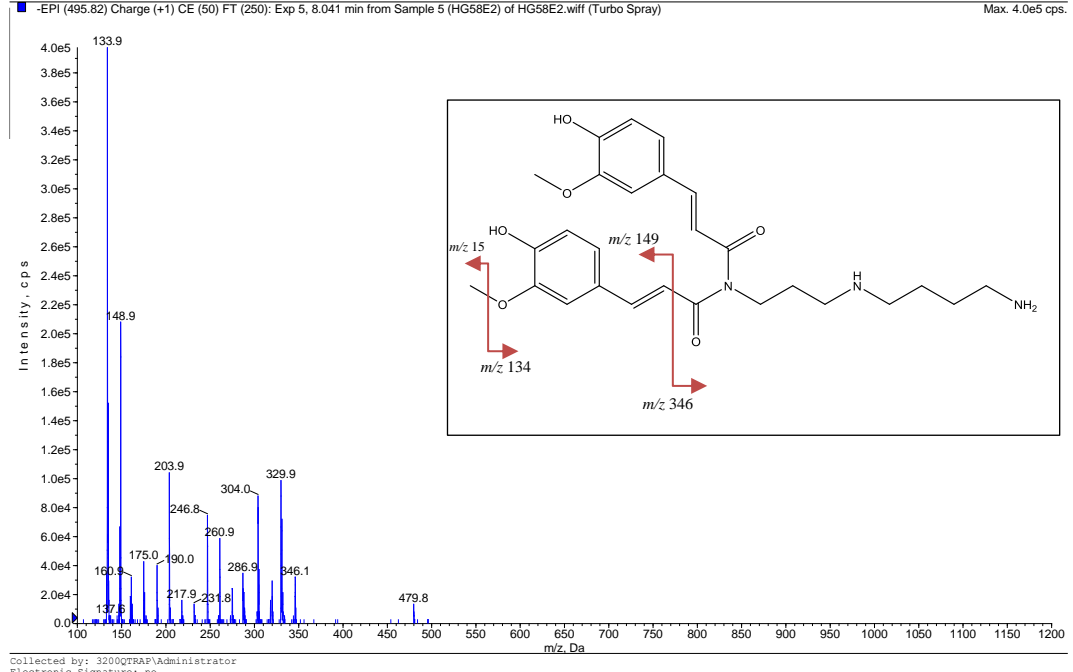
MA: 497 (C₂₇H₃₅N₃O₆)

[M-H]⁻: 496

Temel pik: 134

Fragmentler: 480, 346, 330, 304, 204, 149

Maddeye ait moleküler iyon piki m/z 496 [M-H]⁻, temel pik ise 134 olarak gözlemlendi. Diğer fragmentler ise m/z 346, 331/330, 261, 204, 175, 149 olarak spektrumda görüldü. Spektrumda gözlenen m/z 175, 149 ve 134 fragmentleri yapıdaki feruloil- varlığını desteklemektedir. Spektrum verileri güncel çalışmalarda benzer yapıdaki hidroksisinnamik asit türevleri ile spermidin konjugasyonlarına ait veriler ile karşılaştırıldığında ve molekül ağırlığı dikkate alındığında maddenin *N,N'*-diferuloil spermidin olabileceği düşünülmüştür (Collision ve ark., 2015; Wu ve ark., 2016).



Şekil 24. Diferuloil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu

Kafeoil-kumaroil spermidin:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E2 (6.34), %2.61

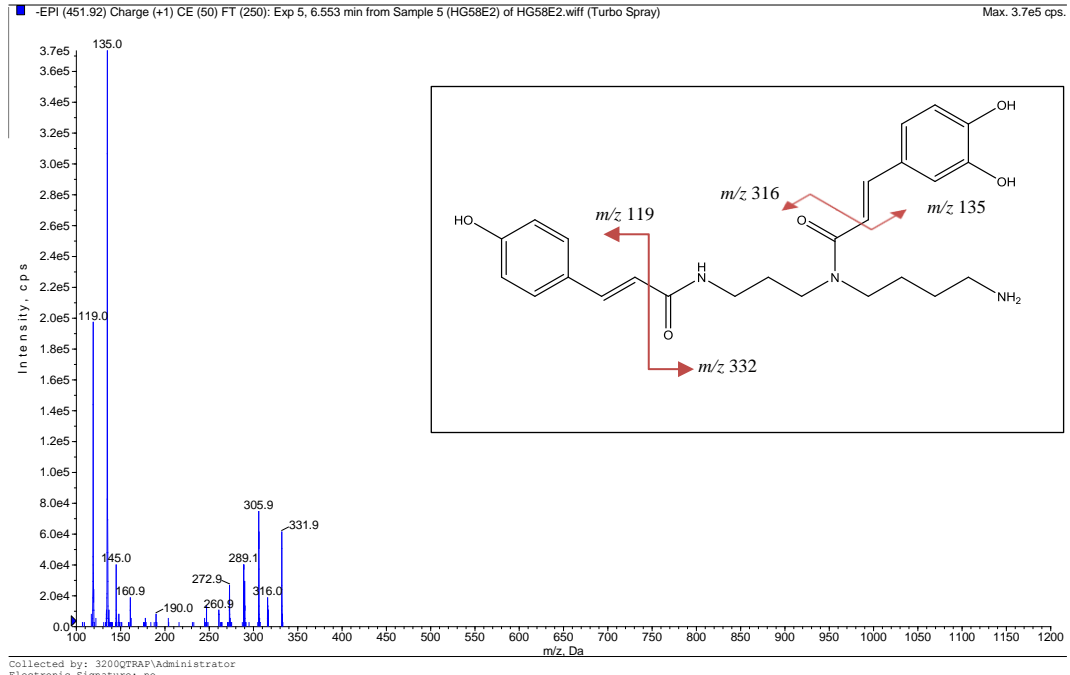
MA: 453 (C₂₅H₃₁N₃O₅)

[M-H]⁻: 452

Temel pik: 135

Fragmentler: 332, 316, 306, 289, 273, 261, 161, 145, 119

Spektrum incelendiğinde m/z 452 [M-H]⁻ olduğu ve temel pikin 135 olduğu görülmektedir. Diğer fragmentler ise m/z 332, 316, 306, 289, 231, 119 olarak sıralanmaktadır. m/z 332 [M-H-120]⁻, m/z 316 [M-H-136]⁻, m/z 306 [M-H-146]⁻ fragment iyonları dikkati çekmektedir. m/z 306 iyonunun deprotonlanmış glutatyon yapısı olabileceği, ayrıca 120 ve 146 amu'luk farkların gözlenmesi ramnozit grubunun varlığını ilk bakışta çağrıştırmaktadır. Levandi ve ark., (2014)'nın yayınladığı makalede tanımlayamadıkları ve ramnozit grubu taşıyan bir bileşik olarak yorumladıkları bu spektrum ile elde edilen spektrum arasında tam bir benzerlik bulunmuştur. Ancak güncel olarak yayınlanan iki makale incelendiğinde, bu maddenin spermidin türevi olabileceği ve spektrumdaki verilerden hareketle, *N*-kafeoil-*N*³-kumaroil spermidin konjugasyonu olabileceği düşünülmüştür (Cho ve ark., 2013; Collision ve ark., 2015; Wu ve ark., 2016).



Şekil 25. Kafeoil-Kumaroil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu

Kumaroil-feruloil spermidin:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E2 (7.50), %3.08

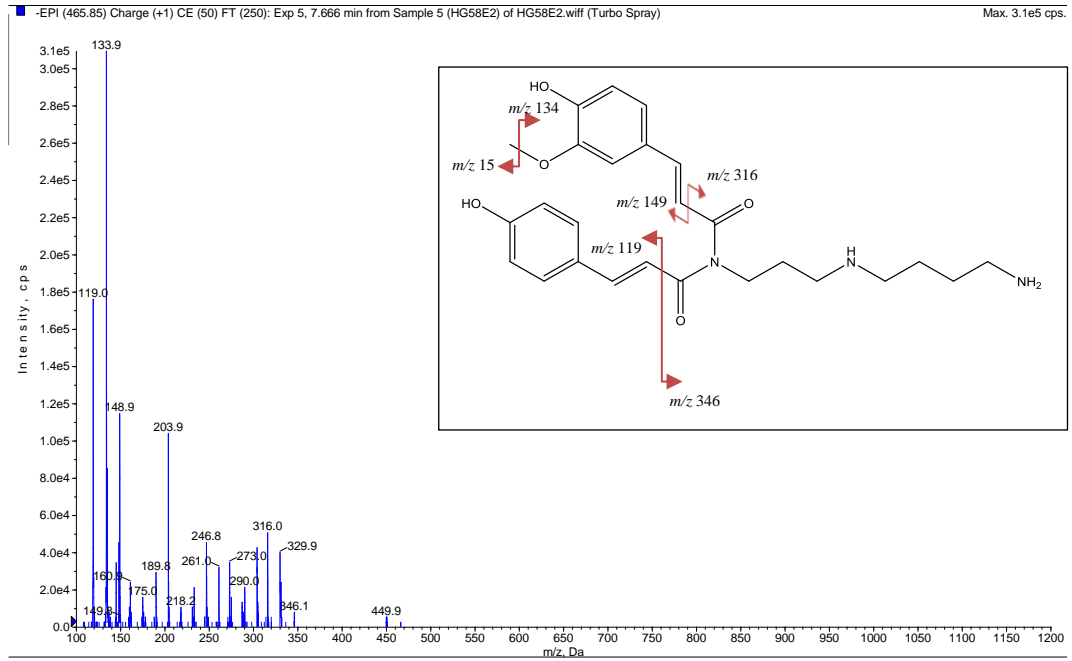
MA: 467 (C₂₆H₃₃N₃O₅)

[M-H]⁻: 466

Temel pik: 134

Fragmentler: 346, 316, 273, 149, 133

Maddeye ait spektrum incelendiğinde moleküler iyon piki m/z 466 [M-H]⁻ ve temel pik m/z 134, diğer fragmentler ise m/z 346, 316, 273, 149, 135, 133 olarak belirlenmiştir. m/z 161 ve 119 fragmentleri yapıda kumaroil varlığını, m/z 175, 149 ve 134 fragmentleri de feruloil varlığını desteklemektedir. Spektrum verileri güncel çalışmalar ile karşılaştırıldığında ve molekül ağırlığı dikkate alındığında, bu maddenin *N*-kumaroil-*N'*-feruloilspermidin olabileceği düşünülmüştür (Cho ve ark., 2013; Collision ve ark., 2015; Wu ve ark., 2016).



Şekil 26. Kumaroil-Feruloil Spermidin'e ait Kütle Spektrumu

Flavon ve glikozitlerine ait bulgular;

Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağlı yüzde: E1 (8.12), %3.93; E2 (8.12), %0.9; E3 (7.91), %3.38; E4 (8.24), %1.58

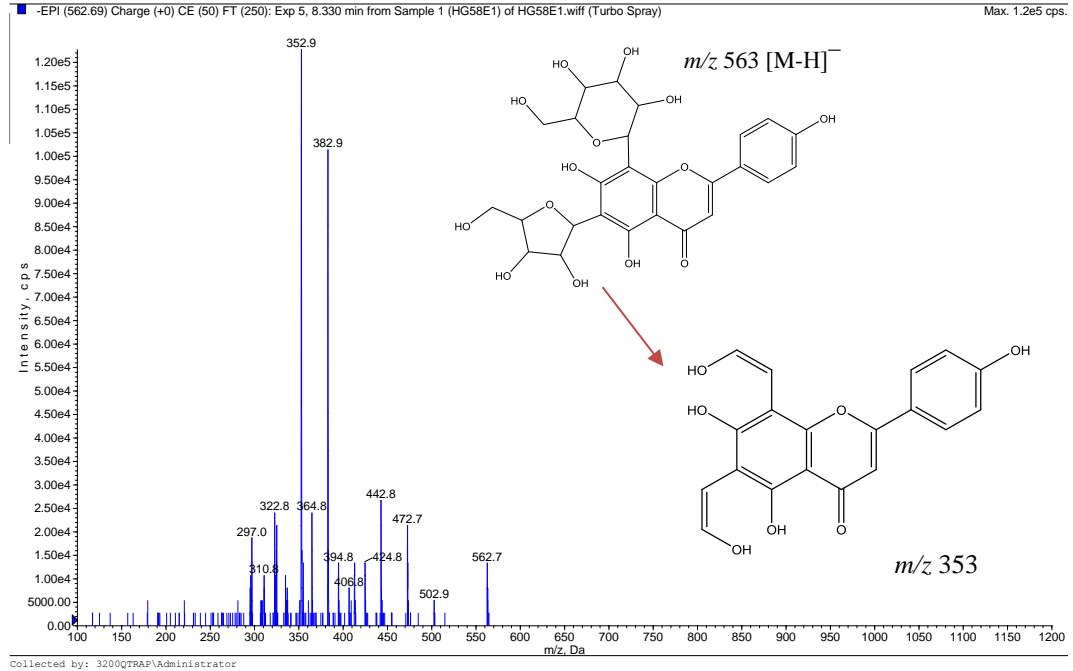
MA: 564 (C₂₆H₂₈O₁₄)

[M-H]⁻: 563

Temel pik: 353

Fragmentler: 473, 443, 383, 323, 311, 297

Maddeye ait spektrum incelendiğinde moleküler iyon piki m/z 563 olan maddenin temel piki m/z 353 olarak gözlenmiştir. Diğer fragmentler ise m/z 503, 473, 443, 425, 383, 323, 311 ve 297 amu'dur. m/z 353 iyonu, aglikonun apigenin ve di-C-glikoziti olduğunu düşündürmektedir. m/z 503 [M-H-60]⁻, m/z 473 [M-H-90]⁻, m/z 443 [M-H-120]⁻ parçalanmaları karbona bağlı şeker kopmasına işaret etmektedir. m/z 425 [M-H-120-18]⁻ parçalanmasının m/z 443 iyonundan bir su çıkışı ile oluştuğu düşünülmektedir. m/z 383 [M-H-120-60]⁻, m/z 353 [M-H-120-90]⁻ ve m/z 323 [M-H-120-120]⁻ iyonları ise yine bir karbondan şeker kopmasını göstermektedir. Flavon yapısı bileşiklerde karbon glikozitleri genellikle 6. ve 8. karbonlarda gerçekleşmektedir (Cao ve ark., 2014). İbrahim ve ark., (2015) ise elde ettiğimiz spektrumla çok benzer verileri yorumlayarak apigenin-6-C-pentozit-8-C-hekzozit şeklinde bileşiği tanımlamışlardır (Cao ve ark., 2014; İbrahim ve ark., 2015). Standart bir madde ile karşılaştırma olanağı olmadığı için ve ayrıca pentozit ya da hekzozitin hangi konumdan bağlandığını belirlemek bu veriler ile zor olduğundan tam bir tanımlama yapılamamıştır. Bu nedenle bu bileşik, apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit olarak tanımlanmıştır.



Şekil 27. Apigenin-6-C-pentozit-8-C-hekzozit'e ait Kütle Spektrumu

Puerarin:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E1 (11.23), % 1.12

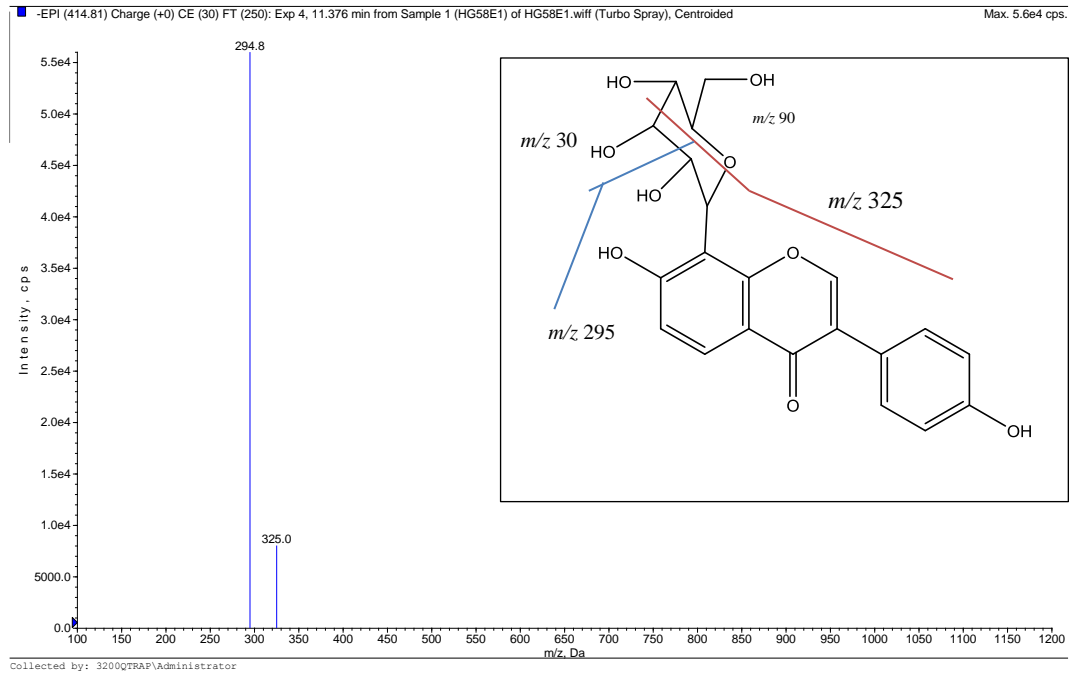
MA: 416 (C₂₁H₂₀O₉)

[M-H]⁻: 415

Temel pik: 295

Fragmentler: 325

m/z 415 [M-H]⁻ moleküler iyon pikli maddeye ait temel pik *m/z* 295 ve diğer iyon *m/z* 325 olarak gözlenmiştir. Spektrumda 120 amu'luk nötral kayıp ile *m/z* 295 iyonunun oluşması maddenin karbon glikoziti olduğunu düşündürmektedir. *m/z* 325 iyonu ise 90 amu'luk bir nötral kayıp sonucu oluşmuştur. Karbon glikozitlerinde 120, 90 ve 60 amu'luk nötral kayıplar karakteristiktir. Literatür bilgileri doğrultusunda bu maddenin daidzein-8-C-glikozit olarak da bilinen puerarin olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca spektrumda *m/z* 267 ve 253 iyonları puerarin'e ait diğer iyonlardır, ancak elde ettiğimiz spektrumda gözlenmemiştir (Fang ve ark., 2006).



Şekil 28. Puerarin'e ait Kütle Spektrumu

Bir flavonoit türevi

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E3 (18.86), % 1.39; E4 (18.84), % 14.55; E5 (18.88), % 3.86

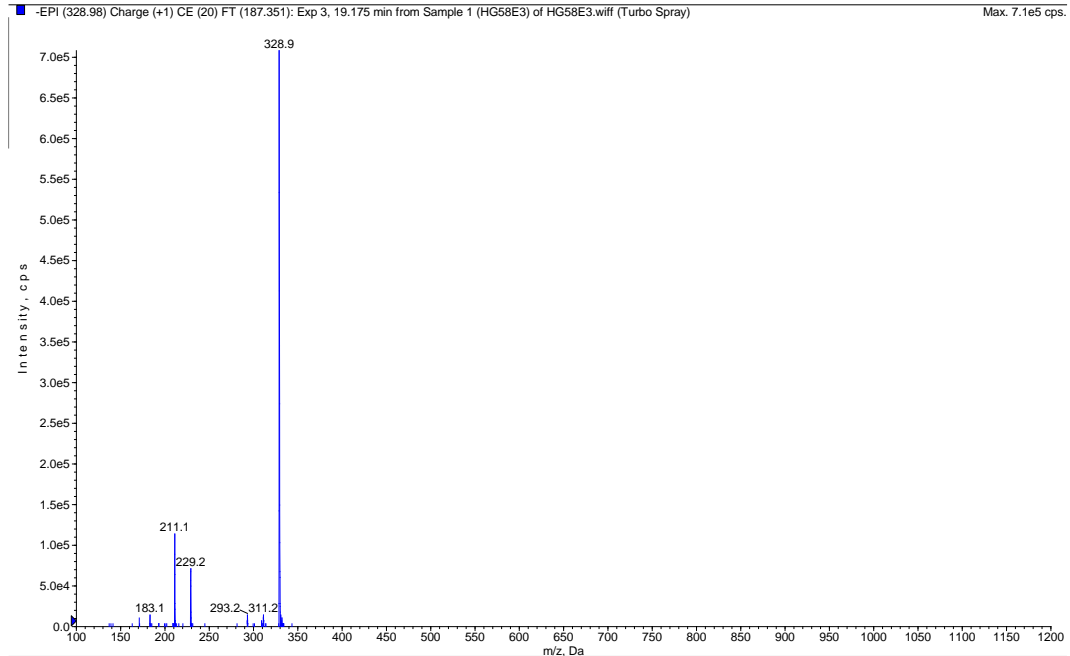
MA: 330

[M-H]⁻: 329

Temel pik: 329

Fragmentler: 311, 293, 211, 229, 183

Maddeye ait spektrumda, moleküler iyon piki m/z 329 [M-H]⁻ olan maddeye ait fragmentler bağıl yoğunluklarına göre sıralandığında m/z 211, 229, 311, 293, 183 olarak görülmektedir. Spektrum verileri önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu madde Deng ve ark. (2012) çalışmalarında trisin (3',5'-O-dimetiltrisetin) ile eşleşmektedir. Trisin'in, monolignoller ile konjugasyon oluşturarak flavonolignan biyosentezinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca allelokimyasal olarak rol oynadığı için toprağa yakın kısımlardan toprağa geçerek biriktiği, herbisidal etki gösterdiği düşünülmektedir (Deng ve ark., 2012; Moheb, 2012; Lan ve ark., 2015). Kütle spektrometrisi çalışmalarında, polimetoksi flavonlarda metil kopmaları ve genellikle [M-H-15]⁻, [M-H-30]⁻ ve [M-H-30-28]⁻ iyonlarının gözlenmesi karakteristiktir. Ancak spektrumda trisin'e ait olduğu düşünülen bu fragmentlere rastlanmamıştır. Mincsovcics ve ark. (2013) ise moleküler iyon piki m/z 329 [M-H]⁻ ve fragmentleri m/z 229, 211, 193, 183 ve 171 olan bileşiğin bir flavonoit türevi olabileceğini belirtmişlerdir (Mincsovcics ve ark., 2013). Spektrumdaki veriler değerlendirildiğinde bu bileşiğin bir flavonoit türevi olduğu düşünülmüştür.



Şekil 29. Bir Flavonoit Türevi'ne ait Kütle Spektrum

Viteksin/Izoviteksin:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E3 (9.87), % 1.48

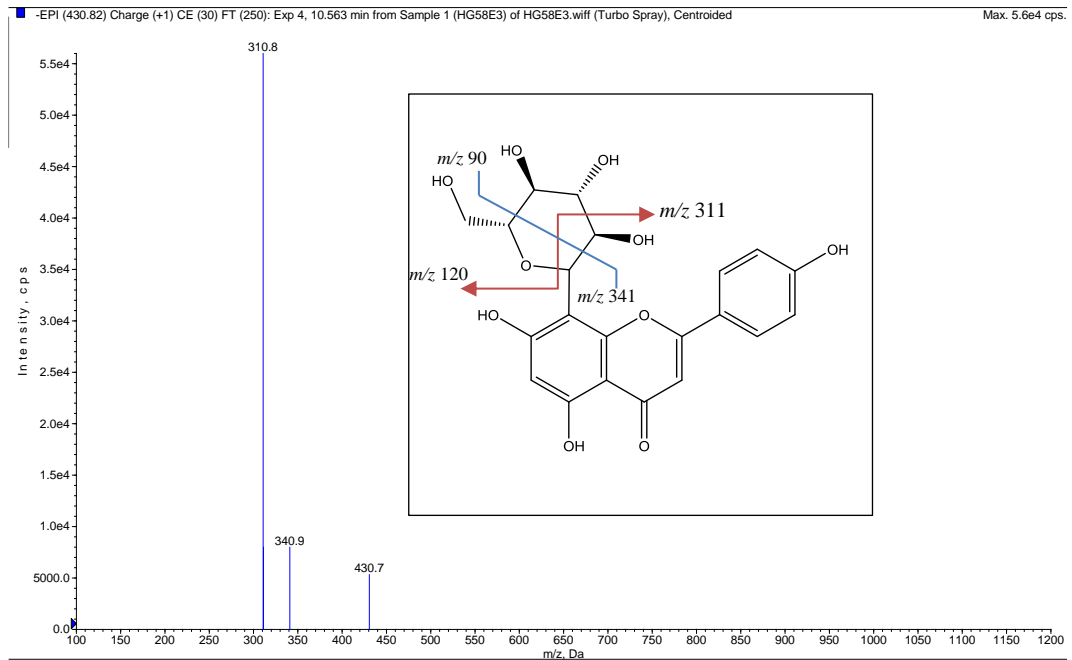
MA: 432 (C₂₁H₂₀O₁₀)

[M-H]⁻: 431

Temel pik: 311

Fragmentler: 341

Maddenin moleküler iyon piki m/z 431 [M-H]⁻ ve temel piki m/z 311 [M-H-120]⁻ olan maddeye ait görülen diğer iyon ise m/z 341 [M-H-90]⁻ olarak gözlenmiştir. Sakalem ve ark., (2012) bu spektruma sahip bileşiği viteksin olarak tanımlamışlardır. Temel pik oluşurken 120 amu'luk nötral kayıp yapıda apigenine bağlı bir karbon glikoziti olabileceğini işaret etmektedir. Apigeninin mono karbon glikozitlerinde m/z 311 karakteristik bir parçalanmadır. Bu bilgiler ışığında bileşiğin apigenin-C-glikoziti olduğu açıktır. Ancak viteksin (apigenin-8-C-glikozit) ile izoviteksinin (apigenin-6-C-glikozit) molekül ağırlıkları aynı ve parçalanmaları benzerdir. Elde ettiğimiz spektrumda m/z 269 ve 283 piklerinin gözlenmemesi viteksin olasılığını arttırmaktadır. Yine de, kesin bir tanımlama yapabilmek için standart maddeye ihtiyaç duyulmaktadır. Viteksin, *Arum dioscoridis* tohumlarında, viteksin ve izoviteksin *A. palaestinum* yapraklarında önceki çalışmalarda tanımlanmıştır (Sakalem ve ark., 2012; Uğuzlar ve ark., 2012; Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 30. Viteksin/Izoviteksin'e ait Kütle Spektrumu

Hidroksisinnamik asit türevlerine ait bulgular;

Ferulik asit:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E1 (12.78), % 1.01; E2 (12.76), % 15.25; E3 (12.79), % 12.11; E4 (12.80), % 8.89

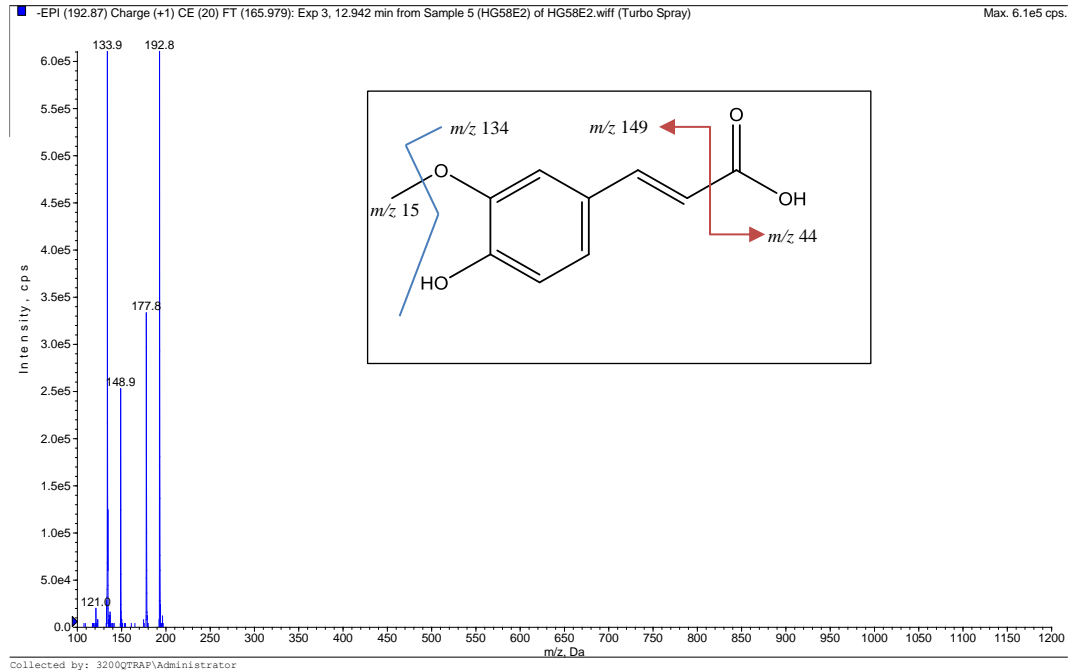
MA: 194 (C₁₀H₁₀O₄)

[M-H]⁻: 193

Temel pik: 134

Fragmentler: 178, 149, 121

Maddenin spektrumu incelendiğinde m/z 193 [M-H]⁻ ve diğer fragmentler m/z 178, 149 ve 134 olarak belirlendi. Bu bilgiler doğrultusunda madde, ferulik asit olarak yorumlanmaktadır. Ferulik asit, *A. italicum* rizomlarının sulu aseton ekstresinde, *A. palaestinum* yaprak ekstresinde, Araceae familyasına ait *Pinellia ternata* taze rizomlarında ve *Acorus calamus* rizomlarında tanımlanmıştır (Della Greca ve ark., 1993a; Han ve ark., 2007; Wojdylo ve ark., 2007; Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 31. Ferulik Asit'e ait Kütle Spektrumu

Kafeik asit:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağlı yüzde: E1 (9.27), %2.20; E2 (9.14), %1.93

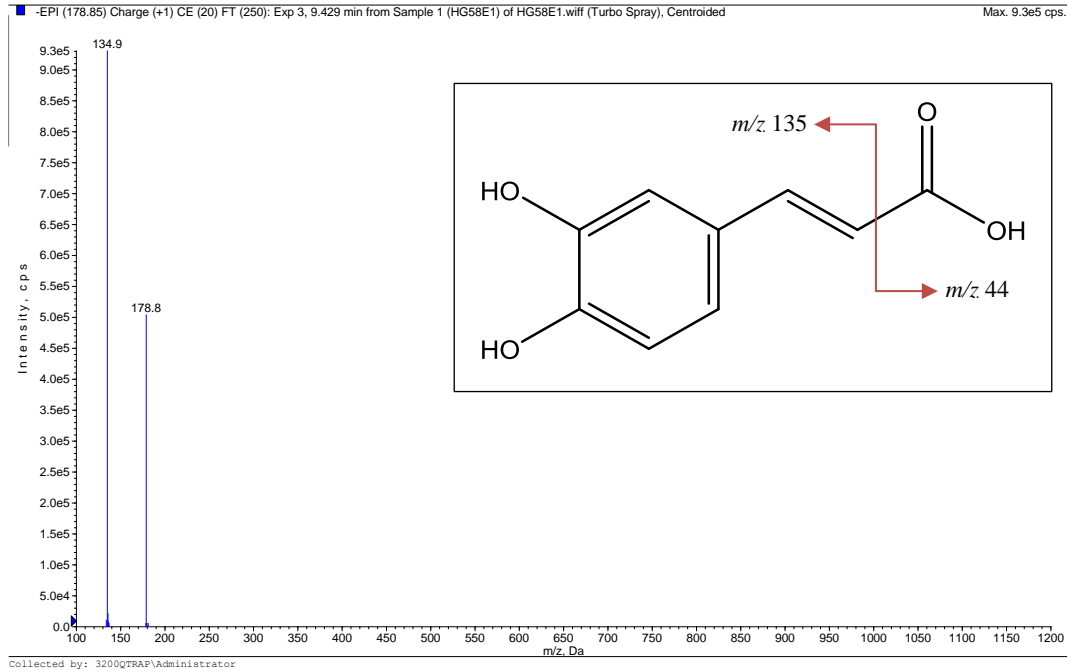
MA: 180 (C₉H₈O₄)

[M-H]⁻: 179

Temel pik: 135

Fragmentler: 107

Maddeye ait spektrumda moleküler iyon piki m/z 179 [M-H]⁻ ve 44 amu'luk karboksilik asit kopmasıyla meydana gelen temel pik m/z 135 [M-H-44]⁻ olarak gözlenmiştir. Bu madde, kafeik asit olarak yorumlanmıştır (Wang, X. ve ark., 2015). Hidroksisinnamik asit türevi olan kafeik asit, *Arum palaestinum* yaprak ekstrelerinde daha önceki çalışmalarda tanımlanmıştır (El-Desouky ve ark., 2007a; Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 32. Kafeik Asit'e ait Kütle Spektrumu

Kafeik asit hekkozit:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E1 (6.93), % 1.93

