

**BAZI *GENTIANA* TÜRLERİNİN
FARMAKOGNOZİ YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

Hülya Tuba KIYAN

Eskişehir, 2017

**BAZİ GENTJANATÜRLERİNİN FARMAKOGNOZİYÖNÜNDEN
İNCELENMESİ**

Hülya Tuba KIYAN

DOKTORA TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak, 2017

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hülya Tuba Kıyan'ın "Bazı *Gentiana* Türlerinin Farmakognozi Yönünden İncelenmesi" başlıklı tezi 12/01/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyanınca, Farmakognozi Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK	
Üye	Prof. Dr. Dilek AK	
Üye	Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN-ORHAN	
Üye	Doç. Dr. Elif İlkay ARMUTAK	
Üye	Doç. Dr. Gökâlöp İŞCAN	


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Dilek AK

ÖZET

BAZI *GENTIANA* TÜRLERİNİN FARMAKOGNOZT YÖNÜNDE İNCELENMESİ

Hülya Tuba Kıyan

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak, 2017

Danışman: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Gentiana türleri halk arasında sindirimi kolaylaştırıcı, antidiyabetik, antiinflamatuvar, hepatoprotektif ve antihipertansif gibi pek çok tıbbi amaçla kullanılmaktadır. *Gentiana asclepiadea* L., *G. brachyphylla* Vill., *G. cruciata* L., *G. gelida* Bieb., *G. olivieri* Griseb., *G. pyrenaica* L., *G. septemfida* Pallas., *G. verna* L. subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek, *G. verna* L. subsp. *balcanica* Pritchard ve ülkemiz için endemik olan *G. boissieri* Schott et Kotschy ex Boiss. türlerinden elde edilen ekstre ve fraksiyonların LC/MS-IT-TOF ile analizlerinde; sekoiridoitler; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, loganin, svertianolin, norsvertianolin, 3'-asetil sverozit, flavon glikozitleri; östomorzit viteksin ve orientin bellidin, bellidifolin ve ksanton-C glikozitleri; mangiferin ve oleanolik asit tespit edilmiştir. Biyolojik aktivite sonuçlarına göre; *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata* metanol ekstreleri belirgin DNA hasarı koruyucu; *G. cruciata*, *G. asclepiadea* ve *G. boissieri* metanol ekstreleri yüksek metal şelatlayıcı; *G. verna* subsp. *pontica* metanol fraksiyonu yüksek ABTS'+ radikal katyon renksizleştirici; *G. brachyphylla* etil asetat ve metanol fraksiyonları yüksek DPPH' serbest radikal süpürücü antioksidan aktivite; *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* ve *G. verna* subsp. *pontica* metanol ekstreleri ile *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* metanol fraksiyonları çok yüksek MAO-A ve MAO-B inhibitör; *G. olivieri* metanol ekstresi çok yüksek BChE inhibitör ve orta düzeyde COX-2 inhibitör etki göstermiştir. Ayrıca *Gentiana* ekstrelerinin genotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Tez kapsamında, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. gelida*, *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerinin antioksidan, antiinflamatuvar, antikolinesteraz etkileri; *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. gelida*, *G. olivieri* ve *G. septemfida* türlerinin MAO-A, MAO-B inhibitör etkileri ve *G. asclepiadea* hariç diğer türlerin genotoksik etkileri ilk kez çalışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Gentiana* sp., LC/MS-IT-TOF, antioksidan, MAO, BChE inhibitör.

ABSTRACT

PHARMACOGNOSTICAL INVESTIGATIONS ON SOME *GENTIANA* TAXA

Hülya Tuba Kıyan

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Gentiana species are traditionally used as digestive, antidiabetic, antiinflammatory, hepatoprotective, antihypertensive and for many medicinal purposes. According to the LC/MS-IT-T0F analysis of the extracts obtained from *Gentiana asclepiadea* L., *G. brachyphylla* Vill., *G. cruciata* L., *G. gelida* Bieb., *G. olivieri* Griseb., *G. pyrenaica* L., *G. septemfida* Pallas., *G. verna* L. subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek, *G. verna* L. subsp. *balcanica* Pritchard and *G. boissieri* Schott et Kotschy ex Boiss. which is endemic for Turkey species; secoiridoids; gentiopicroside, sweroside, swertiamarin, loganin, swertianolin, norswertianolin, 3'-acetyl sweroside and eustomorusside; flavone glycosides; vitexin and orientin; xanthone-C glycosides; bellidin, bellidifolin, mangiferin and also oleanolic acid were found. The methanol extracts of *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata* showed significant DNA damage preventive; *G. cruciata*, *G. asclepiadea* and *G. boissieri* extracts showed strong metal chelating; *G. verna* subsp. *pontica* methanol fraction showed strong ABTS decolorization; *G. brachyphylla* ethyl acetate and methanol fractions showed strong DPPH scavenging antioxidant; *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* and *G. verna* subsp. *pontica* methanol extracts also *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* methanol fractions exhibited very strong MAO-A and MAO-B inhibitory; *G. olivieri* methanol extract showed very strong BChE inhibitory but moderate COX-2 inhibitory effects. *Gentiana* extracts did not show genotoxic effects. To the best of our knowledge this is the first study on the antioxidant, antiinflammatory, anticholinesterase effects of *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. gelida*, *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* and *G. verna* subsp. *pontica*; MAO-A, MAO-B inhibitory effects of *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. gelida*, *G. olivieri* and *G. septemfida* and genotoxic effects of species except *G. asclepiadea*.

Keywords: *Gentiana* sp., LC/MS-IT-T0F, antioxidant, MAO, BChE inhibitory.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyip Fakültemizin imkanlarını sınırsızca kullanmamı olanak sağlayan çok kıymetli hocam, Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e

Bu zorlu süreçte her türlü desteğini esirgemeyen iyi kalpli değerli hocam, Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Prof. Dr. Dilek AK'a,

Değerli emek ve görüşlerini hiçbir zaman esirgemeyen, her pes ettiğimde ve her düştüğümde beni kaldırıp yoluma devam etmem için yüreklendiren, bana sabrın ve azmin başarıya ulaştıran erdemler olduğunu bir kez daha gösteren, iyi niyete ve emek verilerek bileğinin hakkıyla kazanılan başarının kutsallığına olan inancımı güçlendiren yol göstericim, kalbimde çok farklı ve çok değerli bir yere sahip olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK'e,

Tez bitkilerimin temin edilmesini sağlayan Yalova Zir. Müh. Dr. Serdar ERKEN ve Zir. Müh. Dr. Fatih GÜLBAG'a,

Genotoksisite çalışmalarımın emeği geçen ve her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. İlham Eröz POYRAZ ve Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a,

Çalışmalarım sırasında Eczacılık Fakültesi Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarı'nın imkanlarını kullanmam konusunda her türlü kolaylığı sağlayan Eczacılık Fakültesi Dekan Yardımcısı değerli hocam Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY'a,

Enzimatik aktivite çalışmalarımın destek olan hem öğrencim hem arkadaşım Arş. Grv. Begüm Nurpelin SAÖLİK'a ve LC-MS-IT-TOF analizlerimde emeği geçen Uzman Kim. Serkan LEVENT'e,

Laboratuvar çalışmalarımın ellerinden gelen desteği esirgemeyen, canım dostum Göksu CEYLAN'a, iyi kalpli sevgili öğrencilerim ve arkadaşlarım Aybike BAYRAKTAR ve Hakan SABAHTİN ALİ'ye,

Kötü günümde iyi günümde her zaman yanımda olan en büyük destekçilerim canım dostlarım Arş. Grv. Feyza ALYU ve Arş Grv. Saniye ÖZCAN'a,

Maddi manevi desteklerini esirgemeyen dostlarım Yrd. Doç. Dr. Gülsel YURTDAŞ-KIRIMLIOGLU ve Yüksek Biyolog Şennur GÖRGÜLÜ-KAHYAOGU'na,

Bu süreçte her zaman yanımda olan ve desteğini hep hissettiğim sırdaşım Fatma DURUER- YILMAZ'a,

Tezimi başarıyla tamamlamam konusunda beni hep yüreklendiren ve çalışmaya teşvik eden, manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Elif İlkay ARMUTAK ve Doç. Dr. Ebru GÜREL-GÜREVİN'e

Güler yüzünü ve tatlı sohbetini esirgemeyip her zaman destek olan kıymetli hocam Doç. Dr. Gülmira ÖZEK'e,

Geç tanıştığım ama sevgisini ve desteğini hep hissettiğim sevgili arkadaşım Arş. Grv. Ayça ÜVEZ'e,

Aynı yolda yürüdüğüm ve benzer zorluklarla karşılaşmış birlikte üstesinden gelmeye çalıştığımız can arkadaşım Diyetisten Gülcan OK- DÜKER'e,

Hayallerimi ve hayatımın en güzel anılarını paylaştığım, bana hem anne hem baba olan, Biricik Canım Annem Elif PAKSOY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hülya Tuba KIYAN

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal jçermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Hülya Tuba KIYAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Gentianaceae Familyası	3
2.2. <i>Gentiana</i> L. Cinsi	3
2.3. <i>Gentiana</i> Türlerinin Fitokimyasal Bileşimi	12
2.3.1. İridoitler	12
2.3.2. Ksantonlar	14
2.3.3. Flavonoitler	14
2.3.4. Alkaloitler	15
2.3.5. Triterpenler	15
2.3.6. Diğer bileşikler	16
2.4. <i>Gentiana</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Çalışmalar	16
2.4.1. Fitokimyasal çalışmalar	17
2.4.2. <i>Gentiana</i> Türlerinin Etnomedikal Kullanımları	25
2.4.3. Biyoaktivite çalışmaları	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1. Bitkisel Materyal	33
3.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	34
3.2.1. Kimyasal maddeler	34
3.2.2. Cihazlar	36

3.3. <i>Gentiana</i> Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	37
3.3.1. <i>Gentiana</i> metanol ekstralarının hazırlanması	37
3.3.2. <i>Gentiana</i> diklorometan, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının hazırlanması	37
3.4. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	37
3.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizisi Dedektör (HPLC-DAD) İle Fenolik Asitlerin Tayini	38
3.6. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizisi Dedektör (HPLC-DAD) İle Sekoiridoit Miktar Tayini	39
3.7. Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) Sistemi İle Fitokimyasal Bileşimlerinin Belirlenmesi	40
3.8. Biyolojik Aktivite Yöntemleri	41
3.8.1. Antioksidan aktivite yöntemleri	41
3.8.1.1. DNA hasarı koruyucu yöntem	41
3.8.1.2. Metal şelatlayıcı yöntem	42
3.8.1.3. ABTS'+ radikal kation renksizleştirme yöntemi	42
3.8.1.4. Redükleyici güç ölçümü	43
3.8.1.5. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem	43
3.8.2. Enzimatik aktivite deneyleri	44
3.8.2.1. MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite yöntemi	44
3.8.2.2. AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi	44
3.8.2.2.1. AChE ve BChE enzim çözeltisinin hazırlanması	45
3.8.2.2.2. Asetiltiyokolin iyodür (ATC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M)	45
3.8.2.2.3. Bütiriltiyokolin iyodür (BTC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M)	45
3.8.2.2.4. 5-5-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonunun hazırlanması (0.01 M)	46
3.8.2.2.5. Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8.0) ...	46
3.8.2.2.6. AChE ve BChE inhibisyon çalışması	46

3.8.2.3. COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite yöntemi (Antiinflamatuvar etki)	47
3.8.3. Genotoksik etki yöntemi	47
3.8.3.1. <i>Allium cepa</i> kök ucu testi	48
3.8.3.1.1. Mitotik indeks (MI)	48
3.8.3.1.2. Mikroskop analizi	48
3.8.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi	48
3.8.3.2.1. Çalışma materyalinin hazırlanması	48
3.8.3.2.2. DNA izolasyonu	49
3.8.3.2.3. DNA'nın spektrofotometrik ölçümü	49
3.8.3.2.4. PCR için kalıp DNA hazırlığı	51
3.8.3.2.5. PCR analizleri	51
3.8.3.2.6. Rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) analizi RAPD-PCR analizi	51
3.8.3.2.7. Basit dizi tekrarları arası-polimeraz zincir reaksiyonu (ISSR-PCR) analizi	53
3.8.3.2.8. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin yürütülmesi	54
3.8.3.2.9. Agaroz jel elektroforezin fotoğraflanması	55
4. SONUÇLAR	56
4.1. <i>Gentiana</i> Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyonların Verimleri	56
4.2. <i>Gentiana</i> Ekstre ve Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları	57
4.3. Ters-Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (BPLC) İle Fenolik Asitlerin Tayini	59
4.4. Ters-Faz HPLC İle Sekoiridoit Miktar Tayini	65
4.5. Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) Sistemi İle Fitokimyasal İçeriklerin Belirlenmesi	70
4.5.1. <i>Gentiana</i> türlerine ait metanol ekstralarının LC/MS-IT-TOF kromatogramları	72
4.5.2. <i>Gentiana</i> türlerine ait metanol ekstralarında LC/MS-IT-TOF	

ile tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları	77
4.5.3. <i>Gentiana</i> türlerine ait metanol fraksiyonlarının LC/MS-IT- TOF kromatogramları	87
4.5.4. <i>Gentiana</i> türlerine ait metanol fraksiyonlarında LC/MS-IT- TOF ile tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları	88
4.6. Biyolojik Aktivite Sonuçları	94
4.6.1. Antioksidan aktivite sonuçları	94
4.6.1.1. DNA hasarı koruyucu yöntem	94
4.6.1.2. Metal şelatlayıcı yöntem	95
4.6.1.3. ABTs+ radikal katyon renksizleştirme yöntemi ile antioksidan aktivite sonuçları	97
4.6.1.4. Redükleyici güç ölçümü antioksidan aktivite sonuçları	99
4.6.1.5. DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite sonuçları	101
4.6.2. Enzimatik aktivite deneyleri	106
4.6.2.1. MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite sonuçları	106
4.6.2.2. AChE ve BChE inhibitör aktivite sonuçları	110
4.6.2.3. COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite (Antiinflamatuvar etki) sonuçları	117
4.6.3. Genotoksik aktivite sonuçları	119
4.6.3.1. Mikroskop analizi	119
4.6.3.1.1. Mitotik indeks	133
4.6.3.2. RAPD-PCR sonuçları	134
4.6.3.3. ISSR-PCR sonuçları	137
5. TARTIŞMA	139
KAYNAKÇA	151
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1.	<i>Gentiana</i> Türlerinin Toplandığı Lokalizeler ve Toplanma Tarihleri	33
Çizelge 3.2.	DNA Örneklerinin Miktar ve Kalite (Safılık) Tayini	49
Çizelge 3.3.	Çalışmada Kullanılan RAPD Prim erleri	52
Çizelge 3.4.	Kullanılan RAPD-PCR Bileşenleri ve Miktarları	52
Çizelge 3.5.	RAPD-PCR Uygulama Protokolü	53
Çizelge 3.6.	Çalışmada Kullanılan ISSR Prim erleri	53
Çizelge 3.7.	Kullanılan ISSR-PCR Bileşenleri ve Miktarları	54
Çizelge 3.8.	ISSR-PCR Uygulama Protokolü	54
Çizelge 4.1.	<i>Gentiana</i> Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyon Verimleri	56
Çizelge 4.2.	<i>Gentiana</i> Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları	58
Çizelge 4.3.	<i>Gentiana</i> Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyonlarında Ters-Faz HPLC İle Tespit Edilen Fenolik Asit Miktarları	60
Çizelge 4.4.	<i>Gentiana</i> Ekstre ve Fraksiyonlarında Ters-Faz HPLC İle Tespit Edilen sekoiridoit miktar tayinleri	66
Çizelge. 4.5.	<i>Gentiana</i> Türlerine Ait Metanol Ekstrelerinde LC/MS-IT-TOF İle Tespit Edilen Bileşikler	71
Çizelge 4.6.	<i>Gentiana</i> Türlerine Ait Metanol Fraksiyonlarında LC/MS-IT-TOF İle Tespit Edilen Bileşikler	86
Çizelge 4.7.	<i>Gentiana</i> Türlerine Ait Metanol Ekstrelerinin DNA Hasarı Koruyucu Aktivite Sonuçları	94
Çizelge 4.8.	<i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonlarının Metal Şelatlayıcı Aktivite Sonuçları	96
Çizelge 4.9.	<i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların ABTs+ Radikal Katyon Renksizleştirme Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Sonuçları	98
Çizelge 4.10.	<i>Gentiana</i> Ekstre ve Fraksiyonlarının Redükleyici Güç Ölçümü İle Antioksidan Aktivite Sonuçları	100
Çizelge 4.11.	<i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Aktivite Sonuçları	102