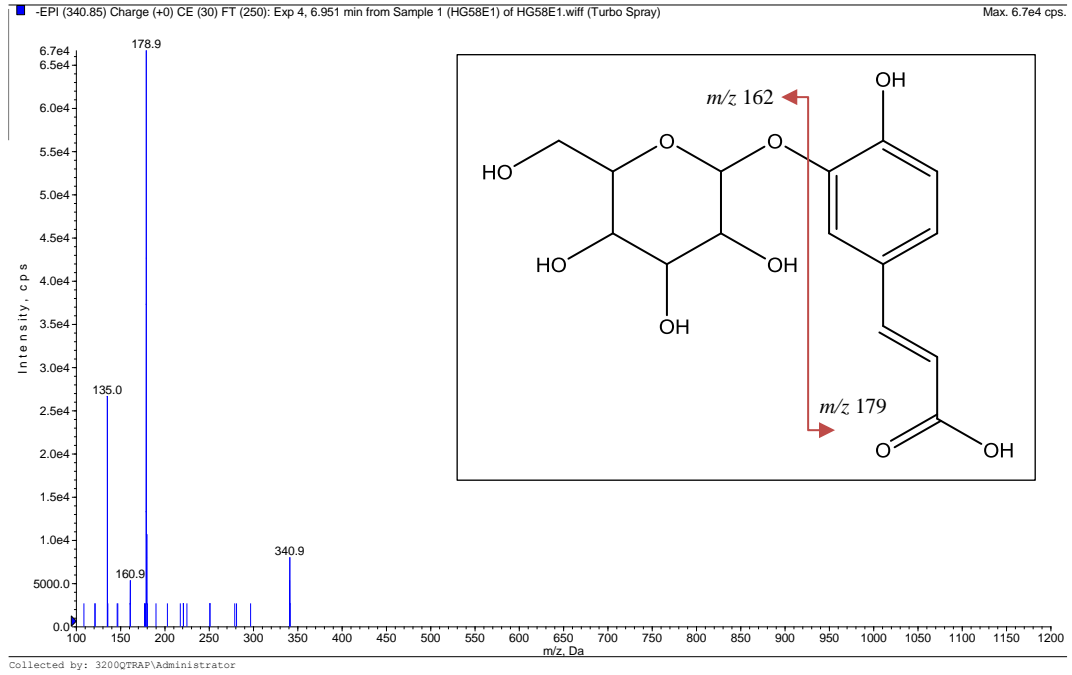
MA: 342 (C₁₅H₁₈O₉)

[M-H]⁻: 341

Temel pik: 179

Fragmentler: 135

Moleküler iyon piki m/z 341 [M-H]⁻ olan maddeye ait temel pik m/z 179 [M-H-162] olarak gözlenmiştir. m/z 179 ([kafeik asit-H]⁻), 161 ([kafeik asit-H-H₂O]⁻) ve 135 ([kafeik asit-H-CO₂]⁻) iyonları kafeik aside özgü parçalanmalar olup spektrumda 162'lik nötral kayıp gözlenmesi bu maddenin kafeik asit hekkozit olabileceğini göstermektedir (Hossain ve ark., 2010; Koolen ve ark., 2013; Barreira ve ark., 2014). *Arum palaestinum* yaprak sulu metanol ekstraktlarında daha önce tanımlanmıştır (Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 33. Kafeik Asit Hekkozit'e ait Kütle Spektrumu

Bir kafeik asit türevi:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E4 (16.55), %2.67

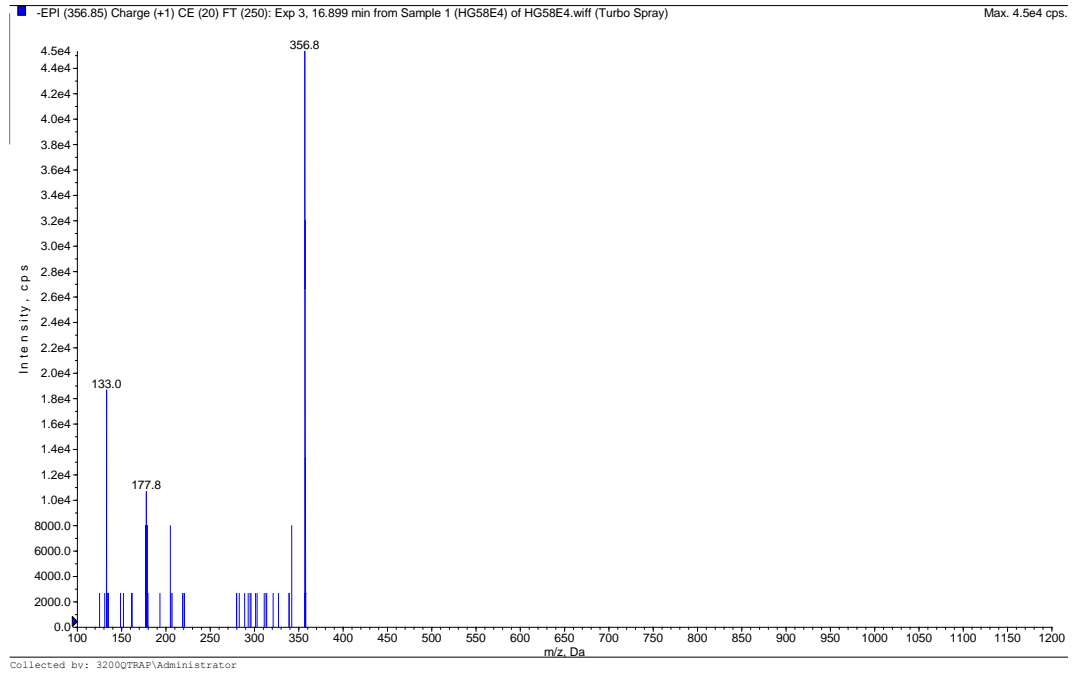
MA: 358

[M-H]⁻: 357

Temel pik: 357

Fragmentler: 177, 133

Maddeye ait spektrumda moleküler iyon piki m/z 357 [M-H]⁻ ve diğer iyonlar m/z 177 ve 133 olarak gözlenmiştir. Spektrumda dikkati çeken m/z 133 pikinin tek olmadığı ve 135 pikinin de gözlenmiş olmasıdır. m/z 179 piki ile m/z 177 iyonu da bitişik olarak gözlenmektedir. Spektrumda gözlenen m/z 133 iyonunu 44 amu'luk m/z 177 iyonundan kopması yapıdan bir -CO₂ grubunun kopmasını çağrıştırmaktadır. Bu bağlantı m/z 179 ve 135 iyonları arasında da kurulabilir. Molekülün fenolik yapıda karboksil grubu taşıdığı düşünülebilir. m/z 179 ve 135 iyonları kafeik asit varlığına işaret etmektedir. Molekül ağırlığı 358 olan bu maddenin kafeik asit'in dimerizasyonu ile oluşabileceği düşünülmektedir (Theerasin ve Baker, 2009). Bu nedenle bu madde bir kafeik asit türevi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 34. Bir Kafeik Asit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu

p-Kumarik asit:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E1 (11.88), %4.03; E2 (11.88), %9.21; E3 (11.90), %6.46

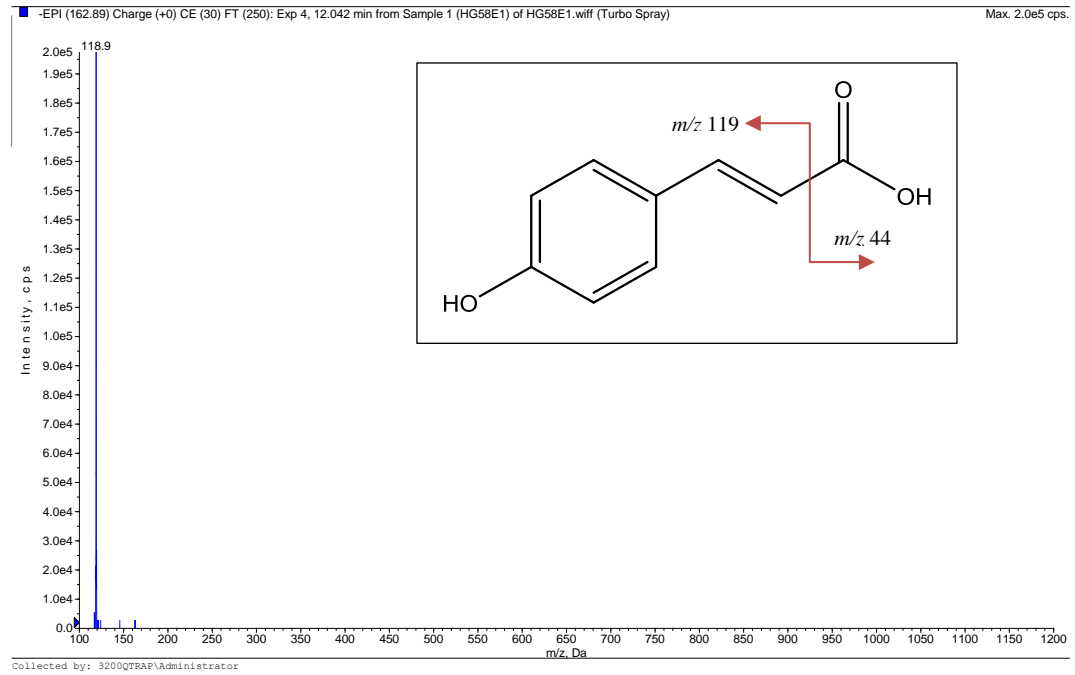
MA: 164 (C₉H₈O₃)

[M-H]⁻: 163

Temel pik: 119

Fragmentler: -

Maddeye ait moleküler iyon 163 [M-H]⁻ ve temel piki *m/z* 119 [M-H-44]⁻ olan madde *p*-kumarik asit olarak yorumlanmıştır (Li ve ark., 2012). *p*-Kumarik asit *Arum dioscoridis* tohumlarında tanımlanmış hidroksisinnamik asit türevidir (Uğuzlar ve ark., 2012).



şekil 35. *p*-Kumarik Asit'e ait Kütle Spektrumu

Karbonhidrat türevlerine ait bulgular;

Disakkarit türevi:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt): E1 (3.55); E2 (3.56)

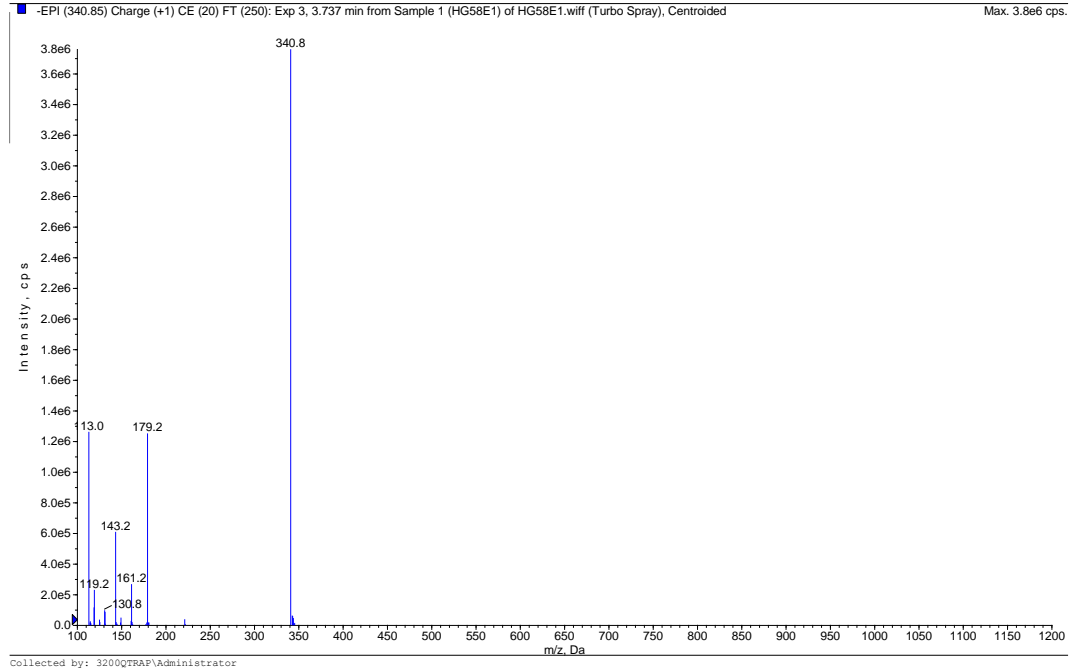
MA: 342

[M-H]⁻: 341

Temel pik: 179

Fragmentler: 161, 149, 143, 119, 113

m/z 179 iyonunun 162'lik nötral kayıp ile yani glikoz, galaktoz, fruktoz gibi bir hekzoz kopması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. m/z 179 ve 161 iyonlarının gözlenmesi, glikozidik bağ ile bağlı monohekzoz moleküllerinin ayrılmasına işaret etmektedir. Diğer m/z 143, 119 ve 131 iyonlarının gözlenmesi ise hekzoz grubundan H₂O ve CH₂O gruplarının kopmalarına işaret etmektedir. 280 nm'de UV absorbansı vermeyen bu bileşik total iyon kromatogramı ile belirlenmiştir. Hem spektrum bilgileri doğrultusunda hem de kolonu kısa sürede terk edişinden dolayı bu maddenin, sakkaroz, maltoz gibi bir disakkarit türevi olabileceği düşünülmüştür (Gabbanini ve ark., 2010; Levandi ve ark., 2014). *Arum maculatum* yumruları ve *A. palaestinum* yapraklarında disakkarit türevleri önceki çalışmalarda tanımlanmıştır (Stanimirovic ve ark., 1978; Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 36. Bir Disakkarit Türevi'ne ait Kütle Spektrumu

Lignan ve glikozitlerine ait bulgular;

Pinorezinol:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E3 (11.52), %2.27

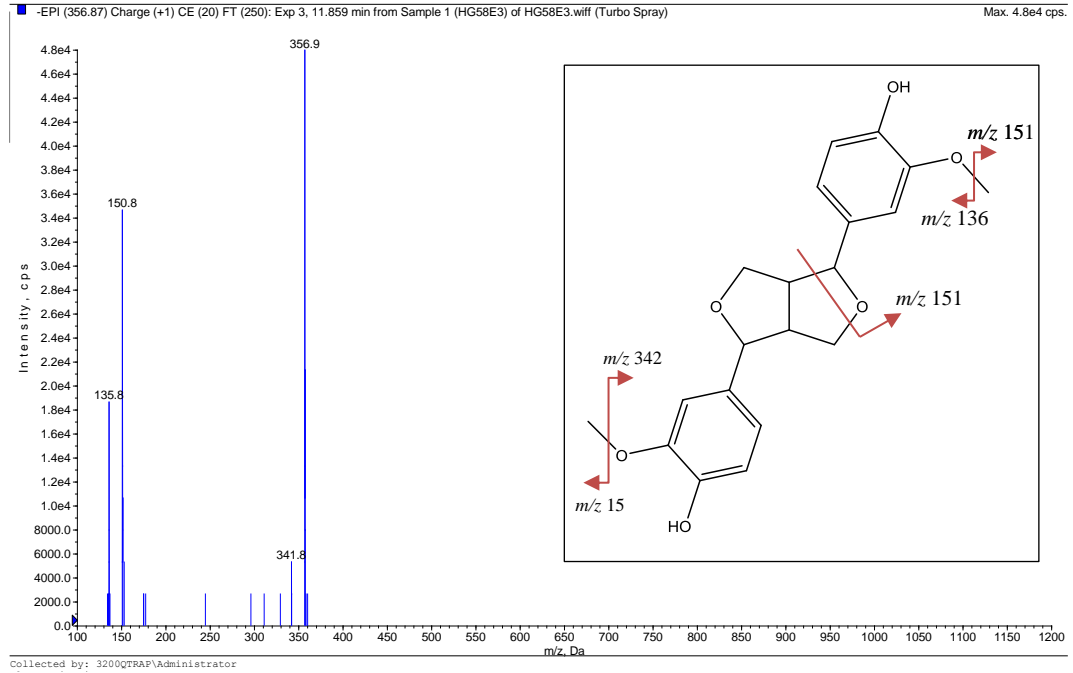
MA: 358 (C₂₀H₂₂O₆)

[M-H]⁻: 357

Temel pik: 357

Fragmentler: 342, 151, 136

Maddeye ilişkin spektrumda m/z 357 moleküler iyon piki gözlenmiş ve parçalanmalar bağıl yoğunluklarının yüksekten aza doğru m/z 151, 136 ve 342 şeklinde sıralanmaktadır. Bu maddenin spektrumu literatürdeki maddeler ile karşılaştırıldığında lignan türevi bir madde olan pinorezinol standardı ile uyumlu olduğu görülmüştür (Eyles ve ark., 2007; Banoub ve ark., 2015). *A. italicum* yumrularında yapılan önceki çalışmalarda lignanlar ve onların glikozit formları izole edilmiştir. Bu bilgilerden hareketle, bitkinin lignan biyosentezi yollarını kullanarak pinorezinol sentezleyebileceği düşünülmektedir.



Şekil 37. Pinorezinol'e ait Kütle Spektrumu

Hidroksipinorezinol:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E2 (14.57), %2.92; E3 (14.61), %2.09; E4 (14.67), %2.84

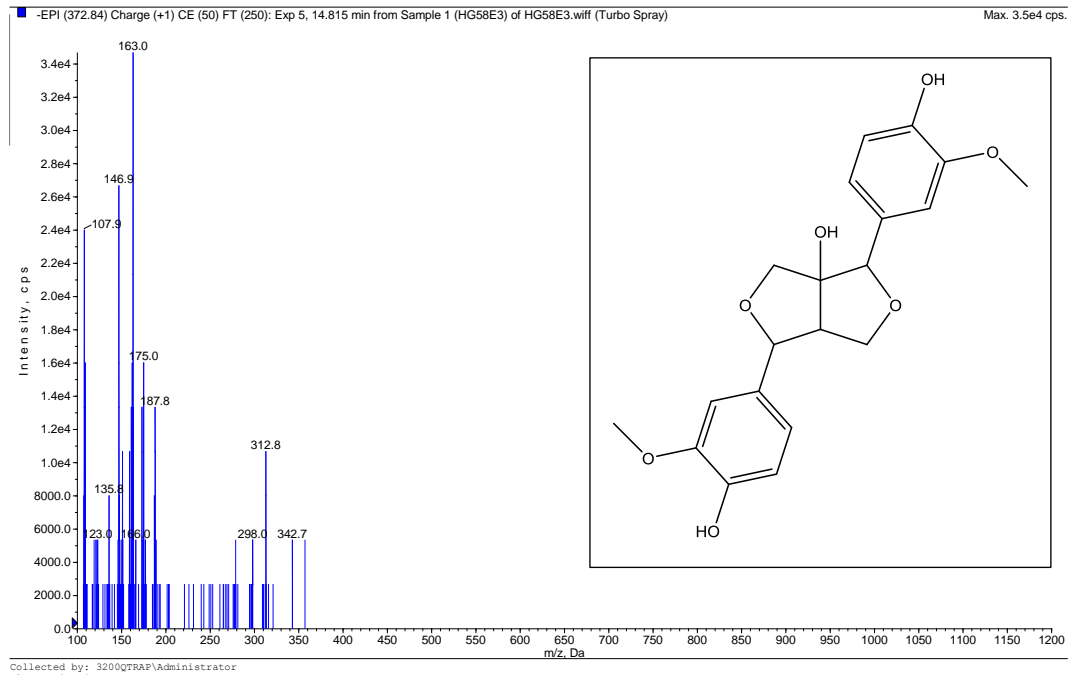
MA: 374 (C₂₀H₂₂O₇)

[M-H]⁻: 373

Temel pik: 163

Fragmentler: 343, 313, 298, 188, 175, 166, 147, 136, 108

Moleküler iyon piki m/z 373 [M-H]⁻ olan maddenin temel iyon piki m/z 163 olarak gözlenmiştir. Diğer iyonlar ise, m/z 343, 313, 298, 188, 175, 166, 147, 136, 108 şeklinde sıralanmaktadır. m/z 343 ve 313 iyonları, yapıdan 30 amu'luk -CH₂O gruplarının kopmasına işaret etmektedir. Ayrıca spektrumda gözlenen m/z 298 ve 285 iyonlarının da 1 tane -CH₃ ve muhtemelen bir tane de CO kopmasından kaynaklanmaktadır. Bu karakteristik parçalanmaların, hidroksipinorezinol'den kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Ricci ve ark., 2008; Li ve ark., 2015). Lignanlarca zengin olduğu bilinen *A. italicum* rizomlarında, hidroksipinorezinolün biyosentetik yollar sırasında sentezleyebileceği düşünülmektedir.



Şekil 38. Hidroksipinorezinol'e ait Kütle Spektrumu

Larisirezinol glikozit:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E1 (10.35), %1.85; E2 (10.34), %0.59; E3 (10.44), %0.21

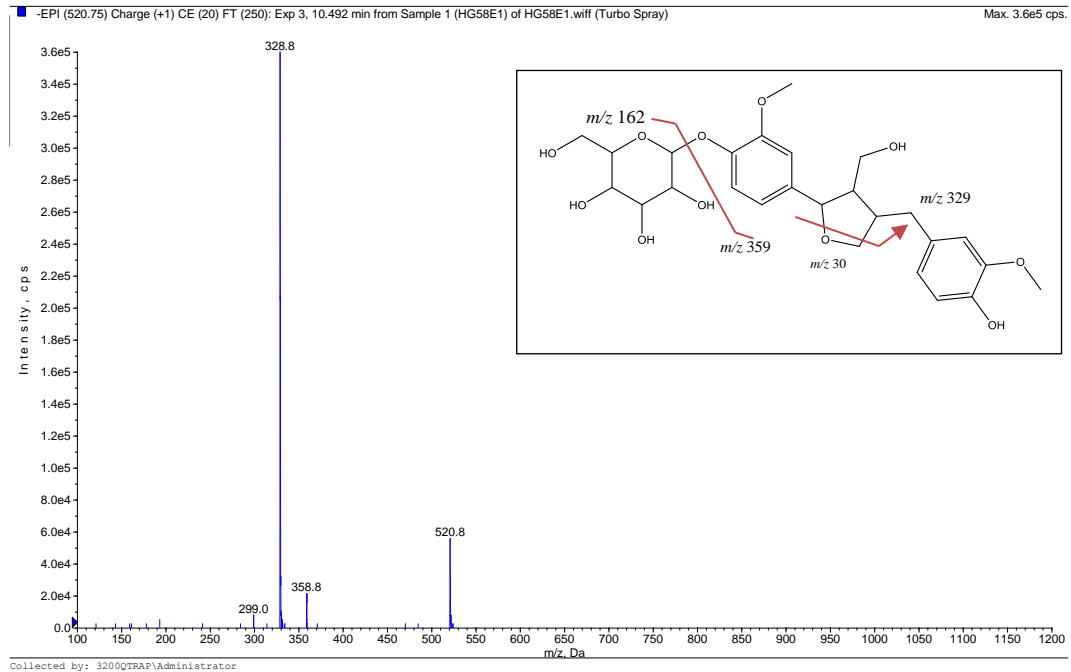
MA: 522 (C₂₆H₃₄O₁₁)

[M-H]⁻: 521

Temel pik: 329

Fragmentler: 359, 299

Maddeye ait spektrumda moleküler iyon piki m/z 521 [M-H]⁻ olan maddeye ait temel pikin m/z 329 ve diğer iyonun m/z 359 olduğu görülmektedir. Spektrum incelendiğinde, ilk bakışta bu maddenin izoiridin'e ait olabileceği düşünülmüştür. Wang ve ark. (2011) çalışmalarında, izoiridin'e ait parçalanmaları m/z 521 [M-H]⁻, m/z 359 [M-H-glikoz]⁻, m/z 344 [M-H-glikoz-metil]⁻ ve m/z 329 [M-H-glikoz-metil-metil]⁻ olarak vermişlerdir. Ancak m/z 344'luk iyon elde ettiğimiz spektrumda gözlenmemiştir. Eyles ve ark. (2007) ise moleküler iyon piki m/z 521 [M-H]⁻ maddeye ait parçalanmalarda bağlı yoğunluğu fazla olan m/z 329 [M-H-162-CH₂O] ve diğer gözlenen iyon ise m/z 359 [M-H-162]⁻ olarak verilmiştir ve bu madde larisirezinol glikozit olarak tanımlanmıştır. Huis ve ark. (2012) çalışmalarındaki bulgular, bileşiğin larisirezinol glikozit olabileceğini desteklemektedir. *Arum italicum* yumrularında yapılan izolasyon çalışmalarında lignan türevi maddelerden larisirezinol-4-O- β -glikopiranozit tanımlanmıştır (Della Greca ve ark., 1993a). Bu nedenle maddenin, larisirezinol-O-glikozit olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 39. Larisirezinol Glikozit'e ait Kütle Spektrumu

Bir furofuranolignan türevi:

Bulunduğu fraksiyon(lar) ve (Rt): E2 (15.01), %0.61; E3 (15.05), %0.33

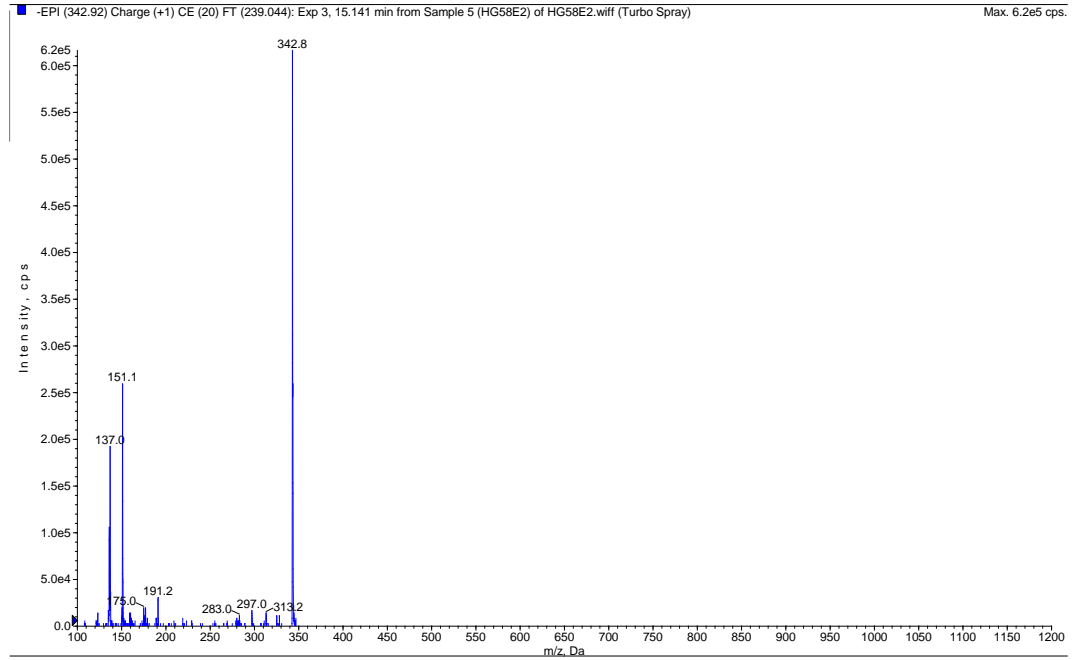
MA: 344

$[M-H]^-$: 343

Temel pik: 343

Fragmentler: 325, 313, 297, 191, 177, 151, 136

Maddenin bağlı yoğunluğu en fazla bulunan moleküler iyonu m/z 343 $[M-H]^-$ ve diğer iyonlar m/z 325, 313, 297, 191, 177, 151 ve 136 olarak belirlenmiştir. Spektrumda gözlenen m/z 325 ve 313'lük iyonların su ve metoksi/dimetil çıkışından kaynaklandığı düşünülmektedir. Burada dikkati çeken iki iyon m/z 151 ve 136 iyonlarıdır. Furofurano grubu lignanlarda, gayakol kalıntısından dolayı m/z 151 ve 136 iyonları yoğunluğu yüksek iyonlar olarak spektrumda gözlenmektedir. Ayrıca pinorezinolde gözlemlenen benzer parçalanmalar belirlenmiştir (Eklund ve ark., 2008). Bu maddenin pinorezinolün demetiltürevi olabileceği düşünülmekle birlikte literatürde tam bir benzerliğe rastlanmamıştır. Bu maddenin, furofuranolignan türevi olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 40. Bir Furofuranolignan Türevi'ne ait Kütle Spektrumu

Monolignol/Dilignol türevlerine ait bulgular;

Koniferil alkol:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E3 (17.72), %4.17

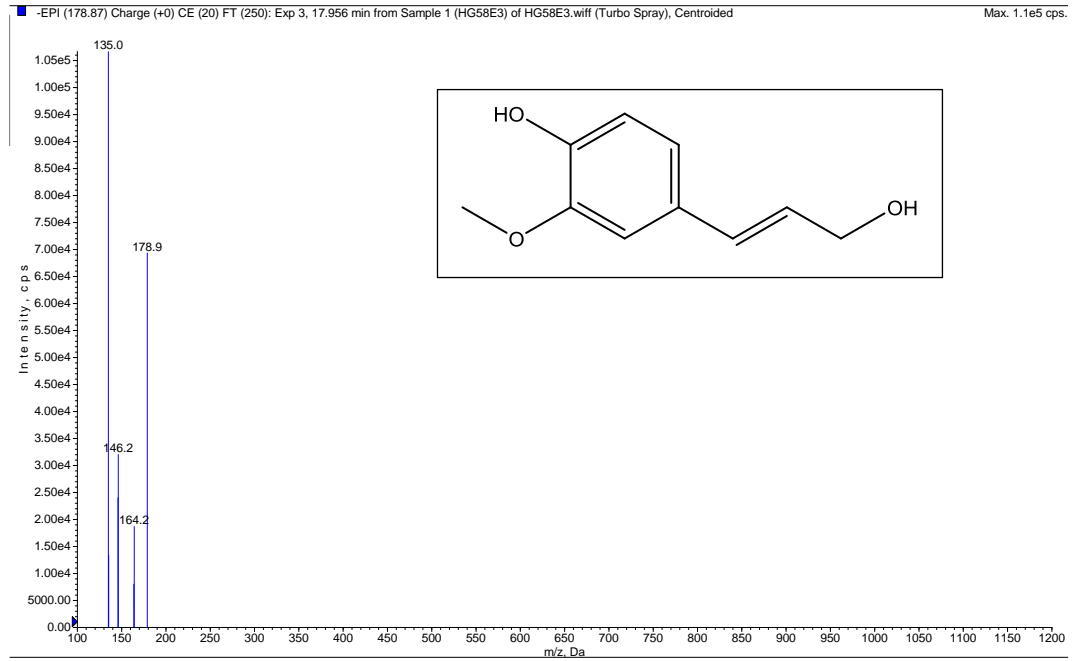
MA: 180 (C₁₀H₁₂O₃)

[M-H]⁻: 179

Temel pik: 179

Fragmentler: 164, 146, 135

Moleküler iyon piki m/z 179 [M-H]⁻ olan maddeye ait parçalanmalar m/z 164 [M-H-15]⁻, 146 [M-H-15-18]⁻ ve 135 olarak gözlenmiştir. Spektrumdaki bilgiler literatür ile karşılaştırıldığında bu maddenin koniferil alkol olabileceği düşünülmüştür. Li ve ark. (2001)'nin koniferil alkol için verilen spektrum ile elde ettiğimiz spektrum birbiri ile uyumludur. Ayrıca *A. italicum* yumrularında yapılan önceki çalışmalarda koniferil alkol glikoziti tanımlanmıştır (DellaGreca ve ark., 1993a).



Şekil 41. Koniferil Alkol'e ait Kütle Spektrumu

Koniferil alkol (8-5) ferulik asit:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E2 (16.52), %4.37

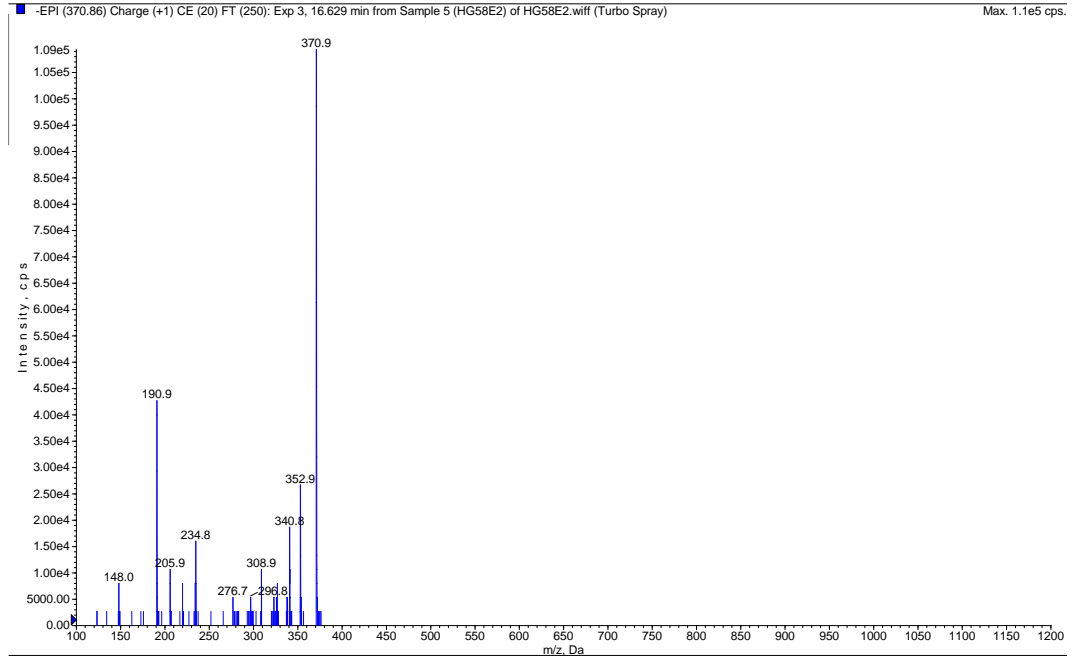
MA: 372 (C₂₀H₂₀O₇)

[M-H]⁻: 371

Temel pik: 371

Fragmentler: 353, 341, 309, 297, 191

Moleküler iyon piki m/z 371 [M-H]⁻ olan maddeye ait parçalanmalar m/z 353 [M-H-18]⁻, 341 [M-H-30]⁻, 309, 297, 277, 235, 206, 191 ve 148 olarak gözlenmiştir. Spektrum bilgileri, literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında fenilkumaran tip dilignol yapısındaki koniferil alkol ile ferulik asitin 8-5 çapraz bağlı konjugasyonu dikkati çekmektedir. Konjugasyona özgü, spektrumda gözlenen m/z 353 ve 341 iyonları, su ve formaldehit çıkışı ile oluşmaktadır (Huiss ve ark., 2012; Strehmel ve ark., 2014).