Çizelge 4.12. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-A İnhibitör Aktivite Sonuçları	107
Çizelge 4.13. <i>G. pyrenaica</i> , <i>G. brachyphylla</i> ve <i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Fraksiyonlarının MAO-A İnhibitör Aktivite Sonuçları	108
Çizelge 4.14. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-B İnhibitör Aktivite Sonuçları	108
Çizelge 4.15. <i>G. pyrenaica</i> , <i>G. brachyphylla</i> ve <i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Fraksiyonlarının MAO-B İnhibitör Aktivite Sonuçları	109
Çizelge 4.16. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları	111
Çizelge 4.17. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının BChE İnhibitör Aktivite Sonuçları	114
Çizelge 4.18. <i>Gentiana</i> Metanol Ekstrelerinin COX-1 İnhibitör Aktivite Sonuçları	117
Çizelge 4.19. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-2 İnhibitör Aktivite Sonuçları	118
Çizelge 4.20. <i>Gentiana</i> Türlerine Ait Ekstrelerin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Hücrelerinde Belirlenen Mitotik İndeks Değerleri	133

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. İridoit Glikozit İskeleti	12
Şekil 2.2. Sekoiridoit Glikozit İskeleti	13
Şekil 2.3. Flavonoit İskeleti	14
Şekil 2.4. Sverozit	17
Şekil 2.5. Gentiopikrozit	17
Şekil 2.6. Svertiamarin	17
Şekil 3.1. Fermantas Gene Ruler 100 bp ONA Ladder Plus (100-3000 bp) B- 100 bp DNA Ladder (100-1000 bp)	55
Şekil 4.1. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi	57
Şekil 4.2. <i>Gentiana</i> Ekstre ve Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları	59
Şekil 4.3. Çalışılan Standart Fenolik Asitlerin HPLC Kromatogramı	61
Şekil 4.4. GOME'nin HPLC Kromatogramı	62
Şekil 4.5. GPME'nin HPLC Kromatogramı	62
Şekil 4.6. GBME'nin HPLC Kromatogramı	63
Şekil 4.7. GVPME'nin HPLC Kromatogramı	63
Şekil 4.8. GPMEF'nun HPLC Kromatogramı	64
Şekil 4.9. GBMEF'nun HPLC Kromatogramı	64
Şekil 4.10. GVPMEF'nun HPLC Kromatogramı	65
Şekil 4.11. Standart Sekoiridoit HPLC Kromatogramı	67
Şekil 4.12. GVPMEF'mın HPLC Kromatogramı	67
Şekil 4.13. GBME'nin HPLC Kromatogramı	68
Şekil 4.14. GPME'nin HPLC Kromatogramı	68
Şekil 4.15. GPMEF'nun HPLC Kromatogramı	69
Şekil 4.16. GVPME'nin HPLC Kromatogramı	69
Şekil 4.17. GBMEF'nun HPLC Kromatogramı	70
Şekil 4.18. GPME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	72
Şekil 4.19. GBME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	72
Şekil 4.20. GOME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	73
Şekil 4.21. GCME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	73

Şekil 4.22. GAME'nin LC/MS-TT-TOF Kromatogramı	74
Şekil 4.23. GBOME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	74
Şekil 4.24. GGME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	75
Şekil 4.25. GSME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	75
Şekil 4.26. GVBME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	76
Şekil 4.27. GVPME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	76
Şekil 4.28. Gentiopikrozit	77
Şekil 4.29. Gentiopikrozit'in Kütle Spektrumu	77
Şekil 4.30. Sverozit	77
Şekil 4.31. Sverozit'in Kütle Spektrumu	78
Şekil 4.32. Svertiamarin	78
Şekil 4.33. Svertiamarin'in Kütle Spektrumu	78
Şekil 4.34. Loganin	79
Şekil 4.35. Loganin'in Kütle Spektrumu	79
Şekil 4.36. Svertianolin	79
Şekil 4.37. Svertianolin'in Kütle Spektrumu	80
Şekil 4.38. Norsvertianolin	80
Şekil 4.39. Norsvertianolin'in Kütle Spektrumu	80
Şekil 4.40. 3'-Asetilsverozit	81
Şekil 4.41. 3'-Asetilsverozit'in Kütle Spektrumu	81
Şekil 4.42. Östomoruzzit	81
Şekil 4.43. Östomoruzzit'in Kütle Spektrumu	82
Şekil 4.44. Viteksin	82
Şekil 4.45. Viteksin'in Kütle Spektrumu	82
Şekil 4.46. Orientin	83
Şekil 4.47. Orientin'in Kütle Spektrumu	83
Şekil 4.48. Beli idin	83
Şekil 4.49. Bellidin'in Kütle Spektrumu	84
Şekil 4.50. Bellidifolin	84
Şekil 4.51. Bellidifolin'in Kütle Spektrumu	84
Şekil 4.52. Mangiferin	85
Şekil 4.53. Mangiferin'in Kütle Spektrumu	85
Şekil 4.54. Oleanolik Asit	85

Şekil 4.55. Oleanolik Asit'in Kütle Spektrumu	86
Şekil 4.56. GPMEF'nun LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	87
Şekil 4.57. GBMEF'nun LC/MS-IT TOF Kromatogramı	87
Şekil 4.58. GVPMEF'nun LC/MS-IT-TOF Kromatogramı	88
Şekil 4.59. Gentiopikrozit'in Kütle Spektrumu	88
Şekil 4.60. Sverozit'in Kütle Spektrumu	89
Şekil 4.61. Svertianolin'in Kütle Spektrumu	89
Şekil 4.62. Norsvertianolin'in Kütle Spektrumu	90
Şekil 4.63. Oliverozit C'nin Kütle Spektrumu	90
Şekil 4.64. İzopirenin'in Kütle Spektrumu	91
Şekil 4.65. Östomoruzzit'in Kütle Spektrumu	91
Şekil 4.66. Viteksin'in Kütle Spektrumu	92
Şekil 4.67. İzoviteksin' in Kütle Spektrumu	92
Şekil 4.68. Orientin'in Kütle Spektrumu	93
Şekil 4.69. Bellidifolin'in Kütle Spektrumu	93
Şekil 4.70. <i>Gentiana</i> Türlerine Ait Metana\ Ekstrelerinin DNA Hasarı Koruyucu Yöntem İle Antioksidan Aktivite Sonuçları	95
Şekil 4.71. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların Metal Şelatlayıcı Aktivite Sonuçları	97
Şekil 4.72. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların ABTs+ Radikal Katyon Renksizleştirme Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Sonuçları	99
Şekil 4.73. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların Redükleyici Güç Ölçümü İle Antioksidan Aktivite Sonuçları	101
Şekil 4.74. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Aktivite Sonuçları	105
Şekil 4.75. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-A İnhibitör Aktivite Sonuçları	107
Şekil 4.76. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-B İnhibitör Aktivite Sonuçları	109

Şekil 4.77. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları	113
Şekil 4.78. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının BChE İnhibitör Aktivite Sonuçları	116
Şekil 4.79. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-1 İnhibitör Aktivite Sonuçları	118
Şekil 4.80. <i>Gentiana</i> Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-2 İnhibitör Aktivite Sonuçları	119

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>G. asclepiadea</i> L.	S
Görsel 2.2. <i>G. boissieri</i> Schott & Kotschy ex Boiss.	6
Görsel 2.3. <i>G. cruciata</i> L.	7
Görsel 2.4. <i>G. gelida</i> Bieb.	8
Görsel 2.5. <i>G. olivieri</i> Griseb.	8
Görsel 2.6. <i>G. pyrenaica</i> L.	9
Görsel 2.7. <i>G. septemfida</i> Pallas	10
Görsel 2.8. <i>G. verna</i> subsp. <i>balcanica</i> Pritchard	11
Görsel 2.9. <i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> (Soltok.) Hayek	12
Görsel 3.1. Gallik Asit Standartı Kalibrasyon Çözeltileri	38
Görsel 4.1. <i>A. cepa</i> kök hücrelere ait kontrol grubu preparatlarının mikroskop görüntüleri	120
Görsel 4.2. 0.05 mg/mL'lik GPME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	121
Görsel 4.3. 0.05 mg/mL'lik GOME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	122
Görsel 4.4. 0.05 mg/mL'lik GCME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	123
Görsel 4.5. 0.05 mg/mL'lik GSME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	124
Görsel 4.6. 0.1 mg/mL'lik GPME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	125
Görsel 4.7. 0.1 mg/mL'lik GOME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	126
Görsel 4.8. 0.1 mg/mL'lik GCME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	127
Görsel 4.9. 0.1 mg/mL'lik GSME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	128
Görsel 4.10. 0.5 mg/mL'lik GPME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	129

Görsel 4.11. 0.5 mg/mL'lik GOME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	130
Görsel 4.12. 0.5 mg/mL'lik GCME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	131
Görsel 4.13. 0.5 mg/mL'lik GSME'nin Uygulandığı <i>A. cepa</i> Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri	132
Görsel 4.14. <i>A. cepa</i> Kök Hücre Genomundan RAPD-OPC 04 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü	135
Görsel 4.15. <i>A. cepa</i> Kök Hücre Genomundan RAPD-OPC 07 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü	135
Görsel 4.16. <i>A. cepa</i> Kök Hücre Genomundan RAPD-OPD 09 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü	136
Görsel 4.17. <i>A. cepa</i> Kök Hücre Genomundan RAPD-P9 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü	136
Görsel 4.18. <i>A. cepa</i> Kök Hücre Genomundan ISSR-1 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü	138
Görsel 4.19. <i>A. cepa</i> Kök Hücre Genomundan ISSR-847 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü	138

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS+	: 2, 2'-Azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
AChE	: Asetilkolinesteraz
ALT	: Alanin aminotransferaz
APTT	: Aktif kısmi tromboplastin zamanı
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATC	: Asetilkolin iyodür
BHT	: Butilhidroksi toluen
BChE	: Bütirilkolinesteraz
BSA	: Bovin serum albumin
BTC	: Bütirilkolin iyodür
CCl4	: Karbontetraklorür
cm	: Santimetre
COMET	: Tek hücre jel elektroforezi yöntemi
COX	: Siklooksijenaz
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-bisditiyonitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EIA	: Enzim immün testi
EMS	: Etil metansülfonat
FeCh	: Demir II klorür
FeCb	: Demir III klorür
FTIR	: Fourier transform infrared spektroskopisi
GAE	: Gallik aside eşdeğer
g	: Gram
GC/MS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi sistemi
GAME	: <i>G. asclepiadea</i> metanol ekstresi
GADMeF	: <i>G. asclepiadea</i> diklorometan fraksiyonu
GAEAF	: <i>G. asclepiadea</i> etil asetat fraksiyonu
GAMEF	: <i>G. asclepiadea</i> metanol fraksiyonu

GBOME	: G <i>boissieri</i> metanol ekstresi
GBODMeF	: G <i>boissieri</i> diklorometan fraksiyonu
GBOEAF	: G <i>boissieri</i> etil asetat fraksiyonu
GBOMeF	: G <i>boissieri</i> metanol fraksiyonu
GBME	: G <i>brachyphylla</i> metanol ekstresi
GBDMeF	: G <i>brachyphylla</i> diklorometan fraksiyonu
GBEAF	: G <i>brachyphylla</i> etil asetat fraksiyonu
GBMeF	: G <i>brachyphylla</i> metanol fraksiyonu
GCME	: G <i>cruciata</i> metanol ekstresi
GCDMeF	: G <i>cruciata</i> diklorometan fraksiyonu
GCEAF	: G <i>cruciata</i> etil asetat fraksiyonu
GCMeF	: G <i>cruciata</i> metanol fraksiyonu
GGME	: G <i>gelida</i> metanol ekstresi
GGDMeF	: G <i>gefida</i> diklorometan fraksiyonu
GGEAF	: G <i>gelida</i> etil asetat fraksiyonu
GGMeF	: G <i>gelida</i> metanol fraksiyonu
GOME	: G <i>olivieri</i> metanol ekstresi
GODMeF	: G <i>olivieri</i> diklorometan fraksiyonu
GOEAF	: G <i>olivieri</i> etil asetat fraksiyonu
GOMeF	: G <i>olivieri</i> metanol fraksiyonu
GPME	: G <i>pyrenaica</i> metanol ekstresi
GPDMeF	: G <i>pyrenaica</i> diklorometan fraksiyonu
GPEAF	: G <i>pyrenaica</i> etil asetat fraksiyonu
GPMeF	: G <i>pyrenaica</i> metanol fraksiyonu
GSME	: G <i>septemfida</i> metanol ekstresi
GSDMeF	: G <i>septemfida</i> diklorometan fraksiyonu
GSEAF	: G <i>septemfida</i> etil asetat fraksiyonu
GSMeF	: G <i>septemfida</i> metanol fraksiyonu
GVBME	: G <i>verna</i> subsp. <i>balcanica</i> metanol ekstresi
GVBDMeF	: G <i>verna</i> subsp. <i>balcanica</i> diklorometan fraksiyonu
GVBEAF	: G <i>verna</i> subsp. <i>balcanica</i> etil asetat fraksiyonu
GVBMeF	: G <i>verna</i> subsp. <i>balcanica</i> metanol fraksiyonu
GVPME	: G <i>verna</i> subsp. <i>pontica</i> metanol ekstresi

GVPDMeF	: <i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> diklorometan fraksiyonu
GVPEAF	: <i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> etil asetat fraksiyonu
GVPMEF	: <i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> metanol fraksiyonu
HCl	: Hidroklorik asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPAEC-PAD	: Yüksek Performanslı Anyon Değişimi Kromatografisi- Elektroamperometrik Dedektör
HPGPC	: Yüksek Performanslı Jel Geçirgenliği Kromatografisi
HPLC-DAD	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Diode Array Dedektör
IS	: İç standart (Internal Standard)
ISSR-PCR	: Basit dizi tekrarlan arası-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi
K₄[Fe(CN)₆]•3H₂O	: Potasyum hekzasiyanofelTat II trihidrat
K₂S₂O₈	: Potasyum persülfat
K	: Ksantin
KO	: Ksantin oksidaz
LC/MS-IT-TOF	: Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi
MAO	: Monoamin oksidaz
MgCl₂	: Magnezyum klorür
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MI	: Mitotik indeks
NaCl	: Sodyum klorür
NGF	: Sinir gelişme faktörü
NK	: Doğal öldürücü hücreler
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PT	: Protrombin zamanı
RAPD-PCR	: Rastgele çoğaltılmış ONA farklılığı-polimeraz zincir reaksiyonu

	yöntemi
SLE	: Sistemik lupus eritematozus ;
SOD	: Süperoksit dismutaz
SRLR	: Cinsiyete bağlı resesif letal yöntemi
STZ	: Streptozosin
RTCA-DP	: xCelligence real time hücre analiz sistemi
RUE	: Rutine eşdeğer
TEAC	: Troloksa eşdeğer antioksidan kapasite
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
TCA	: Trikoloroasetik asit
TT	: Trombin zamanı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gentianaceae familyasına ait *Gentiana* türlerinin kök ve rizomları gastrointestinal ve antiinflamatuvar hastalıkların tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır. Dünyada 400 kadar türü kayıtlı olan cinsin ofisinal türü olan *G. lutea* L., halk arasında ateş düşürücü, antidepresan, yara iyileştirici ve acı glikozitlerinden dolayı iştah açıcı amaçlarla yaygın şekilde kullanılmaktadır (European Medicines Agency [EMA], 2009). Dünyada yaklaşık 400 türü olan *Gentiana* cinsinin ülkemizde *G. lutea* L. ve endemik olan *G. boissieri* Schott & Kotschy ex Boiss. dışında 10 türü daha bulunmaktadır. Bu türler; *G. asclepiadea* L., *G. aquatica* L., *G. brachyphylla* Vill., *G. cruciata* L., *G. gelida* Bieb., *G. nivahs* L., *G. olivieri* Griseb., *G. pyrenaica* L., *G. septemfida* Pallas, *G. verna* L. olarak sayılmaktadır (Davis, 1978). Türlerden *G. aquatica* L. ve *G. nivalis* L. tek yıllık bitkiler olup, diğerleri çok yıllık, otsu formdadır (Pritchard, 1978, s. 184).