Şekil 42. Koniferil Alkol (8-5) Ferulik Asit Konjugasyonu'na ait Kütle Spektrumu

Oksilipinlere ait bulgular;

Oksilipinler, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksijenli metabolitleridir ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunurlar. Çoğunlukla linoleik asit ve linoleik asit üzerinden sentezlenirler (Prost ve ark., 2005). Bu grupta yer alan bileşiklerin 280 nm'de absorbansları düşük belirlenmiş ve çalışılan sistemde iyi iyonlaştıkları görülmüştür. Bu gruptaki bileşiklerin spektrumlarında su ve karbondioksit çıkışı karakterizedir.

9-Hidroperoksi-oktadekenoik asit:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E6 (38.06), %21.99

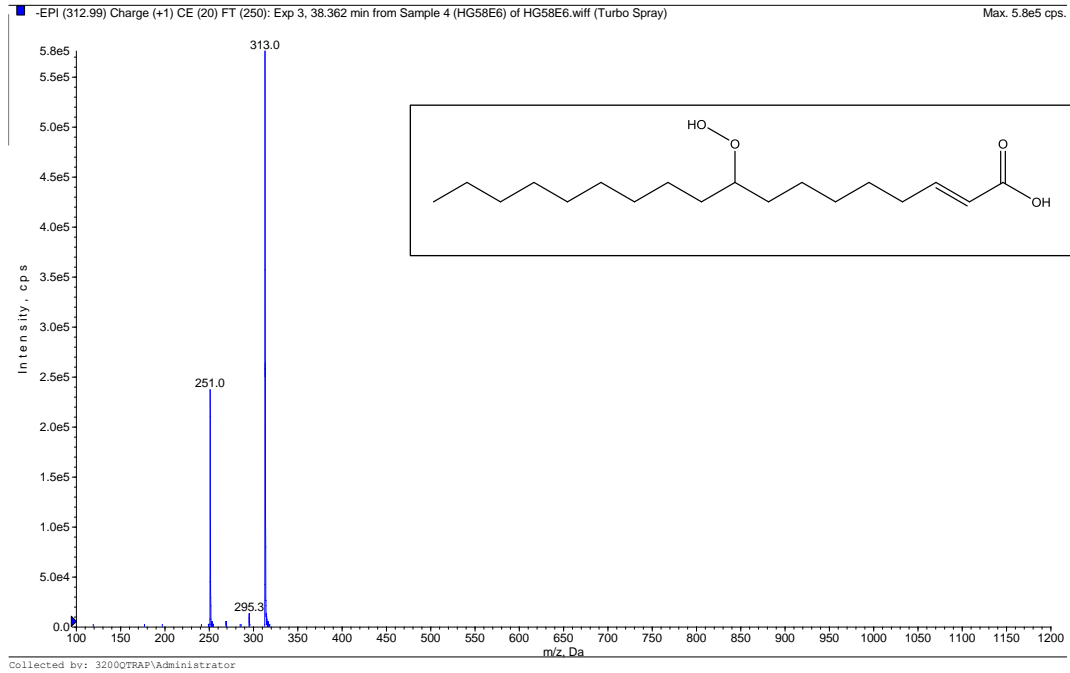
MA: 314 (C₁₈H₃₄O₄)

[M-H]⁻: 313

Temel pik: 313

Fragmentler: 295, 251

Moleküler iyon piki m/z 313 [M-H]⁻ olan maddeye ait parçalanmalar m/z 295 [M-H-18]⁻ ve 251 [M-H-18-44]⁻ şeklinde gözlenmiştir. Spektrumda gözlenen su ve ardından karboksil çıkışı, hidroperoksi oktadekenoik asit türevlerine yönlendirmektedir. m/z 251 iyonunun gözlenmesi 9-hidroperoksi-oktadekenoik asit'e işaret etmektedir (Oliw ve ark., 2011).



Şekil 43. 9-Hidroperoksi-Oktadekenoik Asit'e ait Kütle Spektrumu

9-okzo-Oktadekadienoik asit:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E6 (38.88), %23.48

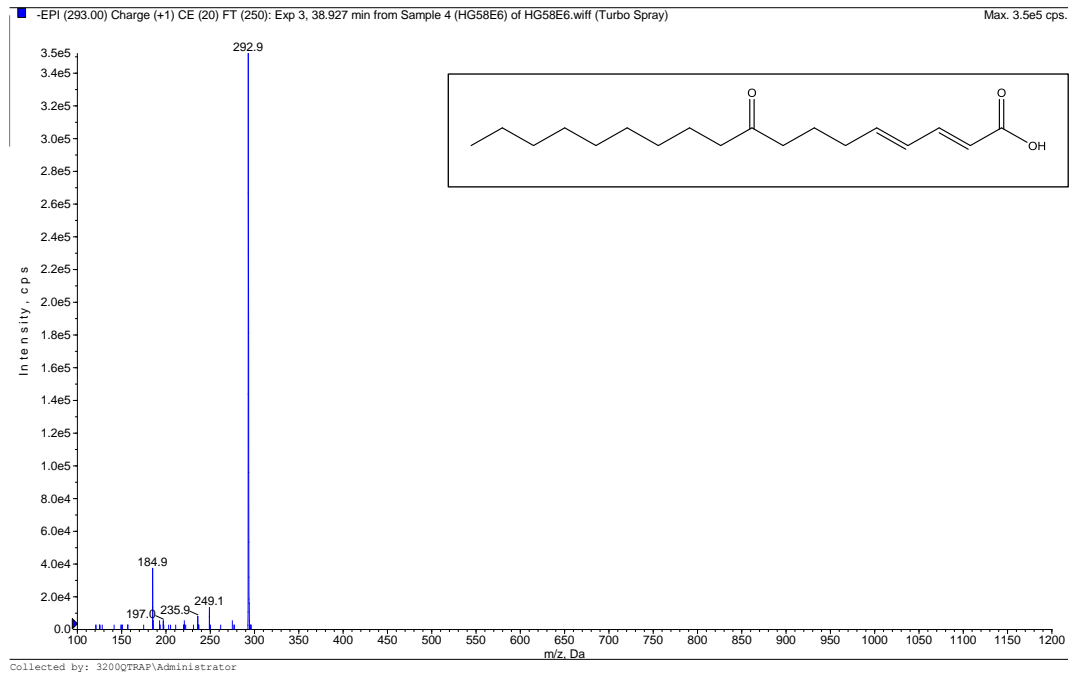
MA: 294 (C₁₈H₃₀O₃)

[M-H]⁻: 293

Temel pik: 293

Fragmentler: 249, 236, 197, 185

Maddeye ait spektrum incelendiğinde moleküler iyon piki m/z 293 [M-H]⁻ ve diğer parçalanmalar m/z 249 [M-CO₂-H]⁻, 236, 197 ve 185 olarak gözlenmiştir. Spektrum verileri, 9-okzo-oktadekadienoik asit'e ait parçalanmalara benzemektedir (Levision ve ark., 2013). Bu nedenle maddenin, 9-okzo-oktadekadienoik asit olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 44. 9-okzo-Oktadekadienoik Asit'e ait Kütle Spektrumu

15,16-dihidroksi-9,12-oktadekadienoik asit:

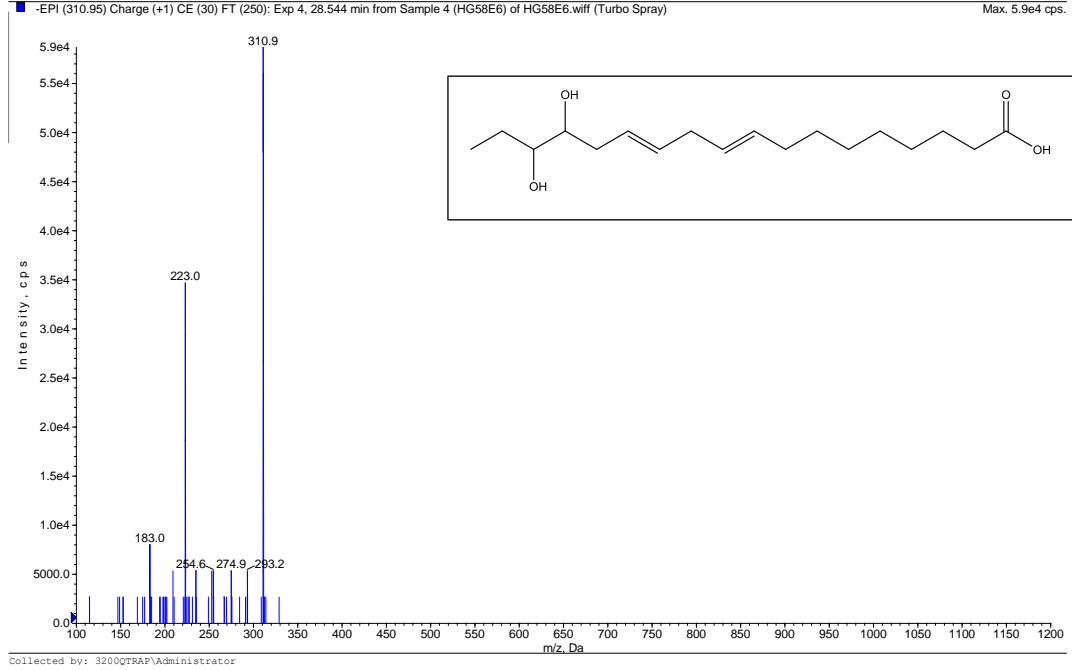
Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağlı yüzde: E5 (28.42), %4.64; E6 (28.42), %6.6

MA: 312 (C₁₈H₃₂O₄)

[M-H]⁻: 311

Temel pik: 311

Fragmentler: 293, 275, 255, 223, 183 Maddeye ait spektrumda m/z 311 [M-H]⁻ moleküler iyon pikine ait bağlı yoğunluğu en yüksek pik m/z 223 olarak görünmektedir. Diğer parçalanmalar m/z 293, 275, 255, 183 olarak şeklinde gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda, molekül ağırlığı 312 olan ve negatif iyonlaşmada m/z 223 ve 183 parçalanmalara sahip madde Yang ve ark. (2013) çalışmalarına göre 15,16-dihidroksi-9Z,12Z-oktadekadienoik asit olarak tanımlanmıştır. Elde edilen spektrumdaki benzerliğin yüksek olması nedeniyle, kolonu 28.42'nci dakikada terk eden madde 15,16-dihidroksi-9,12-oktadekadienoik asit olarak yorumlanmıştır.



Şekil 45. 15,16-Dihidroksi-9,12-Oktadekadienoik Asit'e ait Kütle Spektrumu

Hidroperoksi-oktadekenoik asit izomeri:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E5 (31.56), % 1.63

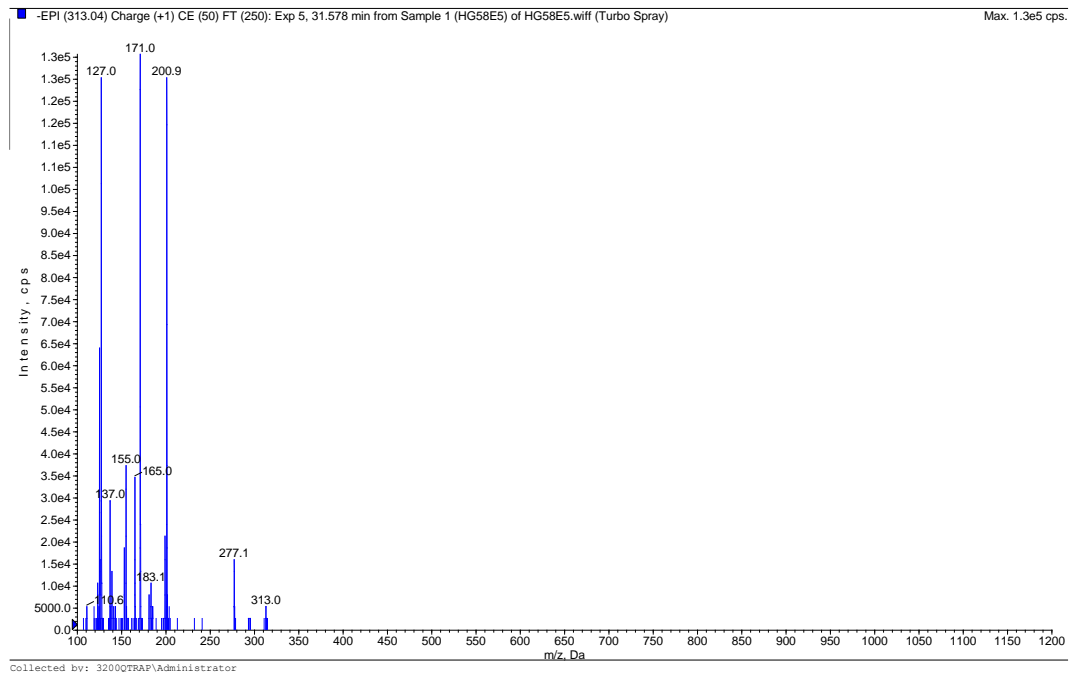
MA: 314 (C₁₈H₃₄O₄)

[M-H]⁻: 313

Temel pik: 171

Fragmentler: 201, 127

m/z 313 [M-H]⁻ moleküler iyon piki gözlenen maddeye ait temel pik *m/z* 171 olarak belirlenmiştir. Bağlı yoğunlukları temel pike oldukça yakın olan *m/z* 201 ve 127 iyonları da dikkat çekmektedir. Bu maddenin hidroperoksi-oktadekenoik asit izomeri olabileceği düşünülmektedir (Oliw ve ark., 2011).



Şekil 46. Hidroperoksi-Oktadekenoik Asit izomeri'ne ait Kütle Spektrumu

Okzo-dihidroksi oktadekenoik asit izomeri:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağlı yüzde: E2 (17.68), %6.95; E4 (17.71), %3.75

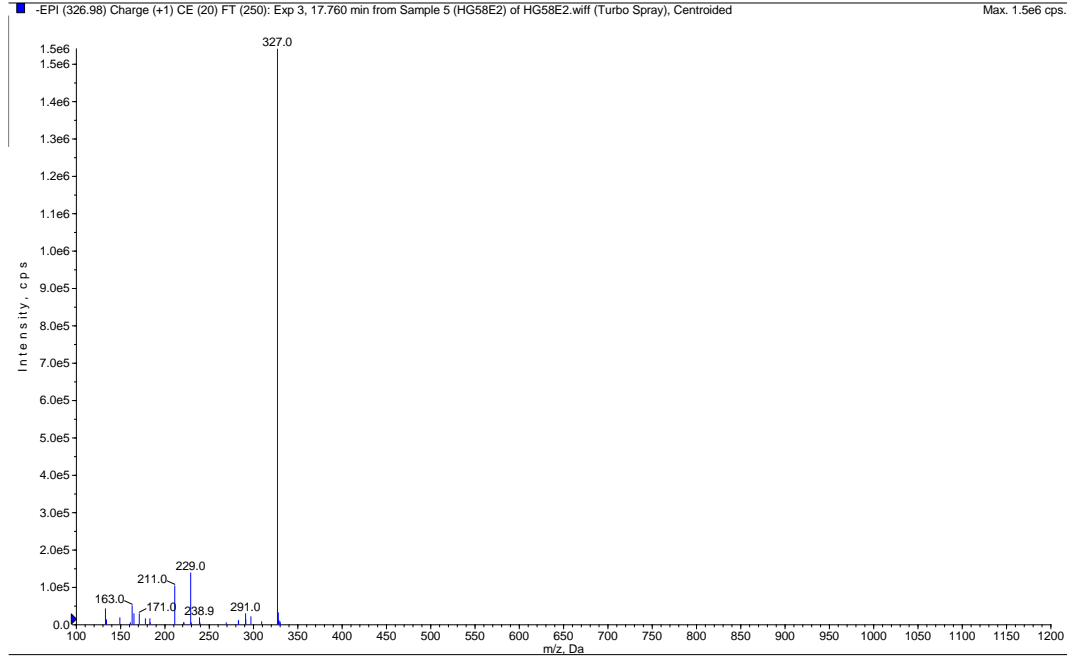
MA: 328 (C₁₈H₃₂O₅)

[M-H]⁻: 327

Temel pik: 327

Fragmentler: 309, 291, 239, 229, 211, 171, 163, 149

Maddenin spektrum bilgileri incelendiğinde, m/z 327 [M-H]⁻ ve diğer fragmentler ise m/z 309 [M-H-18]⁻, 291 [M-H-18-18]⁻, 239 [M-H-88]⁻, 229, 211, 171, 163, 149 amu olarak belirlenmiştir. *Arum palaestinum* yapraklarında rastlanan bir maddenin elde ettiğimiz spektrum ile oldukça benzer spektruma sahip olduğu ancak tanımlanamadığı görülmektedir (Abu-Reidah ve ark., 2015). Kaynak taramalarında Llorent ve ark. (2014) ise okzo-dihidroksi oktadekenoik asit için spektrum verileri m/z 327, 291/292, 229, 211, 171, 209, 165 olarak verilmiştir. Spektrumdaki benzerlikten dolayı bileşiğin okzo-dihidroksi oktadekenoik asit izomeri olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 47. Okzo-Dihidroksi Oktadekenoik Asit İzomeri'ne ait Kütle spektrumu

Trihidroksi-oktadekadienoik asit:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağlı yüzde: E2 (19.53), %1.25; E3 (19.56), %31.16; E4 (19.55), %22.78; E5 (19.61), %0.72

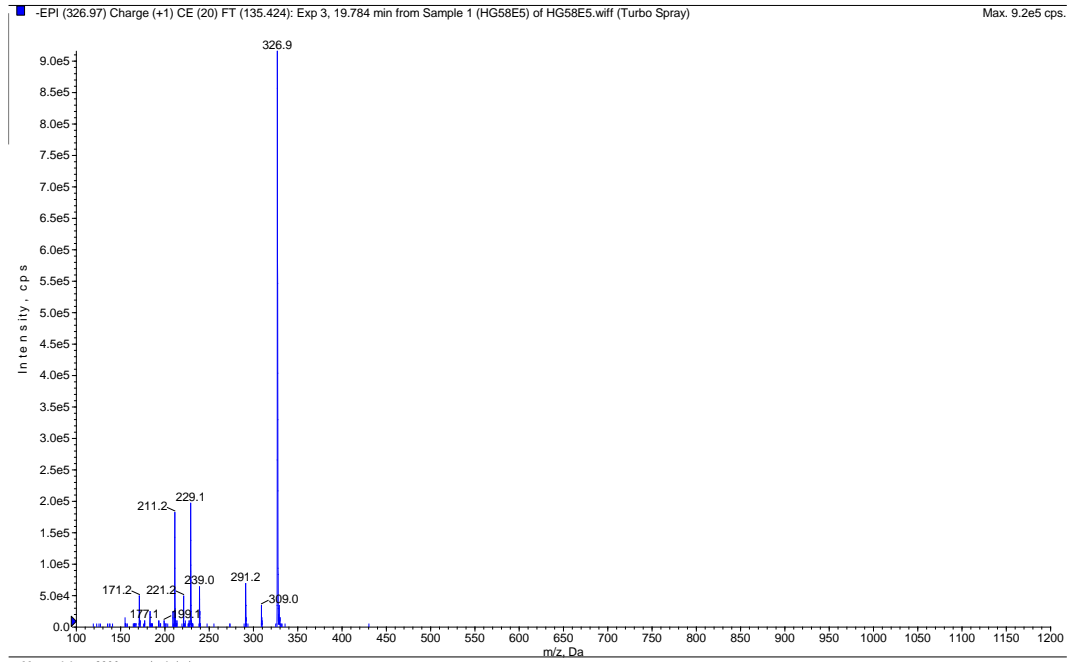
MA: 328 (C₁₈H₃₂O₅)

[M-H]⁻: 327

Temel pik: 327

Fragmentler: 309, 291, 273, 239, 229, 221, 211, 177, 171

Spektrumda gözlenen parçalanmaların, Strehmel ve ark. (2014)'e göre 9,12,13-trihidroksi-10,15-oktadekadienoik asit'e ait olduğu belirtilmiştir. Hidroksil gruplarının yakın çevrelerde bulunmaları durumunda spektrumda *m/z* 211, 201, ve 199 pikleri gözlenmektedir. Ayrıca *m/z* 229 ve *m/z* 171 iyonları yağ asidinin hidroksil gruplarının pozisyonları konusunda bilgi vermektedir (12 ve/veya 13 ve 9 ve/veya 10). Ancak bu verilerle fonksiyonel grupların ve çifte bağların yapılarını belirlemek güçtür (Jimenez-Sanhcez ve ark., 2016). Bu nedenle bileşik, trihidroksi oktadekadienoik asit olarak yorumlanmıştır. Çoklu doymamış yağ asitlerinden bazıları *Arum palaestinum* yapraklarında Abu-Reidah ve ark. (2015) tarafından tanımlanmıştır.



Şekil 48. Trihidroksi-Oktadekadienoik Asit'e ait Kütle Spektrumu

Trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E3 (20.08), %0.93

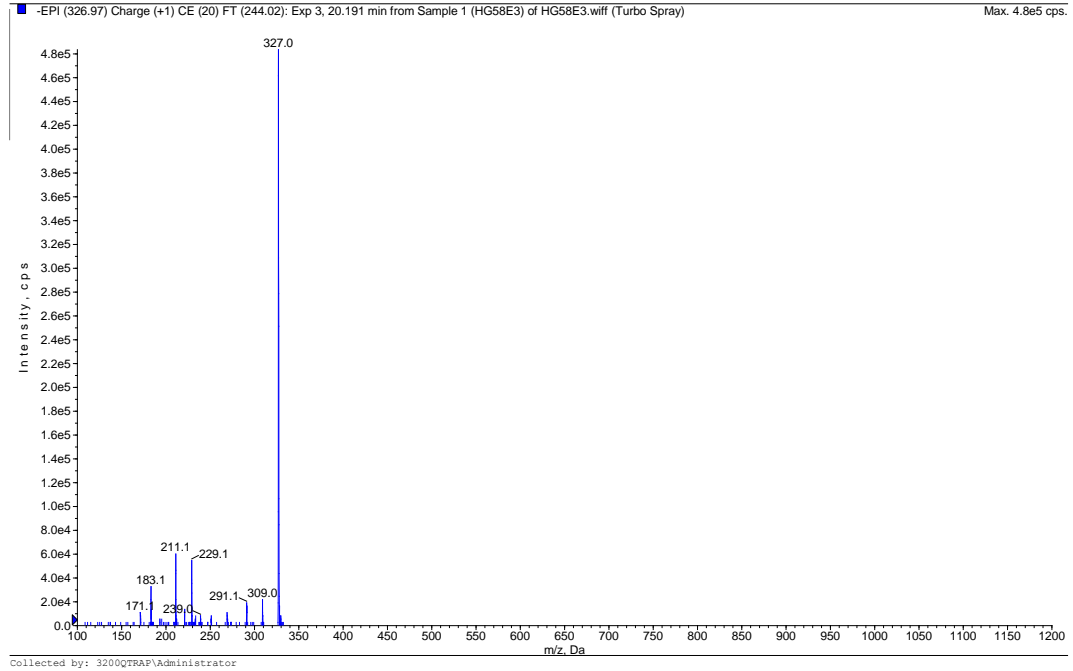
MA: 328 (C₁₈H₃₂O₅)

[M-H]⁻: 327

Temel pik: 327

Fragmentler: 309, 291, 273, 239, 229, 221, 211, 183, 171

Maddeye ait spektrum, E3 kodlu alt fraksiyonda kolonu 19.56'nci dakikada terk eden maddeye oldukça benzemekte ve aynı molekül ağırlığına sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen spektrum, trihidroksi-oktadekadienoik asit'e ait verilerle kıyaslandığında m/z 211 pikinin bağıl yoğunluğu m/z 229 pikinden; m/z 183 pikinin bağıl yoğunluğu ise m/z 171 pikinden daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu maddenin trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri olma olasılığı yüksektir (Jimenez-Sanchez ve ark., 2016).



Şekil 49. Trihidroksi-Oktadekadienoik Asit İzomeri'ne ait Kütle Spektrumu

Trihidroksi-oktadekenoik asit:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E4 (22.11), %5.22

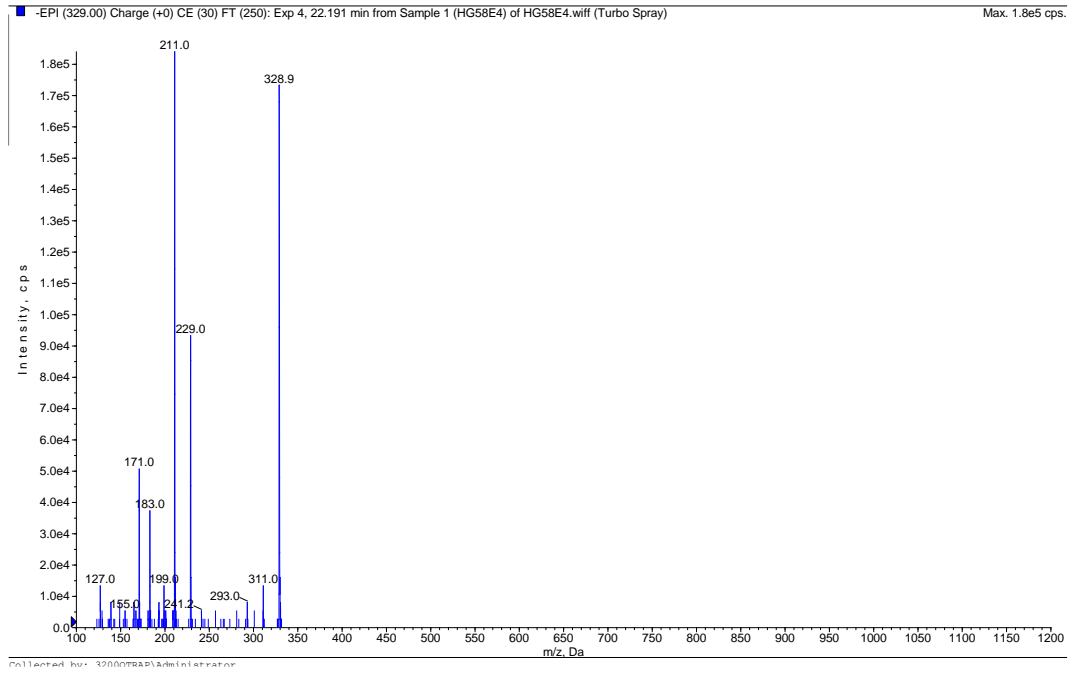
MA: 330 (C₁₈H₃₄O₅)

[M-H]⁻: 329

Temel pik: 211

Fragmentler: 311, 293, 241, 229, 199, 183, 171, 155, 127

Moleküler iyon piki m/z 329 [M-H]⁻ olan maddeye ait temel pik m/z 211 olarak gözlemlenmiştir. Spektrumda gözlemlenen diğer parçalanmalar m/z 311, 293, 241, 229, 199, 183, 171, 155, 127 olarak sıralanmaktadır. Llorent-Martinez ve ark. (2015)'nin çalışmalarında, trihidroksi oktadekenoik asit'e ait spektrum verileri ile elde ettiğimiz veriler oldukça örtüşmektedir. Aghofack-Nguemezi ve ark. (2011) trihidroksi oktadekenoik asit için spektrum verilerini şu şekilde vermiştir: m/z 329, 311, 293, 229, 211, 193, 171, 125 ve 99. Benzerliğin fazla olması nedeniyle, bu maddenin trihidroksi-oktadekenoik asit olarak tanımlanabileceği düşünülmüştür. *A. palaestinum* yapraklarında trihidroksi-10-oktadekenoik asit tanımlanmıştır (Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 50. Trihidroksi Oktadekenoik Asit'e ait Kütle Spektrumu

Trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri 1:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E4 (24.12), %3.41; E5 (24.19), %14.83

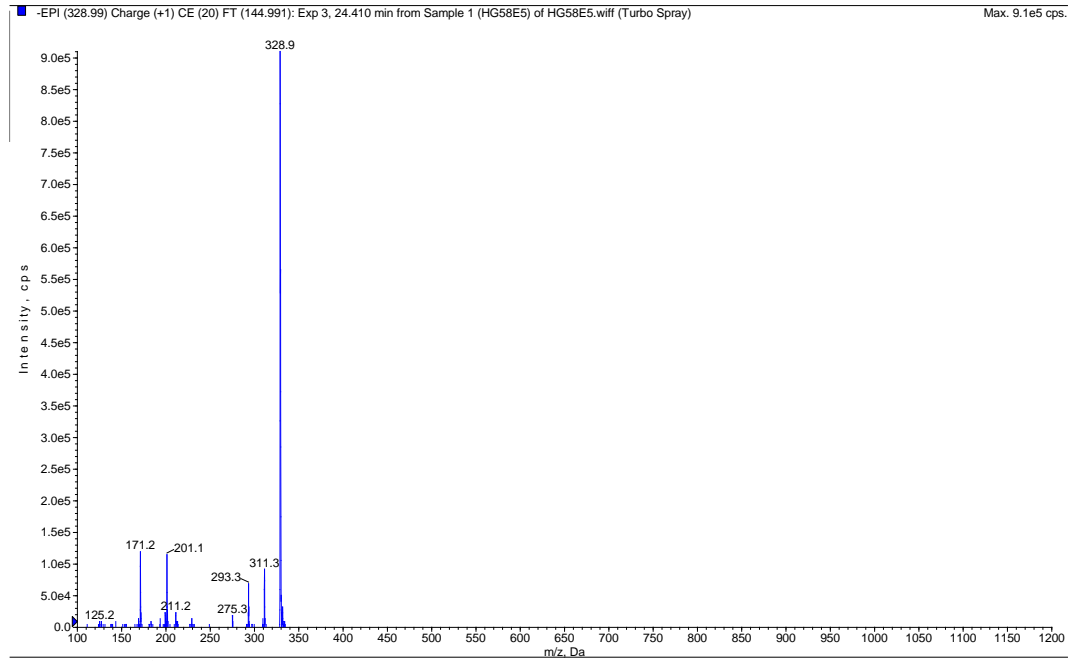
MA: 330 (C₁₈H₃₄O₅)

[M-H]⁻: 329

Temel pik: 211

Fragmentler: 311, 293, 201, 171

Molekül ağırlığı 330 olan bu madde, trihidroksi-oktadekenoik asit'e olan benzerliğinden dolayı, trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri olarak yorumlanmıştır (Jimenez-Sanchez ve ark., 2016).



Şekil 51. Trihidroksi-Oktadekenoik Asit İzomeri 1'e ait Kütle Spektrumu

Trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri 2:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E5 (25.32), % 1.87

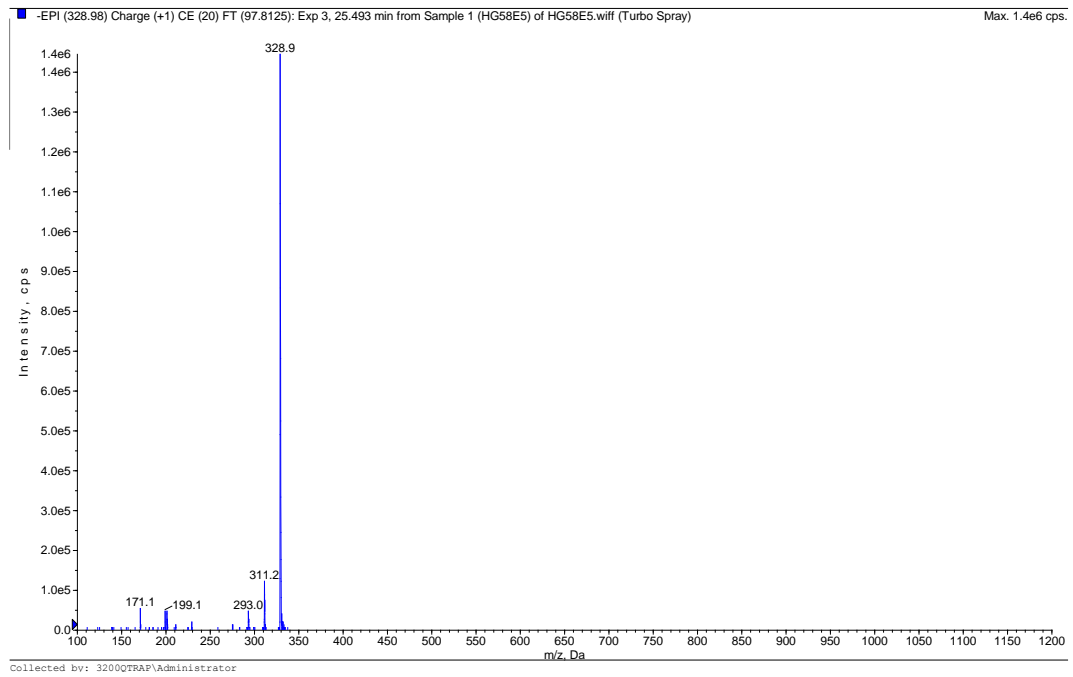
MA: 330 (C₁₈H₃₄O₅)

[M-H]⁻: 329

Temel pik: 329

Fragmentler: 311, 293, 199, 171

Maddeye ait spektrumda moleküler iyon piki m/z 329 [M-H]⁻ ve diğer iyonlar m/z 311, 293, 199 ve 171 olarak gözlenmiştir. Molekül ağırlığı 330 olan bu madde, trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri olarak yorumlanmıştır (Jimenez-Sanchez ve ark., 2016).



Collected by: 32000TRAP\Administrator

Şekil 52. Trihidroksi-Oktadekenoik Asit İzomeri 2'ye ait Kütle Spektrumu

Diğer gruplarda yer alan maddelere ait bulgular;

10-metoksidihidrofussin:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E2 (18.07), %2.34; E3 (18.11), %1.39; E4 (18.07), %1.94

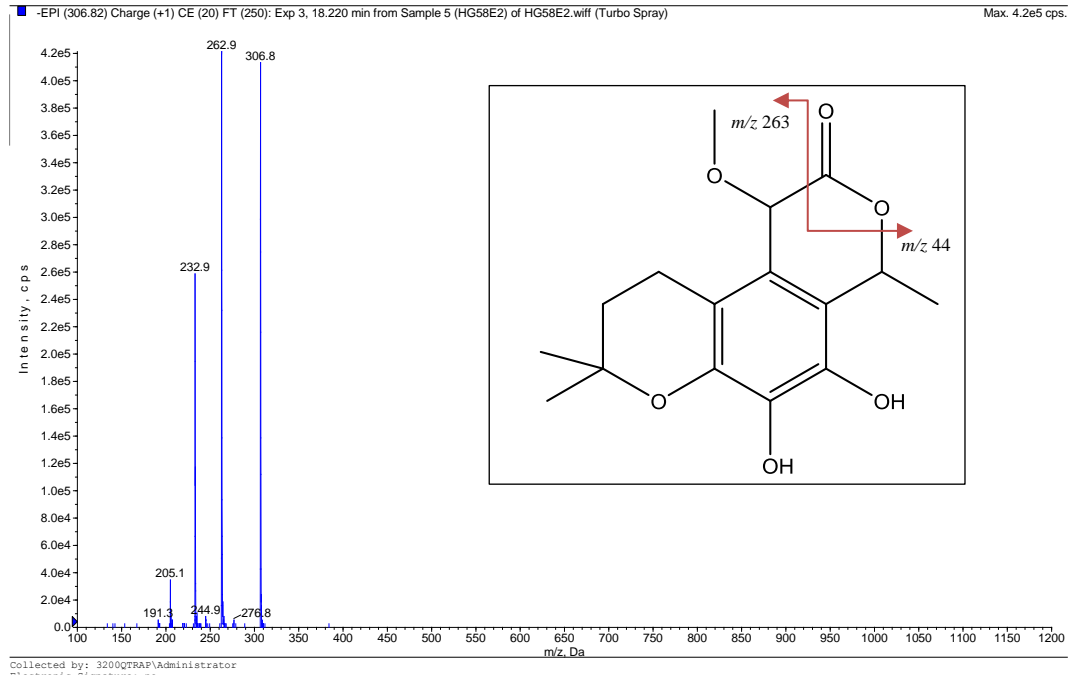
MA: 308 (C₁₆H₂₀O₆)

[M-H]⁻: 307

Temel pik: 263

Fragmentler: 233

Maddenin spektrumunda gözlenen moleküler iyon piki m/z 307 [M-H]⁻, karboksil grubunun kopmasıyla oluşan temel pik m/z 263 [M-H-44]⁻ ve dimetil kopmasıyla da m/z 233 [M-H-44-30]⁻ iyonlarının oluştuğu düşünülmektedir. Bu madde, fussin türevi olup bir toprak fungusu olan *Oidiodendron griseum*'dan izole edilmiştir (Yoganathan ve ark., 2003). *Arum italicum* yumruları, topraktan kazılarak elde edilmiş ve yumrulardaki topraklı kısımlar fırça yardımıyla temizlenmiştir. Temizlenen yumrular, kabukları ile birlikte dilimlenerek kurutulduğu için bu maddenin fungustan ileri gelebileceği düşünülmektedir.



Şekil 53. 10-Metoksidihidrofussin'e ait Kütle Spektrumu

Dihidroksiapat:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E3 (22.11), %5.28

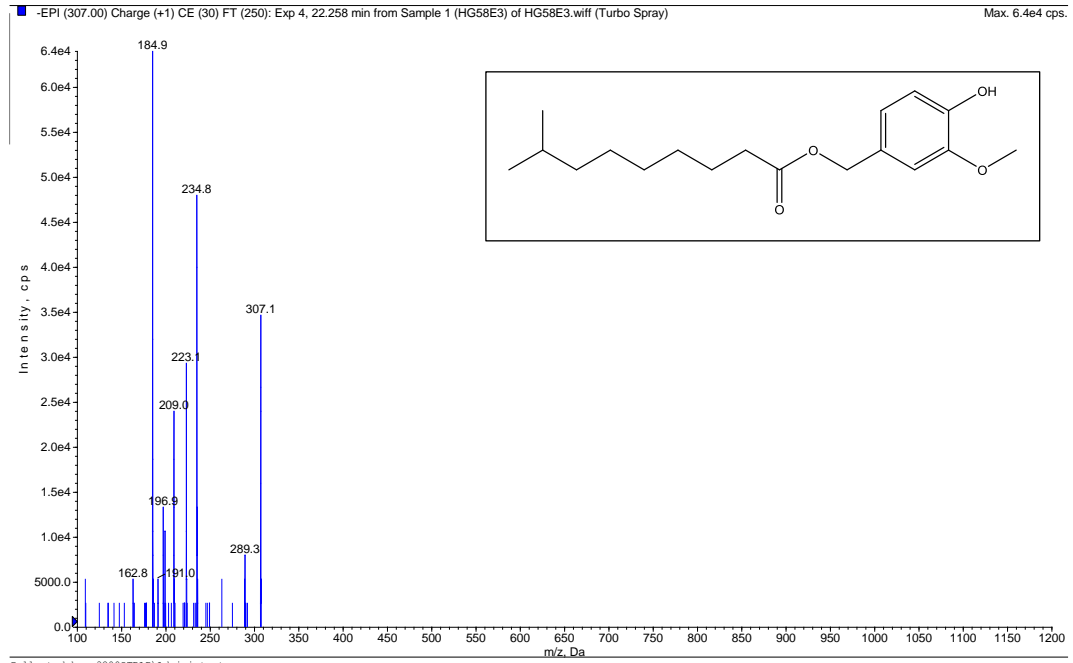
MA: 308 (C₁₈H₂₈O₄)

[M-H]⁻: 307

Temel pik: 185

Fragmentler: 235, 223, 209, 197, 289, 191, 163

Moleküler iyon piki m/z 307 [M-H]⁻ ve temel iyon piki m/z 185 olan maddeye ait spektrumda gözlemlenen diğer iyonlar bağlı yoğunluklarına göre çoktan aza doğru sıralandığında m/z 235, 223, 209, 197, 289, 191 ve 163'dür. Yapılan kaynak araştırmaları sonucunda, *A. palaestinum* yaprak ekstraktlarında tanımlanan, antikanser ekisi belirlenen kapsaisinoid-benzeri bir madde olan dihidroksiapat (vanilil-8-metilnonanat) ile eşleşmektedir (Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 54. Dihidroksiapat'a ait Kütle Spektrumu

Gliserofosfoinozitol:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağıl yüzde: E5 (5.50), %2.71

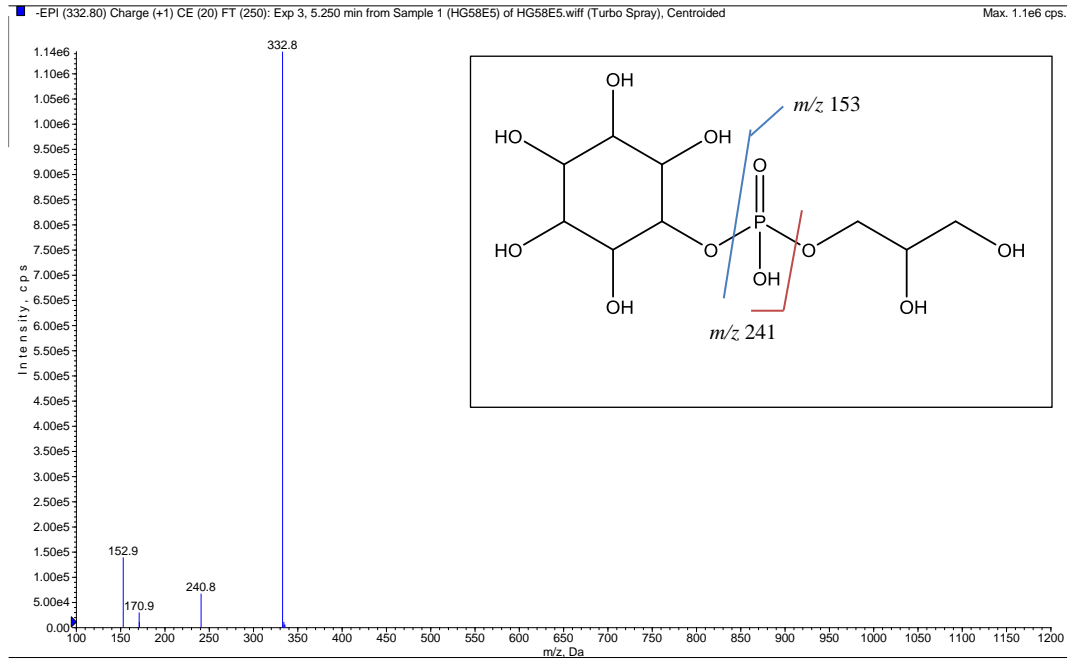
MA: 334 (C₉H₁₉O₁₁P)

[M-H]⁻: 333

Temel pik: 133

Fragmentler: 241, 171, 153

m/z 333 [M-H]⁻ moleküler iyon pikine ait parçalanmalar m/z 241, 171, 153 olarak gözlenmiştir. Moleküler iyon pikinden sonra bağıl yoğunluğu en fazla olan m/z 153 iyonunun yapıdan 180 amu'luk nötral kayıp ile oluştuğu ve inozitol grubunun kopmasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca spektrumda gözlenen m/z 241 iyonu, fosfoinozitol grubuna özgü karakteristik bir parçalanmadır. Bu nedenle molekül ağırlığı 334 olan bu madde, gliserofosfoinozitol olarak yorumlanmıştır (Becker ve ark., 2013; Grauso ve ark., 2015).



Şekil 55. Gliserofosfoinozitol'e ait Kütle Spektrumu

L-Malik asit:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E2 (4.14), %1.67; E3 (4.14), %0.44

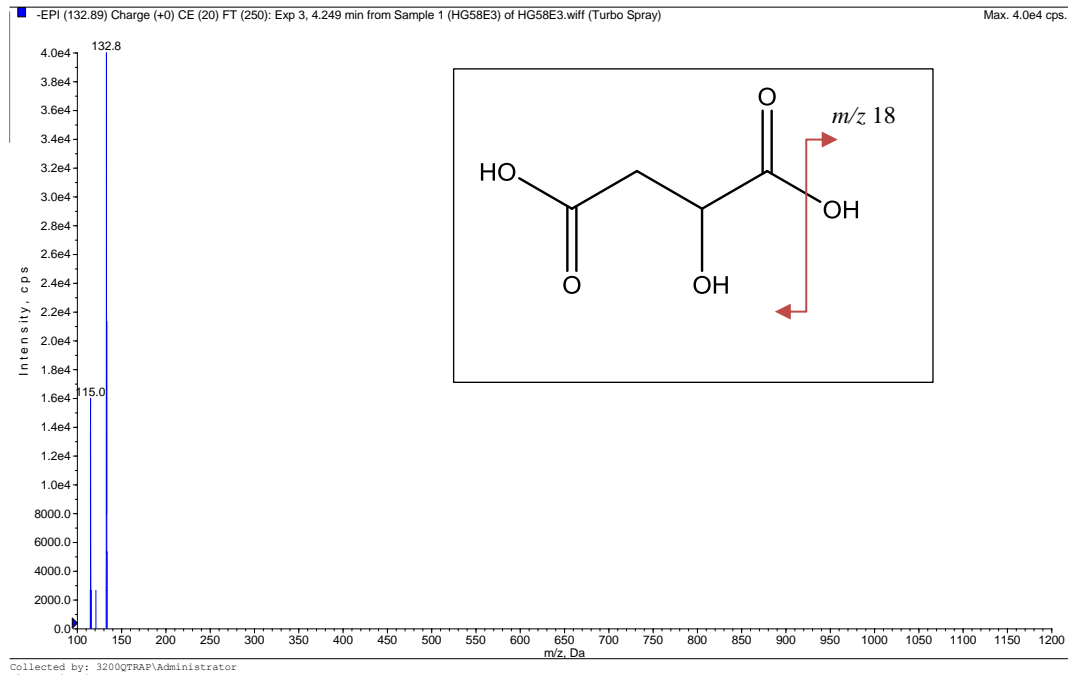
MA: 134 (C₄H₆O₅)

[M-H]⁻: 133

Temel pik: 133

Fragmentler: 115

Maddenin spektrumu incelendiğinde *L*-malik asit'e özgü m/z 133 [M-H]⁻ ve bir su çıkışı ile oluşan fragmenti m/z 115 [M-H-18]⁻ spektrumda gözlenmiştir. Malik asit, *A. palaestinum* yaprak ekstralarında tanımlanan dikarboksilik asit türevi bir maddedir. (Yang ve ark., 2009; Abu-Reidah ve ark., 2015).



Şekil 56. *L*-Malik asit e ait Kütle Spektrumu

Metil-4-kromanon türevi:

Bulunduğu fraksiyonlar (Rt), bağıl yüzde: E2 (15.67), %5.64; E3 (15.69), %3.95; E4 (15.67), %2.76

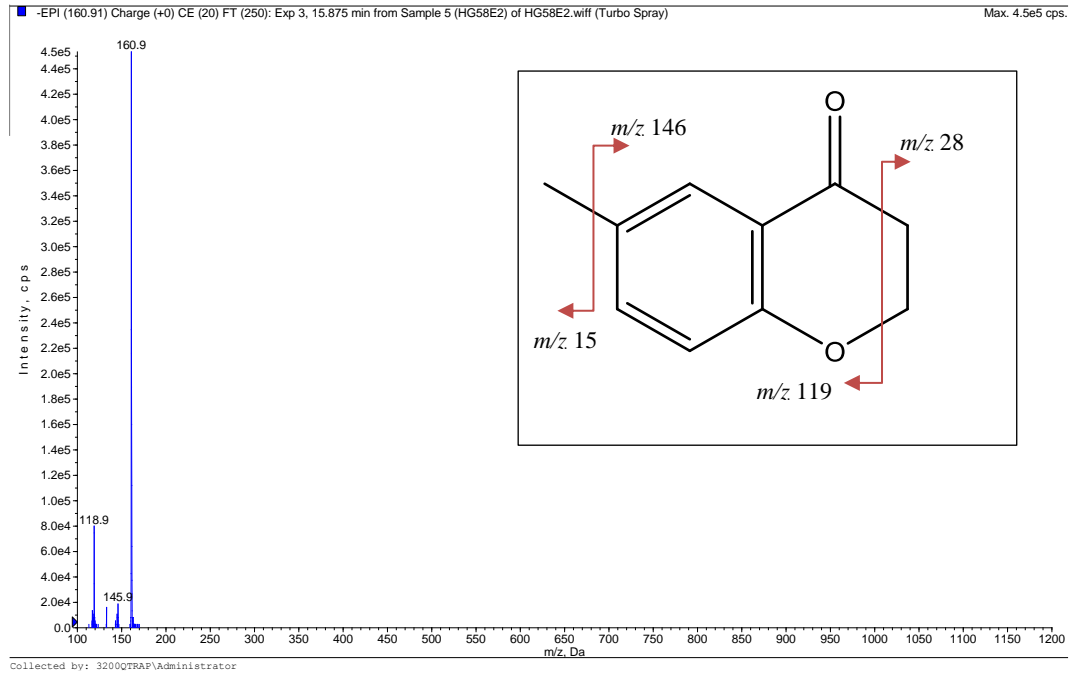
MA: 162 (C₁₀H₁₀O₂)

[M-H]⁻: 161

Temel pik: 161

Fragmentler: 146, 119

Spektrumda m/z 161 [M-H]⁻ moleküler iyon piki gözlenen maddeye ait diğer parçalanmalar m/z 146, 119 olarak görülmektedir. Spektrumdaki veriler incelendiğinde bir metil çıkışı ile m/z 146 ve 42 amu'luk nötral kayıp ile m/z 119 iyonlarının oluştuğu görülmektedir. Literatür bilgileri göz önüne alındığında, elde edilen spektrum herhangi bir madde ile eşleşmemektedir. İlk bakışta maddenin *p*-kumarik aside benzer bir yapıda olabileceği düşünülmüştü. Ancak maddeye ait spektrumdaki parçalanmalar kromanon tipi bileşiklere işaret etmektedir. Literatürde, *Aegle marmelos* Correa köklerinin metanol ekstresinden izole edilen ve güçlü sitotoksik etki gösteren 6-metil-4-kromanon bileşiğine ait verilere rastlanmış (Ravi ve ark., 2009) ve elde ettiğimiz verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz spektrum ile metilin konumunun 6-, 7-, ya da 8. karbon atomuna bağlı olabileceği düşünülmekle beraber tam bir yorum getirilememektedir. Bu nedenle madde, bir metil-4-kromanon türevi olarak yorumlanmıştır.



Şekil 57. Metil-4-Kromanon Türevi'ne ait Kütle Spektrumu

Paksanton:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E2 (18.83), % 1.01

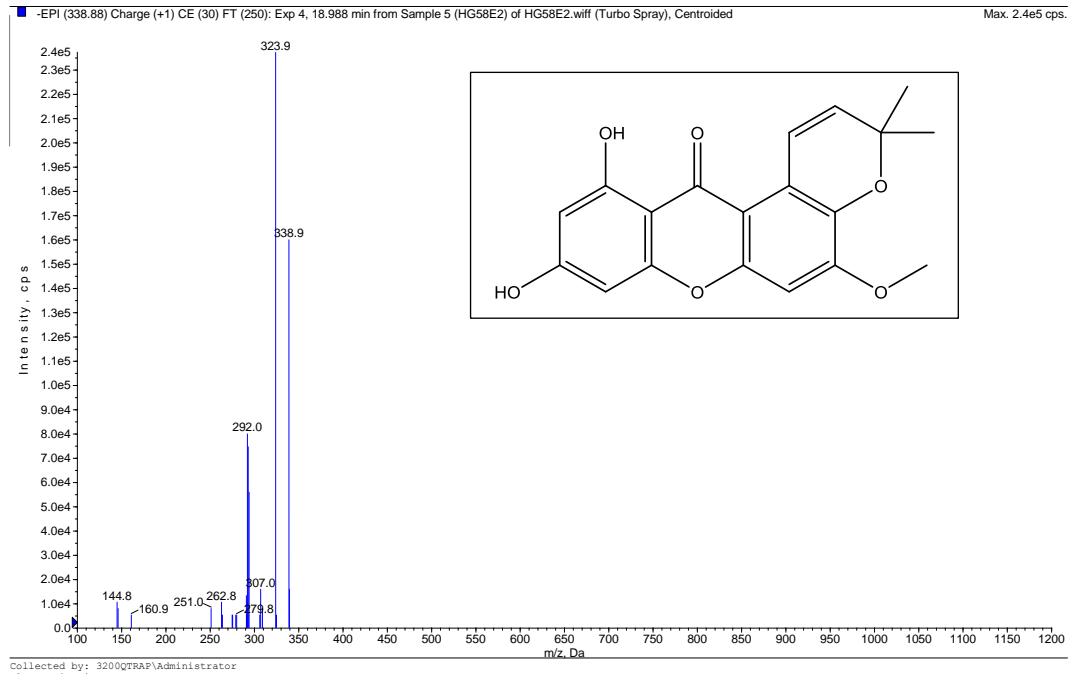
MA: 340 (C₁₉H₁₆O₆)

[M-H]⁻: 339

Temel pik: 324

Fragmentler: 307, 292, 263, 251, 161, 145

Spektrumdan elde edilen verilere göre moleküler iyon piki m/z 339 [M-H]⁻ ve temel pik m/z 324 [M-H-15]⁻, m/z 307 [M-H-32]⁻, m/z 292, 263, 251, 161 ve 145 amu'dur. Tusevski ve ark., (2013) çalışmalarında ksanton türevi bir madde olan paksanton'a ait spektrum verileri moleküler iyon piki m/z 339 ve 324 (tp), 307 amu şeklinde verilmiştir. Bu nedenle bu benzerlikten dolayı madde, paksanton olarak yorumlanmıştır.



Şekil 58. Paksanton'a ait Kütle Spektrumu

Tanımlanamayan maddelere ait bulgular;

Bilinmeyen 1:

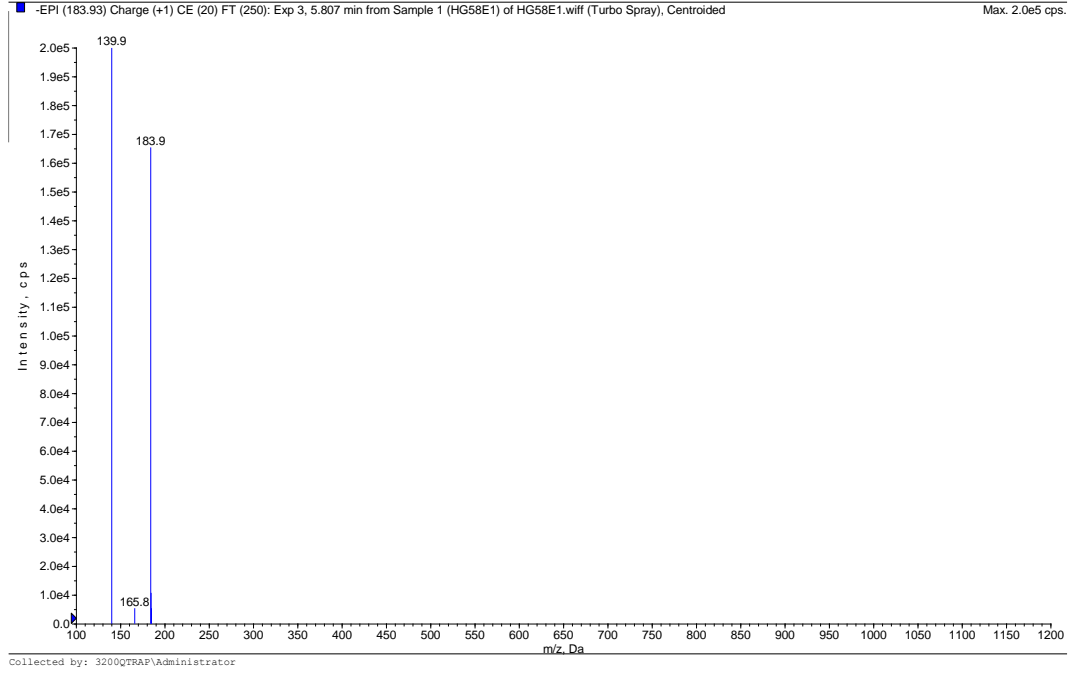
Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E1 (5.53), % 12.79

MA: 185

$[M-H]^-$: 184

Temel pik: 140

Fragmentler: 166



Şekil 59. Bilinmeyen 1 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu

Bilinmeyen 2:

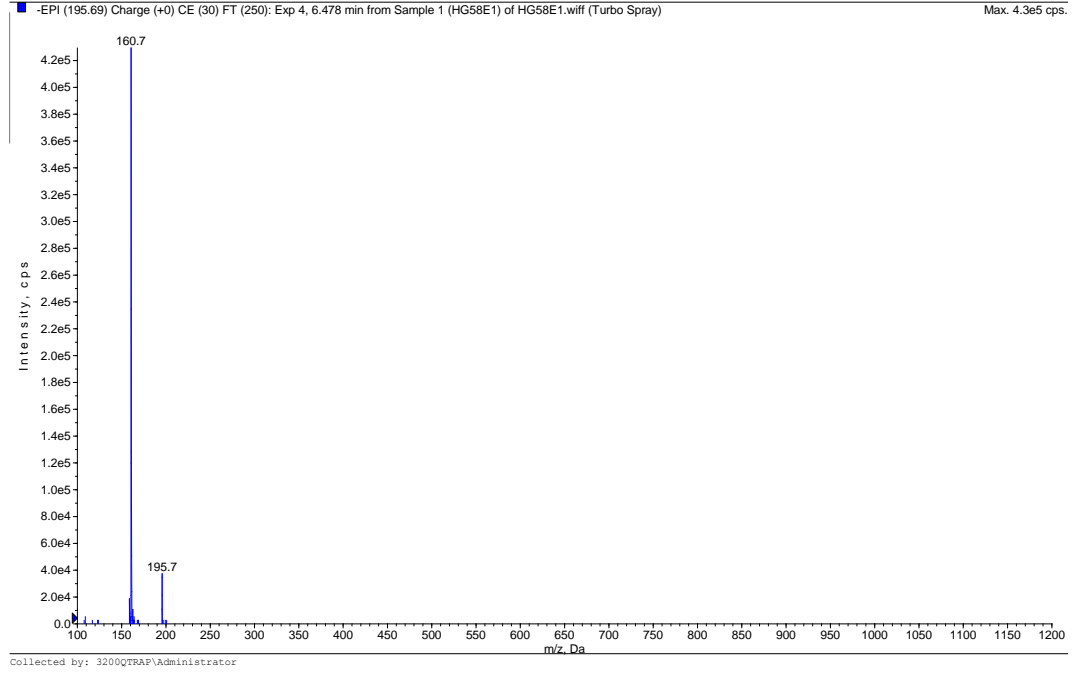
Bulunduğu fraksiyon (Rt): E1 (6.37), %3.70

MA: 197

$[M-H]^-$: 196

Temel pik: 161

Fragmentler: -



Şekil 60. Bilinmeyen 2 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu

Bilinmeyen 3:

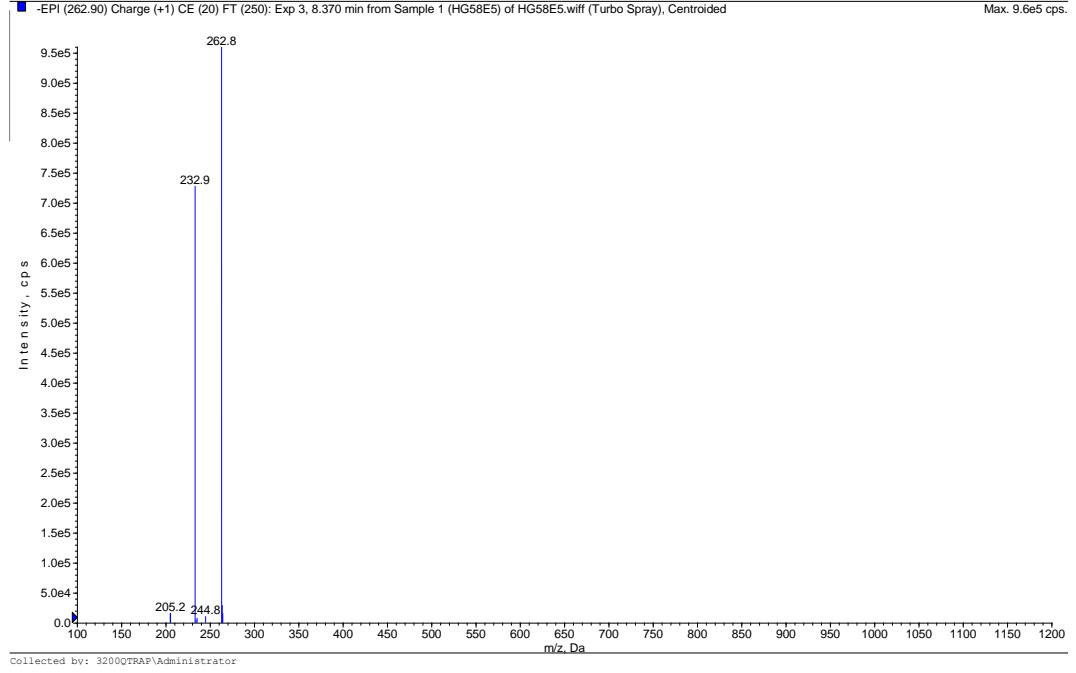
Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E5 (8.27), % 11.82

MA: 264

$[M-H]^-$: 263

Temel pik: 263

Fragmentler: 245, 233, 205



Şekil 61. Bilinmeyen 3 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu

Bilinmeyen 4:

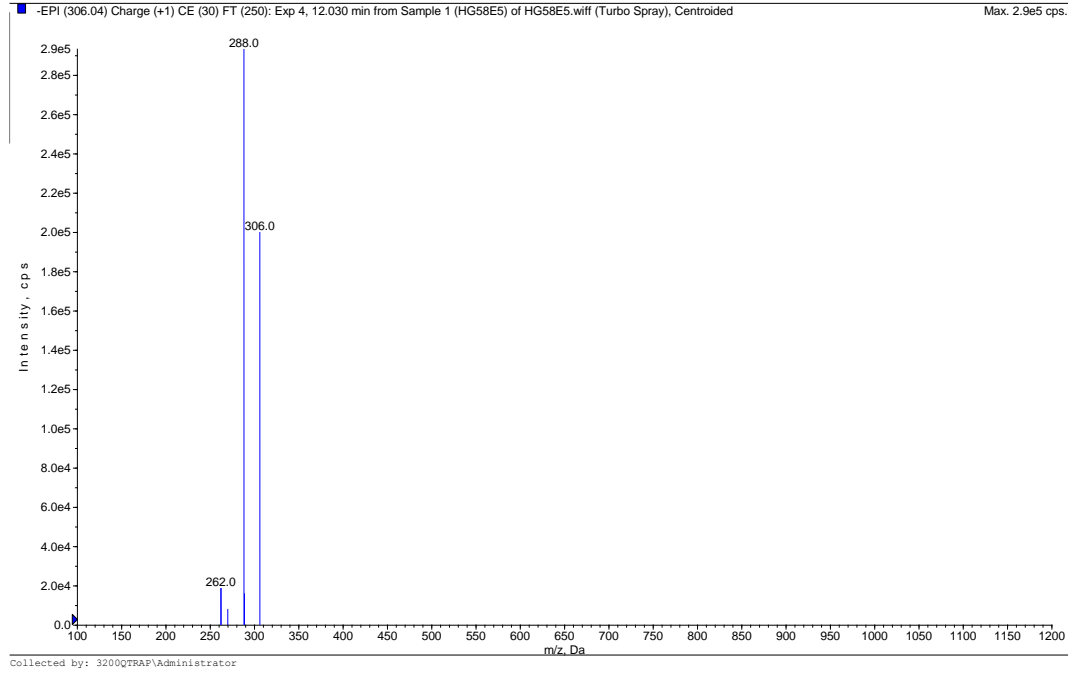
Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E5 (11.94), %6.34

MA: 307

$[M-H]^-$: 306

Temel pik: 288

Fragmentler: 262



Şekil 62. Bilinmeyen 4 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu

Bilinmeyen 5:

Bulunduğu fraksiyon (Rt), bağlı yüzde: E1 (28.27), %2.25

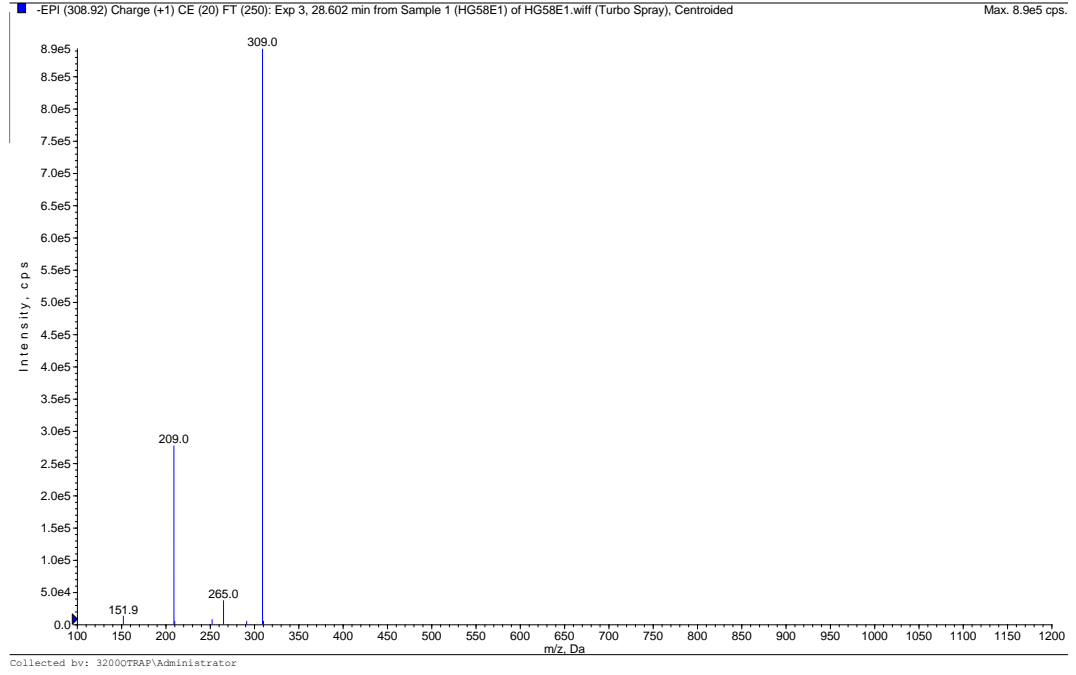
MA: 310

$[M-H]^-$: 309

Temel pik: 309

Fragmentler: 265, 209, 152

Zhao ve ark. (2013) çalışmalarında aynı molekül ağırlığına ve parçalanmalara sahip maddenin tanımlanamadığı belirtilmiştir.