Gentiana türleri halk arasında çok eski zamanlardan beri iştah açıcı, sindirim stimülanı, antikonvülzan, antihipertansif, antidiyabetik, antihepatotoksik, antinosiseptif, antiinflamatuvar, antiülserojenik, sedatif, antioksidan, antidepresan ve antianemik olarak kullanılmaktadır. Tüm *Gentiana* türleri başta kök olmak üzere bütün bitki kısımlarında bulunan sekoiridoit glikozitlerinden dolayı acı tatlarıyla karakterizedir. Bu acı tat nedeniyle Avrupa'da birçok iştah açıcı preparatın bileşiminde stimulan ve midevi tonik olarak bulunmaktadır (Şenol vd., 2012, s. 802).

Gentiana cinsine ait bitkiler, son otuz yıldır fitokimya ve farmakoloji alanında yapılan pekçok çalışmaya konu olmuştur. Yapılan kaynak taramalarında, ülkemizde yetişen türler arasından *G. lutea* subsp. *symphyandra* (Murb.) Hayek köklerinin iridoitleri ve farmakolojik aktiviteleri (Öztürk, 1997), *G. olivieri* Griseb.'in iridoitleri ve farmakolojik aktiviteleri (Ersöz, 1988) hakkında doktora tezleri, yine *G. olivieri* Griseb.'in *in vitro* antitümöral aktivitesi hakkında bir yüksek lisans tezi, (Yalım, 2014), ayrıca *G. pyrenaica* L., *G. verna* subsp. *balcanica* Pritchard ve *G. verna* subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek'in toprak üstü kısımlarının monoamin oksidaz-A (MAO-A) inhibitör etki'leri hakkında bir doktora tezi (Kaya, 2013) ve *G. olivieri* Griseb., *G. asclepiadea* L., *G. cruciata* L., *G. gelida* Bieb. ve *G. septemfida* Pallas'ın izoorientin içeriği konulu bir yüksek lisans tezi (Edis, 2003) bulunmaktadır. Bunların dışında ise söz konusu türleri ile ilgili çok sayıda fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışması bulunmaktadır. Bunların

bazıları; türlerin toprak üstü kısımları ve köklerinden hazırlanan ekstrelerde gentiopikrin, gentiopikrozit (Savikin-Fodulovic vd., 2003, s. 380; Öztürk vd., 2006, s. 292), sekoiridoit (Garcia vd., 1989, s. 998), alkaloid (Mansoor vd., 2000, s. 108) içeriklerinin araştırılmasıdır. Türlerin biyolojik aktivite çalışmaları genellikle halk arasında kullanımlarından yola çıkılarak gerçekleştirilmiştir. Kaynaklarda farklı *Gentiana* türleri ile ilgili hepatoprotektif (Deliorman Orhan vd., 2003, s. 2275), antidiyabetik (Sezik vd., 2005, s. 1224), antiinflamatuvar (Kupeli vd., 2004, s. 787), radyoprotektif (Menkovic vd., 2010, s. 1694), antioksidan (Hudecova vd., 2012, s. 105), *in vitro* kolinesteraz (asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz)inhibisyonu (Şenol vd., 2012, s. 803), genotoksik ve sitotoksik (Hudecova vd., 2010, s. 23), antimikrobiyal (Mihailovic vd., 2011, s. 1165) ve MAO-A inhibitör (Kaya vd., 2014, s. 505) etki çalışmaları göze çarpmaktadır.

Bu çalışmada, *G. asclepiadea* L., *G. boissieri* Schott & Kotschy ex Boiss., *G. brachyphylla* Vill., *G. cruciata* L., *G. gelida* Bieb., *G. olivieri* Griseb., *G. pyrenaica* L., *G. septemfida* Pallas, *G. verna* subsp. *balcanica* Pritchard ve *G. verna* subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek'in toprak üstü kısımlarından hazırlanan ham metanol ekstreleri ile diklorometan, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının fitokimyasal bileşimlerinin yanı sıra antioksidan aktiviteleri ABTS+ Radikal Katyon Renksizleştirme Yöntemi, Redükleyici Güç Ölçümü, Metal Şelatlayıcı, DNA Hasarı Koruyucu yöntemi ile; Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BChE) enzim inhibitör aktiviteleri Ellman testi ile; antiinflamatuvar aktiviteleri Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve Siklooksijenaz-2 (COX-2) İnhibitör Testi ile; Monoamin oksidaz inhibitör aktiviteleri Monoamin oksidaz A (MAO-A) ve Monoamin oksidaz B (MAO-B) İnhibitör Testi ile ve genotoksik etki ise moleküler belirteçler yardımı ile incelenmiştir. *Gentiana* ekstre ve fraksiyonlarının kimyasal bileşimleri ise çeşitli kromatografik ve spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gentianaceae Familyası

Tek yıllık, iki ya da çok yıllık otlar. Yapraklar glabros (tüysüz), tam, tabanda genellikle bir rozet şeklinde, gövdedekiler genellikle opozit (karşılıklı) ve sessi! (sapsız), sıklıkla tabanda konnat. Çiçekler 4-8 parçalı, aktinomorfik. Kaliks ± derince bölünmüş. Korolla lopları tomurcuk içinde buruşuk halde, genellikle tüysüz. Stamenler korolla tüpü içinde; anterler tabanda hafif kordat, basifiks ya da nadiren versatil. Ovaryum süperior, tek lokuluslu, 2 parietal plasentalı, ovüller çok sayıda. Meyveler 2 valf ile açılan bir kapsül (Davis, 1978, s. 176).

2.2. *Gentiana* L. Cinsi (Davis, 1978, s. 176).

Çok yıllık (nadiren tek yıllık) bitkiler. Habit (görünüşleri) çeşitli: bazen ± dallanmış, sık dokulu sürünücü yapıda, bazen etli bir rizomdan çıkan bir veya birkaç gövdeli. Çiçekler 4-5(-'9) parçalı. Kaliks derince bölünmüş, loplar bir iç membran ile kısmen birleşmiş. Korolla hipokrateriformdan (yayık laminalı boru şeklinde) infundibulara (huni şeklinde) kadar, uçuk ya da koyu menekşe rengi-mavi, sarı ya da krem (nadiren beyaz), genellikle ana loplara ile daha küçük olan ikincil loplara (kıvrımlar) alternat dizilimli; boğaz iç kısmında fimbriat (saçaklı) değil. Anterler bazifiks. Ovaryum kısa bir stilus üzerinde daralmış ya da mevcut değil; stigma iki, düşücü. Nektarlar ovaryum tabanında mevcut. Kapsül elipsoidden oblonga kadar, stipitat (saplı) ya da sessi! (sapsız).

1. Bazal yapraklar çok geniş (40x25 cm'e kadar); korolla ½'sinden fazla bölünmüş, parlak sarı **1. *lutea***

1. Bazal yapraklar 15x3 cm'e kadar (sıklıkla daha kısa); korolla ½'sinden az bölünmüş, beyaz, açık sarı, mavi ya da menekşe rengi

2. Gövdeler uzun, genellikle 30 cm'den yüksek, yanlarda çiçekli

3. Yapraklar akut; çiçekler 5 parçalı; anterler konnat **2. *asclepiadea***

3. Yapraklar obtus; çiçekler 4 parçalı; anterler serbest **3. *cruciata***

2. Gövdeler daha kısa, genellikle 30 cm'den kısa, çiçekler terminal ya da terminal-lateral

4. Tek yıllık bitkiler
5. Korolla açık mavi, loplar obtus; kapsül stipitat **5. *aquatica***
5. Korolla parlak mavi, loplar akut; kapsül sessil **12. *nivalis***
4. Çok yıllık bitkiler
6. Rizom apeksi fibröz bir halka ile sarılmış; gövde dik, 10-40 cm **4. *olivieri***
6. Rizom apeksi fibröz halka ile sarılı değil; gövdeler genellikle prokumbent ya da 10 cm'den daha kısa
7. Korolla açık sarı **9. *gelida***
7. Korolla mavi (nadiren beyaz)
8. Çiçekler yanlarda baş şeklinde toplanmış çiçek durumları halinde, 3 ya da daha fazla sayıda; gövdeler basit **7. *septemfida***
8. Çiçekler genellikle tek tek, terminal; gövdeler basit ya da dallanmış
9. Çiçekli gövdeler 11 ya da daha fazla internodlu; gövdeler basit, prostrat **8. *boissieri***
9. Çiçekli gövdeler I l'den daha az internodlu; gövdeler genellikle tabanda çok dallanmış, sık dokulu (halı gibi)
10. İkincil korolla loplari, ana toplara \pm eşit, korolla 10parçalı; internodlar \pm eşit **6. *pyrenaica***
10. İkincil korolla loplari küçük ana lobun $\frac{1}{2}$ 'sinden daha kısa; internodlar çiçeklenme sonrası uzamış
11. En uzun rozet yapraklar gövde yapraklarından daha uzun; korolla (20-)28 mm ya da daha uzun **10. *verna***
11. Rozet yapraklar gövde yapraklarına \pm eşit; korolla 20 mm'den kısa **11. *brachyphylla***

1. *G. asclepiadea* L.



Görsel 2.1. *G. asclepiadea* L.

100 cm kadar olabilen robust (kuvvetli) bitkiler. Gövde çok sayıda, basit, 14-20 intemodlu; çiçekler üstteki yaprak koltuklarında, \pm uzamış bir baş şeklinde. Yapraklar ovat-lanseolattan lanseolata kadar, gövde tepesine doğru daha dar ve daha yoğun, genellikle 5 damarlı, yeşil. Çiçekler genellikle 5 parçalı, sessi) (sapsız). Kaliks 12-20 mm, yaklaşık yarısına kadar dar, (tepe) akut (sivri) ve yayık loplul. Korolla orta maviden koyu maviye kadar, nadiren beyaz, 30-50 mm, loplann 1/6'sına kadar bölünmüş, loplul triangular, (tepede) akut; yan loplul daha küçük ve \pm düzensiz. Kapsül elipsoid, kısaca stipitat.

Çiçeklenme: Ağustos-Eylül

Yetiştığı yerler: Otluk alanlar ve ormanlık açıklıkları

Yükseklik: 300-2000 m

Toplandığı yer: Kastamonu (Ilgaz Dağı)

2. *G. boissieri* Schott & Kotschy ex Boiss.



Görsd 22. *G. boissieri* Schott & Kotschy ex Boiss.

G. septemfida'nın küçük formlarına benzer. Gövdeler 4-1 Ocm, prostrat, genellikle 1 çiçekli. Yapraklar ovat, subakut, 3 damarlı, 10x5 mm'ye kadar. Kaliks c. 15 mm, 1/3'üne kadar bölünmüş; loplar 1,5-2 mm eninde. Korolla 25-30 mm, 1/6'sına kadar bölünmüş; loplar triangular; yan loplar c. ½'si kadar uzunlukta, 3-4 dişli.

Çiçeklenme: Temmuz-Eylül

Yetiştigi yerler: Kireçtaşı turbalıkları

Yükseklik: 2400-2700 m

3. *G. brachyphylla* Vill.

G. verna'ya benzer, fakat tüm kısımları ona göre daha küçüktür. Rozet yapraklar 10x5 mm'ye kadar, yoğun imbrikat, eliptik ya da spatulat, obtus. Çiçekler sesi!. Kaliks 8-12 mm, ¼'üne kadar bölünmüş, tüp kanatlı ya da köşeli. Korolla 15-20(-28) mm, loplar obtus; tüp, muhtemel olarak çiçekte daha az yayık olan lopları ile *G. verna*'ninkine göre daha dar.

Çiçeklenme: Temmuz-Ağustos

Yetiştigi yerler: Alp in çayırlar

Yükseklik: 2500-2800 m

(Pritchard, 1978, s. 183-190).

4. *G. cruciata* L.



Görsel 2.3. *G. cruciata* L.

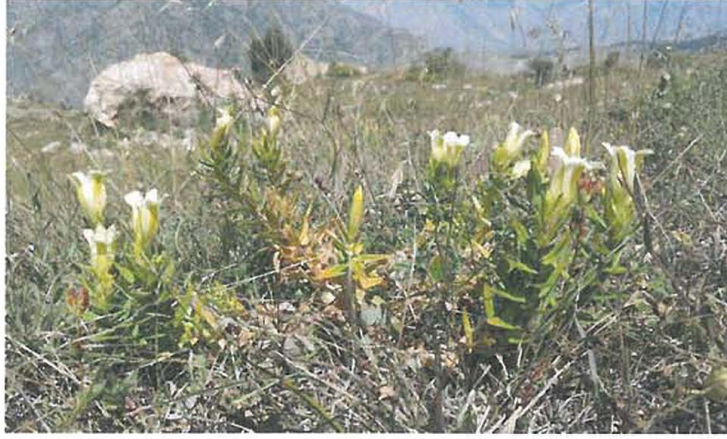
50 cm'ye kadar yükselebilen robust bitkiler. Gövdeler basit, kalın, bazalda rozet yapraklar üzerinde sıklıkla çok sayıda, 6-10(-12) intemodlu; çiçekler bir yan başçıkta ve üst yaprak aksil (koltuk altı)lerinde. Yapraklar 30- 100 x 10-30 mm, ovat-lanseolat, (tepede) subakut, 3 damarlı, tabanda± konnat ve özellikle alttakiler kın şeklinde. Çiçekler 4 parçalı, sessil. Kaliks 8-15 mm, loplarmın 1/2'sine kadar triangular. Korolla mavi, sıklıkla morumsu ve yeşil çizgili, 15-30 mm, intermediat loplard düzensiz, kısa. Kapsül dar, sessil ya da subsessil.