Şekil 63. Bilinmeyen 5 no'lu Maddeye ait Kütle Spektrumu

YBSK kromatogramlarına ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Alt fraksiyonlarda spektrumların değerlendirilmesinden sonra her bir fraksiyonun hangi bileşikçe zengin olduğu konusunda yorum yapabilmek için, 280 nm’de elde edilen kromatogramlarda her bir pikin alan değeri belirlenmiştir. Tüm alanlar 100 birim kabul edilerek her bir pik için bağıl yüzde değer hesaplanmıştır. Yorumlanabilen her bir bileşik için hesaplanan bağıl yüzde miktarları EK1-12’de verilen “Alt Fraksiyonlarda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler” başlıklı tablolarda verilmiştir.

Alt fraksiyonlarda yorumlayabildiğimiz ve kromatogramlarda alan olarak dikkati çeken bileşikler aşağıda özetlenmiştir: E1 kodlu alt fraksiyon için adenin (%31.23) ve bir disakkarit türevi; E2 için dikumaroil spermidin (%14.8) ve ferulik asit (%15.3); E3 için trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri (%31.2) ve ferulik asit (%12.1); E4 için trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri (%22.8) ve MA’sı 330 olan bir flavonoid türevi (%14.6); E5 için trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri 1 (%14.8) ve MA 310 olan bilinmeyen bir madde (%11.8); E6 için okzo-oktadekadienoik asit (%23.5) ve hidroperoksi-oktadekadienoik asit (~%22).

YBSK/KS-KS analizine ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Alt fraksiyonlarda yapılan YBSK/KS-KS analizleri ile yapıları belirlenen bileşikler, kaynak taramalarına dayandırılarak ve elde edilen spektrumlar ile mevcut çalışmalarda rastlanan spektrum verileri ilişkilendirilerek yorumlanmıştır. Bu değerlendirme sonucunda alt fraksiyonlarda belirlenen bileşiklerin hidroksisinnamik asit türevleri, lignanlar ve glikozitleri, fenolik aminler, oksilipinler gibi sekonder metabolitler gruplarında yer aldığı görülmüştür.

Hidroksisinnamik asit türevleri, bitkiler âleminde yaygın bir şekilde bulunmakta ve antioksidan etkilerinden dolayı oksidatif stresle ilişkili başta kardiyovasküler sistem ve kanser gibi hastalıklar üzerine etkilerinden dolayı birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. *A. italicum* alt fraksiyonlarında bu yapıdaki ferulik asit, kafeik asit ve türevleri ve *p*-kumarik asit’e rastlanmıştır. Araceae familyasında ferulik asit, *A. italicum*, *Pinellia ternata* ile *Acorus calamus* rizomlarında; kafeik asit ve türevleri, *A. palaestinum* yapraklarında; *p*-kumarik asit, *A. dioscoridis* tohumlarında önceki çalışmalarla tanımlanmıştır. Hidroksisinnamik asit türevlerinin antioksidan etki göstermelerinde radikal süpürücü etkileri, bazı spesifik enzim inhibisyonları ile hücre proliferasyonunu engelleyici etkilerinin rol oynadığı belirtilmektedir. *p*-Kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit’in LDL oksidasyonunu, radikal zincilerini ve singlet oksijeni önleyici etkileri bilinmektedir. Hidroksisinnamik asitlerin, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazını engellediğini belirten çalışmalar gittikçe artmaktadır. Kafeik asit ve esterleri, *p*-kumarik asit, ferulik asit’in çeşitli kaynaklardan elde edilen kolon, akciğer, meme, karaciğer, prostat, serviks ve gastrik gibi çeşitli kanser hücrelerine karşı antikanser etkileri gösterilmiştir (Chung ve ark., 2004; Fiuza ve ark., 2004; Ou ve Kwok, 2004; Prasad ve ark., 2011; Rocha ve ark., 2012; de Paiva ve ark., 2013; Eroğlu ve ark., 2015; Panwar ve ark., 2015; Rosendahl ve ark., 2015; Rosa ve ark., 2016; Wang ve ark., 2016).

Meme kanseri üzerine onkoprotektif etki göstermelerinde, antioksidan etki, steroid ve aril hidrokarbon reseptörlere bağlanmaları, sinyal sistemlerini modifiye etmeleri, hücre içi elementlerle ve sinyal sistemleri ile doğrudan iletişim kurmaları gibi çeşitli mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir (Rocha ve ark., 2012). *p*-Kumarik

asit, ferulik asit ve kafeik asit'in MDA-MB 468 ve HBL 100 meme kanser hücrelerinin yaşama oranını, ayrıca MDA-MB 468 hücrelerinin koloni formasyonlarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Kafeik asit ve ferulik asit, MCF-7 ve T47D insan meme kanser hücrelerine karşı doğrudan antiproliferatif etkili bulunmuştur (Kampa ve ark., 2004). *p*-Kumarik asit'in MCF7, NCI-H460 ve HCT15 kanser hücrelerine karşı antitümör etkileri kayıtlıdır (Heleno ve ark., 2015).

Akciğer kanserinin önlenmesinde antioksidanca zengin beslenmenin önemi vurgulanmaktadır. Bu bakımdan ferulik asit'in nitrik oksit sentaz, kaspaz ve COX-2 gibi sitotoksik etki ile ilişkili enzimleri inhibe ettiği bilinmektedir. Ayrıca nikotin tarafından indüklenen lipit peroksidasyonunu engellemektedir. Kafeik asit esterlerinin tümör hücrelerinin akciğere metastazını önledikleri belirtilmektedir. Ayrıca kafeik asitçe zengin *Prunella* (Apiaceae) ekstreleri akciğer kanserinin önlenmesi ve tedavisinde etkilidir (Rosa ve ark., 2012). Ferulik asit'in antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri bilinmekte, bu etkilerinden dolayı Alzheimer hastalığında etkili olabileceği düşünülmektedir (Ou ve Kwok, 2004; Paiva ve ark., 2013; Picone ve ark., 2013; Panwar ve ark., 2015).

Alt fraksiyonlarda rastlanan bir diğer grup benzoik asit türevleridir. Spektrum verileri yorumlanarak belirlenen bileşikler için spesifik bir isimlendirme yapılamamış ancak benzoik ve hidrosibenzoik asit türevi olabileceği düşünülen iki bileşik belirlenmiştir. Benzoik asit türevlerinin radikal süpürücü etkilerinden dolayı antioksidan etkili oldukları bilinmektedir. Ayrıca antimutajenik, antikarsinojenik, antiinflamatuvar etkili benzoik asit türevleri doğal kaynaklarda tanımlanmıştır (Khadem ve Marles, 2010; Spilioti ve ark., 2014; Heleno ve ark., 2015; Roleira ve ark., 2015).

Fenolik antioksidanlar grubunun büyük bir bölümünü oluşturan flavonoit türevlerinin, çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif etkili oldukları ve bazı hayvan modelleri ile tümör gelişimlerini önledikleri bilinmektedir (Roleira ve ark., 2015). Son çalışmalar ile flavonoitlerin spesifik hedef proteinler ile etkileşerek gen ekspresyonlarını ve hücre sinyal yollarını güçlü bir şekilde etkiledikleri belirlenmiştir (Zhou ve Ibrahim, 2010). Alt fraksiyonlarda, puerarin (daidzein-8-C-glikozit), viteksin (apigenin-8-C-glikozit) ve apigenin-6-C-pentozit-8-C-hekzozit ve bir flavonoit türevi, spektrum bilgileri yorumlanarak belirlenmiştir. Viteksin, *A. dioscoridis* ve *A. palaestinum* ekstrelerinde önceki çalışmalarla tanımlanmıştır (Uğuzlar ve ark., 2012; Abu-Reidah ve ark., 2015).

Viteksin'in, kardiyoprotektif etkilerinin yanı sıra antioksidan, antiinflamatuvar ve hipotansif etkileri bilinmektedir (Özkay ve Can, 2013). Kolon kanser hücrelerini apoptoza sürüklediği ve hücre gelişimini engellediği; mitokondriyal sinyal yollarındaki etkilerinden dolayı insan lösemi hücrelerini (U937) apoptoza sürüklediği belirlenmiştir (Aslam ve ark., 2015).

İzoflavon türevi olan puerarin ise *Pueraria* (Fabaceae) cinsinde yüksek oranda bulunmaktadır. İzoflavon türevlerinin, antiinflamatuvar, spazmolitik, hipotansif ve kanserden koruyucu etkileri bilinmekle birlikte antioksidan ve fitoöstrojenik etkileri nedeniyle dikkat çekmektedirler. *P. lobata* köklerinden hareketle hazırlanan puerarin ve türevlerince zengin fraksiyonların antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri *in vitro* olarak belirlenmiştir (Jin ve ark., 2012).

Alt fraksiyonlarda rastlanan lignanlarla ilgili detaylı bilgi ‘Lignan ve glikozitleri’ başlığında verilmiştir. Kanser tedavisinde lignan ve türevleri kullanılmaktadır. Diyetle alınan lignanlar, erken karsinogenez aşamasında antitümör etkilidirler ve bu nedenle araştırmacıların dikkatini çekmektedirler (Pusztai ve ark., 2010). Alt fraksiyonlardan elde edilen veriler doğrultusunda pinorezinol, hidroksipinorezinol, larisirezinol glikozit’in yumrulara olabileceği düşünülmüştür.

Pinorezinolce zengin zeytin yağı, kolon kanseri hücrelerinde p53 genine etki ederek apoptotik etki göstermiştir (Fini ve ark., 2008). Pinorezinol, insan bağırsak Caco 2 hücrelerinde interlökin-6 ve prostaglandin E2 gibi inflamatuvar faktörlerin üretimini azaltarak COX-2 regülasyonuna etki etmektedir (Satake ve ark., 2015). Pinorezinol ve larisirezinol glikozit’in antiinflamatuvar etki gösterdiği ve fare makrofaj hücrelerinden TNF- α üretimini inhibe ettiği bilinmektedir (Ricci, 2012). 9-Hidroksipinorezinol beyin dokusunda antioksidan etkisinden dolayı nöroprotektif etki göstermektedir (Mathew, 2015).

Yağ asitleri, yaşayan tüm organizmalarda hücre membranları ve depo lipitler için anahtar bileşenlerdir. Oksijenli doymamış yağ asitlerine genel olarak oksilipinler adı verilmektedir. Doğada yaygın bir yayılışı bulunan bu grubun, biyolojik etkileri ve sentezlendiği canlıdaki fizyolojik rolleri araştırmacılar tarafından dikkat çekmektedir. Bitkilerde sentezlenen oksilipinlerin, mikroorganizma-bitki arasındaki bağlantı kurmak, patojenlere karşı savunma sisteminde yer alan proteinlerin gen ekspresyonlarında aktivasyon yapmak, bitkide gelişme ve büyümeyi düzenlemek gibi önemli rollerinin olduğu bilinmektedir (Barbosa ve ark., 2016). Çoklu doymamış yağ asitlerinin, insan sağlıklı fibroblast ya da hayvan sağlıklı hücrelerde advers etki göstermeyecek dozlarda, insan meme, akciğer ve prostat kanser hücrelerini seçici bir şekilde öldürdüğü bilinmektedir (Begin ve ark., 1985). Üstünes ve ark. (1985)’nın *Allium cepa*’dan izole ettikleri 9,10,13-trihidroksi-11-oktadekenoik ve 9,12,13-trihidroksi-10-oktadekenoik asit, izole organ deneylerinde prostaglandin E benzeri aktivite göstermiştir. Hayashi ve ark. (1998) pirinç kepeğinin su ekstresinden izole edilen 9-hidroksi-10,12-oktadekadienoik asit, 13-hidroksi-9,11-oktadekadienoik asit’in P388 fare lösemi hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini belirlemişlerdir. Bu çalışmada tanımlanan oksilipinlerle ilgili biyoaktivite araştırmasına rastlanmamıştır.

Alt fraksiyonlarda rastlanan bir diğer grup hidroksisinnamik asit-spermidin konjugasyonlarıdır: dikafeoil spermidin, dikumaroil spermidin, diferuloil spermidin, kafeoil-kumaroil spermidin ve kumaroil-feruloil spermidin. Araceae familyasında yer alan bitkilerin çiçekli kısımlarında hidroksisinnamik asit amitlerinin varlığından Ponchet ve ark. (1982) tarafından bahsedilmiştir. *Arum* cinsine ait türlerde alkaloit varlığından söz edilir ancak tam olarak bu konuda yapılan detaylı bir çalışma yoktur. Bienz ve ark. (2002) ise *A. maculatum*’da N^1, N^6 -dikumaroil putressin, N^1, N^5 -dikumaroil spermidin ve N^1, N^{10} -dikumaroil spermidin varlığından bahsetmişlerdir. Fenolik aminler olarak bilinen bu madde grubu, bitkilerde geniş bir yayılış göstermekte ve özellikle savunma sisteminde yer aldıkları belirtilmektedir. Mono- ve disüstitüe spermidin ve putressin türevleri tohum, kök, çiçek ve üretken organlarda yer bulunmaktadırlar (Elejalde-Palmett ve ark., 2015). Hem endojenik hem de diyetle alınan putressin, spermidin ve spermin türevleri, yara iyileşmesinde ve tümör gelişimde rol oynamaktadırlar (Kalac, 2009). Kanser hücrelerinde poliamin düzeylerinin aşırı artışı dikkat çekicidir. Bir poliamin

analogunun K562 kronik myeloid lösemi hücrelerine olası etkilerini araştıran Q. Wang ve ark. (2015), K562 hücrelerinde poliamin katabolik yolağında anahtar enzim üzerine etkileri, proliferasyonu önleyici ve apoptozu indükleyici etkilerini doza ve zamana bağılı olarak belirlemişlerdir.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Ülkemizde *Arum* cinsine ait türler zehirli olarak tanınmasına rağmen bazı yörelerde yapraklarının gıda olarak pişirilerek tüketildiği ve başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. *Arum* cinsi ile ilgili kaynak taramalarında kanser tedavileri ile ilgili sınırlı bilgiye rastlanmıştır. Ülkemizde bu konudaki sözlü bilgilere farklı yörelerden ve kişilerden ulaşılmasına rağmen sadece Çatalca yöresinde yapılan bir etnobotanik çalışmada *Arum italicum* taze yumrularının kanser tedavisinde kullanıldığına ait sadece bir yazılı kaynağa rastlanmıştır (Genç ve Özhatay, 2006). Filistin’de yetişen *A. palaestinum* türünün halk arasında antikanser etkili olarak kullanımlarının bulunması, 2015 yılında yapılan *in vitro* sitotoksik aktivite çalışmaları sonucunda bu kullanımın desteklenmesi dikkat çekmektedir (Farid ve ark., 2015).

Arum türlerinin halk arasında kullanımlarının çok yaygın olmaması, bu cinsin araştırmacıların ilgisini daha az çektiğini düşündürmüştür. Kaynak taramalarında *A. italicum* ile ilgili az sayıdaki çalışmada, ekstrelerin antioksidan ve antimikrobiyal etkileri *in vitro* olarak araştırılmış, *Staphylococcus aureus*’a karşı herhangi bir etkiye rastlanmazken, metal şelatlama kapasitesi 0.1 g/L konsantrasyonda %82 oranında belirlenmiştir (Yılmaz, 2008; Quave ve ark., 2008).

Arum cinsine ait üzerinde en fazla kaynak bilgisine rastlanan türler *A. palaestinum* ve *A. maculatum* olup bu çalışmalar şu şekilde özetlenebilir;

A. palaestinum yapraklarından izole edilen alkaloid türevi iki maddenin sitotoksik etkileri oldukça dikkat çekicidir: “piperazirum” un akciğer, ovaryum, melanoma ve kolon kanseri (El-Desouky ve ark., 2007b), “3-hidroksipiperazin-2,5-dion” un ise multi ilaç rezistansı gelişmiş uterus karsinomunda (El-Desouky ve ark., 2014) güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

A. maculatum örneklerinde immün sistem üzerine olumlu etki (Alencar ve ark., 2007), antimikrobiyal etki (Uzun ve ark., 2004; Çolak ve ark., 2009) ve antioksidan etki (Berk, 2012), *A. palaestinum* örneklerinde antioksidan (El-Desouky ve ark., 2007a; Al-Mustafa ve Al-Thunibat, 2008; Husein, 2010), antifungal etki (Husein, 2010) ve meme (Hüsein, 2010; Farid ve ark., 2015), lenfoblastik lösemi (Diab-Assaf ve ark., 2012), larinks, serviks, karaciğer (Farid ve ark., 2015) kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki görülmüştür.

Arum cinsine ait türlerde bu tür etkilerin belirlenmesi dikkat çekicidir ve bu cinse ait türlerin detaylı olarak incelenmesi açısından önem taşımaktadır. *A. italicum* yumrularının *in vitro* biyolojik aktivitelerinin araştırılmasının ve etkiden sorumlu olabilecek bileşikler hakkında fikir sahibi olunmasının, gelecekte yapılacak araştırmalara kaynak teşkil edeceği düşünülmüştür. Tez kapsamında planlanan ‘biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama’ yönteminde, yumrulardan elde edilen ekstrenin fraksiyonlanması için meme (MCF-7) ve akciğer (A549) kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkinin araştırılması esas alınmıştır. Bu amaçla çalışılan örneklerde her iki kanser hücresinde elde edilen etki ve ekstre verimleri göz önünde tutularak çalışmaya devam edilmiştir. Alt fraksiyonlarda belirlenen sitotoksik etki hangi yollar üzerinden gerçekleşiyor sorusuna yanıt alabilmek için kanser hücrelerindeki DNA sentezinin inhibisyonu ve hücrelerin apoptotik özellikleri *in vitro* olarak incelenmiştir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda antioksidan, antiinflamatuvar, antikolinesteraz etkili bileşiklerin kanser oluşumunu önleyici

etkiler olduğu tartışılmaktadır. Bu nedenle alt fraksiyonların antioksidan etkileri ve enzim inhibisyonları (asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz ve LOX) *in vitro* olarak araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* aktivite sonuçları ile ilgili detaylı açıklamalar 'Bulgular ve Tartışma' bölümünde verilmiştir.

Sitotoksik etkiler değerlendirildiğinde MCF-7 meme kanser hücrelerinde karşı E2 ve E6; A549 akciğer kanser hücrelerine karşı E2, E3 ve E6 alt fraksiyonları kayda değer etki göstermişlerdir. Özellikle E2 kodlu alt fraksiyonun akciğer kanserine karşı sitotoksik etkisi, tedavide kullanılan mitoksantron ile kıyaslanabilir düzeydedir. Sitotoksik etkinin oluşumunda, E2 ve E6 fraksiyonlarının meme kanseri hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettikleri; E2, E3 ve E6 fraksiyonlarının ise akciğer kanseri hücrelerinde hem DNA sentezini inhibe ettiği hem de hücreleri erken apoptoza sürükledikleri söylenebilir. Etkisi belirlenen alt fraksiyonların çalışılan dozlarda sağlıklı hücrelere toksik olmadıkları ise fare kökenli normal fibroblast hücreleri üzerinde gösterilmiştir. Bu bulgu, bu alt fraksiyonların seçicilikleri hakkında ön fikir vermektedir.

Diğer aktiviteler değerlendirildiğinde, E3 ve E4 fraksiyonlarının, inflamasyonda rol oynayan lipoksijenaz enzimi üzerine inhibisyonlarının oldukça düşük olduğu gözlenirken diğer alt fraksiyonlarda herhangi bir etkiye rastlanmamıştır. Sitotoksik etkili fraksiyonlarda, LOX enzimi üzerine kayda değer herhangi bir etkiye rastlanmamıştır. Bu nedenle iki aktivite arasında bir korelasyon kurulamamıştır.

Antikolinesteraz etkinin belirlenmesi, Alzheimer hastalığının tedavisi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca antikanser etkide kolinesteraz enzim inhibisyonlarının rolü olabileceği bilinmektedir. E2 kodlu alt fraksiyonda asetilkolinesteraz enzim inhibisyonu oldukça zayıf gözlenirken diğer fraksiyonlarda bir etkiye rastlanmamıştır. Alt fraksiyonların butirilkolinesteraz enzim inhibisyonları değerlendirildiğinde ise E1 kodlu alt fraksiyon hariç diğerlerinde %40 civarında bir inhibisyon gözlenmiştir. Burada kayda değer olan alt fraksiyonların butirilkolinesteraza daha seçici davrandıklarıdır. Bu nedenle alt fraksiyonların butirilkolinesteraz enzim inhibisyonu araştırmalarının devamı önerilmektedir.

Antioksidan etki sonuçlarına göre, alt fraksiyonların hesaplanabilir düzeyde etki gösterdikleri ancak bu etkinin, gallik asit ve BHT'den daha düşük olduğu görülmektedir. Antioksidan etki ile sitotoksik etki arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Ekstre ve fraksiyonların karşılaştırılması amacıyla yapılan ince tabaka kromatografisi ile kullanılan sabit ve hareketli fazlar ile tam bir başarı sağlanamamıştır. Bunun nedeni İTK çalışmalarının araştırmaların başlangıcında, henüz fraksiyonların içeriği hakkında hiçbir bilgi edinilmemiş iken yapılmış olmasıdır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda YBSK/KS-KS analizleri ile belirlenen sekonder metabolitler için yeni sistemler belirlenebilir, ekstrelerin ve fraksiyonların hızla karşılaştırılması mümkün olabilir ve sonuçlar yorumlanabilir.

Biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama yöntemi ile etkili fraksiyonlardan etkiden sorumlu bileşik(ler)in izolasyonu hedeflenmiştir. Etkisi belirlenen alt fraksiyonların verimlerinin çok düşük olması nedeniyle alt fraksiyonların kimyasal bileşimlerinin ortaya konulması ve etkiden sorumlu olabilecek madde gruplarının belirlenmesi için YBSK/KS-KS yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle tanımlanan

bileşiklerin izolasyonu ancak ileride daha büyük ölçekle yapılacak çalışmalarla gerçekleştirilebilecektir.

YBSK/KS-KS yöntemiyle, total iyon kromatogramları ve 280 nm’de elde edilen kromatogramdaki her bir pikin kütle spektrumları, önceki çalışmalarla kıyaslanarak ve verilen spektrumlardaki benzerlikler esas alınarak yorumlanmıştır. Ayrıca, alt fraksiyonlarda yer alan bileşiklerin kabaca yüzdelerini belirlemek için her bir pikin alan değeri hesaplanmış ve bağlı yüzde miktarları hesaplanmıştır. Alt fraksiyonlarda yorumlayabildiğimiz ve kromatogramlarda alan olarak dikkati çeken bileşikler aşağıda özetlenmiştir: E1 kodlu alt fraksiyon için adenin (~%26) ve bir disakkarit türevi (%16.8); E2 için dikumaroil spermidin (%14.8) ve ferulik asit (%15.3); E3 için trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri (%31.2) ve ferulik asit (%12.1); E4 için trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri (%22.8) ve MA’sı 330 olan bir flavonoid türevi (%14.6); E5 için trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri 1 (%14.8) ve MA 310 olan bilinmeyen madde (%11.8); E6 için okzo-oktadekadienoik asit (%23.5) ve hidroperoksi-oktadekadienoik asit (~%22).

A549 akciğer kanser hücrelerinde mitoksantron ile kıyaslanabilir düzeyde güçlü sitotoksik etki gösteren E2 kodlu alt fraksiyonun ferulik asit ve dikumaroil spermidince zengin olduğu söylenebilir. Ferulik asit’in çeşitli kanser hücrelerine karşı antiproliferatif ve koloni formasyonlarını önleyici etkileri, sitotoksik etki ile ilişkili enzimleri inhibe edici etkileri bilinmektedir. Bu bilgiler, elde ettiğimiz bulguları destekler niteliktedir. Fenolik asit-spermidin konjugasyonları biyolojik etkinliği bilinen birçok bitkide tanımlanmış olup kaynaklarda rastlanan az sayıdaki araştırma bitkilerdeki yara iyileşmesi, patojenlere karşı savunma, hücre büyümesi vb etkileri konularındadır. Dikumaroil spermidin’in belirlediğimiz sitotoksik etkiye ne oranda katkı verdiği henüz yorumlanamamaktadır. Bulgular doğrultusunda elde edilen etkinin sadece iki bileşiğe dayandırılmasının mümkün olmayacağı, E2 kodlu alt fraksiyonda rastlanan fenolik asitlerin, fenolik asit-spermidin konjugatlarının, lignan türevlerinin ve diğer bileşiklerin birlikte etki gösterdikleri de düşünülebilir. E2 kodlu alt fraksiyonun ileriki çalışmalarla, etkiden sorumlu bileşik(ler)inin aydınlatılması önerilmektedir. Böylelikle etkinin bileşik(ler) bazında değerlendirmesi ya da sinerjik etkiden bahsedilmesi mümkün olabilecektir. Ayrıca sitotoksik etkinin *in vivo* ortamda araştırılması gerekliliğini de vurgulamak gerekmektedir.

Sitotoksik etkileri dikkat çeken E3 ve E6 kodlu alt fraksiyonlarda ana bileşiklerin ferulik asit ve oksilipinler sınıfında yer alan oktadekadienoik asit türevleri tanımlanmıştır. Ferulik asitin sitotoksik etkiye katkı verebileceği yönündeki düşünceler yukarıda paylaşılmıştır. Oksilipinlerin linoleik asitten (oktadekadienoik asit) hareketle lipoksijenaz yolağından sentezlendikleri bilinmektedir. Hidroksi-oktadekadienoik asit türevlerinin antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve P388 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri bilinmektedir. Ayrıca mono-hidroksi türevleri K562 ve RPMI8226 hücrelerine orta düzeyde, HepG2 ve MCF-7 hücrelerine karşı zayıf sitotoksik etki göstermişlerdir. Ancak bu bilgiler oksilipinlerin sitotoksik etki bulgularımıza katkılarını tam olarak açıklamak için yeterli değildir.

Tez kapsamında elde edilen tüm bulgular, yorumlar ve değerlendirmeler ışığında, özellikle E2, E3 ve E6 kodlu alt fraksiyonların bileşimlerinin daha detaylı

alışmalarla aydınlatılmasının kanser tedavisi konusunda ümit veren yeni doğal bileşikler ve/veya kombinasyonlarının keşfine yardımcı olacağı düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

Abdallah, I.B., Tlili, N., Martinez-Force, E., Rubio, A.G.P., Perez-Camino, M.C., Albouchi, A., Boukhchina, S., Content of carotenoids, tocopherols, sterols, triterpenic and aliphatic alcohols, and volatile compounds in six walnuts (*Juglans regia* L.) varieties, *Food Chem.*, 173, 972-978 (2015).

Abu-Dahab, R., Afifi, F., Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7), *Sci. Pharm.*, 75, 121-136 (2007).

Abu-Reidah, I.M., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Res. Int.*, 70, 74-86 (2015).

Aburjai, T., Hudaib, M., Tayyem, R., Yousef, M., Qishawi, M., Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Ajloun Heights region, *J. Ethnopharmacol.*, 110, 294-304 (2007).

Achtardjiev, C.Z., Koleva, M., A glucomannan from the tubers of *Arum orientale*, *Phytochem.*, 12(12), 2897-2900 (1973).

Aehle, E., Muller, U., Eklund, P.C., Willfor, S.M., Sippl, W., Drager, B., Lignans as food constituents with estrogen and antiestrogen activity, *Phytochem.*, 72(18), 2396-2405 (2011).

Afifi, F.U., Abu-Irmaileh, B., Herbal medicine in Jordan with special emphasis on less commonly used medicinal herbs, *J. Ethnopharmacol.*, 72, 101–110 (2000).

Afifi, F.U., Khalil, E., Abdalla, S., Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs, *J. Ethnopharmacol.*, 65, 173–177 (1999).

Agarwal, V., Ranatunge, D., Campbell, A., Lind, M.J., Cawkwell, L., Expression of 5 & 12 lipoxygenase in malignant pleural mesothelioma, 9th Annual BTOG Conference, Poster:55 (2011).

Aghofack-Nguemezi, J., Fuchs, C., Yeh, S.-Y., Huang, F.-C., Hoffmann, T., Schwab, W., An oxygenase inhibitor study in *Solanum lycopersicum* combined with metabolite profiling analysis revealed a potent peroxygenase inactivator, *J. Exp. Bot.*, 62(3), 1313-1323 (2011).

Aiello-Laws, L., Genetic cancer risk assessment, *Semin. Oncol. Nurs.*, 27(1), 13-20 (2011).

Akgünlü, S.B., Kilis ve Gaziantep yöresinde tüketilen bazı yabancı sebzelerin mineral içerikleri ve mikrobiyolojik analizleri, Yüksek Lisans Tezi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kilis, Türkiye (2012).

Akhtardzhiev, K., Koleva, M., Kitanov, G., Ninov S., Pharmacognostic study of representatives *Arum*, *Althae* and *Hypericum* species, *Farmatsiya*, 34(3), 1-6 (1984).

Akiyama, K., Maruyama, M., Yamauchi, S., Nakashima, Y., Nakato, T., Tago, R., Sugahara, T., Kishida, T., Koba, Y. Antimicrobiological activity of lignan: Effect

of benzylic oxygen and stereochemistry of 2,3-dibenzyl-4-butanolide and 3,4-dibenzyltetrahydrofuran lignans on activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(7), 1745-1751 (2007a).

Akiyama, K., Yamauchi, S., Nakato, T., Maruyama, M., Sugahara, T., ve Kishida, T. Antifungal activity of tetra-substituted tetrahydrofuran lignan, (-)-Virgatusin, and its structure-activity relationship, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(4), 1028-1035 (2007b).

Alencar, V., Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Mota, M.L., Brito, G.A.C., Aragao, K.S., Bittencourt, F.S., Pinto, V.P.T., Debray, H., Ribeiro, R.A., Cavada, B.S., Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37, 1805–1814 (2005).

Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Al-Shafie, J.H., Elgharabah, W.A., Kherfan, F.A., Qarariah, K.H., Khdaif, I.S., Soos, I.M., Musleh, A.A., Isa, B.A., Herzallah, H.M., Khlaif, R.B., Aiash, S.M., Swaiti, G.M., Abuzahra, M.A., Haj-Ali, M.M., Saifi, N.A., Azem, H.K., Nasrallah, H.A., Traditional knowledge of wild edible plants used in Palestine (Northern West Bank): A comparative study, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 4, 13 (2008).

Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Jamous, R.M., Complementary and alternative medicine use amongst Palestinian diabetic patients, *Complement. Ther. Clin. Pract.*, 18, 16-21 (2012).

Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Jamous, R.M., Herbal preparation use by patients suffering from cancer in Palestine, *Complement. Ther. Clin. Pract.*, 17, 235-240 (2011).

Allen, A.K., Purification and characterization of an *N*-acetyllactosamine-specific lectin from tubers of *Arum maculatum*, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1244, 129-132 (1995).

Al-Mustafa, A.H., Al-Thunibat, O.Y., Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes, *Pak. J. Biol. Sci.*, 11(3), 351-358 (2008).

Al-Qura'n, S., Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan, *Toxicon*, 46, 119–129 (2005).

Altundag, E., Ozturk, M., Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey, *Procedia Soc. Behav. Sci.*, 19, 756–777 (2011).

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies, *Food Chem.*, 84, 551–562 (2004).

Arıdur, R., Bazı şifalı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye (2013).