Çiçeklenme: Temmuz-Eylül

Yetiştığı yerler: Orman kenarları ve otlaklar

Yükseklik: 800-2500 m

5. *G. gelida* Bieb.



Görsel 2.4. *G. gelida* Bieb.

G. septemfida'ya çok benzer ama sıklıkla daha robust, 40 cm'ye kadar yükselen gövdeler 20 kadar internodlu. Çiçekler çoğunlukla 5 parçalı. Kaliks 16-30 mm; loplar linear-lanseolat, akut. Korolla açık sarı ya da krem, 30-45(-50) mm; yan loplar± dentat.

Çiçeklenme: Ağustos-Eylül

Yetiştği yerler: Açık otlaklar ve meralar

Yükseklik: 2000-3200 m

6. *G. olivieri* Griseb.



Görsel 2.5. *G. olivieri* Griseb.

Rozet yapraklı bir tabandan yükselen çiçekli gövdeler 1-3, dik, 10-30(-40) cm. Rizom uç kısmında fibröz bir halka ile sarılmış. Internodlar az, iyi gelişmiş gövde yapraklarının olduğu üst kısımlar dışında. Rozet yapraklar 15 cm'ye kadar, oblanseolat,

obtus ya da subakut; gövde yaprakları 6 cm'ye kadar, lanseolat, tabanda perfoliat ve gövdeyi sarar. Çiçekler (1-)3-1 O,± terminal bir baş şeklinde, 5 parçalı. Kaliks 12-15 mm, ½'sine kadar bölünmüş. Korolla mavi, iç kısımda± beyaz çizgili, 20-30 mm, yan lopların ½ uzunluğu kadar yaklaşık 1/3'üne kadar bölünmüş. Kapsül stilusa doğru daralır ve kısa saplı.

Çiçeklenme: Nisan-Temmuz

Yetiştği yerler: Kireçtaşı, marn ya da killi otlaklar

Yükseklik: 350- 2300 m

1. *G. pyrenaica* L.



Görsel 2.6. *G. pyrenaica* L.

Dallanmış bir rizomdan yükselen sıklıkla çok sayıda gövdeli bitkiler, kümeler halinde ya da kısaca sürüncüler şeklinde. Gövdeler 2-5 cm, ± küme oluşturan alt yapraklardan dallandığında her dalda 6'ya kadar intemodlu; çiçekler tek tek, terminal. Yapraklar dar lanseolattan lineara kadar, 15x4 mm'ye kadar, en alttaki çok küçük ve pul benzeri. Çiçekler 5 parçalı, fakat yan loplar çok genişlediği için 10 parçalı gibi görünür. Kaliks 12-20 mm, c. 1/2x korolla boyu kadar, c. ¼'üne kadar bölünmüş. Korolla koyu mavi ya da menekşe rengi-mavi, 20-30 mm, c. ¼'ü kadar bölünmüş; loplar ovat, obtus, yayık; yan loplar apeks ± dentat. Kapsül stipitat.

Çiçeklenme: Mayıs-Ağustos

Yetiştği yerler: Alpin turf

Yükseklik: 1800-3100 m

8. *G. septemfida* Pallas



Görsel 2.7. *G. septemfida* Pallas

Prostrat ya da yükselici bitkiler; gövdeler çok sayıda, 5-30 cm, 10-16 internodlu, basit ya da üst yaprakların aksillerinde 1-5 çiçekli± terminal ?aşçıklar halinde. Yapraklar çok çeşitli; alt kısımlarda pul benzeri,± ovat, üst kısımlarda dereceli daralan lanseolattan lineara kadar; bazen kordat tabanlar boyunca genişlemiş; yaprak tabanları en tepedekiler haricinde bir kın şeklinde birleşmiş; yanlarda 40x25 mm'ye kadar. Çiçekler 5-6(-7) parçalı. Kaliks 12-24 mm, korolla boyunun yarısından daha kısa, c. ½'sine kadar bölünmüş; loplar çeşitli, ± lanseolat, akut, eni 3 mm'ye kadar. Korolla koyu maviden koyu mavi-mora kadar, (25-)30-40 mm, 1/6'sına kadar bölünmüş, loplar triangular, akut ya da subakut; yan loplar uzunluğunun 1/3-½'si kadar, fimbriat. Kapsül kısaca stipitat.

Çiçeklenme: Temmuz-Ağustos

Yetiştği yerler: Alpin çayırlar, alpin su basma bölgeleri ve *Abies* orman açıklıkları

Yükseklik: 1800-3200 m

9. *G. verna* L.

Çok yıllık bitkiler, gövdeler çiçekte 10 cm'ye kadar fakat genellikle meyvede uzamış. Yapraklar tabanda yoğun, rozet şeklinde, genişten dara kadar eliptik ya da ovat, bazen kenarlarda papilloz, 20x8 mm'ye kadar; gövde yaprakları 2-3 parçalı, genellikle daha dar. Çiçekler tek tek, 5 parçalı. Kaliks 1-2 parçalı, 1/3'üne kadar bölünmüş, köşelerde± kanatlı. Korolla koyu mavi, göze benzeyen beyaz lekeli, loplar genişçe obtus ve yayık; yan loplar küçük ve dar.

8. *G. septemfida* Pallas



Görsel 2.7. *G. septemfida* Pallas

Prostrat ya da yükselici bitkiler; gövdeler çok sayıda, 5-30 cm, 10-16 internodlu, basit ya da üst yaprakların aksillerinde 1-5 çiçekli± terminal başcıklar halinde. Yapraklar çok çeşitli; alt kısımlarda pul benzeri,± ovat, üst kısımlarda dereceli daralan lanseolattan lineara kadar; bazen kordat tabanlar boyunca genişlemiş; yaprak tabanları en tepedekiler haricinde bir kn şeklinde birleşmiş; yanlarda 40x25 mm'ye kadar. Çiçekler 5-6(-7) parçalı. Kaliks 12-24 mm, korolla boyunun yarısından daha kısa, c. ½'sine kadar bölünmüş; loplar çeşitli, ± lanseolat, akut, eni 3 mm'ye kadar. Korolla koyu maviden koyu mavi-mora kadar, (25-)30-40 mm, 1/6'sına kadar bölünmüş, loplar triangular, akut ya da subakut; yan loplara uzunluğunun 1/3-½'si kadar, fimbriat. Kapsül kısaca stipitat.

Çiçeklenme: Temmuz-Ağustos

Yetiştği yerler: Alpin çayırlar, alpin su basma bölgeleri ve *Abies* orman açıklıkları

Yükseklik: 1800-3200 m

9. *G. verna* L.

Çok yıllık bitkiler, gövdeler çiçekte 10 cm'ye kadar fakat genellikle meyvede uzamış. Yapraklar tabanda yoğun, rozet şeklinde, genişten dara kadar eliptik ya da ovat, bazen kenarlarda papilloz, 20x8 mm'ye kadar; gövde yaprakları 2-3 parçalı, genellikle daha dar. Çiçekler tek tek, 5 parçalı. Kaliks 1-2 parçalı, 1/3'üne kadar bölünmüş, köşelerde± kanatlı. Korolla koyu mavi, göze benzeyen beyaz lekeli, loplara genişçe obtus ve yayık; yan loplara küçük ve dar.

I. Korolla (20-)28-37(-39) mm; rozet yapraklar± dar eliptik, genellikle boyu eninin 2½ katından uzun, subakut **su bsp. *balcanica***

1. Korolla (38-)40-46 mm; rozet yapraklar ovattan eliptiğe kadar, genellikle boyu eninin 2½ katından uzun değil, ± obtus **subsp. *pontica***

***G. verna* subsp. *balcanica* Pritchard**



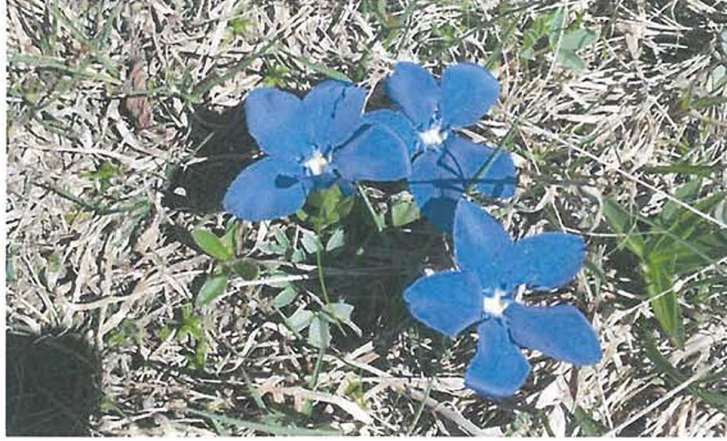
Görsel 2.8. *G. verna* subsp. *balcanica* Pritchard

Çiçeklenme: Mayıs-Haziran

Yetiştığı yerler: Alpin meralar, kireçtaşı yamaçları ve yamaç eteklerinde biriken taş, toprak yığınları

Yükseklik: 1800-2225 m

G. verna subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek



Görsel 2.9. *G. verna* subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek

Çiçeklenme: Mayıs-Temmuz

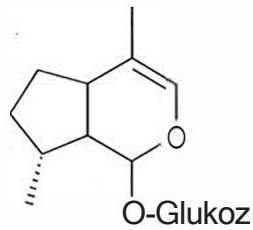
Yetiştirildiği yerler: Alpin otlaklar ve turbalıklar

Yükseklik: 1830-3660 m

2.3. *Gentiana* Türlerinin Fitokimyasal Bileşimi

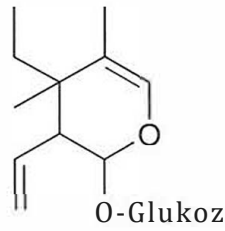
Gentiana cinsinin içerdiği türlerin kimyasal bileşiminde; toplamda 593 bileşik olmak üzere iridoit, ksanton, flavonoit, alkaloid ve triterpen yapısında bileşikler ile çeşitli sekonder metabolitler tespit edilmiştir (Pan vd., 2016, s. 108).

2.3.1. İridoitler



Şekil 2.1. *İridoit Glikozit İskeleti*

İridoitler, siklopentanopiran halkasına sahip acı lezzetli monoterpen laktonlardır. Yapılarında bir o-piran bir de siklopentan olmak üzere iki siklik halka bulunmaktadır. *Gentiana* türlerinin bileşiminde 120'den fazla iridoit ve sekoiridoit bileşiği izole edilmiştir. Bu cinse ait türlerde tespit edilen iridoitlerde, 1 ve 7. karbon atomuna (C1 ve C7) bağlı oksijen konumlanmış olup çok bilinen iridoitlerden loganin, loganik asit ve türevlerinde olduğu gibi 11. karbon atomuna karboksil (COOH) veya ester grubu bağlıdır. Bazen aldehit (HO-C) grubu karboksil grubu (C=O) ile oksijenlenmiştir (örneğin; 2'-O-(2,3-dihidroksibenzoil)-7-ketologanin ve 2',3',6'-tri-O-asetil-4'-O-[(E)-4-O-,B-D-glukopiranozil]kumaroil]-7-ketologaninde olduğu gibi). Loganetinde olduğu gibi karbon atomuna bağlı oksijene bir ,B-O-glukopiranozil grubu bağlı olabilir.



Şekil 2.2. *Sekoiridoit Glikozit İskeleti*

Sekoiridoitler ise iridoitlerin siklopentan halkasının parçalanması ile oluşan maddelerdir. Bunlar genellikle glikozit halinde bulunurlar. Yapılarında bulunan HO-C ve C 11-OOH arasındaki laktan halkası ile karakterize olup gentiopikrozit, svertiamarin, sverozit ve türevleri en bilinen sekoiridoit örnekleridir. Ayrıca 2'-O-feruloilloganin, gentiotriflorozit, gentioumozit A-E, sekologanol, östomozit, östomoruzzit, 3'-O-asetilsverozit, rodantozit A-C, gentimakrozit, makrofillozit A, kingizit, skabrazit, septemfidozit, oliverozit A ve B farklı *Gentiana* türlerinden izole edilen iridoitlere örnektir (Pan vd., 2016, s. 108).

Gentiana türlerinden farklı yapıda yeni iridoitlerin de izole edildiği rapor edilmiştir. İzole edilen yeni iridoit glikozitlere iridoit-sekoiridoit yapısında olan gentiournozidler A-C örnek verilebilir. Sekoiridoit yapısında olan rodantozidler A-C, *G. rhodantha*'dan; açillenmiş sekoiridoit yapısında olan 2'-O-(2,3-dihidroksibenzoil)gentiopikrozit ve 2'-O-(2,3-dihidroksibenzoil) svertiamarin ile 3'-O-(2,3-dihidroksibenzoil) sverozit *G. rigescens*'ten izole edilmiştir (Suyama vd., 2013, s. 166).

İridoitler *Gentiana* türlerinde bulunan ana bileşikler değildir ancak Gentianaceae familyasında çok belirgin bir role sahiptirler.

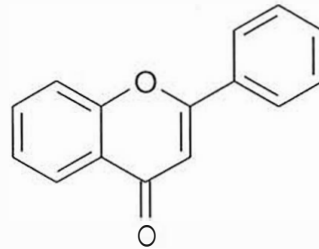
Gentiana türlerinde en yaygın bulunan loganik asit, gentiopikrozit, sverozit ve svertiamarin iridoitlerinin *Gentiana* cinsi açısından karakteristik olmalarının yanı sıra bu cinsteki iridoitlerin biyosentetik yolda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Gentianaceae familyasında biyosentetik yolağın 1967 ve 1976 yılları arasında araştırılmış ve biyosentetik yolağın mevalonolaktonla başlayıp gentiopikrozitle sonuçlandığı bulunmuştur (Xu vd., 2005, s. 669).

2.3.2. Ksantonlar

Farklı *Gentiana* türlerine ait toprak üstü kısımlardan 60'a yakın ksanton bileşiği izole edilmiştir. Bunlardan bazıları; 1,5-dihidroksi-3-metoksiksanon, izogentisin, gentiozot, svertianin 7-0-primeverozit, gentiakalein, desasetilgentiabavarutinozot, dekuztatın, izobellidifolin, mangiferin ve lanserin'dir. Dekuztatın, gentiakalein ve mangiferin en yaygın olanlardır. Lanserin ve mangiferin gibi bazı ksantonlar C-glikozitlerinden oluşmaktadır.

Mangiferin ve onun 0-glikozidik türevleri olan mangiferin 7-0-8-D-glukopiranozot (neomangiferin) ve mangiferin 6-0-P-D-glukopiranozot 2-C-glikozilksantonlardır (Pan vd., 2016, s. 108). Ayrıca *Gentiana* türlerinden farklı yapıda yeni ksanton bileşikleri de tespit edilmiştir. Örneğin, *G. campestris*'in toprak üstü kısımlarından izole edilen kampestrozot, doğada keşfedilen ilk tetrahidroksantonundur (Kaldas vd., 1978, s. 295).

2.3.3. Flavonoidler



Şekil 2.3. Flavonoid İskeleti

Gentiana flavonoidleri, serbest ya da glikozit formunda bulunurlar. Türlerde en yaygın bulunan flavonoidler; izoorientin, izoviteksin' ve bunların 4'-glikozit türevlerinin olması izoorientin ve izoviteksin'in türlerdeki flavonoidlerin biyosentetik yolda anahtar bileşikler olduklarına işaret etmektedir (Pan vd., 2016, s. 108). *G. lutea* kök kabuklarından izole edilen (2E)-1-(2-hidroksifenil)-3-{ 5'-[3-(2-hidroksifenil)-3-okzopropil]-2',6-bis[(3-metilbut-2-en-1-il)oksi]-bifenil-3-il} prop-2-en-1-on, *Gentiana* cinsinde bulunan tek flavonoid dimerdir (Haraguchi vd., 2004, s. 2255).

2.3.4. Alkaloidler

Farklı *Gentiana* türlerinden terpenoid yapıda olan gentianin, gentianidin, gentianadin, gentianain, gentianal, gentianamin, gentiananin, gentiatibetin, gentioflavin, oliveramin, bromogentioflavin, ve oliveridin olmak üzere toplam 12 alkaloid izole edilmiştir (Pan vd., 2016, s. 108). Yapılan çalışmalarda, gentiopikrozit ve svertiamarin iridoitlerinin sulu amonyak (NH₃) çözeltisiyle muamelesi" sonucu bir monoterpene alkaloid olan gentianin'e dönüşebildiği bildirilmiştir (Kubota ve Kamikawa, 1962, s. 1046).

2.3.5. Triterpenler

Gentiana türlerinde bulunan triterpenler yapılarındaki farklı karbon iskeletlerine göre; dammaran, oleanan, ursan, lupan, hopan, çiratan, sterol ve skualen tipte olmak üzere 8'e ayrılmaktadır. Türlerin tüm kısımlarında en yaygın bulunan triterpenler oleanan ve ursan tipindedir. Diğer taraftan rizomlar ve kökler; dammaran, lupin, hopan ve çiratan tip triterpenlerce zengindir. Yüksek oranda oksijen taşıyan ursan tipi triterpenlerden; (2/3,3/3)-3,25-epid ioksi-2,24-dihidroksiurs-12-en-28-oik asit ve (2/1,3/3)-3,25-epid ioksi-2,24-dihidroksiurs-12,20(30)-dien-28-oik asit, *G. aristata* ve *G. rigescens*'ten izole edilen yeni triterpenlerdir. Ayrıca, gentirigeozitler A-E ve aglikon gentirigenik asit içeren (20S),25-epoksidammaran iskeletine sahip triterpenler *G. rigescens* köklerinden izole edilmiştir. 2,3-seko-triterpenlerden 2,3-seko-3-okzooolean-12-en-2-oik asit, roburik asit ve 2,3-seko-3-okzours-12-en-2-oik asit sadece *Gentiana* cinsinde bulunmaktadır (Pan vd., 2016, s. 108).

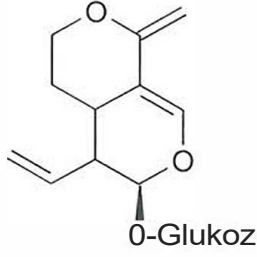
2.3.6. Diğer bileşikler

Gentiana türlerinden ligninler, siklitoller, benzoatlar, fenolik ve uçucu bileşikler gibi farklı yapıda maddeler de izole edilmiştir. *Gentiana* türlerinde bulunan anofinik asit, makrofillozit C ve D siklitollere; pranferin ve eskuletin alkollere; montanik, stearik ve palmatik asit sterollere; (-)-loliolit pironlara; (+)-8-hidroksipinorezinol ve L-sesamin lignanlara; D-sükroz ve gentiobiyoz sakkaritlere; salisilik asit, ferulik asit ve pirenozit fenolik bileşiklere; (2S)-2,3-dihidroksipropil 1,6,8-trihidroksi-3-metilantrakinon-2-karboksilat antrakinonlara; vanillolozit ve rinkozit-D fenilkarbinollere; 8,9-dihidro-4H-nafto[1,2-c:4,5-c'd'] dipiran-4,11(6H)-dion naftodipiranodiona; rodantenonlar A-C benzofenonlara; pedisellanin ve pedisellin 6-aril-2-pironlara; gentizitler A-K benzoatlara; 4-(/3-D-glukopiranozi loksi)-6-metil-1-a-tetralon a-tetralonlara; pedisellozit ve pediglukozit benzofuranlara; heksanal ve oktanal aldehytlere; oktan-3-ol ve heptan-3-ol alkollere; dodekanoik asit ve oleik asit asitlere; öjenol ve elemisin aromatik bileşiklere; butil asetat ve metil linoleat esterlere; 2-etil foran ve 2-pentil furan furanlara; neril asetat ve geranil asetat ketonlara; oktan ve dekan alifatik hidrokarbonlara; a-pinen ve p-simen monotermen hidrokarbonlara; a-karyofillen ve a-muurolen seskiterpen hidrokarbonlara; spatulenol ve viridiflorol oksijenli seskiterpenlere; 2,6,10,14-tetrametilhekzadekan diterpen hidrokarbonlara; famesil aseton ve izofitol oksijenli diterpenlere örnektir (Pan vd., 2016, s. 108).

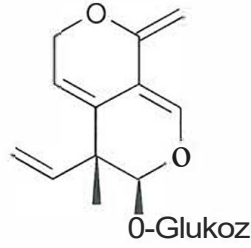
2.4. *Gentiana* Türleri Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

Gentiana türleri üzerinde 1988 yılına kadar yapılan kimyasal çalışmalar; '*Gentiana olivieri* Griseb. Üzerinde Farmakognozok Araştırmalar' isimli doktora tezinde (Ersöz, 1988), 1997 yılına kadar yapılmış olan çalışmalar, anabilim dalımızda tamamlanmış olan '*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra* Murb. (Hayek) İridoitleri' isimli doktora tezinde (Öztürk, 1997), 2013 yılına kadar olan fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalar ise 'Bazı *Gentiana* Türleri Üzerinde Farmakognozok Araştırmalar' isimli doktora tezinde derlenmiştir (Kaya, 2013). Bu tezde ise -tekrardan kaçınmak amacıyla- 2013 yılından günümüze kadar yapılmış olan fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalar derlenerek verilmiştir.

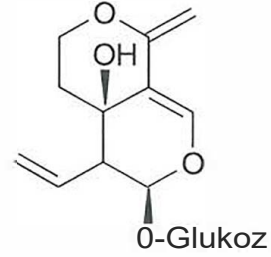
2.4.1. Fitokimyasal çalışmalar



Şekil 2.4. Sverozit



Şekil 2.5. Gentiopikrozit



Şekil 2.6. Svertiamarin

Gentiana algida Pall.

G. algida Pall.'ın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstresinin (% 60; 1:20) fraksiyonlanması sonucu loganik asit, gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, 2'-(2'', 3'-dihidroksibenzoil) sverozit, 6'-(2'',3'-dihidroksibenzoil) sverozit, 2'-(2'',3'-dihidroksibenzoil) svertiamarin, 6'-(2'',3'-dihidroksibenzoil) svertiamarin, triflorozit [(2',3',6'-triasetil-4'-(2''-hidroksi-3''-,8-D-glikoziloksibenzoil) sverozit] ve rindozit [(2',3',6'-triasetil-4'-(2''-hidroksi-3''-,8-D-glikoziloksibenzoil) svertiamarin] ile algidizit I ve algidizit II gibi iridoit glikozitleri tespit edilmiştir (Olenikov ve Chirikova, 2016, s. 637-641).

G. algida, *G. decumbens*, *G. macrophylla* ve *G. triflora* türleri fitokimyasal olarak incelendiğinde *G. decumbens*'in % 60 metanol ekstresinde izoorientin (luteolin-6-C-,8-D-glikozit), lutanarin (izoorientin-7-O-,8-D-glikozit), izoorientin-4'-O-,8-D-glikozit, izoviteksin (apigenin-6-C-,8-D-glikozit), saponarin (izoviteksin-7-O-,8-D-glikozit), izosaponarin (izoviteksin-4'-O-,8-D-glikozit) ve izoskoparin (3'-metoksiluteolin-6-C-,8-D-glikozit), loganik asit, loganik asit-6'-O-,8-D-glikozit ve svertiamarin ile oleanolik asit tespit edilmiştir. *Gentiana* deoksiyonlarında tespit edilen iridoitler; loganik asit-6'-O-,8-D-glikozit (*G. decumbens*, *G. macrophylla*, *G. triflora*), loganik asit, svertiamarin (tüm örneklerde), gentiopikrozit (*G. algida*, *G. macrophylla*, *G. triflora*) ve sverozit (*G. algida*, *G. macrophylla*) olarak belirlenmiştir. Ayrıca tüm örneklerde lutanarin, izoorientin-4'-O-glikozit, saponarin, izoorientin ve izoviteksin tespit edilmiştir. izosaponarin *G. decumbens* ve *G. triflora*'da, izoskoparin *G. decumbens*, *G. macrophylla* ve *G. triflora*'da bulunurken, ksanton C-glikozit ise sadece *G. triflora*'da bulunmuştur. *G. algida*'da ise,

izoorientin, izoorientin-4¹-O-glikozit, orientin, izoskoparin, sveltisin, svertijaponin, izoviteksin, lutanarin ve saponarin isimli :flavonoitler tespit edilmiştir (Olennikov vd., 2015, s. 19174).

Söz konusu 4 türün çaylarının (acı Gentian dekoksasyonları) fitokimyasal profilleri incelenmiş, en fazla gentiopikrozit miktarı *G algida* çayında (259.57 µg/mL), en düşükse *G triflora* (J 5.59 µg/mL) ve *G macrophylla*'da (7.08 µg/mL) bulunurken; en yüksek sverozit ve svertiamarin miktarı *G aLgida*'da (23.03 ve 26.38 µg/mL), en düşük ise *G macrophylla*'da (2.91 ve 4.02 µg/mL) belirlenmiştir. Ayrıca *G. decumbens* ve *G. triflora* çaylarının, en yüksek loganik asit-6'-O-,B-D-glikozit konsantrasyonuna (523.1 Ove 592.41 Lg/mL) sahip olduğu tespit edilmiştir. İzoorientin'e sadece *G algida* çayında (173.60 µg/mL) rastlanmış, izoorientin-4'-O-,B-D-glikozit ve mangiferin ise en fazla *G triflora*'da (204.43 µg/mL, 19.89 µg/mL) tespit edilmiştir (Olennikov vd., 2015, s. 20017).

***G apiata* N. E. Br.**

G apiata uçucu yağları ultrasonik mikrodalga ve mikrodalga ekstraksiyonu yöntemleriyle elde edilmiş ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi (GC/MS) sistemi ile analiz edildiğinde bileşimlerinde bulunan ana bileşikler: oleik asit, fenol, 2,2'-metilenbis-[6-(1, 1-dimetiltil)], linoleik asit, palmitik asit ve stearik asit olarak tespit edilmiştir (Xu vd., 2015, s. 11).

***G asclepiadea* L.**

G asclepiadea köklerinden hazırlanan metanol ekstresinin kloroform, etil asetat ve n-butanol farksiyonlarının bileşiminde Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-Diyot dizisi dedektör (HPLC-DAD) ile analizi sonucu bulunan ana sekonder metabolitler; sverozit, svertiamarin ve gentiopikrin'dir. En yüksek miktardaki sekoiridoit gentiopikrin bulunmuş olup en yüksek miktarda n-butanol fraksiyonunda (442.89 mg/g) tespit edilmiştir. En yüksek toplam fenolik, :flavonoit, flavonol ve gallotanen madde miktarı etil asetat fraksiyonunda tespit edilmiş olup sırasıyla 146.64 mg Gallik Aside Eşdeğer (GAE/g), 44.62 mg Rutine Eşdeğer (RUE/g), 22.71 mg RUE/g ve 0.99 mg GAE/g olarak bulunmuştur (Mihailovic vd., 2013, s. 812,813).

G. asclepiadea'ya ait toprak üstü kısımlar ve köklerden hazırlanan metanol ekstralarının HPLC-DAD sistemi ile analizi sonucu her iki ekstrenin bileşiminde de çok yüksek konsantrasyonlarda sverozit, svertiamarin ve gentiopikrin tespit edilmiştir (Mihailovic vd., 2013, s. 83).

***G cephalantha* Franchet ex Forbes & Hemsley**

G. cephalantha ekstresinin HPLC analizi sonucu bileşiminde % 1.35-9.67 gentiopikrozit, % 0.08-0.18 svertiamarin ve % 0.01-0.11 sverozit tespit edilmiştir (Wang vd., 2015, s. 516).

***G cruciata* L.**

G. cruciata kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstralarının bileşimlerinde majör olarak; üç sekoiridoit glikozit (svertiamarin, gentiopikrin ve sverozit) ve dört fenolik bileşik (orientin, viteksin ve izoviteksin 4',7-diglikozit, izoviteksin glikozit) bulunurken, loganik asit ve mangiferin de tespit edilmiştir (Mihailovic vd., 2015, s. 49,55).

G. cruciata toprak üstü ve köklerinden hazırlanan metanol ekstraları HPLC sistemi ile analiz edilmiş ve gentiopikrin, svertiamarin ve sverozit içerdiği belirlenmiştir (Mihailovic vd., 2014, s. 1795).

***G lutea* L.**

G. lutea L. kök ekstresinin suda çözüldükten sonra sırasıyla n-hekzan, etil asetat ve n-butanolle ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonların HPLC analizinde loganik asit 7-(2'-hidroksi-3'-O-,8-D-glukopiranozil) benzoat, 5-hidroksimetil-2-furfural, furan-2-karboksilik asit, 2,3-dihidroksibenzoik asit, gentiopikrozit, izoviteksin, gentisin 7-O-primeverozit, izogentisin 3-O-primeverozit, gentisin, izogentisin, vanilik asit, loganik asit, sverozit, 6'-O-glukozilgentiopikrozit, svertiajapozit D, anofinik asit ve 2-metoksianofinik asit tespit edilmiştir (Amakura vd., 2016, s. 78-82).

Ayrıca, Amaro Sibilla® isimli acı likör; gentian, kına kına, tarçın, karanfil, yıldız anasonu, portakal ve ravent kabuk, kök, çiçek ve meyvelerinin alkol ekstralarının karışımına şeker veya diğer tatlandırıcıların eklenmesiyle hazırlanmakta olup % 34 alkol

G. asclepiadea'ya ait toprak üstü kısımlar ve köklerden hazırlanan metanol ekstralarının HPLC-DAD sistemi ile analizi sonucu her iki ekstrenin bileşiminde de çok yüksek konsantrasyonlarda sverozit, svertiamarin ve gentiopikrin tespit edilmiştir (Mihailovic vd., 2013, s. 83).

***G. cephalantha* Franchet ex Forbes & Hemsley**

G. cephalantha ekstresinin HPLC analizi sonucu bileşiminde % 1.35-9.67 gentiopikrozit, % 0.08-0.18 svertiamarin ve % 0.01-0.11 sverozit tespit edilmiştir (Wang vd., 2015, s. 516).

***G. cruciata* L.**

G. cruciata kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstralarının bileşimlerinde majör olarak; üç sekoiridoit glikozit (svertiamarin, gentiopikrin ve sverozit) ve dört fenolik bileşik (orientin, viteksin ve izoviteksin 4',7-diglikozit, izoviteksin glikozit) bulunurken, loganik asit ve mangiferin de tespit edilmiştir (Mihailovic vd., 2015, s. 49,55).