Arslan, Y., A549 akciğer adenokarsinom ve SK-MES-1 akciğer skuamöz hücreli karsinom hücre kültürleri üzerinde alfa-bungarotoksin (alfa 7 nikotinik asetilkolin reseptör antagonist) ile sisplatinin (alkilleyici-benzer ajan) tek tek ve kombine kemoterapötik etkinliklerinin değerlendirilmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gülhane

Askeri Tıp Akademisi, Askeri Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye (2011).

Arulpriya, P., Lalitha, P., Hemalatha, S., *In vitro* antioxidant testing of the extracts of *Samanea saman* (Jacq.) Merr, *Der Chemica Sinica*, 1(2), 73-79 (2010).

Aslam, M.S., Ahmad, M.S., Mamat, A.S., Pharmacological potential of vitexin, *Ind. Res. J. Pharm. Sci.*, 2(2), 114-122 (2015).

Atmaca, E., Aksoy, A., Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle Tespit edilmesi, *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 79-83 (2009).

Aydın-Acar, Ç., Akciğer kanserinde rekombinant adenovirüs aracılı trail transferinin potansiyel terapötik etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya, Türkiye (2005).

Azhar-Ul-Haq, M.A., Anis, I., Khan, S.B., Ahmed, E., Ahmed, Z., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I., Enzymes inhibiting Lignans from *Vitex negundo*, *Chem. Pharm. Bull.*, 52(11), 1269-1272 (2004).

Azkur, A.K., Aslan, M.E., Akış sitometri ve veteriner hekimlikteki uygulamaları, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 7(1), 59-66 (2012).

Banoub, J., Delmaz Jr., G.-H., Joly, N., Mackenzie, G., Cachet, N., Benjelloun-Mlayah, B., Delmas, M., A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing, *J. Mass Spectrom.*, 50, 5-48 (2015).

Barbosa, M., Rios, O., Velasquez, M., Villalobos, J., Ehrmanns, J., Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase histochemical activities and tumor cell growth in several brain tumors, *Surg. Neurol.*, 55, 106–12 (2001).

Barbosa, M., Valentão, P., Andrade, P.B., Biologically active oxylipins from enzymatic and nonenzymatic routes in macroalgae, *Mar. Drugs*, 14(23), doi:10.3390/md14010023 (2016).

Barbosa-Pereira, L., Cruz, J.M., Sendon, R., Bernaldo de Quiros, A.R., Ares, A., Castro-Lopez, M., Abad, M.J., Maroto, J., Paseiro-Losada, P., Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish, *Food Control*, 31, 236-243 (2013).

Barile, F.A., Introduction to *in vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods, FL: CRC Press, Boca Raton, 27-32, 1994.

Barreira, J.C.M., Dias, M.I., Zivkovic, J., Stojkovic, D., Sokovic, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., Phenolic profiling of *Veronica* spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments, *Food Chem.*, 163, 275-283 (2014).

Basu, S., Patel, V.B., Jana, S., Patel, H., Liquid chromatography tandem mass spectrometry method (LC–MS/MS) for simultaneous determination of piperine, cinnamic acid and gallic acid in rat plasma using a polarity switch technique, *Anal. Methods*, 5, 967-976 (2013).

Battisti, V., Bagatini, M.D., Maders, L.D.K., Chiesa, J., Santos, K.F., Gonçalves, J.F., Abdalla, F.H., Battisti, I.E., Schentinger, M.R.C., Morsch, V.M., Cholinesterase activities and biochemical determinations in patients with prostate

cancer: Influence of Gleason score, treatment and bone metastasis, *Biomed. Pharmacother.*, 66, 249–255 (2012).

Baylac, S., Racine, P., Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts, *Int. J. Aroma.*, 13, 138–142 (2003).

Baytop, T., Türkiye’de bitkiler ile tedavi (geçmişten günümüze), İstanbul Üniversitesi Yayınları No. 3255 Eczacılık Fakültesi No. 40, İstanbul, 407, 1984.

Baytop, T., Türkçe bitki adları sözlüğü, Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları: 578, İstanbul, 287, 1999.

Becker, L., Poutaraud, A., Hamm, G., Muller, J.-F., Merdinoglu, D., Carre, V., Chaimbault, P., Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray – Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 795, 44–51 (2013).

Begin, M.E., Das, U.N., Ells, G., Horrobin, D.F., Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids, *Prostaglandins Leukot. Med.*, 19(2), 177-186 (1985).

Belviranlı, M., Okudan, N., The effects of *Ginkgo biloba* extract on cognitive functions in aged female rats: the role of oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor, *Behav. Brain Res.*, 278, 453–461 (2015).

Berk, Ş., *Myrtus communis*, *Pistacia vera*, *Arum maculatum*, *Ceterach officinarum*, *Inula oculus-christi* türlerinin antioksidan, anti-mikrobiyal ve DNA koruyucu aktivitelerinin araştırılması, Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye (2012).

Bernardi, C.C., Ribeiro, E.S.F., Cavalli, I.J., Chautard-Freire-Maia, E.A., Souza, R.L.R., Amplification and deletion of the ACHE and BCHE cholinesterase genes in sporadic breast cancer, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 197, 158-165 (2010).

Berridge, M.V., Tan, A.S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction, *Arch. Biochem. Biophys.*, 303(2), 474-482 (1993).

Bienz, S., Detterbeck, R., Ensch, C., Guggisberg, A., Hausermann, U., Meisterhans, C., Wendt, B., Werner, C., Hesse, M., Putrescine, spermidine, spermine and related polyamine alkaloids, In: *The alkaloids: chemistry and biology*, G.A. Cordell (Eds), Volume 58, Academic Press, California, 103-120, 2002.

Billinsky, J.L., Marcoux, M.R., Krol, E.S., Oxidation of the lignan nordihydroguaiaretic acid, *Chem. Res. in Toxicol.*, 20(9), 1352-1358 (2007).

Birks, J., Cholinesterase inhibitors for Alzheimer’s disease, *Cochrane Database Syst. Rev.*, Issue 1, doi: 10.1002/14651858.CD005593 (2006).

Blazics, B., Analysis of medicinal plant phenoloids by coupled tandem mass spectrometry, PhD Thesis, Semmelweis University, Doctoral School of Pharmaceutical Sciences, Budapeşte (2010).

Blitz, C.L., Murphy, S.P., Au, D.L.M., Adding lignan values to a food composition database, *J. Food Comp. Anal.*, 20(2), 99-105 (2007).

- Bobbe, G., Murphy, G., Albert, P.S., Sansbury, L.B., Lanza, E., Schatzkin, A., Cross, A.J., Dietary lignan and proanthocyanidin consumption and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial, *Int. J. Cancer*, 130(7), 1649-1659 (2012).
- Bodiwala, H.S., Singh, G., Singh, R., Dey, C.S., Sharma, S.S., Bhutani, K.K., Singh, I.P., Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*, *J. Nat. Med.*, 61(4), 418-421 (2007).
- Boluda, C.J., Pinero, J., Romero, M., Cabrera-Serra, M.G., Valladares, B., Aragon, Z., Lopez, H., Perez, J.A., Trujillo, J.M., Anti-leishmanial activity of justicidone and its synthetic precursors, *Nat. Prod. Commun.*, 2(2), 169-172 (2007).
- Bonora, A., Pancaldi, S., Gualandri, R., Fasula, M.P., Carotenoid and ultrastructure variations in plastids of *Arum italicum* Miller fruit during maturation and ripening, *J. Exp. Bot.*, 355(51), 873-884 (2000).
- Bonzanini, F., Bruni, R., Palla, G., Serlataite, N., Caligiani, A., Identification and distribution of lignans in *Punica granatum* L. fruit endocarp, pulp, seeds, wood knots and commercial juices by GC-MS, *Food Chem.*, 117(4), 745-749 (2009).
- Brass, N., Racz, A., Heckel, D., Remberger, K., Sybrecht, G.W., Meese, E.U., Amplification of the genes BChE and SLC2A2 in 40 % of squamous cell carcinoma of the lung, *Cancer Res.*, 57, 2290-2294 (1997).
- Bravi, E., Perretti, G., Marconi, O., Patrizi, E., Fantozzi, P., Secoisolariciresinol diglucoside determination in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil and application to a shelf life study, *Food Chem.*, 126(4), 1553-1558 (2011).
- Brufau, G., Canela, M.A., Rafecas, M., Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties, *Nutr. Res.*, 28, 217-225 (2008).
- Bulut, G., İnsan HER2/NEU pozitif, invaziv meme karsinomu hücre hattı olan MDA-MB453 detrastuzumab ve gossipol (AT-101) kombinasyonunun sitotoksitesi ve apoptozis üzerine etkisi, *Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye* (2012).
- Burlacu, A., Regulation of Apoptosis by Bcl-2 Family Proteins, *J. Cell. Mol. Med.*, 7(3), 249-257 (2003).
- Butler, M., *Animal cell culture and technology*, BIOS Scientific Publishers, London, 32-33, 2004.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food Chem. Toxicol.*, 51, 15-25 (2013).
- Cao, J., Yin, C., Qin, Y., Cheng, Z., Chen, D., Approach to the study of flavone di-C-glycosides by high performance liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis*, *J. Mass Spectrom.*, 49, 1010-1024 (2014).
- Cazzonelli, C.I., Carotenoids in nature: insights from plants and beyond, *Funct. Plant Biol.*, 38, 833-847 (2011).
- Chen, J., Power, K.A., Mann, J., Cheng, A., Thompson, L.U., Flaxseed alone or in combination with tamoxifen inhibits MCF-7 breast tumor growth in ovariectomized

- Athymic mice with high circulating levels of estrogen, *Exp. Biol. Med.*, 232(8), 1071-1080 (2007).
- Chen, D.-L., Huang, P.-H., Chiang, C.-H., Leu, H.-B., Chen J.-W., Lin, S.-J., Phytosterols increase circulating endothelial progenitor cells and insulin-like growth factor-1 levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized crossover study, *J. Funct. Foods*, 13, 148-157 (2015).
- Chen, L.H., Fang, J., Li, H.X., Demark-Wahnefried, W., Lin, X., Enterolactone induces apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells via a mitochondrial-mediated, caspase-dependent pathway, *Mol. Cancer Ther.*, 6(9), 2581-2590 (2007).
- Chen, Y.C., Liao, C.H., Chen, I.S., Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*, *Phytochem.*, 68(15), 2101-2111 (2007).
- Chen, Y.L., Lin, P.C., Chen, S.P., Lin, C.C., Tsai, N.M., Cheng, Y.L., Chang, W. L., Chang, L., Lin, S.Z., Harn, H.J., Activation of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene-1 via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase revealed a isochaihulactone-triggered apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 323(2), 746-756 (2007).
- Chermenskaya, T.D., Stepanycheva, E.A., Shchenikova, A.V., Chakaeva, A.Sh., Insectoacaricidal and deterrent activities of extracts of Kyrgyzstan plants against three agricultural pests, *Ind. Crops Prod.*, 32, 157–163 (2010).
- Cho, J.Y., Choi, G.J., Son, S.W., Jang, K.S., Lim, H.K., Lee, S.O., Do Sung, N., Cho, K.Y., Kim, J.C., Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi, *Pest Manag. Sci.*, 63(9), 935-940 (2007).
- Cho, K., Kim, Y., Wi, S.J., Seo, J.B., Kwon, J., Chung, J.H., Park, K.Y., Nam, M.H., Metabolic Survey of defense responses to a compatible hemibiotroph, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, in ethylene signaling-impaired tobacco, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 8477-8489 (2013).
- Chopin, J., Dellamanica, G., C-glycosylflavonoids, In: *The Flavonoids: advances in research since 1980*, J.B. Harborne (Eds.), Chapman and Hall Ltd., London, 64, 1988.
- Christie, W.W., 13-Phenyltridec-9-enoic and 15-phenylpentadec-9-enoic acids in *Arum maculatum* seed oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105, 779–780 (2003).
- Chung, T.-W., Moon, S.-K., Chang, Y.-C., Ko, J.-H., Lee, Y.-C., Cho, G., Kim, S.-H., Kim, J.-G., Kim, C.-H., Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism, *FASEB J.*, 18, 1670-1681 (2004).
- Coelho Filho, J.M.J.M.C., Birks, J., Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2001, Issue 2, doi: 10.1002/14651858.CD001499 (2001).
- Collision, A., Yang, L., Dykes, L., Murray, S., Awika, J.M., Influence of genetic background on anthocyanin and copigment composition and behavior during thermoalkaline processing of maize, *J. Agric. Food Chem.*, 63, 5528–5538 (2015).

- Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S., Mariotti, M.G., Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy), *J. Ethnopharmacol.*, 125, 16–30 (2009).
- Corsini, E., Dell'Agli, M., Facchi, A., De Fabiani, E., Lucchi, L., Boraso, M.S., Marinovich, M., Galli, C.L., Enterodiol and enterolactone modulate the immune response by acting on nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) signaling, *J. Agric. Food Chem.*, 58(11), 6678-6684 (2010).
- Cosentino, M., Marino, F., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Luini, A., Legnaro, M., Delle Canne, M. G., Luzzani, M., Crema, F., Paracchini, S., Lecchini, S., Estrogenic activity of 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR/lignan (TM)) from Norway spruce (*Picea abies*) knots and of its active metabolite enterolactone in MCF-7 cells, *Pharmacol. Res.*, 56(2), 140-147 (2007).
- Coy, E.D., Cuca, L.E., Sefkow, M., COX, LOX and platelet aggregation inhibitory properties of Lauraceae neolignans, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 6922-6925 (2009).
- Cukelj, N., Jakasa, I., Sarajlija, H., Novotni, D., Curic, D., Identification and quantification of lignans in wheat bran by gas chromatography-electron capture detection, *Talanta*, 84(1), 127-132 (2011).
- Culver, C.A., Michalowski, S. A., Maia, R. C., ve Laster, S. A. The anti-apoptotic effects of nordihydroguaiaretic acid: Inhibition of cPLA(2) activation during TNF-induced apoptosis arises from inhibition of calcium signaling, *Life Sci.*, 77(19), 2457-2470 (2005).
- Czapski, G.A., Czubowicz, K., Strosznajder, R.P., Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors, *Pharmacol. Rep.*, 64, 1179-1188 (2012).
- Çokuğraş, A.N., Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance, *Turk. J. Biochem.*, 28(2), 54-61 (2003).
- Çolak, F., Savaroğlu, F., İlhan, S., Antibacterial and antifungal activities of *Arum maculatum* L. leaves extracts, *J. Appl. Biol. Sci.*, 3(3), 13-16 (2009).
- Dachtler, M., van de Put, F.H.M., von Stijn, F., Beindorff, C.M., Fritsche, J., On-line LC-NMR-MS characterization of sesame oil extracts and assessment of their antioxidant activity, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 105(9), 488-496 (2003).
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., Cell death: critical control points, *Cell*, 116, 205–219 (2004).
- Dasgupta, A., Klein, K., Oxidative stress related to other diseases, antioxidants in food, vitamins and supplements, *Bölüm 11*, 185-207, 2014.
- Davis, P.H., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 8, Edinburgh University Press, Edinburgh, 41-55, 1984.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 10, Edinburgh University Press, Edinburgh, 218-221, 1988.
- De Mello Andrade, J.M., Fasolo, D., Polyphenol antioxidants from natural sources and contribution to health promotion: R.R. Watson, V.R. Preedy, S. Zibadi (Ed.), *Polyphenols in human health and disease*, Academic Press, San Diego, 253-265, 2014.

- De Natale, A., Pollio, A., Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy), *J. Ethnopharmacol.*, 109, 295–303 (2007).
- Debeleç-Bütüner, B., Kantarcı, G., Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(2), 149-170 (2006).
- Della Greca M., Fiorentino A., Molinaro A., Monaco P., Previtera L., Hydroperoxysterols in *Arum italicum*, *Nat. Prod. Lett.*, 5(1), 7-14 (1994b).
- Della Greca M., Molinaro A., Monaco P., Previtera L., Two new lignan glucosides from *Arum italicum*, *Heterocycl.*, 36(9), 2081-2086 (1993a).
- Della Greca, M., Fiorentino, A., Molinaro, A., Monaco, P., Previtera, L., Steroidal 5,6-epoxides from *Arum italicum*, *Nat. Prod. Lett.*, 2(1), 27-32 (1993b).
- Della Greca, M., Molinaro, A., Monaco, P., Previtera, L., Dihydrobenzofuran neolignans from *Arum italicum*, *Heterocycl.*, 38(5), 1099-1102 (1994a).
- Demirci, T., HMG-KOA redüktaz inhibitörlerinin meme adenokarsinom hücre hattı MCF-7 üzerinde hücre proliferasyonu ve hücre ölüm mekanizmaları (apoptoz ve otofaji) üzerine etkisinin incelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2010).
- Deng, J., Fan, C., Jiang, Z., Ye, W., Yang, Y., Direct mass spectrometry fingerprinting: A simple and efficient method for pharmaceutical product analysis, *J. Royal Soc. Chem., Electronic Supplement* (2012).
- Diab-Assaf, M., Taleb, R., Shebaby, W., Mansour, A., Moussa, C., Daher, C., Mroueh, M., Antioxidant and anticancer activities of methanolic, ethyl acetate and chloroform extracts of *Arum palaestinum*. *Planta Med.*, 78, I389-1399 (2012).
- Dimakou, C., Oreopoulou, V., Antioxidant activity of carotenoids against the oxidative destabilization of sunflower oil-in-water emulsions, *LWT Food Sci. Technol.*, 46, 393-400 (2012).
- Ding, X., Zhu, C., Qiang, H., Zhou, X., Zhou, G., Enhancing antitumor effects in pancreatic cancer cells by combined use of COX-2 and 5-LOX inhibitors, *Biomed. Pharmacother.*, 65, 486-490 (2011).
- Doctor, B.P., Saxena, A., Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity, *Chem. Biol. Interact.*, 157–158, 167–171 (2005).
- Du, J., Cullen, J.J., Buettner, G.R., Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1826, 443–457 (2012).
- Duncan, A.M., Phipps, W.R., Kurzer, M.S., Phyto-oestrogens, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 17(2), 253-271 (2003).
- Eggert, J., The biology of cancer: what do oncology nurses really need to know, *Semin. Oncol. Nurs.*, 27(1), 3-12 (2011).
- Eklund, P.C., Backman, M.C., Kronberg, L.A., Smeds, A.I., Sjöholm, R.E., Identification of lignans by liquidchromatography-electrospray ionization ion-trap massspectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 43, 97–107 (2008).
- El-Desouky, S.K., Hawas, U.W., Kim, Y.-K., Two new diketopiperazines from *Arum palaestinum*, *Chem. Nat. Comp.*, 50(6), 1075-1078 (2014).

- El-Desouky, S.K., Kim, K.H., Ryu, S.Y., Eweas, A.F., Gamal-Eldeen, A.M., Kim, Y-K., A new pyrrole alkaloid isolated from *Arum palaestinum* Boiss. and its biological activities, *Arch. Pharm. Res.*, 30(8), 927-931 (2007a).
- El-Desouky, S.K., Ryu, S.Y., Kim, Y-K, Piperazirum, a novel bioactive alkaloid from *Arum palaestinum* Boiss., *Tetrahedron Lett.*, 48, 4015–4017 (2007b).
- El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., Lyoussi, B., Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco), *J. Ethnopharmacol.*, 86, 149–158 (2003).
- Elejalde-Palmett, C., de Bernonville, T.D., Glevarec, G., Pichon, O., Papon, N., Courdavault, V., St-Pierre, B., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A., Besseau, S., Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core eudicotyledons, *J. Exp. Bot.*, doi:10.1093/jxb/erv423 (2015).
- Ellman, G.L., Courtney, K. D., Anders, V. J., Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7(88), 951-961 (1961).
- Eroğlu, C., Seçme, M., Bağcı, G., Dodurga, Y., Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines, *Tumor Biol.*, 36, 9437–9446 (2015).
- Eyles, A., Jones, W., Riedl, K., Cipollini, D., Shwartz, S., Chan, K., Herms, D.A., Bonello, P., Comparative phloem chemistry of Manchurian (*Fraxinus mandshurica*) and two North American Ash species (*Fraxinus americana* and *Fraxinus pennsylvanica*), *J. Chem. Ecol.*, 33, 1430–1448 (2007).
- Fang, C., Wan, X., Tan, H., Jiang, C., Identification of Isoflavonoids in Several Kudzu Samples by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatographic Science*, 44, 57-63 (2006).
- Farid, M.M., Hussein, S.R., Ibrahim, L.F., El Desouky, M.A., Elsayed, A.M., El Oqlah, A.A., Saker, M.M., Cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Arum palaestinum* Boiss., *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 5(11), 944-947 (2015).
- Farid, M.M., Hussein, S.R., Ibrahim, L.F., El Desouky, M.A., Elsayed, A.M., Saker, M.M., Shoot regeneration, biochemical, molecular and phytochemical investigation of *Arum palaestinum* Boiss, *Afr. J. Biotechnol.*, 13(34), 3522-3530 (2014).
- Faulds, D., Balfour, J.A., Lanqtry, H.D., Mitoxantrone, a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer, *Drugs*, 41(3), 400-449 (1991).
- Felipe, D.F., Brambilla, L.Z.S., Porto, C., Pilau, E.J., Cortez, D.A.G., Phytochemical analysis of *Pfaffia glomerata* inflorescences by LC-ESI-MS/MS, *Molecules*, 19, 15720-15734 (2014).
- Fernandez, P., Cabral, P.M.C., Phytosterols: applications and recovery methods, *Bioresour. Technol.*, 98, 2335–2350 (2007).

- Ferreira, R.M., Franco, E., Teixeira, A.R.N., Covalent dimerization of ribulose biphosphate carboxylase subunits by UV radiation, *J. Biochem.*, 318, 227-234 (1996).
- Ferroni, L., Pantaleoni, L., Baldisserotto, C., Aro, E.-M., Pancaldi, S., Low photosynthetic activity is linked to changes in the organization of photosystem II in the fruit of *Arum italicum*, *Plant Physiol. Biochem.*, 63, 140-150 (2013).
- Fini, L., Hotchkiss, E., Fogliano, V., Graziani, G., Romano, M., Vol, E.B.D., Qin, H., Selgrad, M., Boland C.R., Ricciardiello, L., Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines, *Carcinogenesis*, 29(1), 139-146 (2008).
- Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M., Cirino, G., Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase, a new avenue in anti-inflammatory therapy, *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1433-1438 (2001).
- Fischer, U.A., Jaksch, A.V., Carle, R., Kammerer, D.R., Determination of lignans in edible and nonedible parts of pomegranate (*Punica granatum* L.) and products derived there from particularly focusing on the quantitation of isolariciresinol using HPLC-DAD-ESI/MS(n), *J. Agric. Food Chem.*, 60(1), 283-292 (2012).
- Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Girao da Cruz, M.T., Cordeiro, N.D.S., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M.P.M., Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study, part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 3581-3589 (2004).
- Fox, K.R., Waring, M.J., Brown, J.R., Neidle, S., DNA sequence preferences for the anti-cancer drug mitoxanthrone and related anthraquinones revealed by DNase I footprinting, *FEBS Lett.*, 202(2), 289-294 (1986).
- Fortini, P., Di Marzio, P., Guarrera, P.M., Iorizzi, M., Ethnobotanical study on the medicinal plants in the Mainarde Mountains (central-southern Apennine, Italy), *J. Ethnopharmacol.*, 184, 208-218 (2016).
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neural red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.*, 160(2), 171-177 (2006).
- Fuchs, D., Piller, R., Linseisen, J., Daniel, H., Wenze, U., The human peripheral blood mononuclear cell proteome responds to a dietary flaxseed-intervention and proteins identified suggest a protective effect in atherosclerosis, *Proteomics*, 7(18), 3278-3288 (2007).
- Gabbanini, S., Lucchi, E., Guidugli, F., Matera, R., Valgimigli, L., Anomeric discrimination and rapid analysis of underivatized lactose, maltose, and sucrose in vegetable matrices by U-HPLC-ESI-MS/MS using porous graphitic carbon, *J. Mass. Spectrom.*, 45, 1012-1018 (2010).
- Gagne, F., Oxidative stress, In: *Biochemical ecotoxicology*, F. Gagne (Eds), Bölüm 6, Academic Press, Tokyo, 103-115 (2014).
- Galluzzi, L., Aaronson, S., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D., Baehrecke, E., Bazan, N., Blagosklonny, M., Blomgren, K., Borner, C., Guidelines for the use and

interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes, *Cell Death Differ.*, 16(8), 1093-1107 (2009).

Gan, L.S., Yang, S.P., Fan, C.Q., Yue, J.M., Lignans and their degraded derivatives from *Sarcostemma acidum*, *J. Nat. Prod.*, 68(2), 221-225 (2005).

Gao, H.Y., Wu, L.J., Kuroyanagi, M., Harada, K., Kawahara, N., Nakane, T., Umehara, K., Hirasawa, A., Nakamura, Y., Antitumor-promoting constituents from *Chaenomeles sinensis* KOEHNE and their activities in JB6 mouse epidermal cells, *Chem. Pharm. Bull.*, 51(11), 1318-1321 (2003).

Garcia-Ayllon, M.S., Saez-Valero, J., Piqueras-Perez, C., Vidal, C.J., *Neurosci. Lett.*, 274, 56-60 (1999).

Garcia-Llatas, G., Rodriguez-Estrada, M.T., Current and new insights on phytosterol oxides in plant sterol-enriched food, *Chem. Phys. Lipids*, 164, 607-624 (2011).

Garcia-Salas, P., Gomez-Caravaca, A.M., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Identification and quantification of phenolic compounds in diverse cultivars of eggplant grown in different seasons by high-performance liquid chromatography coupled to diode array detector and electrospray-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, *Food Res. Int.*, 57, 114-122 (2014).

Gellerstedt, G., Lundquist, K., Wallis, A.F.A, Zhang, L., Revised structures for neolignans from *Arum italicum*, *Phytochem.*, 40(1), 263-265 (1995).

Genç, G.E., Özhatay, N., An ethnobotanical study in Çatalca (European part of İstanbul) II, *Turk. J. Pharm. Sci.*, 3(2), 73-89 (2006).

Giacobini, E., Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: from tacrine to future applications, *Neurochem. Int.*, 32, 413-419 (1998).

Gonzalez, A.L., Roberts, R.L., Massion, P.P., Olson, S.J., Shyr, Y., Shappell, S.B., 15-Lipoxygenase-2 expression in benign and neoplastic lung: an immunohistochemical study and correlation with tumor grade and proliferation, *Hum. Pathol.*, 35(7), 840-849 (2004).

Gordaliza, M., Natural products as leads to anticancer drugs, *Clin. Transl. Oncol.*, 9, 767-776 (2007).

Grauso, L., Mariggio, S., Corda, D., Fontana, A., Cutignano, A., An improved UPLC-MS/MS platform for quantitative analysis of glycerophosphoinositol in mammalian cells, *PLOS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0123198 (2015).

Gregor, J.I., Kilian, M., Heukamp, I., Kiewert, C., Kristiansen, G., Schimke, I., Walz, M.K., Jacobi, C.A., Wenger, F.A., Effects of selective COX-2 and 5-LOX inhibition on prostaglandin and leukotriene synthesis in ductal pancreatic cancer in Syrian hamster, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73, 89-97 (2005).

Guarrera, P.M., Forti, G., Marignoli, S., Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy), *J. Ethnopharmacol.*, 96, 429-444 (2005).

- Guarrera, P.M., Salerno, G., Caneva, G., Food, flavouring and feed plant traditions in the Tyrrhenian sector of Basilicata, Italy, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 2(37), doi:10.1186/1746-4269-2-37, syf 1-6 (2006).
- Güleş, Ö., Eren, Ü., Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78 (2008).
- Güngör, N., Antioksidanlara duyarlı soy metal nanoparçacık esaslı yeni sensörler geliştirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2014).
- Güran Ş., Kanserden Korunma, *Gülhane Tıp Dergisi*, 47, 324-326 (2005).
- Hai-Yun, S., Fu-Jing, L. Sheng-Tao, Z., Qing-Gang, W., Shu-Tian, Z., Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 supresses esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Lett.*, 309, 19-26 (2011).
- Halevy, A.H., *Handbook of flowering VI*, CRC Press, Florida, 53, 1989.
- Han, M.H., Yang, X.W., Zhong, G.Y., Zhang, M., Bioactive constituents inhibiting TNF-alpha production in fresh rhizome of *Pinellia ternata*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 32(17), 1755-1759 (2007).
- Hayashi, Y., Nishikawa, Y., Mori, H., Tamura, H., Matsushita, Y.-I., Matsui, T., Antitumor activity of (10*E*, 12*Z*)-9-Hydroxy-10,12-octadecadienoic acid from rice bran, *J. Ferment. Bioengineer.*, 86(2), 149-153 (1998).
- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., Bioactivity of phenolic acids: metabolites versus parent compounds: a review, *Food Chem.*, 173, 501-513 (2015).
- Hoefnagel, M.H.N., Wiskich, J.T., Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate, *Arch. Biochem. Biophys.*, 355(2), 262-270 (1998).
- Hoefnagel, M.H.N., Rich, P.T., Zhang, Q., Wiskich, J.T., Substrate kinetics of the plant mitochondrial alternative oxidase and the effects of pyruvate, *Plant Physiol.*, 115, 1145-1153 (1997).
- Holst-Hansen, C., Brunner, N., MTT-cell proliferation assay in cell biology, a laboratory handbook, 1(2), 16-18 (1998).
- Hossain, M., Rai, D., Brunton, N., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., Characterization of phenolics composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, 58(19), 10576–10581 (2010).
- Hosseinian, F.S., Muir, A.D., Westcott, N.D., Krol, E.S., AAPH-mediated antioxidant reactions of secoisolariciresinol and SDG, *Org. Biomol. Chem.*, 5(4), 644-654 (2007).
- Hu, C., Yuan, Y.V., Kitts, D.D., Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone *in vitro*, *Food Chem. Toxicol.*, 45(11), 2219-2227 (2007).

- Hudaib, M., Mohammad, M., Bustanji, Y., Tayyem, R., Yousef, M., Abuirjeie, M., Aburjai, T., Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan, Mujib Nature Reserve and surrounding area, *J. Ethnopharmacol.*, 120, 63–71 (2008).
- Huiss, R., Morreel, K., Fliniaux, O., Lucau-Danila, A., Fenart, S., Grec, S., Neutelings, G., Chabbert, B., Mesnard, F., Boerjan, W., Hawkins, S., Natural Hypolignification Is Associated with Extensive Oligolignol Accumulation in Flax Stems, *Plant Physiol.*, 158, 1893–1915 (2012).
- Husein, A.I.A., Modification of biologically active compounds from selected medicinal plants in Palaestine, Master Thesis, An-Najah National University, Department of Chemistry and Department of Biology and Biotechnology, Nablus, Palestine (2010).
- Hyde, C.A.C., Missailidis, S., Inhibition of arachidonic acid metabolism and its implication on cell proliferation and tumour-angiogenesis, *Int. Immunopharmacol.*, 9, 701-715 (2009).
- İbrahim, R.M., El-Halawany, A.M., Saleh, D.O., El Naggat, M.B., El-Shabrawy, A.R.O., El-Hawary, S.S., HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25, 134-141 (2015).
- Ito, T., van Kutlenburg, A.B.P., Bootsma, A.H., Haasnoot, A.J., van Cruchten, A., Wada, Y., van Gennip, A.H., Rapid screening of high risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-Electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips, *Clin. Chem.*, 46(4), 445-452 (2000).
- Ivancheva, S., Stantcheva, B., Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria, *J. Ethnopharmacol.*, 69, 165–172 (2000).
- Janakat, S., Al-Thnaibat, O., Antilipoperoxidative effect of three edible plants extracts: *Viscum album*, *Arum dioscoridis* and *Eminium spiculatum*, *J. Food Qual.*, 31, 1-12 (2008).
- Jasmine, S., Srivastava, R.S., Singh, S.K., Hepatoprotective effect of crude extract and isolated lignans of *Justicia simplex* against CCl₄-induced hepatotoxicity, *Pharm. Biol.*, 45(4), 274-277 (2007).
- Jeong, G.S., Kwon, O.K., Park, B.Y., Oh, S.R., Ahn, K.S., Chang, M.J., Oh, W.K., Kim, J.C., Min, B.S., Kim, Y.C., Lee, H.K., Lignans and coumarins from the roots of *Anthriscus sylvestris* and their increase of caspase-3 activity in HL-60 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 30(7), 1340-1343 (2007).
- Jimenez-Sanchez, C., Lozano-Sanchez, J., Rodriguez-Perez, C., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Comprehensive, untargeted, and qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS² metabolite profiling of green asparagus (*Asparagus officinalis*), *J. Food Comp. Anal.*, 46, 78–87 (2016).
- Jin, J.E., Y.K., Son, Min, B.-S., Jung, H.A., Choi, J.S., Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots, *Arch. Pharm. Res.*, 35(5), 823-837 (2012).

- Jin, J.S., Zhao, Y.F., Nakamura, N., Akao, T., Kakiuchi, N., Hattori, M., Isolation and characterization of a human intestinal bacterium, *Eubacterium* sp. ARC-2, capable of demethylating arctigenin, in the essential metabolic process to enterolactone, *Biol. Pharm. Bull.*, 30(5), 904-911 (2007).
- Kaileh, M., Berghe, W.V., Boone, E., Essawi, T., Haegeman, G., Screening of indigenous palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity, *J. Ethnopharmacol.*, 113, 510–516 (2007).
- Kalac, P., Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man, *J. Appl. Biomed.*, 7, 65-74 (2009).
- Kampa, M., Alexaki, V., Notas, G., Nifli, A., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E., Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action, *Breast Cancer Res.*, 6, 63-74 (2004).
- Kanamaru, T., Kamimura, N., Yokota, T., Iuchi, K., Nishimaki K., Takami, S., Akashiba, H., Shitaka, Y., Katsura K., Kimura K., Ohta, S., Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 587, 126-131 (2015).
- Kandemir, N., Ordu çevresinde yayılış gösteren *Arum* L. (Araceae) cinsinin bazı türleri üzerinde morfolojik ve anatomik incelemeler, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 1(2), 37-43 (2008).
- Kang, K.-H., Liou, H.-H., Hour, M.-J., Liou, H.-C., Protection of dopaminergic neurons by 5-lipoxygenase inhibitör, *Neuropharmacol.*, 73, 380-387 (2013).
- Kara, A., Resveratrolün meme kanseri hücre kültüründeki p53 aracılı apoptoz aktivasyonunun ve sitotoksitesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), immünohistokimya ve MTT yöntemleriyle araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye (2012).
- Karabudak, K., *Arum italicum* bitkisinin genotoksik etkisinin değerlendirilmesi, Y. Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, Türkiye (2013).
- Karaca, T.D., İnsan meme kanseri hücre kültüründe *Nerium oleander* bitkisinden elde edilen ekstraktların antikanserojen etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye (2008).
- Kendir, G., Güvenç, A., Etnobotanik ve Türkiye'de yapılmış etnobotanik çalışmalara genel bir bakış, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 30(1), 49-80 (2010).
- Kepekçi, R.A., *Spirulina platensis*'in antioksidan üretiminin indüklenmesi ve karaciğer koruyucu etkisinin incelenmesi, Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep, Türkiye (2011).
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., Kroemer, G., Cell death assays for drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10(3), 221-237 (2011).

- Khadem, S., Marles, R.J., Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies, *Molecules*, 15, 7985-8005 (2010).
- Khalil, A., Dababneh, B.F., Al-Gabbiesh, A.H., Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal Jordanian plants, *J. Food Agric. Environ.*, 7(2), 103-106 (2009).
- Khlil-Drori, A.J., Ariel, A., 15-Lipoxygenases in cancer: a double-edged sword, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 106, 16-22 (2013).
- Khodzhaeva, M.A., Ismailov, Z.F., Glucomannan from *Arum korolkovii*, *Khim. Prir, Soedin*, 5, 577-580 (1976).
- Kılıksız, S., Demirel, C., Oksidatif stres, radyasyona bağlı hasar ve radyokoruyucu olarak *n*-asetil-sistein'in potansiyel rolü, *Türk Onkoloji Dergisi*, 23(4), 200-207 (2008).
- Kılıç, A., Kardiyak sendrom X'li hastalarda total antioksidan kapasite ve global sol ventrikül performansının değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi*, Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye (2013).
- Kikuzaki, H., Kayano, S., Fukutsuka, N., Aoki, A., Kasamatsu, K., Yamasaki, Y., Mitani, T., ve Nakatani, N. Abscisic acid related compounds and lignans in prunes (*Prunus domestica* L.) and their oxygen radical absorbance capacity (ORAC), *J. Agric. Food Chem.*, 52(2), 344-349 (2004).
- Kim, H., Roh, H., Lee, H.J., Chung, S.Y., Choi, S.O., Lee, K.R., Han, S.B., Etermination of phloroglucinol in human plasma by high performance liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chrom. B*, 792, 307-312 (2003).
- Kinghorn, A.D., Plant secondary metabolites as potential anticancer agents and cancer chemopreventives, *Molecules*, 5, 285-288 (2000).
- Koleva, M., Acetylosis of glucomannan M2, isolated from the tubers of *Arum maculatum* L., *Probl. Pharm.*, 11, 58-63 (1983).
- Koleva, M., Kolev, D., Achtardzhieff, Ch., Studies on the chemical structure of glucomannans from tubers of *Arum orientale* M.B. and *Arum maculatum* L., *Pharmazie*, 35(11), 712 (1980).
- Koleva, M., Partial acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis of glucomannan M2 from tubers of *Arum maculatum* L., *Pharmazie*, 36(7), 505-506 (1981).
- Koleva, M., Polyphenol composition of *Arum orientale* M.B., *Probl. Pharm.*, 12, 35-38 (1984).
- Koolen, H.H.F., da Silva, F.M.A., Gozzo, F.C., de Souza A.Q.L., de Souza A.D.L., Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS, *Food Res. Int.*, 51, 467–473 (2013).
- Koparal, A.T., Hücrelerdeki transformasyon gelişiminin moleküler yöntemlerle belirlenmesi, *Doktora Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2001).

- Korkmaz, Ş., MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre soylarında zeytin yaprağı ekstresinin anti-kanser ilaçlarla kombinasyonunun araştırılması, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye (2012).
- Kritchevsky, D., Chen, S.C., Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review, *Nutr. Res.*, 25, 413–428 (2005).
- Kucukboyaci, N., Sener, B. Biological activities of lignans from *Taxus baccata* L. growing in Turkey, *J. Med. Plants Res.*, 4(12), 1136-1140 (2010).
- Kuhnle, G.G.C., Dell'Aquila, C., Aspinall, S.M., Runswick, S.A., Joosen, A.M.C. P., Mulligan, A.A., Bingham, S.A., Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC-MS and (¹³C)-labelled standards, *Food Chem.*, 116(2), 542-554 (2009).
- Kumar, N., Kumar, R., Nanomedicine for cancer treatment, nanotechnology and nanomaterials in the treatment of life-threatening diseases, William Andrew Publishing, Oxford, 177-246, 2014.
- Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D., Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity, *Phytother. Res.*, 21, 615-621 (2007).
- Kuhn, H., Thiele, B.J., The diversity of the lipoxygenase family, many sequence data but little information on biological significance, *FEBS Lett.*, 449, 7-11 (1999).
- Kupeli, E., Erdemoglu, N., Yesilada, E., Sener, B., Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L, *J. Ethnopharmacol.*, 89(2-3), 265-270 (2003).
- Kültür, Ş., Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey), *J. Ethnopharmacol.*, 111, 341–364 (2007).
- La Rocca, N., Rascio, N., Pupillo, P., Variegation in *Arum italicum* leaves, a structural-functional study, *Plant Phys. Biochem.*, 49, 1392-1398 (2011).
- Lagarda, M.J., Garcia-Llatas, G., Farre, R., Analysis of phytosterols in foods, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 1486–1496 (2006).
- Lambert, J.D., Dorr, R.T., Timmermann, B.N., Nordihydroguaiaretic acid: A review of its numerous and varied biological activities, *Pharm. Biol.*, 42(2), 149-158 (2004).
- Lan, W., Lu, F., Regner, M., Zhu, Y., Rencoret, J., Ralph, S.A., Zakai, U.I., Morreel, K., Boerjan, W., Ralph, J., Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification, *Plant Physiol.*, 167, 1284-1295 (2012).
- Latowski, D., Szymanska, R., Strzalka, K., Carotenoids involved in antioxidant system of chloroplasts, In: *Oxidative damage to plants: antioxidant networks and signaling*, P. Ahmad (Ed.), Academic Press, Bölüm 9, 289-319 (2014).
- Lee, C.P., Yen, G.C., Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil, *J. Agric. Food Chem.*, 54(3), 779-784 (2006).

- Levandi, T., Püssa, T., Vaher, M., Ingver, A., Koppel, R., Kaljurand, M., Principal component analysis of HPLC–MS/MS patterns of wheat (*Triticum aestivum*) varieties, *Proc. Est. Acad. Sci.*, 63, 1, 86–92 (2014).
- Levison, B.S., Zhang, R., Wang, Z., Fua, X., DiDonato, J.A., Hazen, S.L., Quantification of fatty acid oxidation products using on-line high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Free Radic. Biol. Med.*, 59, 2-13 (2013).
- Li, L., Cheng, X.F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S.A., Chiang, V.L., The last step of syringyl monolignol biosynthesis in Angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase, *Plant Cell*, 13, 1567-1585 (2001).
- Li, N., Liu, C., Mi, S., Wang, N., Zheng, X., Li, Y., Huang, X., He, S., Chen, H., Xu, X., Simultaneous determination of oleanolic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, kaempferol and quercetin in rat plasma by LC-MS-MS and application to a pharmacokinetic study of *Oldenlandia diffusa* extract in rats, *J. Chrom. Sci.*, 50(10), 885-92 (2012).
- Li, Y., Liu, Y., Liu, R., Liu, S., Zhang, X., Wang, Z., Zhang, J., Lu, J., HPLC-LTQ-orbitrap MSⁿ profiling method to comprehensively characterize multiple chemical constituents in xiao-er-qing-jie granules, *Anal. Methods*, 7, 7511-7526 (2015).
- Li, Y.S., Wang, Z.T., Zhang, M., Luo, S.D., Chen, J.J., A new pinoresinol-type lignan from *Ligularia kanaitizensis*, *Nat. Prod. Res.*, 19(2), 125-129 (2005).
- Li, W., Qiu, Y., Patterson, C.A., Beta, T., The analysis of phenolic constituents in glabrous canaryseed groats, *Food Chem.*, 127, 10–20 (2011).
- Lim, J.S., Adachi, Y., Takahashi, Y., Ide, T., Comparative analysis of sesame lignans (sesamin and sesamol) in affecting hepatic fatty acid metabolism in rats, *Br. J. Nutr.*, 97(1), 85-95 (2007).
- Lima, L.M., Perazzo, F.F., Carvalho, J.C.T., Bastos, J.K., Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark, *J. Pharm. Pharmacol.*, 59(8), 1151-1158 (2007).
- Lindahl, G., Saarinen, N., Abrahamsson, A., Dabrosin, C., Tamoxifen, flaxseed, and the lignan enterolactone increase stroma- and cancer cell-derived IL-1Ra and decrease tumor angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer, *Cancer Res.*, 71(1), 51-60 (2011).
- Llorent-Martinez, E.J., Spinola, V., Gouveia, S., Castilho, P.C., HPLC-ESI-MSⁿ characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*, *Indust. Crops Prod.*, 69, 80-90 (2015).
- Luczaj, L., Dolina, K., A hundred years of change in wild vegetable use in Southern Herzegovina, *J. Ethnopharmacol.*, 166, 297–304 (2015).
- Mabrok, H.B., Klopffleisch, R., Ghanem, K.Z., Clavel, T., Blaut, M., Loh, G., Lignan transformation by gut bacteria lowers tumor burden in a gnotobiotic rat model of breast cancer, *Carcinogenesis*, 33(1), 203-208 (2012).
- Magedov, I.V., Manpadi, M., Rozhkova, E., Przheval'skii, N.M., Rogelj, S., Shors, S.T., Steelant, W.F.A., Van Slambrouck, S., Kornienko, A., Structural

- simplification of bioactive natural products with multicomponent synthesis: dihydropyridopyrazole analogues of podophyllotoxin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(5), 1381-1385 (2007).
- Majumder, P., Mondal, H.A., Das, S., Insecticidal activity of *Arum maculatum* tuber lectin and its binding to the glycosylated insect gut receptors, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 6725-6729 (2005).
- Manev, H., Chen, H., Dzitoyeva, S., Manev, R., Cyclooxygenases and 5-lipoxygenase in Alzheimer's disease, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35, 315-319 (2011).
- Marangoni, F., Poli, A., Phytosterols and cardiovascular health, *Pharmacol. Res.*, 61, 193-199 (2010).
- Marc, E.B., Nelly, A., Annick, D.-D., Frederic, D., Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon, *J. Ethnopharmacol.*, 120, 315-334 (2008).
- Maruyama, M., Yamauchi, S., Akiyama, K., Sugahara, T., Kishida, T., Koba, Y. Antibacterial activity of a virgatusin-related compound, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(3), 677-680 (2007).
- Masoud, S.T., Vecchio, L.M., Bergeron, Y., Hossain, M.M., Nguyen, L.T., Bermejo, M.K., Kile, B., Sotnikova, T.D., Siesser, W.B., Gainetdinov, R.R., Wightman, R.M., Caron, M.G., Richardson, J.R., Miller, G.W., Ramsey, A.J., Cyr, M., Salahpour, A., Increased expression of the dopamine transporter leads to loss of dopamine neurons, oxidative stress and L-DOPA reversible motor deficits, *Neurobiol. Dis.*, 74, 66-75 (2015).
- Masuda, T., Akiyama, J., Fujimoto, A., Yamauchi, S., Maekawa, T., Sone, Y., Antioxidation reaction mechanism studies of phenolic lignans, identification of antioxidation products of secoisolariciresinol from lipid oxidation, *Food Chem.*, 123(2), 442-450 (2010).
- Mathew, C.Y., Pinoresinol: a potential biological warrior in edible foods, *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.*, 1(1), 44-47 (2015).
- McCann, S.E., Kulkarni, S., Trevisan, M., Vito, D., Nie, J., Edge, S.B., Muti, P., Freudenheim, J.L., Dietary lignan intakes and risk of breast cancer by tumor estrogen receptor status, *Breast Cancer Res. Treat.*, 99(3), 309-311 (2006).
- Mehta, M., Adem, A., Sabbagh, M., New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Int. J. Alzheimer's Dis.*, doi:10.1155/2012/728983 (2012).
- Mei, Y., Thompson, M.D., Cohen, R.A., Tong, X.Y., Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1852, 243-251 (2015).
- Mekha, R.I., Shobha, C.U., Rajeshwari, B.A., Aging and arthritis: oxidative stress and antioxidant effects of herbs and spices, In: aging: oxidative stress and dietary antioxidants, V. Preedy (Eds.), Academic Press, London, 233-245 (2014).
- Mendez, M., Diaz, A., Flowering dynamics in *Arum italicum* (Araceae): relative role of inflorescence traits, flowering synchrony, and pollination context on fruit initiation, *Am. J. Bot.*, 88(10), 1774-1780 (2001).

- Mendez, M., Modification of phenotypic and functional gender in the monoecious *Arum Italicum* (Araceae), *Am. J. Bot.*, 85(2), 225-234 (1998).
- Mendez, M., Sexual mass allocation in species with inflorescences as pollination units: a comparison between *Arum italicum* and *Arisaema* (Araceae), *Am. J. Bot.*, 88(10), 1781-1785 (2001).
- Meng, Z., Cao, R., Yang, Z., Liu, T., Wang, Y.Z., Wang, X., Inhibitor of 5-Lipoxygenase, zileuton, suppresses prostate cancer metastasis by upregulating e-cadherin and paxillin, *Urology*, 82(6) , 1452.e7 - 1452.e14 (2013).
- Mincsovics, E., Ott, P.G., Alberti, A., Böszörményi, A., Hethelyi, E.B., Szöke, E., Kery, A., Moricz, E.L.E.A.M., *In-situ* clean-up and OPLC fractionation of chamomile flower extract to search active components by bioautography, *J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC*, 26, 172-179 (2013).
- Miura, D., Saarinen, N.M., Miura, Y., Santti, R., Yagasaki, K., Hydroxymatairesinol and its mammalian metabolite enterolactone reduce the growth and metastasis of subcutaneous AH109A hepatomas in rats, *Nutr. Cancer Int. J.*, 58(1), 49-59 (2007).
- Mogana, R., Teng-Jin, K., Wiart, C., Anti-Inflammatory, anticholinesterase, and antioxidant potential of scopoletin isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth), *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, doi:10.1155/2013/734824 (2013).
- Moheb, A., Biochemical, molecular and pharmacological studies of the wheat (*Triticum aestivum* L.) flavone, tricetin, Doktora Tezi, Concordia Üniversitesi, Kimya ve Biyokimya Anabilim Dalı, Kanada, Montreal, syf 12-13 (2012).
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D., Hicks, K.B., Phytosterols, phytosteranols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses, *Prog. Lipid Res.*, 41, 457–500 (2002).
- Mrsny, R., Cancer cell biology, In: biomaterials for cancer therapeutics, diagnosis, prevention and therapy, K. Park (Eds), Woodhead Publishing, Cambridge, 20-30 (2013).
- Nabeel, M., Abderrahman, S., Papini, A., Cytogenetic Effect of *Arum maculatum* extract on the bone marrow cells of mice, *Caryologia*, 61(4), 383-387 (2008).
- Nadeem, N., Woodside, J.V., Kelly, S., Allister, R., Young, I.S., McEneny, J., The two faces of α - and γ -tocopherols: an *in vitro* and *ex vivo* investigation into VLDL, LDL and HDL oxidation, *J. Nutr. Biochem.*, 23, 845–851 (2012).
- Nahrstedt, A., Triglochinin in Araceen, *Phytochem.*, 14(12), 2627-2628 (1975).
- Neuhaus, O., Kieseier, B.C., Hartung, H.-P., Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis, *Pharmacol. Ther.*, 109, 198-209 (2006).
- Nirmala, M.J., Samundeeswari A., Deepa Sankar P., Natural plant resources in anti-cancer therapy-a review, *Res. Plant Biol.*, 1(3), 01-14 (2011).
- Olin, J., Schneider, J., Galantamine for dementia due to Alzheimer's disease, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 3, doi: 10.1002/14651858.CD001747 (2002).

- Oliw, E.H., Wennman, A., Hoffmann, I., Garscha, U., Hamberg, M., Jerneren, F., Stereoselective oxidation of regioisomeric octadecenoic acids by fatty acid dioxygenases, *J. Lipid Res.*, 52, 1995–2004 (2011).
- Ou, S., Kwok, K.-C., Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1261–1269 (2004).
- Oyaizu, M., Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction, *Jpn. J. Nutr.*, 44, 307-315 (1986).
- Özer, Ö.H.E., Alzheimer hastalığında oluşan β -amiloid fibrillerin yeni sentezlenen kolinesteraz inhibitörleri ile destabilizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2012).
- Özhatay, N., Koçak, S., Plants used for medicinal purposes in Karaman province (Southern Turkey), *İstanbul Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41, 75-89 (2011).
- Özkay, D.Ü., Can, Ö.D., Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 109, 23-30 (2013).
- Özudoğru, B., Akaydın, G., Erik, S., Yesilada, E., Inferences from an ethnobotanical field expedition in the selected locations of Sivas and Yozgat provinces (Turkey), *J. Ethnopharmacol.*, 137, 85–98 (2011).
- Paiva, L.B., Goldbeck, R., Santos, W.D., Squina, F.M., Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 49(3), 395-411 (2013).
- Pan, L., Chai, H., Kinghorn, A.D., The continuing search for antitumor agents from higher plants, *Phytochem Lett.*, 3(1), 1-8 (2010).
- Pantaleoni, L., Ferroni, L., Baldisserotto, C., Aro, E.V., Pancaldi, S., Photosystem II organisation in chloroplasts of *Arum italicum* leaf depends on tissue location, *Planta*, 230, 1019-1031 (2009).
- Panwar, R., Sharma, A.K., Kaloti, M., Dutt, D., Pruthi, V., Characterization and anticancer potential of ferulic acid-loaded chitosan nanoparticles against ME-180 human cervical cancer cell lines, *Appl. Nanosci.*, doi: 10.1007/s13204-015-0502-y (2015).
- Parlar, S., Potansiyel anti-Alzheimer 1,4-dihidropiridin türevleri üzerinde sentez ve biyoaktivite çalışmaları, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye (2012).
- Penttinen-Damdimopoulou, P.E., Power, K.A., Hurmerinta, T.T., Nurmi, T., van der Saag, P.T., Makela, S.I., Dietary sources of lignans and isoflavones modulate responses to estradiol in estrogen reporter mice, *Mol. Nutr. Food Res.*, 53(8), 996-1006 (2009).
- Penumathsa, S.V., Koneru, S., Thirunavukkarasu, M., Zhan, L.J., Prasad, K., Maulik, N., Secoisolariciresinol diglucoside: Relevance to angiogenesis and cardioprotection against ischemia-reperfusion injury, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 320(2), 951-959 (2007).

- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P., McCullough, M. L., Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction, *Nutr. Rev.*, 68(10), 571-603 (2010).
- Picone, P., Nuzzo, D., di Carlo, M., Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric α -beta on sea urchin embryo, *Biol. Bull.*, 224, 18–28 (2013).
- Pieroni, A., Quave, C.L., Santoro, R.F., Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy, *J. Ethnopharmacol.*, 95, 373–384 (2004).
- Polat, R., Cakilcioglu, U., Satil, F., Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl- Turkey), *J. Ethnopharmacol.*, 148, 951–963 (2013).
- Ponchet, M., Martin-Tanguy, J., Marais, A., Martin, C., Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescences of some Araceae species, *Phytochem.*, 21(12), 2865-2869 (1982).
- Power, K.A., Thompson, L.U., Can the combination of flaxseed and its lignans with soy and its isoflavones reduce the growth stimulatory effect of soy and its isoflavones on established breast cancer, *Mol. Nutr. Food Res.*, 51(7), 845-856 (2007).
- Prasad, K., Flax lignan complex slows down the progression of atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 14(1), 38-48 (2009).
- Prasad, N.R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., Reddy, B.V., Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line, *Mol. Cell Biochem.*, 349, 11–19 (2011).
- Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K., Henderson, B.E., Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model of carcinogenesis, *Environ. Health Persp.*, 101(Suppl 5), 137-138 (1993).
- Prieto, M.A., Rodriguez-Amado, I., Vazquez, J.A., Murado, M.A., β -Carotene assay revisited, application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate, *J. Agric. Food Chem.*, 60, 8983-8993 (2012).
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerre-Tugaye, M.-T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., Fournier, J., Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens, *Plant Physiol.*, 139, 1902-1913 (2005).
- Pusztai, R., Abrantes, M., Shely, J., Duarte, N., Molnar, J., Ferreira, M.-J.U., Antitumor-promoting activity of lignans: inhibition of human cytomegalovirus IE gene expression, *Anticancer Res.*, 30, 451-454 (2010).
- Putchala, M.C., Ramani, P., Sherlin, H.J., Premkumar, P., Natesan, A., Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy fortumours of oral cavity – A systematic review, *Arch. Oral Biol.*, 58, 563-574 (2013).
- Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., Bennett, B.C., Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Ethnopharmacol., 118, 418–428 (2008).
- Quilez, J., Garcia-Lorda, P., Salas-Salvado, J., Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions, Clin. Nutr., 22(4), 343–351 (2003).
- Radmark, O., Werz, O., Steinhilber, D., Samuelsson, B., 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease, Biochim. Biophys. Acta, doi: 10.1016/j.bbali.2014.08.012 (2014).
- Rahman, M.A., Katayama, T., Suzuki, T., Nakagawa, T., Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* I: isolation and stereochemistry of syringyl lignans and predicted precursors to (+)-lyoniresinol from wood, J. Wood Sci., 53(2), 161-167 (2007).
- Ravi, S., Sadashiva, C.T., Tamizmani, T., Balasubramanian, T., Rupeshkumar, M., Balachandran, I., *In vitro* glucose uptake by isolated rat hemi-diaphragm study of *Aegle marmelos* Correa root, Bangl. J. Pharmacol., 4, 65-68 (2009).
- Reddy, N.P., Aparoy, P., Reddy, T.C.M., Achari, C., Sridhar, P.R., Reddanna, P., Design, synthesis, and biological evaluation of prenylated chalcones as 5-LOX inhibitors, Bioorg. Med. Chem., 18, 5807–5815 (2010).
- Reid, G.A., Chilukuri, N., Darvesh, S., Butyrylcholinesterase and the cholinergic system, Neurosci., 234, 53–68 (2013).
- Ribeiro, D., Freitas, M., Tome, S.M., Silva, A.M.S., Porto, G., Cabrita, E.J., Margues, M.M.B., Fernandes, E., Inhibition of LOX by flavonoids: a structure - activity relationship study, Eur. J. Med. Chem., 72, 137-145 (2014).
- Ricci, A., Fiorentino, A., Piccolella, S., Golino, A., Pepi, F., D'Abrosca, B., Letizia, M., Monaco, P., Furofuranic glycosylated lignans: a gas-phase ion chemistry investigation by tandem mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom., 22, 3382–3392 (2008).
- Ricci, S., Phytoestrogens: characterization and biological effects, Doktora Tezi, Tuscia University, Ekoloji ve Biyoloji Departmanı, Viterbo, İtalya (2012).
- Rocha, L.D., Monteiro, M.C., Teodoro, A.J., Anticancer properties of hydroxycinnamic acids- a review, Cancer Clin. Oncol., 1(2), 109-121 (2012).
- Roleira, F.M.F., Tavares-da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J., Borges, F., Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties, Food Chem., 183, 235-258 (2015).
- Rosa, L.S., Silva, N.J.A., Soares, N.C.P., Monteiro, M.C., Teodoro, A.J., Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer, J. Nutr. Food Sci., 6(2), doi:10.4172/2155-9600.1000468 (2016).
- Rosendahl, A.H., Perks, C.M., Zeng, L., Markkula, A., Simonsson, M., Rose, C., Ingvar, C., Holly, J.M.P., Jernström H., Caffeine and caffeic acid inhibit growth and modify estrogen receptor and insulin-like growth factor I receptor levels in human breast cancer, Clin. Cancer Res., 21(8), 1877-1887 (2015).

- Saad, B., Azaizeh, H., Said, O., Tradition and perspectives of arab herbal medicine: a review, *eCAM*, 2(4), 475–479 (2005).
- Saarinen, N.M., Warri, A., Airio, M., Smeds, A., Makela, S., Role of dietary lignans in the reduction of breast cancer risk, *Mol. Nutr. Food Res.*, 51(7), 857-866 (2007).
- Saez-Valero, J., Poza-Cisneros, G., Vidal, C.J., Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma, *Neurosci. Lett.*, 206, 173-176 (1996).
- Saez-Valero, J., Vidal, C.J., Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma, *Biochim. Biophys. Acta*, 1317, 210-218 (1996).
- Safalı, M., Gedikoğlu, G., Celasun, B., Finci R., Flow cytometry/akım sitometrisinin patolojideki yeri, *Ankara Patoloji Bülteni*, 9(1), 92-106 (1992).
- Saggar, J.K., Chen, J.M., Corey, P., Thompson, L.U., The effect of secoisolariciresinol diglucoside and flaxseed oil, alone and in combination, on MCF-7 tumor growth and signaling pathways, *Nutr. Cancer Int. J.*, 62(4), 533-542 (2010).
- Sağlık, S., Alpınar K., İmre S., Fatty acid composition of the seed oil of *Arum italicum* Miller, *J. Food Lipids*, 9, 95-103 (2002).
- Said, M.N.K., *In vitro* evaluation of the apoptotic and antimitotic (cytostatic) effects of *Arum palaestinum* and *Peganum harmala*, Master Thesis, Degree of Master of Science in Biology, Faculty of Graduate Studies, An-Najah National University, Nablus, Palestine (2013).
- Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H., Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region, *J. Ethnopharmacol.*, 83, 251-265 (2002).
- Sakalem, M.E., Negri, G., Tabach, R., Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus, *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22(6), 1219-1232 (2012).
- Sarveswaran, S., Thamilselvan, V., Brodie, C., Ghosh, J., Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in prostate cancer cells via down-regulation of protein kinase C-epsilon, *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 2108–2117 (2011).
- Satake, H., Koyama, T., Bahabadi S.E., Matsumoto, E., Ono, E., Murata, J., Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis, *Metabolites*, 5, 270-290 (2015).
- Schmid, P.C., Holman, R.T., Soukup, V.G., 13-Phenyltridecanoic acid in seed lipids of some Aroids, *Phytochem.*, 45(6), 1173-1175 (1997).
- Schroeder, F.C., del Campo, M.L., Grant, J.B., Weibel, D.B., Smedley, S.R., Bolton, K.L., Meinwald, J., Eisner, T., Pinoresinol: a lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 103(42), 15497-15501 (2006).
- Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K., Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing, *Mol. Cell*, 19, 1-13 (2005).

Scott, L.J., Figgitt, D.P., Mitoxantrone, a review of its use in multiple sclerosis, *CNS Drugs*, 18(6), 379-396 (2004).

Serbes, U., HeLa hücre kültürlerinde apoptoz ve moleküler mekanizması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2009).

Shenkenberg, T.D., Von Hoff, D.D., Mitoxantrone: a new anticancer drug with significant clinical activity, *Ann. Intern. Med.*, 105,67 – 81 (1986).

Shoeb, M., Anticancer agents from medicinal plants, *Bangl. J. Pharmacol.*, 1, 35-41 (2006).

Sies, H., Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.*, 4, 180-183 (2015).

Simstein, R., Burow, M., Parker, A., Weldon, C., Beckman, B., Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system, *Exp. Biol. Med.*, 228, 995-1003 (2003).

Singh, A.P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G.S., Pasakdee, S., Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp, *Food Chem.*, 114, 955–961 (2009).

Sok, Dai-Eun, Cui Hui, S., Kim Mee, R., Isolation and bioactivities of furfuran type lignan compounds from edible plants, *Recent Pat. Food Nutr. Agric.*,1(1), 87-95 (2009).

Sonestedt, E., Wirfalt, E. Enterolactone and breast cancer: methodological issues may contribute to conflicting results in observational studies, *Nutr. Res.*, 30(10), 667-677 (2010).

Song, Q., Fischer, N.H., Biologically active lignans and neolignans from *Magnolia* species, *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 43 (6), 211-218 (1999).

Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., Chinou, I., Kassi, E., Karabournioti, S., Moutsatsou, P., Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece, *PLoS ONE*, 9(4), doi: 10.1371/journal.pone.0094860 (2014).

Srivastava, V., Negi, A.S., Kumar, J.K., Gupta, M.M., Khanuja, S.P.S., Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads, *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 5892–5908 (2005).

Srivasta, A., Pitesky, M.E., Steele, P.T., Tobias, H.J., Ferguson, D.P., Horn, J.M., Russell, S.C., Czerwieniec, G.A., Lebrilla, C.B., Gard, E.E., Frank, M., Comprehensive assignment of mass spectral signatures from individual *Bacillus atropheus* spores in matrix-free laser desorption/ionization bioaerosol mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 77, 3315-3323 (2005).

Stagos, D., Amoutzias, G.D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols, *Food Chem. Toxicol.*, 50, 2155–2170 (2012).

Stanimirovic, D., Miletic, I., Miric, M., Stanimirovic, S., Composition and nutritive value of *Arum maculatum* rhizome, *Arh. Farm*, 28(3-4), 230-238 (1978).

- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S., Schell, D., Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*, *Phytochem.*, 108, 35–46 (2014).
- Teklehaymanot, T., Giday M., Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Zegie Peninsula, Northwestern Ethiopia, *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 3(12),1-11 (2007).
- Tetik, F., Civelek, S., Cakilcioglu, U., Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey), *J. Ethnopharmacol.*, 146, 331–346 (2013).
- Theerasin, S., Baker, A.T., Analysis and identification of phenolic compounds in *Dioscorea hispida* Dennst, *As. J. Food Ag-Ind.*, 2(4), 547- 560 (2009).
- Tominaga, S., Nishi, K., Nishimoto, S., Akiyama, K., Yamauchi, S., Sugahara, T., (-)-Secoisolariciresinol attenuates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice, *Food Funct.*, 3(1), 76-82 (2012).
- Topcu, G., Demirkiran, O., Lignans from *Taxus* species, *Bioactive Heterocycl. V*, 11, 103-144 (2007).
- Tong, W.-G., Ding, X.-Z., Adrian, T.E., The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, 942–948 (2002).
- Touillaud, M.S., Thiebaut, A.C.M., Fournier, A., Niravong, M., Boutron-Ruault, M.C., ve Clavel-Chapelon, F., Dietary lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status, *J. Natl. Cancer Inst.*, 99(6), 475-486 (2007).
- Travis, R.C., Spencer, E.A., Allen, N.E., Appleby, P.N., Roddam, A.W., Overvad, K., Johnsen, N.F., Olsen, A., Kaaks, R., Linseisen, J., Boeing, H., Nothlings, U., Bueno-De-Mesquita, H.B., Ros, M.M., Sacerdote, C., Palli, D., Tumino, R., Berrino, F., Trichopoulou, A., Dilis, V., Trichopoulos, D., Chirlaque, M.D., Ardanaz, E., Larranaga, N., Gonzalez, C., Suarez, L.R., Sanchez, M.J., Bingham, S., Khaw, K.T., Hallmans, G., Stattin, P., Rinaldi, S., Slimani, N., Jenab, M., Riboli, E., Key, T.J., Plasma phyto-oestrogens and prostate cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition, *Brit. J. Cancer*, 100(11), 1817-1823 (2009).
- Tuncer, S., Farklı dentin bağlayıcı sistemlerin sitotoksik etkileri, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2010).
- Tuntiwachwuttikul, P., Phansa, P., Pootaeng-On, Y., Taylor, W.C., Chemical constituents of the roots of *Piper sarmentosum*, *Chem. Pharm. Bull.*, 54(2), 149-151 (2006).
- Tuzlacı, E., Erol, M.K., Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta), *Fitoterapia*, 70, 593-610 (1999).
- Tuzlacı, E., Alparslan, D.F., Turkish folk medicinal plants, Part V: Babaeski (Kırklareli), *İstanbul Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39, 11-23 (2007).
- Tuzlacı, E., Aymaz, P.E., Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir), *Fitoterapia*, 72, 323-343 (2001).