G. cruciata toprak üstü ve köklerinden hazırlanan metanol ekstraları HPLC sistemi ile analiz edilmiş ve gentiopikrin, svertiamarin ve sverozit içerdiği belirlenmiştir (Mihailovic vd., 2014, s. 1795).

***G. lutea* L.**

G. lutea L kök ekstresinin suda çözüldükten sonra sırasıyla n-hekzan, etil asetat ve n-butanolle ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonların HPLC analizinde loganik asit 7-(2'-hidroksi-3'-0-/3-D-glukopiranozil) benzoat, 5-hidroksimetil-2-furfural, furan-2-karboksilik asit, 2,3-dihidroksibenzoik asit, gentiopikrozit, izoviteksin, gentisin 7-0-primeverozit, izogentisin 3-0-primeverozit, gentisin, izogentisin, vanilik asit, loganik asit, sverozit, 6'-0-glukozilgentiopikrozit, svertiajapozit D, anofinik asit ve 2-metoksianofinik asit tespit edilmiştir (Amakura vd., 2016, s. 78-82).

Ayrıca, Amaro Sibilla® isimli acı likör; gentian, kına kına, tarçın, karanfil, yıldız anasonu, portakal ve ravent kabuk, kök, çiçek ve meyvelerinin alkol ekstralarının karışımına şeker veya diğer tatlandırıcıların eklenmesiyle hazırlanmakta olup % 34 alkol

içermektedir. Likörün filtre edilmesini takiben yoğunlaştırılmış (alkol ve su) ve kalan bakiye metanolle ekstre edilerek HPLC-MS-MS analizinde; acı likörün ve metanol alt ekstresinde şikimik, gallik, klorojenik, kafeik, p-kumarik, ferulik, tr-sinamik asitler ile (+)-kateşin, (-)-epikateşin, kinin, naringin, hesperidin, amarogentin, öjenol, tr-sinamaldehit ve yüksek miktarda gentiopikrozit tespit edilmiştir. Metana! alt ekstresinin bileşiminde ise oldukça yüksek oranda gentiopikrozit, kinin, naringin ve hesperidin (1200, 81.20, 104.21 and 247.97 µg/g, sırasıyla) tesbit edilmiş olup, bu miktarların likördeki miktarlara yakın olduğu görülmüştür. Toplam fenolik madde miktarı, etanol : etil asetat 1:1 ile hazırlanan ekstrede (256.55 ± 1.81 mg GAE/g ekstre), etanol ekstresinden (127.66 ± 1.33 mg GAE/g ekstre) daha fazla bulunmuştur (Mustafa vd., 2016, s. 134, 138).

G. lutea köklerinin sulu metana! (metanol:su, 50:50) ve su ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş ve sırasıyla 12.03 ± 1.8 ve 3.79 ± 1.7 g GAE/g bulunmuştur. Sulu metana! ekstresinin bileşiminde yüksek miktarda gentiopikrozit (1805 ± 62 mg/L ekstre) ve sverozit (72 ± 4 mg/L ekstre) tespit edilmiştir (Azman vd., 2014, s. 465).

İber yarımadası'nın kuzey-batı bölümüne endemik ve nesli tükenmekte *G. lutea* L. subsp. *aurantiaca* M. Lainz ve 32 yabancı popülasyonuna ait köklerinin metana! ekstrelerinin bileşimindeki acı bileşiklerin konsantrasyon farklılığı HPLC ile araştırılmış; Lacina, Babia ve Omafia'nın yüksek rakımlı bölgelerinin yüksek alüvyon içerikli topraklarında yetişen kök örneklerinin metanol ekstrelerinde sekoiridoit oranı ve kök gelişimi yüksek bulunmuştur (Gonzalez-López vd., 2015, s. 932).

***G. macrophylla* Pall.**

G. macrophylla Pall.'ın çiçeklerinden hazırlanan sulu etanol(% 75) ekstresinin ve petrol eteri, kloroform, etil asetat ve n-butanol fraksiyonlarında HPLC analizleri sonucunda loganik asit, svertiamarin, gentiopikrozit ve sverozit tespit edilmiştir (Jia vd., 2016, s. 1-9).

Ayrıca köklerin % 80 etanollü ekstresinde toplam fenolik madde miktarı 98.26 ± 3.99 GAE/g, toplam flavonoit miktarı ise 10.68 ± 1.01 RUE/g olarak bulunurken, ana bileşikler gallik asit (4.36 ± 0.19 mg/g), kateşin (2.17 ± 0.21 mg/g), gentisik asit (13.69 ±

0.76 mg/g) ve kafeik asit (47.34 ± 1.98 mg/g) olarak tespit edilmiştir (Huang vd., 2015, s. 2).

***G. nubigenan* Edgew**

G. nubigenan çiçeklerinin uçucu yağı GC/MS ile analiz edilmiş ve bileşiminde bulunan ana bileşikler; furfural (% 11.078), 5-metil-2-furankarboksi aldehit(% 7.259), benzoik asit(% 6.495), 2-metoksi vinil fenol(% 2.120), palmitik asit(% 12.623), linoleik asit(% 4.445), a-linolenik asit(% 3.228), n-stearik asit(% 2.614) ve n-trikosan (% 5.435) olarak tespit edilmiştir (Yang vd., 2014, s. 41).

***G. olivieri* Griseb.**

G. olivieri Griseb.'nin toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi ve etil asetat, *n*-butanol ve su fraksiyonlarında HPLC ve FT-IR analizleri sonucu gentiopikrozit, izoorientin ve sükroz tespit edilmiştir (Baran vd., 2016, s. 2).

***G. rigescens* Franch ex Hemsi.**

Doğal ve kültüre alınmış *G. rigescens*'in kök, gövde ve yaprak kısımlarında FTIR ile esterler, terpenoitler, sakkaritler, lignin ve gentiopikrozit tespit edilmiş, doğal ve kültüre alınmış kök örneklerinde gentiopikrozit miktarının gövde ve yapraklara kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Shen vd., 2016, s. 667-671).

Çin'in Yunnan bölgesi'ne ait çeşitli lokalitelerinden toplanan *G. rigescens*'in farklı kısımlarından hazırlanan metanol ekstreleri sıvı kromatografisi-ultraviyole ışımata tandem kütle spektroskopisi (LC-UV-MS/MS) ile analiz edilmiş ve bileşimlerinde başta gentiopikrozit, svertiamarin, loganik asit, sverozit ve türevleri olmak üzere izoorientin, izoviteksin, makrofillozit A ve B tespit edilmiştir. Köklerde gentisitler, tohumlarda ise loganik asit ana bileşikler olarak bulunmuş, bunun yanısıra köklerde flavonoidlere rastlanmamıştır. Gentiopikrozitler en yüksek miktarda Honghe (62.77 ± 1.58 mg/g) ve Lincang (62.04 ± 7.20 mg/g) örneklerinde, en düşükse Kunming (52.40 ± 1.49 mg/g) örneklerinde; loganik asit en yüksek Kunming örneklerinde (2.78 ± 0.25 mg/g) belirlenmiştir. Diğer bitki kısımlarıyla karşılaştırıldığında, sverozit en yüksek miktarda

çiçeklerde (1.43 ± 0.53 mg/g) ve yapraklarda (1.06 ± 0.27 mg/g) rapor edilmiştir (Pan vd., 2016, s. 234-238).

Beş farklı metotla işlenmiş *G. rigescens* örnekleri FTIR kullanılarak analiz edilmiş ve bileşimlerinde gentiopikrin ve karbonhidrat tespit edilmiştir (Shen vd., 2016, s. 1369-1373).

G. rigescens doku kültürü ve doğal yetişen örneklerinde büyüme periyodu süresince metabolitlerin birikimlerindeki değişimler araştırılmış ve metabolit çeşitliliğinin nispeten arttığı görülmüştür. Kantitatif analiz de gentiopikrozit içeriğinin büyüme evresinde belirgin bir şekilde değiştiğini göstermiştir. En yüksek gentiopikrozit içeriği doku kültüründe geliştirilmiş genç yapraklarda 122.93 ± 7.01 mg/g olarak bulunurken köklerde toprak altı kısımların gelişimiyle birlikte belirgin bir şekilde artmıştır. Ayrıca toprak üstü kısımlarda gentiopikrozit miktarı bitki gelişimi süresince benzerlik göstermiştir (Pan vd., 2015, s. 1).

G. rigescens kök ve rizomlarının çeşitli seyreltme derecelerinde etanol kullanılarak (% 60, 70, 80, 90) sulu etanol ekstraktlarının katı faz ekstraksiyon-silika jel kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra HPLC analizi yapılmış ve bileşimlerinde gentisit A, B, G, H, I, J ve K bulunmuştur. En yüksek gentisit miktarı % 90 etanol kullanılarak elde edilen ekstrede tespit edilmiştir (Chu vd., 2015, s. 1).

***G. rhodantha* Franch. ex Hemsli.**

G. rhodantha etanol ekstresi sırasıyla petrol eteri, etil asetat ve metanolle fraksiyonlanmış ve etil asetat ve metanol fraksiyonları kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. HPLC analizi sonucu iki yeni apiron türevi; rodantpiron A ve rodantpiron B, 14 bilinen bileşik; lutanarin, luteolin, izoorientin, 1,3,5,8-tetrahidroksiksanton, 1,3,8-trihidroksiksanton 5-O-P-D-gl ikozit, mangiferin, 1,3,7-trihidroksi ksanton 2-C-P-D-gl ikozit, norsvertianin, tripteksantozit A, izoviteksin, naringenin, sirinjik ve vanilik asit ile sverozit tespit edilmiştir (Yao vd., 2015, s.658).

***G. scabra* Bunge**

G. scabra'nın kurutulmuş kök ve rizomlarından hazırlanan metanol ekstraktları kloroform ve n-butanolla fraksiyonlanmış ve fraksiyonlara kolon kromatografisi uygulanarak bileşimlerinde 17,8,21,8-epoksihopan-3-on, hop-17(21)-en-3,8-ol, hop-17(21)-en-30:-0!, çiratenol, 8-sitosterol, duruvillonol, 3,8-hidroksi-urs-12-en-16-on, 17,8,21,8-epoksihopan-3,8-ol, hopenon, oleanolik asit, 3,8-eritrodol, çiratenon, masililik asit, korozolik asit, 3-O-fi-feruloilursolik asit, berçemol, 1,8,20:,30:,24-tetrahidroksiursa-12,20(30)-dien-28-oik asit, urjinolik asit, 1,8,20:,30:,24-tetrahidroksiolean-12-en-28-oik asit, ursolik asit, 3,8,24-dihidroksiurs-12-en-28-oik asit, pigenik asit, (R)-2-hidroksi-1(1,2-dihidroksi-2-metil-3-butenil)-5-benzoik asit metil ester, (±)-liriozezinol C, 3-(8-D-glukopiranoziloksi)-2-hidroksi-benzoik asit metil ester, benzil-O-,8-D-glukopiranozit, gentiopikrozit, 4-hidroksi-1-prenil-5-(3-O-,B-D-glukopiranozil)-benzoik asit, 1-O-kafeoil glukoz, siringin, koaburazit, 8-epikingisit, loganin, 2,3-deasetiltriflorozit, karyoptozit, triflorozit, 3-deasetiltriflorozit, 2-deasetiltriflorozit, 4"-O-fi-D-glukopiranoziltriflorozit, glukopiranozilskabrazit, 6'-O-,B-D-glukopiranozilgentiopikrozit, 3'-O-,8-D-glukopiranozilgentiopikrozit, 4'-O-,8-D-glukopiranozilgentiopikrozit, sekologanozit, gentianazit, 4"-O-,8-D-glukopiranozillinearozit, skabrazit, gelidozit tespit edilmiştir (Li vd., 2015, s. 170-173).

G. scabra rizom ve köklerinden hazırlanan metanol ekstresinden duruvillonol, skabranol, 3,8-hidroksi-urs-12-en-16-on, 1,8,20:,30:,24-tetrahidroksiursa-12,20(30)-dien-28-oik asit, 17,8,21,8-epoksihopan-3-on, hop-17(21)-en-3,8-ol, hop-17(21)-en-30:-ol, hopenon, oleanolik asit, masililik asit, urjinolik asit, 1,8,20:,30:,24-tetrahidroksiolean-12-en-28-oik asit, 3,8-eritrodol, ursolik asit, korozolik asit, 3,8,24-dihidroksiurs-12-en-28-oik asit, pigenik asit C, 3-O-/3-feruloilursolik asit, çiratenol, çiratenon izole edilmiştir. Skabranolün doğal kaynaklardan ilk kez izole edildiği rapor edilmiştir (Li vd., 2015, s. 2126).

G. scabra köklerinden suda çözünür GSP-1, GSP-2 ve GSP-3 kodlu üç polisakkarit fraksiyonu elde edilmiş ve fraksiyonların kimyasal karakterizasyonu Yüksek Performanslı Jel Geçirgenliği Kromatografisi (HPGPC), Yüksek Performanslı Anyon Değişimi Kromatografisi-Elektroamperometrik Dedektör (HPAEC-PAD) ve Fourier Transform-Infrared (FT-IR) kullanılarak yapılmıştır. GSP-1 ve GSP-2'de ramnoz,

arabinoz, galaktoz, glukoz ve galakturonik asit bulunurken, GSP-3,te ramnoz, arabinoz, galaktoz ve galakturonik asit bulunmuştur (Cai vd., 2016, s. 308).

***G straminea* Maxim.**

G straminea, *G tibetica*, *G lhassica*, *G waltonii* ve *G robusta*'nın köklerinin metanol ekstralarının bileşiminde; loganik asit, 6'-O-glukopiranozilgentiopikrozit, 6'-O-glukopiranozilsverozit/izomer, svertiamarin, gentiopikrozit, sverozit bulunurken; *G straminea*, *G tibetica*, *G waltonii* ve *G robusta*'da; rindoizit/izomerler ve triflorozit/izomerler; *G. straminea*, *G waltonii* ve *G robusta*'da; 4'''-O-/J-D-glukopiranoziltriflorozit/izomer; *G lhassica*, *G waltonii* ve *G robusta*'da; deglukogelidozit/izomer; *G waltonii* ve *G robusta*'da; gentistraminozit A/izomer, gentistraminozitler B/izomer, 2',3'-di-O-asetil-4'-O-(3-glukopiranozil-2-hidroksi benzoil) sverozit/izomer, 2,3'-di-O-asetil-4'-O-(3-O-glukopiranozil-6'-O-glukopiranozil-2-hidroksibenzoil) svertiamarin/izomer, gentistraminozitler B/izomer, *G straminea* ve *G robusta*'da; 2',3'-di-O-asetil-4'-O-(3-O-glukopiranosyl-6'-O-glukopiranozil-2-hidroksibenzoil) svertiamarin/izomer, 4'''-O-/J-D-glukopiranoziltriflorozit/ izomer, *G straminea*'da; 7-O-(4''-O-glukozil)kumaroil loganik asit ve 7-O-kumaroil-loganik asit, *G waltonii*'de; 6'-O-(2-hidroksil-3-O-/J-D-glukopiranozil-benzoil)-sverozit, *G tibetica*'da; makrofillozit B/izomer ve makrofillozit A/izomer iridoit glikozitleri tespit edilmiştir (Wu vd., 2016, s. 1-6).