Tuzlacı, E., Türkiye bitkileri sözlüğü, Türkçe/Latince-Latince/Türkçe bitki adlarının özel açıklamaları, Alfa, İstanbul, 247-248, 2006.

Türker, A.U., Yıldırım, A.B., Evaluation of antibacterial and antitumor activities of some Turkish endemic plants, *Trop. J.Pharm. Res.*, 12(6), 1003-1010 (2013).

Uğuzlar, H., Maltas E., Yıldız S., Screening of phytochemicals and antioxidant activity of *Arum dioscoridis* seeds, *J. Food Biochem.*, 36, 285–291 (2012).

Ulukaya, E., Acılan, C., Ari, F., İkitimur, E., Yılmaz Y., A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively, *Turk. J. Biochem.*, 36(3), 261–269 (2011).

Uzun, E., Sarıyar, G., Adsersen, A., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoğlu, E., Pırıldar, S., Traditional medicine in Sakarya Province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species, *J. Ethnopharmacol.*, 95, 287–296 (2004).

Üstünes, L., Claeys, M., Laekeman, G., Herman, A.G., Vlietinck, A.J., Ozer, A., Isolation and identification of two isomeric trihydroxy octadecenoic acids with prostaglandin E-like activity from onion bulbs (*Allium cepa*), *Prostaglandins*, 29(5), 847-65 (1985).

Van Damme, J.M., Goossens, K., Smeets, K., Leuven, F.V., Verhaert, P., Peumans, W.J., The major tuber storage protein of Araceae species is a lectin, *Plant Physiol.*, 107, 1147-1158 (1995).

Van Den Bergen, C.W.M., Wagner, A.M., Krab, K., The relationship between elektron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. interplay between quinol-oxidizing and quinone-reducing pathways, *Eur. J. Biochem.*, 226 (3), 1071-1078 (1994).

Varga, Z.V., Giric, Z., Liaudet, L., Hasko, G., Ferdinandy, P., Pacher, P., Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1852, 232–242 (2015).

Velentzis, L.S., Cantwell, M.M., Cardwell, C., Keshtgar, M.R., Leathem, A.J., Woodside, J.V., Lignans and breast cancer risk in pre- and post-menopausal women: meta-analyses of observational studies, *Brit. J. Cancer*, 100(9), 1492-1498 (2009).

Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P.M., Vangelisti, R., A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank, *J. Ethnopharmacol.*, 89, 221–244 (2003).

Vincent, C., Fiancette, R., Donnard, M., Bordessoule, D., Turlure, P., Trimoreau, Denizot, Y., 5-LOX, 12-LOX and 15-LOX in immature forms of human leukemic blasts, *Leuk. Res.*, 32, 1756–1762 (2008).

Wang, P., Henning S.M., Heber D., Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols, *PLoS One*, 5(4), e10202 (2010).

Wang, T., Gong, X., Jiang, R., Li, H., Du, W., Kuang, G., Ferulic acid inhibits proliferation and promotes apoptosis via blockage of PI3K/Akt pathway in osteosarcoma cell, *Am. J. Transl. Res.*, 8(2), 968-980 (2016).

- Wang, Q., Wang, Y.-L., Wang, K., Yang, J.-L., Cao, C.-Y., Polyamine analog TBP inhibits proliferation of human K562 chronic myelogenous leukemia cells by induced apoptosis, *Oncol. Lett.*, 9, 278-282 (2015).
- Wang, W., Zhu, J., Lyu, F., Panigrahy, D., Ferrara, K.W., Hammock, B., Zhang, G., ω -3 Polyunsaturated fatty acids-derived lipid metabolites on angiogenesis, inflammation and cancer, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 113–115, 13–20 (2014).
- Wang, X., Li, W., Ma, X., Chu, Y., Li, S., Guo, J., Jia, Y., Zhou, S., Zhu, Y., Liu, C., Simultaneous determination of caffeic acid and its major pharmacologically active metabolites in rat plasma by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.*, 29, 552–559 (2015).
- Wang, X., Liang, Y., Peng, C., Xie, H., Pan, M., Zhang, T., Ito, Y., Preparative isolation and purification of chemical constituents of *Belamcanda* by MPLC, HSCCC and PREP-HPLC, *J. Liq. Chromat. Relat. Technol.*, 34(4), 241–257 (2011).
- Webb, A.L., McCullough, M.L., Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, *Nutr. Cancer Int. J.*, 51(2), 117-131 (2005).
- Wilkinson, D.G., Francis, P.T., Schwam, E., Payne-Parrish, J., Cholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease: the relationship between pharmacological effects and clinical efficacy, *Drugs Aging*, 21(7), 453-478 (2004).
- Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemyers, R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chem.*, 105, 940–949 (2007).
- Woodside, J.V., McGrath, A.J., Lyner, N., McKinley, M.C., Carotenoids and health in older people, *Maturitas*, 80, 63–68 (2015).
- Wright, C.A, *Mediterranean vegetables: a cook's ABC's of vegetables and their preparation in Spain*, The Harvard Common Press, Boston, 29, 2001.
- Wroblewska, K., The influence of adenine and benzyladenine on rooting and development of *Fuchsia hybrida* cuttings, *Acta Agrobot.*, 65, 101-108 (2012).
- Wu, S.J., Wu, T.S., Cytotoxic aryl-naphthalene lignans from *Phyllanthus oligospermus*, *Chem. Pharm. Bull.*, 54(8), 1223-1225 (2006).
- Wu, W., Huff, H.E., Hsieh, F., Processing and properties of extruded flaxseed-corn puff, *J. Food Process. Preserv.*, 31(2), 211-226 (2007).
- Xu, L.J., Huang, F., Chen, S.B., Li, L.N., Chen, S.L., Xiao, P.G., A cytotoxic neolignan from *Schisandra propinqua* (Wall.) Baill, *J. Integr. Plant Biol.*, 48(12), 1493-1497 (2006).
- Xu, Z. H., Wang, X.Y., Zhou, M.M., Ma, L.P., Deng, Y., Zhang, H.J., Zhao, A.H., Zhang, Y.Y., Jia, W., The antidiabetic activity of total lignan from fructus arctii against alloxan-induced diabetes in mice and rats, *Phytother. Res.*, 22(1), 97-101 (2008).
- Yalçın, G., İğde (*Elaeagnus angustifolia* L.) bitkisinin çeşitli kısımlarının kimyasal bileşenlerinin farklı yöntemler kullanılarak antioksidan kapasitesinin incelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye (2012).

- Yamashita, K., Yamada, Y., Kitou, S., Ikeda, S., Abe, C., Saarinen, N.M., Santti, R., Hydroxymatairesinol and sesaminol act differently on tocopherol concentrations in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 53(5), 393-399 (2007).
- Yan, L.-J., Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance, *Redox Biol.*, 2, 165–169 (2014).
- Yang, N.-Y., Yang, Y.-F., Li, K., Analysis of hydroxy fatty acids from the pollen of *Brassica campestris* L. var. *oleifera* DC. by UPLC-MS/MS, *J. Pharm.*, doi: 10.1155/2013/874875 (2013).
- Yang, S., Sadilek, M., Synovek, R.E., Lidstrom, M.E., Liquid chromatography - tandem quadrupole mass spectrometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry measurement of targeted metabolites of *Methylobacterium extorquens* AM1 grown on two different carbon sources, *Chrom. A*, 1216(15), 3280–32 (2009).
- Yaren, H., Kolinesteraz inhibitörü bir organofosforlu kimyasalın etkilerine karşı tıbbi yönetimin deneysel olarak irdelenmesi, Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2006).
- Yavaşer, R., Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye (2011).
- Yeğin, D., MDA-MB-231 ve MCF-7 insan meme kanseri hücre dizilerinde Doseksol, Karboplatin, Gemcitabin'in yaptığı sitotoksikite üzerine, Verapamil'in etkilerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye (2009).
- Yerdelen, K.Ö., 3-Aril-1-(4-hidroksifenil)-2-propen-1-on ve 1,5-diaril-penta-1,4-dien-3-on türevi bileşiklerin ve onların aminometil türevlerinin sentezi ve sitotoksik aktivitelerinin değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye (2009).
- Yeşil, Y., Kürecik (Akçadag/Malatya) bucağında etnobotanik bir araştırma, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2007).
- Yılmaz, A.D., Karaciğer ve safra rahatsızlıklarında kullanılan tıbbi bitkilerin antioksidan aktiviteleri üzerinde farmakognozok araştırmalar, Y. Lisans tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye (2008).
- Yoganathan, K., Rossant, C., Ng, S., Huang, Y., Butler, M.S., Buss, A.D., 10-Methoxydihydrofusicin, fuscinarin, and fusicin, novel antagonists of the human CCR5 receptor from *Oidiodendron griseum*, *J. Nat. Prod.*, 66, 1116-1117 (2003).
- Yoshikawa, A., Salto, Y., Maruyama, K., Lignan compounds and 4,4'-dihydroxybiphenyl protect C2C12 cells against damage from oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344(1), 394-399 (2006).
- Zakut, H., Erlich, G., Ayalan, A., Prody, C.A., Malinger, G., Seidman, S., Ginzberg, D., Kehlenbach, R., Soreq, H., Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas, *J. Clin. Invest.*, 86, 900–908 (1990).

Zhao, C.Q., Zhu, Y.Y., Chen, S.Y., Ogihara, Y., Lignan glucoside from *Sinopodophyllum emodi* and its cytotoxic activity, *Chin. Chem. Lett.*, 22(2), 181-184 (2011).

Zhao, H., Wang, J., Xie, C., Song, S., Bai, G., Luo, G., Study on fingerprints of different organs of *Arabidopsis thaliana* by using UPLC/ESI-Q-TOF MS, *Asian J. Chem.*, 25(6), 3023-3029 (2013).

Zheng, C.J., Tang, W.Z., Huang, B.K., Han, T., Zhang, Q.Y., Zhang, H., Qin, L.P., Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L. seeds, *Phytomed.*, 16(6-7), 560-567 (2009).

Zhou, J.-M., Ibrahim, R.K., Tricin- a potential multifunctional nutraceutical, *Phytochem. Rev.*, 9, 413-424 (2010).

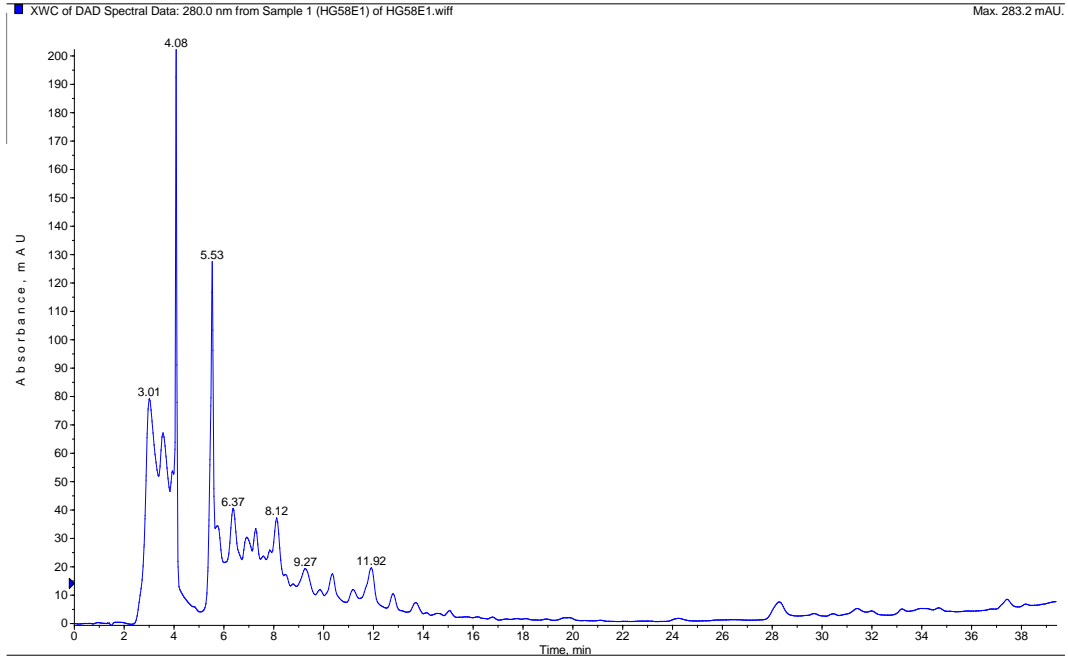
Zykova, T.A., Zhu, F., Zhai, X., Ma, W., Ermakova, S.P., Lee, K.W., Bode, A.M., Dong, Z., Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis, *Mol. Carcinog.*, 47(10), 797-805 (2008).

http-1 Kanser Daire Başkanlığı, <http://kanser.gov.tr/kanser/kanser-taramalari/915-2013-kanser-tarama-istatistikleri.html> (12.11.2014).

http-2 <http://www.a549.com/> (19.12.2014).

EKLER

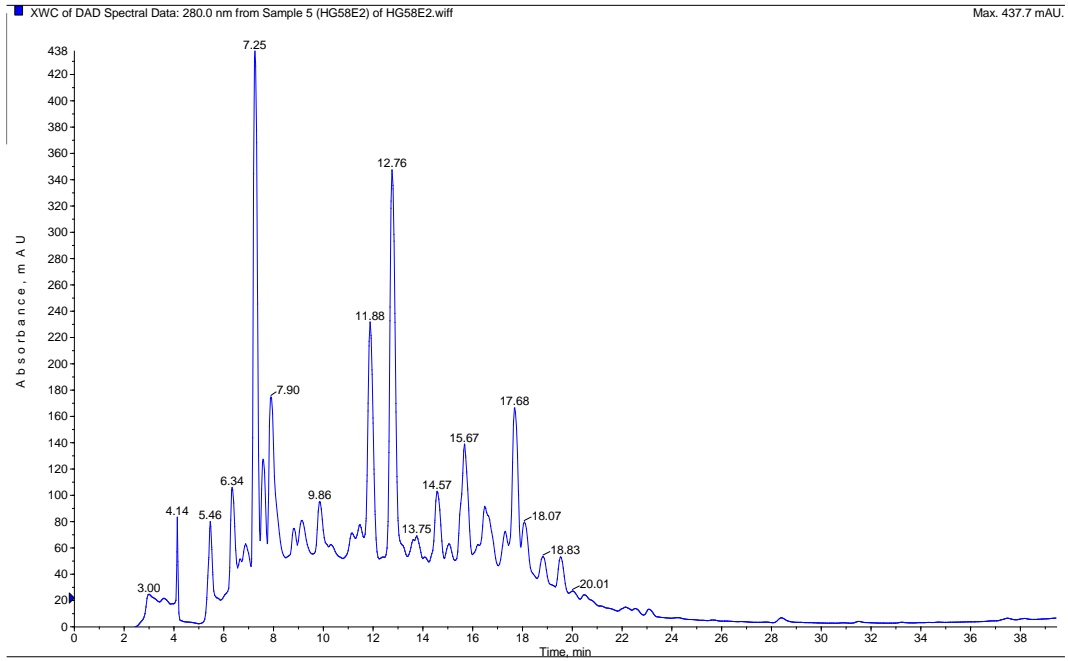
EK 1. E1 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)



EK 2. E1 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

Rt (dk)	MA	[M-H] ⁻	Temel pik	Fragmentler	Muhtemel Yapı	Bağlı yüzde
3.01	135	134	134	107	Adenin	31.23
3.56	342	341	179	161, 149, 143, 119, 113	Disakkarit türevi	-
5.53	185	184	140	166	Bilinmeyen 1	12.79
6.37	198	197	161	-	Bilinmeyen 2	3.70
6.93	342	341	179	135	Kafeik asit hekzozit	1.93
7.28	437	436	436	316, 290, 272, 145, 135, 119	<i>N,N</i> -dikumaroil spermidin	2.12
8.12	564	563	353	473, 443, 383, 323, 311, 297	Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit	3.93
9.27	180	179	135	107	Kafeik asit	2.20
10.35	522	521	329	359, 299	Larisirezinol glikozit	1.85
11.23	416	415	295	325	Puerarin	1.12
11.88	164	163	119	-	<i>p</i> -Kumarik asit	4.03
12.78	194	193	134	178, 149, 121	Ferulik asit	1.01
28.27	310	309	309	265, 209, 152	Bilinmeyen 5	2.25

EK 3. E2 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)



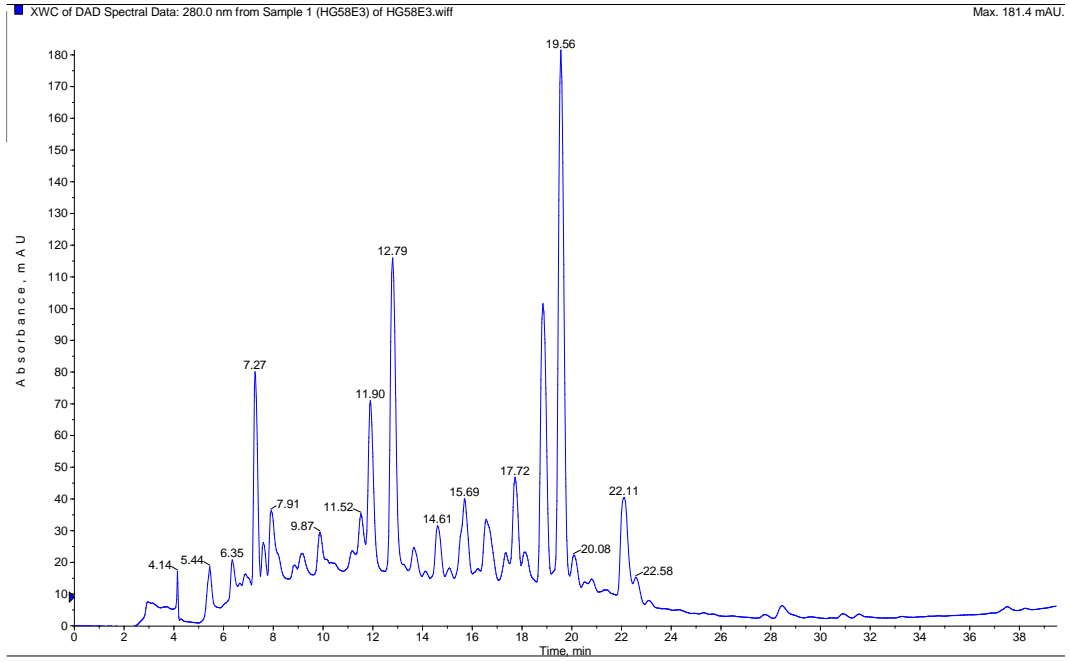
EK 4. E2 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

Rt (dk)	MA	[M-H] ⁻	Temel pik	Fragmentler	Muhtemel Yapı	Bağl yüzde
3.56	342	341	179	161, 149, 143, 119, 113	Disakkarit türevi	-
4.14	134	133	133	115	L-Malik asit	1.67
5.46	469	468	135	332, 306, 289, 261, 161	N,N-dikafeoilspemidin	2.82
6.34	453	452	135	332, 316, 306, 289, 273, 261, 161, 145, 119	Kafeoilkumaroil spemidin	2.61
7.25	437	436	135	316, 290, 272, 145, 119	N,N-dikumaroil spemidin	14.80
7.50	467	466	134/135	346, 316, 273, 149, 133	N-kumaroil-N'-feruloilspemidin	3.08
7.90	497	496	134/135	480, 346, 330, 304, 204, 149	N,N'-diferuloil spemidin	7.21
8.12	564	563	353	473, 443, 383, 323, 311, 297	Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit	0.90
9.14	180	179	135	107	Kafeik asit	1.93
10.34	522	521	329	359	Larisirezinol glikozit	0.59
11.88	164	163	119	-	p-Kumarik asit	9.21
12.76	194	193	134/135	178, 149, 121	Ferulik asit	15.25
13.66	188	187	125	169, 143	Benzoik asit türevi	0.47
14.57	374	373	163	343, 313, 298, 188, 175, 166, 147, 136, 108	Hidroksipinorezinol	2.92
15.01	344	343	343	325, 313, 297, 191, 177, 151, 136	Furofuranolignan türevi	0.61
15.67	162	161	161	146, 119	Metil-4-kromanon türevi	5.64
16.52	372	371	371	353, 341, 309, 297, 191	Koniferil alkol (8-5) ferulik asit	4.37
17.68	328	327	327	309, 291, 239, 229, 211, 171, 163	Okzo-dihidroksi-oktadekenoik asit izomeri	6.95
18.07	308	307	263	233	10-metoksidihidrofusün	2.34
18.83	340	339	324	307, 292, 263, 251, 161, 145	Paksanton	1.01

E2 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler (devamı)

19.53	327	327	229, 211, 171	Trihidroksi- oktadekadienoik asit izomeri	1.25
-------	-----	-----	---------------	---	------

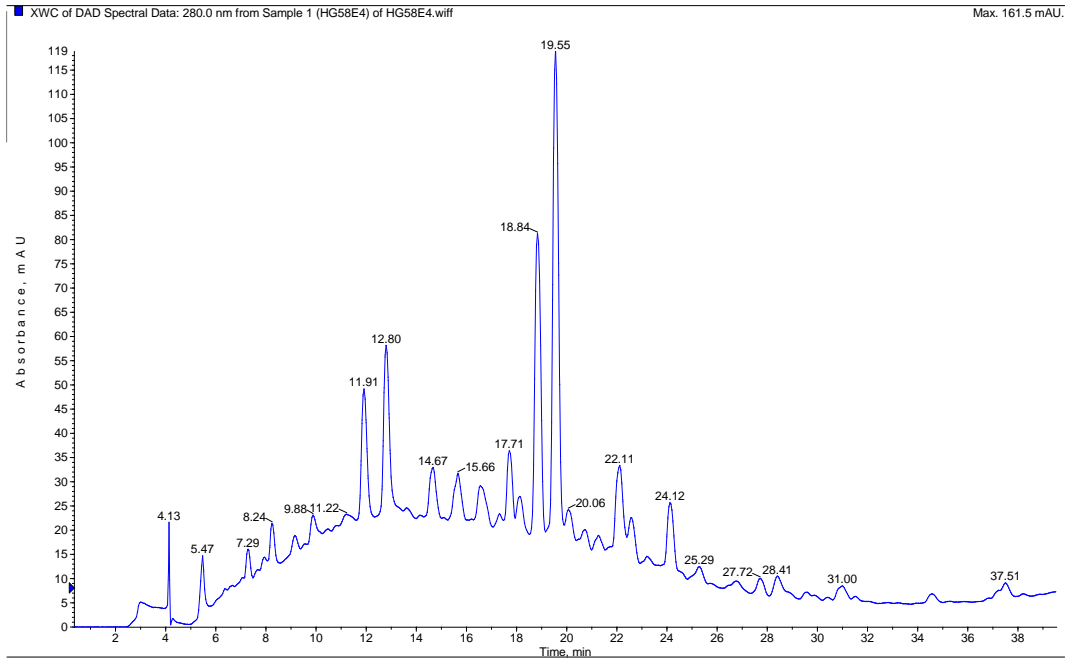
EK 5. E3 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)



EK 6. E3 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

Rt (dk)	MA	[M-H] ⁻	Temel pik	Fragmentler	Muhtemel Yapı	Bağlı yüzde
4.14	134	133	133	115	L-Malik asit	0.44
5.44	469	468	135	332, 306, 289	N,N-dikafeoil spermidin	1.66
7.58	437	436	436	316, 290, 273, 145, 119	N,N-dikumaroil spermidin	1.12
7.91	564	563	353	503, 413, 383, 365, 323, 311, 297	Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit	3.38
9.17	138	137	137	-	Hidroksibenzoik asit türevi	1.09
9.87	432	431	311	341	Viteksin/İzoviteksin	1.48
10.44	522	521	329	359	Larisirezinol glikozit	0.21
11.52	358	357	357	342, 151, 136	Pinorezinol	2.27
11.90	164	163	119	-	p-kumarik asit	6.46
12.79	194	193	193	178, 149, 134	Ferulik asit	12.11
13.66	188	187	125	169, 143	Benzoik asit türevi	1.35
14.61	374	373	163	343, 313, 298, 188, 175, 166, 147, 136, 108	Hidroksipinorezinol	2.09
15.05	344	343	343	325, 313, 297, 191, 177, 151, 136	Furofuranolignan türevi	0.33
15.69	162	161	161	146, 119	Metil-4-kromanon	3.95
17.72	180	179	179	164, 146, 135	Koniferil alkol	4.17
18.11	308	307	263	233	10-metoksidihidroflussin	1.39
18.86	330	329	329	311, 293, 211, 229, 183	Bir flavonoid türevi	1.39
19.56	328	327	327	309, 291, 273, 239, 229, 221, 211, 183, 171	Trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri	31.16
20.08	328	327	327	309, 291, 273, 239, 229, 221, 211, 183, 171	Trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri	0.93
22.11	308	307	185	235, 223, 209, 197, 289, 191, 163	Dihidroksiasit	5.28

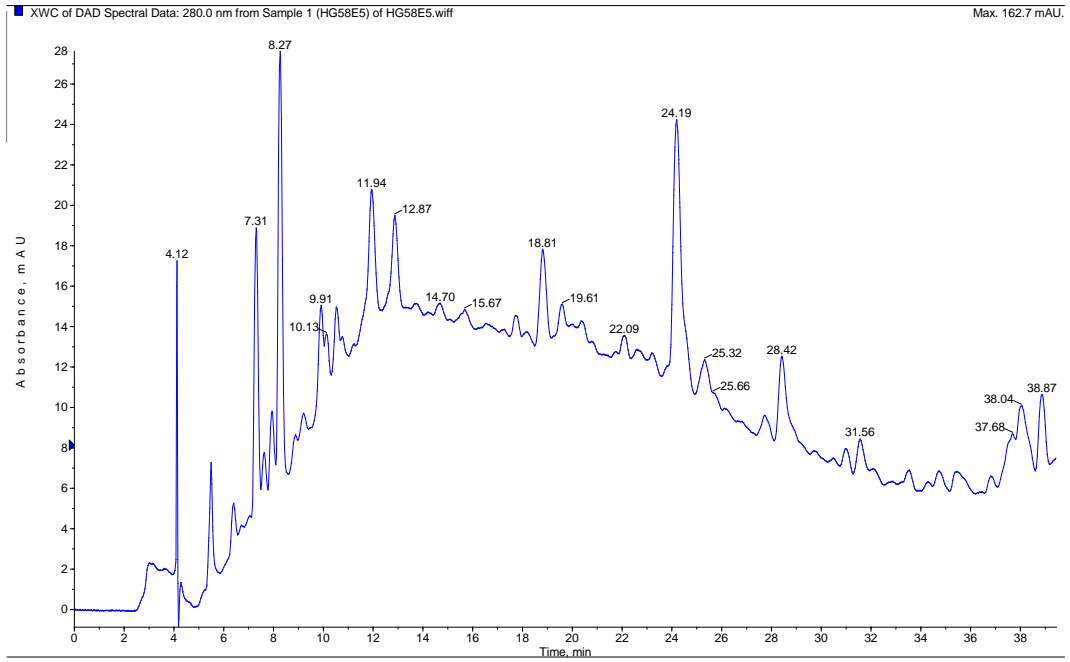
EK 7. E4 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)



EK 8. E4 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

Rt (dk)	MA	[M-H]⁻	Temel pik	Fragmentler	Muhtemel Yapı	Bağıl yüzde
5.47	469	468	135	332, 306, 289, 261, 161, 135	<i>N,N</i> -dikafeoil spermidin	1.82
7.28	437	436	135	332, 306,	<i>N,N</i> -dikumaroil spermidin	0.92
8.24	564	563	353	473, 443, 383, 323, 311, 297	Apigenin-6,8-C-pentozit-hekzozit	1.58
12.80	194	193	135	178, 149	Ferulik asit	8.89
14.67	374	373	163	343, 313, 298	Hidroksipinorezinol	2.84
15.67	162	161	161	146, 119	Metil-4-kromanon	2.76
16.55	358	357	357	177, 133	Kafeik asit türevi	2.67
17.71	328	327	327	309, 291, 239, 229, 211, 171, 163	Okzo-dihidroksi-oktadekenoik asit izomeri	3.75
18.07	308	307	263	233	10-Metoksidihidrofussin	1.94
18.84	330	329	329	311, 293, 211, 229, 183	Bir flavonoit türevi	14.55
19.55	328	327	327	309, 291 ve 273, 239, 229, 221, 211, 183, 171	Trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri	22.78
22.11	330	329	211	311, 293, 241, 229, 199, 183, 171, 155, 127	Trihidroksi-oktadekenoik asit	5.22
24.12	330	329	329	311, 293, 201, 171	Trihidroksi-oktadekenoik asit izomeri	3.41

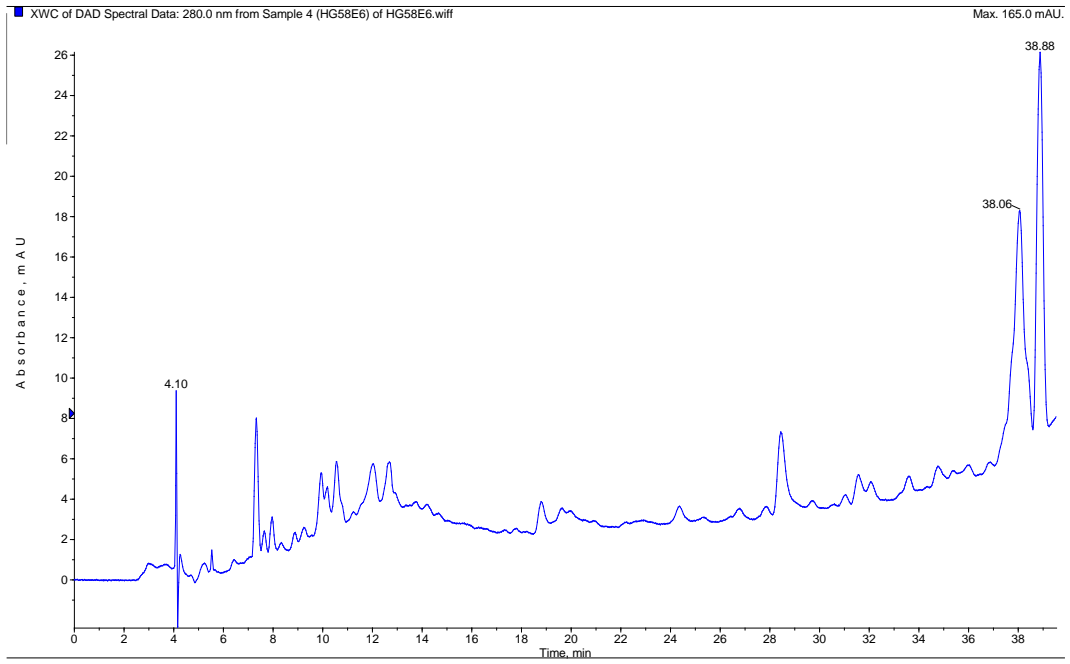
EK 9. E5 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)



EK 10. E5 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

Rt (dk)	MA	[M-H] ⁻	Temel pik	Fragmentler	Muhtemel Yapı	Bağıl yüzde
5.50	334	333	333	241, 171, 153	Gliserofosfoinozitol	2.71
7.31	437	436	436	316, 273, 145, 119	<i>N,N</i> -dikumaroil spermidin	7.36
8.27	264	263	263	245, 233, 205	Bilinmeyen 3	11.82
11.94	307	306	288	262	Bilinmeyen 4	6.34
18.88	330	329	329	311, 293, 211, 229, 183	Bir flavonoit türevi	3.86
19.61	328	327	327	309, 291, 273, 239, 229, 221, 211, 183, 171	Trihidroksi-oktadekadienoik asit	0.72
24.19	330	329	329	311, 293, 201, 171	Trihidroksi-oktadekadienoik asit izomeri	14.83
25.32	330	329	329	311, 293, 199, 171	Trihidroksi oktadekenoik asit izomeri	1.87
28.42	312	311	311	293, 275, 255, 223, 183	15,16-dihidroksi-9,12-oktadekadienoik asit	4.64
31.56	314	313	171	201, 127	Hidroperoksi-oktadekenoik asit izomeri	1.63

EK 11. E6 Kodlu Alt Fraksiyona ait Kromatogram (280 nm)



EK 12. E6 Kodlu Alt Fraksiyonda Belirlenen Maddelere İlişkin Bilgiler

Rt (dk)	MA	[M-H]⁻	Temel pik	Fragmentler	Muhtemel Yapı	Bağıl yüzde
7.42	437	436	135	332, 306,	<i>N,N</i> -dikumaroil spermidin	5.09
28.42	312	311	311	293, 275, 255, 223, 183	15,16-dihidroksi-9,12-oktadekadienoik asit	6.6
38.06	314	313	313	295, 251	9-hidroperoksi-oktadekenoik asit	21.99
38.88	294	293	293	249, 236, 197, 185	9-okzo-oktadekadienoik asit	23.48