Tibet halk ilacı olan *G straminea*'nın bileşiminde gentiopikrozit, izoorientin, mangiferin ve oleanolik asit tespit edilmiştir (Yang vd., 2015, s. 1439-1440).

***G tibetica* King ex Rook. f**

G tibetica çiçeklerinden hazırlanan% 95 alkollü ekstrenin kolon kromatografisi ile ayrımı sonrasında spektroskopik yöntemlerle incelenmesi sonucu kromen, flavon C-glikozitleri, sekoiridoit glikozitler, iridoit glikozitler, alifatik alkoller, disakkaritlerden oluşan on iki bileşik: makrofillozit D, orientin 7-kafeat, 7-O-feruloilorientin, izoviteksin, saponarin, izoorientin, 6'-O-/J-D-glukopiranozil gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, loganik asit, 1-heneikozanol ve sükröz olarak belirlenmiştir (Li vd., 2015, s. 2052-2056).

***Gentiana urnula* Harry Sm.**

..

G. urnula çiçeklerinin metanol ekstresinin aktivite ile yönlendirilmiş fraksiyonlama sonucu elde edilen n-butanolde çözünür fraksiyonun bileşiminde gentiournozit A, gentiournozit E ve depressozit tespit edilmiştir (Kusakari vd., 2016, s. 955).

2.4.2. *Gentiana* Türlerinin Etnomedikal Kullanımları

***G. algida* Pall.**

Geleneksel Çin tıbbında *G. a/g;da'nın* toprak üstü kısımları pnömoniye iyileştirmek için, Tibet tıbbında ise çiçekli kısımları boğaz, akciğer ve karaciğer hastalıklarında ve zehirlenmelerde kullanılmaktadır (Olennikov ve Chirikova, 2016, s. 637). Ayrıca, uzak doğuda yara iyileştirici olarak bilinmektedir (Olennikov vd., 2015, s. 19173).

***G. asclepiadea* L.**

Sırbistan'da 'sanlık otu' olarak bilinen *G. asclepiadea'nın* halk arasında hepatit enfeksiyonlarına (özellikle hepatit A) karşı kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca bitkinin toprak üstü kısımları ve kökleri sindirim stimülanı ve acı tonik olarak kullanılmaktadır. (Mihailovic vd., 2013, s. 808; Hudecova vd., 2012, s. 105).

Ayrıca, kök ve rizomları iştahsızlığa karşı kullanılırken, sigara karşıtı ürünlerin bileşimine girmekte ve şerbetçi otuyla birlikte bira yapımında kullanılmaktadır (Hudecova vd., 2012, s. 105).

***G. cruciata* L.**

"Yıldız gentian" olarak bilinen *G. cruciata'nın* halk arasında iştah arttırıcı, hazmı kolaylaştırıcı olarak kullanıldığı, ayrıca gastroduodenal ve karaciğer koruyucu preparatların bileşimine girdiği kaydedilmiştir (Mihailovic vd., 2015, s. 50). Bunun yanında, bitkinin kurutulmuş kökleri ve toprak üstü kısımları Balkanlarda yine iştah kaybında stomaşik etkileri nedeniyle bitkisel çay veya tıbbi şarap olarak tüketilmekte ve safra ile karaciğer üzerine de tedavi edici etkileri bulunmaktadır (Mihailovic vd., 2014, s. 1795).

***G. decumbens* L. f.**

Geleneksel Tibet tıbbında midevi ve bazı enfeksiyonlarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır (Olennikov vd., 2015, s. 19173).

***G. lutea* L.**

Birçok farmakopede kayıtlı ofisinal tür *G. lutea'nın* kök ve rizomlarının, tüm dünyada tonik ve stomaşık olarak kullanıldığı bilinmektedir. Kök ve rizomlarından hazırlanan sulu veya etanollü ekstrenin de likörlere acı tat vermek için kullanıldığı rapor edilmiştir (Amakura vd., 2016, s. 78).

***G. macrophylla* Pall.**

Geleneksel Çin tıbbında "Qinjiao" adıyla kayıtlı *G. macrophylla* köklerinin Çin, Japonya ve Güney Kore'de halk arasında inflamasyon, romatoit artrit, osteoartrit, kulak ağrısı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Jia vd., 2016, s. 2).

G. macrophylla bileşimindeki acı bileşikler nedeniyle midevi, diyabet, felç gibi rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. Ayrıca köklerin sistemik lupus eritematozus (SLE) tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (Huang vd., 2015, s. 2).

***G. nubigenan* Edgew**

Çin'in farklı bölgelerinde yetişen türün çiçekleri; gastrit, soluk borusu iltihabı, üretrit, vajinit, ekzema ve su çiçeği gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Yang vd., 2014, s. 41).

***G. olivieri* Griseb.**

G. olivieri'nin çiçekli toprak üstü kısımları ülkemizin güney bölgelerinde; stomaşık, sindirim stimülanı ve antipiretik olarak kullanılmasının yanısıra diyabette kan glukoz seviyesini düşürdüğü ve çeşitli mental hastalıklarda faydalı olduğu bildirilmiştir (Toker vd., 2011, s. 150).

Bitkinin ayrıca acı tonik, iştah arttırıcı, antikonvülzan, antidiyabetik, antihepatotoksik, antinosiseptif, antiinflamatuvar, antiülserojenik, sedatif, antioksidan,

antideptesan ve antianemik aktiviteye sahip olduğu da rapor edilmiştir (Baran vd., 2016, s. 2).

***G rigescens* Franch**

Çin'de, diğer ilaçlarla birlikte epilepsi ve post herpetik nöralji gibi beyin hastalıklarında kullanıldığı (Li vd., 2016, s. 108), ayrıca hepatoprotektif, antiinflamatuvar, analjezik, antiproliferatif ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Chu vd., 2015, s. 1).

Toprak üstü kısımların ise sarılık ve romatoit artrit tedavisinde kullanıldığı ve antipiretik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca sabit yağ içerisinde hazırlanan linimenti, haricen yara, ülser ve çıban tedavisinde kullanılmaktadır (Pan vd., 2016, s. 233).

***G rhodantha* Franchet**

Kurutulmuş bitki kısımları Çin'de yetiştiiği bölgelerde harareti almak için, akciğer, karaciğer ve safra kesesi rahatsızlıklarında, ayrıca öksürük kesici ve iltihap giderici olarak kullanılmaktadır (Yao vd., 2015, s. 657).

***G scabra* Bunge**

Geleneksel Çin tıbbında bitkiye ait rizom ve kökler inflamasyon, anoreksi, hazımsızlık ve midevi hastalıkların tedavisinde (Li vd., 2015, s. 169), ayrıca karaciğer koruyucu olarak, karaciğer yetersizliğinde ve gastrik asit salgısının atırılmasında kullanılmasından dolayı popülerdir (Li vd., 2015, s. 2124).

***G trijlora* Pall.**

Geleneksel Tibet tıbbında toprak üstü kısımların kronik mide rahatsızlıklarında (mide asiditesini azaltarak), kolesistit ve inflamasyonda iyileştirici olarak, Çin tıbbında ise köklerin birçok formülasyonda iştahsızlık ve sindirim problemleri için kullanıldığı bildirilmiştir (Olennikov vd., 2015, s. 19174).

***G urnula* Harry Sm.**

Batı Çin ve Himalayalar'ın yüksek kısımlarında yetişen *G. urnula*, soğuk algınlığı, ateş ve zehirlenme tedavisinde kullanılmaktadır (Kusakari vd., 2016, s. 955).

2.4.3. Biyoaktivite çalışmaları

***G algida* Pall.**

G. algida, *G. decumbens*, *G. macrophylla* ve *G. triflora'nın* toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyonlarının, yüksek miktarda iridoit ve flavonoit içeriklerine bağlı olarak mide asit, enzim ve müsin oluşum fonksiyonlarını stimüle ettiği tespit edilmiş olup güvenli iştah açıcılar oldukları ileri sürülmüştür (Olennikov vd., 2015, s. 19172).

***G asclepiadea* L.**

G. asclepiadea köklerine ait metanol ekstresinden hazırlanan kloroform, etil asetat ve n-butanol fraksiyonlarının DPPH radikal süpürücü, redükleyici güç, lipid peroksidasyon yöntemleriyle *in vitro* antioksidan ve cinsiyete bağlı resesif letal (SLRL) yöntemi ile *in vivo* antigenotoksik etkileri araştırıldığı çalışmada, tüm fraksiyonlar antioksidan aktivite göstermiş ancak en yüksek etkiyi toplam fenolik, flavonoit, flavonol ve gallotanen miktarı yüksek olan etil asetat fraksiyonu göstermiş olup bu etkinin yüksek toplam fenolik, flavonoit, flavonol ve gallotanen madde miktarlarına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür. Antioksidan aktiviteye ek olarak *G. asclepiadea* kök ekstresinin fraksiyonları etil metansülfonat (EMS) ile alkilasyon sonucu indüklenen DNA hasarına karşı antigenotoksik etki göstermiştir. Antioksidan aktivitenin fraksiyonların fenolik madde miktarlarına bağlı olarak değiştiği ancak bu fenolik madde miktarındaki farklılığın fraksiyonların antigenotoksik etkileri arasında belirgin bir fark yaratmadığı bulunmuştur (Mihailovic vd., 2013, s. 807).

G. asclepiadea'ya ait toprak üstü kısımlar ve köklerden hazırlanan metanol ekstrelerinin sıçanlarda karbontetraklorür (CCl₄) ile indüklenmiş karaciğer hasarı ölçülerek hepatoprotektif etkileri araştırılmış, toprak üstü ve kök metanol ekstreleri 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarında Wistar sıçanlarına CCl₄ ile muamele edilmeden önce oral

olarak bir hafta boyunca günde bir kez uygulanmıştır. Silimarin ile kıyaslanan hepatoprotektif etki CCl₄ ile muamele edilen hayvanlarda, metanol ekstreleri serum transaminaz, alkali fosfataz ve toplam bilirubin düzeylerini düşürürken toplam protein düzeyini yükseltmiştir. Ekstrelerle muamele sonucu katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve indirgenmiş glutatyon düzeyi belirgin bir şekilde artmış, aynı zamanda CCl₄ ile muamele edilmiş grupla karşılaştırıldığında belirgin bir malondialdehit (MDA) redüksiyonu görülmüştür. Histopatolojik çalışmalar ekstrelerin CCl₄-indüklediği karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini ispatlamıştır. Kök ekstresi karaciğer hücrelerinde tek hücre jel elektroforezi (COMET) yöntemi sonucunda zayıf genotoksik etki gösterirken, toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstre genotoksik etki göstermemiştir (Mihailovic vd., 2013, s. 83).

***G. cruciata* L.**

G. cruciata'ya ait toprak üstü ve kök metanol ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin ve ekstrelerin antioksidan kapasitelerinin stabilitesinin farklı pH ve ısıtma sırasında değişiminin araştırıldığı çalışmada, yüksek fenolik madde miktarına sahip toprak üstü kısımların köklere kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Genel olarak ekstrelerin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerinde en fazla duodenal şartlar etkili olurken ekstrelerin aynı zamanda pH ve termal stabiliteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki ekstrenin genotoksik ve antigenotoksik etkileri COMET yöntemi kullanılarak albino Wistar sıçanlarının karaciğerinde CCl₄'e karşı test edilmiş, 400 mg/kg konsantrasyonda, toprak üstü kısımlar zayıf genotoksikite gösterirken, köklerde genotoksik aktivite saptanmamıştır (Mihailovic vd., 2015, s. 49).

G. cruciata'ya ait toprak üstü ve kök metanol ekstrelerinin sıçanlarda CCl₄ nedenli karaciğer hasarı ölçülerek hepatoprotektif etkilerinin araştırıldığı çalışmada, sverozit, sveiiamarin ve gentiopikrince zengin ekstrelerle muamele edilmiş grup CCl₄ ile muamele edilmiş grupla karşılaştırıldığında doza bağlı olarak serum transaminaz, alkali fosfataz ve toplam bilirubin seviyelerinin belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca ekstrelerin oral uygulanması sonucu SOD ve katalaz antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) düzeyi azalırken, glutatyon düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Karaciğerin mikroskopik incelenmesi sonucu, kg başına 400 mg dozda önceden ekstrelerle muamele edilmiş sıçan karaciğerlerinde CCl₄ ile

indüklenmiş lezyonlar ve bunlara bağlı toksik oluşumlar gözlenmiştir (Mihailovic vd., 2014,s. 1795).

***G. lutea* L.**

Amaro Sibi.lla® ticari ismiyle bilinen acı likör ekstreleri A549 insan fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermezken, etanol: etil asetat (1: 1) ekstresi yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite (EC₅₀=3.47 µg/mL) ve sıçan feokromositoma hücrelerinin (PCJ2 Adh) proliferasyonunu ve farklılaşmalarını indükleyerek sinir gelişme faktörü (NGF) ile sinerjik etki göstermiştir (Mustafa vd., 2016, s. 131).

Sekoiridoitler, NGF'yi uyarak nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılmalarını sağlayan nöritojenik etkileri nedeniyle son yıllarda en çok araştırılan bileşikler arasındadır. Sekoiridoitlerce zengin *G. lutea* köklerinin metanol ekstresinin sıçan feokromositoma (PC12) hücreleri üzerinde xCelligence real time hücre analiz sistemi (RTCA-DP), nörit görüntü analizi ve immünofloresan boyama tekniği kullanılarak nöritojenik etkileri araştırılmıştır. Ekstreler NGF ile ya da NGF olmaksızın 12.5-25 µg/mL konsantrasyon aralığında nöritojenezi belirgin bir şekilde uyarmıştır. Ekstrelerin nöritojenik etkiyi NGF ile sinerjik olarak gösterdiği bulunmuştur (Mustafa vd., 2015, s. 164).

G. lutea köklerinden hazırlanan sulu ekstrenin ve bileşiminde bulunan major bileşik izoviteksin'in streptozosin (STZ) nedenli diyabetik sıçanlarda endotel inflamasyon, düz kas hücre göçü, aterosklerozun başlangıç ve ilerlemesi üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada ekstre ve izoviteksin antiaterosklerotik aktivite göstermiştir (Kesavan vd., 2016, s. 293).

G. lutea köklerinin sulu metanol (metanol:su, 50:50) ve su (1: 10, a/h) ekstresinin lipit peroksidasyon, Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAC), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), ksantin/ksantin oksidaz (K/KO), TBARS yöntemleriyle antioksidan aktiviteleri araştırıldığında, sulu metanol ekstresinin çok yüksek oranda DPPH ve TEAC antioksidan aktivite (sırasıyla; 15.89 ve 48.90 µmol Troloksa Eşdeğer (TE/g) gösterdiği bulunmuştur. *G. lutea*'nın % 0.5 (h/h) liyofilizatı lipit oksidasyonunu zamanla inhibe etmiş olup *G. lutea* ve % 0.1 bov-in serum albumin (BSA) karışımı sinerjik etki göstererek daha yüksek lipit peroksidasyon aktivite göstermiştir. Ayrıca *G. lutea*

sulu metanol ekstresinde bulunan gentiopikrozit ve sverozit antiradikal aktivite göstermezken, ekstreler HPLC post kolon ölçünlerinde yüksek 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS'+) serbest radikal aktivite göstermiştir (sırayla; 31.33 ± 1.16 mg GAE/L ve 8.30 ± 0.12 mg GAE/L) (Azman vd., 2014, s. 468).

G. macrophylla **Pall.**

G. macrophylla köklerinin sulu etanol (% 80) ekstresinin NZB/W F1 farelerinin sol ventrikül dokularında kolesterolün artırdığı kardiyak apoptozu belirgin bir şekilde baskıladığı tespit edilmiş ve bu etkiyi P13K ve AKT fosforilasyonu ile ekstrinsik ve intrinsik apoptoz sinyalleri boyunca kardiyak IGF-1 yaşam sinyallerini artırarak gerçekleştirdiği kanısına varılmıştır. Ayrıca *G. macrophylla* ekstresinin lupusa eğilimli farelerde sol ventrikül dokularını kolesterolün şiddetlendirdiği apoptozu karşı koruyabileceği ve sistemik lupus eritematozus (SLE)'lu hastalarda kardiyovasküler hastalıklara karşı tedavide kullanılabileceği düşünülmüştür (Huang vd., 2015, s. 11).

G. macrophylla'nın farklı polaritedeki çözücülerle ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrelerinin, karaciğer koruyucu etkileri; CCl4 nedenli fare karaciğer modelinde karaciğer AST ve ALT enzim düzeyleri ölçülerek araştırılmış ve en yüksek etkiyi sulu ekstrenin AST düzeyini artırıp, ALT'yi belirgin bir şekilde inhibe ederek gösterdiği bulunmuştur (Zhang vd., 2014, s. 3934).

G. rigescens **Franch ex Hems.**

G. rigescens, geleneksel Çin Tıbbında ilaçlarla birlikte post herpetik nöralji ve epilepsi gibi beyin rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. *G. rigescens*'in köklerinden hazırlanan gentizit içeren benzoat fraksiyonunun PC 12 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş, benzoat fraksiyonunun skopolamin ile bozulmuş bellek parametreleri üzerinde iyileştirici etkileri, AChE inhibisyonunun yanısıra oksidatif stres inhibisyonu aracılığıyla ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (Li vd., 2016, s. 107).

G. scabra **Bunge**

G. scabra toprak üstü ve köklerinden hazırlanan metanol ekstrelerinden izole edilen triterpenoitlerin, triptofanın kinurenin [T hücreleri ve doğal öldürücüler (NK) de

kapsayan çeşitli bağışıklık sistemi (immun) hücrelerinin fonksiyonlarını baskılayan immun sistem düzenleyicisi]'e dönüşümünü yavaşlatan tepkimeyi katalizleyen indoleamin 2,3-dioksijenaz enziminin inhibitör etkisinin araştırıldığı çalışmada, oleanolik ve masililik asit (sırasıyla 1Cso_{12.5} ve 9.5 µM), indoleamin 2,3-dioksijenazı belirgin bir şekilde inhibe ederken urjinolik asit (IC₅₀ =18.7 µM) orta düzeyde aktivite göstermiştir. Skabranol ve 1,8,2a,3a,24-tetrahidroksiolean-12-en-28-oik asit ise sırasıyla 56.8 ve 60.6 µM IC₅₀ değerleri ile zayıf inhibitör etki göstermiştir (Li vd., 2015, s. 2124).

G. scabra köklerinden elde edilen ekstrenin ve suda çözünür üç polisakkarit fraksiyonunun (GSP-I, GSP-2 ve GSP-3) aktif kısmi tromboplastin zamanı (APTT), trombin zamanı (TT) ve protrombin zamanı (PT) yöntemleri ile *in vitro* antikoagülan aktiviteleri araştırılmış ve ramnoz, arabinoz, galaktoz, galakturonik asit (GSP-3) ve glukozca (GSP, GSP-1, GSP-2) zengin ekstre ve fraksiyonların APPT ve TT'yi uzatırken PT'yi değiştirmedeği görülmüştür. Ayrıca, en yüksek antikoagülan etkiyi glukoz içermeyen GSP-3 fraksiyonunun gösterdiği tespit edilmiştir (Cai vd., 2016, s. 308).

***G. urnula* Harry Sm.**

G. urnula çiçeklerinin metanol ekstresinden, aktivite ile yönlendirilmiş fraksiyonlama sonucu elde edilen, n-butanolde çözünür fraksiyondan izole edilen gentiournozit A, gentiournozit E ve depressozit'in antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Aktivite sonuçlarına göre üç iridoit glikozit askorbik asit ve trolox'la karşılaştırıldığında 10-20 µM IC₅₀ aralığında oldukça yüksek DPPH süpürücü aktivite göstermiştir. Ayrıca depressozitin 45.5 µM IC₅₀ değeriyle diğer iki bileşikten (IC₅₀ = 900 µM) daha yüksek süperoksit radikali süpürücü etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kusakari vd., 2016, s. 954).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Çizelge 3.1. *Gentiana* Türlerinin Toplandığı Lokaliteler ve Toplanma Tarihler;*

Tür	Lokalite	Tarih
<i>G. pyrenaica</i> L.	A7 Gümüşhane: Zigana Dağı, çayırılık alanlar, 2160-2135 m	L0.06.2013
<i>G. brachyphylla</i> Vill.	ES Niğde: Bolkar Dağı, Karagöl üstü, Kızıltepe, alpin açıklıklar, 2700 m	14.08.2013
<i>G. boissieri</i> Schott & Kotschy ex Boiss.	ES Niğde: Bolkar dağı, Karagöl çevresi, alpin açıklıklar, 2650 m	14.08.2013
<i>G. cruciata</i> L.	A4 Kastamonu: Ilgaz dağı, çayırılık alanlar, 1819-1980 m	29.07.2013
<i>G. asc/epiadea</i> L.	A4 Kastamonu: Ilgaz dağı, nemli ıslak yerler, 1647-1784 m	29.07.2013
<i>G. olivieri</i> Griseb.	e6 Gaziantep: Nizip, Akçakent koyu, kuru dere kenarları, kireçli yerler, 535-551 m	05.06.2013
<i>G. gelida</i> Bieb.	B8 Erzurum: Erzurum-Çat yolu 26. km, Yaylasuyu gecidi, çayırılık alanlar, 2157 m	08.07.2013
<i>G. septemjida</i> Pallas	A8 Bayburt: Soğanlı gecidi, çayırılık alanlar, 2383-2416 m	10.06.2013
<i>G. verna</i> L. subsp. <i>pontica</i> (Soltok.) Hayek	A8 Bayburt: Soğanlı gecidi, çayırılık alanlar, 2416 m	08.07.2013
<i>G. verna</i> L. subsp. <i>balcanica</i> Pritchard	A2 Bursa: Uludağ, Volfram madeni çevresi, taşlık alanlar, 2230-2330 m	25.06.2013

**Cemiana* türleri Yalova Atatürk Bahçe Bitkileri Araştırma Merkezi'den Ziraat Yüksek Müh. Fatih Gülbağ ve Ziraat Yüksek Müh. Serdar Erken tarafından toplanmış, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Emine Alçitepe tarafından teşhis edilmiştir.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

..

3.2. 1. Kimyasal maddeler

EDTA	(Sigma Aldrich, Almanya)
Ferrozin	(Fluka, Almanya)
FeCb	(Sigma Aldrich, Almanya)
2-deoksi-D-riboz	(Sigma Aldrich, Almanya)
$K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O$	(Sigma Aldrich, Almanya)
FeCb	(Sigma Aldrich, Almanya)
Gallik asit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Gentiopikrozit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Sverozit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Svertiamarin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Loganik asit	(Sigma Aldrich, Almanya)
p-Hidroksi benzoik asit (p-OH-BA)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Kafeik asit (KA)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Klorojenik asit (KLA)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Sirinjik asit (Sİ)	(Sigma Aldrich, Almanya)
o-Kumarik asit (o-KU)	(Sigma Aldrich, Almanya)
p-Kumarik asit (p-KU)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Ferulik asit (FA)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Butil hidroksitoluen (BHT)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Folin-Ciocalteu's Reagent	(Sigma Aldrich, Almanya)
ABTS	(Sigma Aldrich, Almanya)
DPPH	(Sigma Aldrich, Almanya)
Orsein	(Sigma Aldrich, Almanya)
Selejilin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Klorjilin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Galantamin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Takrin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Donepezil	(Sigma Aldrich, Almanya)
ATC	(Sigma Aldrich, Almanya)

BTC	(Sigma Aldrich, Almanya)
DTNB	(Sigma Aldrich, Almanya)
AChE	(Sigma Aldrich, Almanya)
BChE	(Sigma Aldrich, Almanya)
Bitki & Mantar DNA Saflaştırma ve DNA izolasyon kiti	(EurX GeneMATRIX, Almanya)
1X TaqBuffer	(Sigma Aldrich, Almanya)
2,2'-Dithiobis (5-nitropyridine) (DNTP)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Kalıp DNA ve 1U Taqpolimeraz enzimi	(Sigma Aldrich, Almanya)
COX-1 ve COX-2 enzimleri	(Sigma Aldrich, Almanya)
MgCl ₂	(Sigma Aldrich, Almanya)
Monoamin Oksidaz inhibitör (MAO-A ve MAO-B) kitleri	(BioVision, Almanya)
Potasyum dihidrojen fosfat	(Sigma Aldrich, Almanya)
Potasyum hidroksit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Dimetilsülfoksit (DMSO)	(Sigma Aldrich, Almanya)
Sodyum hidrojen karbonat	(Sigma Aldrich, Almanya)
Jelatin	(Sigma Aldrich, Almanya)
Hidroklorik asit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Hidrojen peroksit	(Sigma Aldrich, Almanya)
Metanol	(Sigma Aldrich, Almanya)
Etanol	(Sigma Aldrich, Almanya)
Diklorometan	(Sigma Aldrich, Almanya)
Etil asetat	(Sigma Aldrich, Almanya)
Metafosforik asit	(Sigma Aldrich, Almanya)

3.2.2. Cihazlar

Shimadzu Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) sistemi	(Kyoto, Japonya)
Shimadzu Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) sistemi ve SPD DAD dedektör	(Kyoto, Japonya)
H1 mikropilaka okuyucusu	(Biotek, Amerika)
Nanodrop Spektrofotometre	(Biotek, Amerika)
Precision XS robotik sistemi	(Biotek, Amerika)
Su banyosu	(Nüve BM 302, Türkiye)
Vorteks	(Ika Genius 2, Almanya)
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	(Heidolph MR 3001, Almanya)
Binoküler ışık mikroskobu	(Olympus, Japonya)
Kameram 122CU	
Döngü aleti	(Thermo Arktik Thermal Cylers, Almanya)

3.3. *Gentiana* Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

3.3.1. *Gentiana* metanol ekstrlerinin hazırlanması

G. asclepiadea, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. pontica olivieri*, *G. pyrenaica*, *G. septemfida*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. türlerine ait metanol ekstrleri; bitkilerin toprak üstü kısımları, metanolle, 48 saat 3 kez masere edilerek hazırlanmış, kuru drog verimleri hesaplanmıştır (% a/a).

3.3.2. *Gentiana* diklorometan, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının hazırlanması

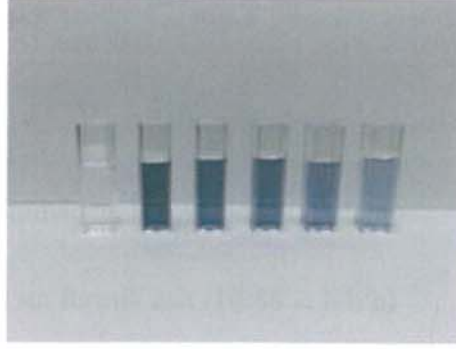
G. asclepiadea, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. olivieri*, *G. pyrenaica*, *G. septemfida*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerine ait diklorometan fraksiyonları; bitkilerin toprak üstü kısımları, diklorometanla, 24 saat 3 kez masere edilerek hazırlanmıştır. Sonrasında çözücülerini tamamen uzaklaştırılan toprak üstü kısımlar önce etil asetatla sonra metanolle, 24 saat 3 kez masere edilmiş ve etil asetat ve metanol fraksiyonları elde edilmiş, kuru drog verimleri hesaplanmıştır (% a/a).

3.4. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının toplam fenolik madde miktarlarının analizi, fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu's çözeltisinde bulunan fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin kompleks polimerik iyonları ile oksidasyonu sonucu oluşan mavi renkli molibden-tungsten kompleksinin konsantrasyonunun 750 nm dalga boyunda ölçülmesi ilkesine dayanan Vinson ve Hontz ile Singleton ve arkadaşlarının Folin-Ciocalteu's spektrofotometrik yöntemine göre yapılmıştır (Vinson vd., 1995, s. 402; Singleton vd., 1999, s. 153).

Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit % 50'lik metanolde çözülmüştür (0.5 mg/mL). 0.5 mL örnek, 2.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (% 10'luk, h/h, suda) ve 7.5 mL sodyum karbonat çözeltisi (% 20'lik, a/h, suda) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözeltilerin absorbans değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunmuş, aynı işlem gallik asit'in 5 farklı konsantrasyonu için yapılarak, gallik asit kalibrasyon grafiği çizilmiş, elde edilen kalibrasyon eşitliği

($r^2=0.997$) kullanılarak, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer (mg GAE/g ekstre) olacak şekilde hesaplanmıştır.



Görsel 3.1. *Gallik Asit Standartı Kalibrasyon Çözeltileri*

3.5. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizisi Dedektör (HPLC-DAD) İle Fenolik Asitlerin Tayini

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının içerdiği fenolik asitlerin miktar tayinleri ters-faz C_{18} kolon ve gradient elüsyon çözücü sistemiyle Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Diode Array Dedektör (HPLC-DAD) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Öztürk vd., 2007).

Ters faz analitik kolonda ayrılan fenolik bileşiklerin HPLC-DAD sisteminde, UV spektrumları kontrol edilerek ekstreler içindeki fenolik bileşiklerin teşhisleri gerçekleştirilmiş ve miktar tayini çalışmalarına geçilmiştir (Rodriguez-Delgado vd., 2001, s. 249-251; Sakakibara, vd., 2003, s. 574-578; Öztürk vd., 2007).

HPLC-DAD Analiz Şartları

Cihaz: Shimadzu 20 AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan)

İşlemci: Class VP Chromatography Manager Software (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Pompa: Shimadzu LC20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Kolon: INERTSIL ODS3- C_{18} kolon (100 mm, 4.6 mm i.d., 3 μ m partikül çapı) (GL Sciences Inc.)

Degazer: DGU-20A₅ (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Enjektör: SIL 20A (Shimadzu, Japan)

Akış hızı: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Dedektör: SPD-M 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) 280 nm

Hareketli Faz A: Metanol: su: formik asit (10:88:2, h/h/h)

Hareketli Faz B: Metanol: su: formik asit (90:8:2, h/h/h)

Gradient program: 0'dan 15 dk % 15 B'ye, 6 dk % 15 B'de devam etmiş, % 15'den % 50 B'ye 10 dk'da, % 50'den % 100 B'ye 5 dk'da arttırılmış ve 6 dk'da başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür (analiz süresi 42 dk) (Öztürk vd. 2007).

Sonuçların değerlendirilmesinde, ayırımın tekrarlanabilirliğini artırmak amacıyla İç Standart (Internal Standard) (IS) yöntemi kullanılmış, sunulan analiz koşullarında ilgili fenolik asitlerle birlikte sisteme IS olarak propil paraben (1×10^{-5} mg/mL, $R_t = 32.00$ dk) eklenmiş ve IS'nin girişime neden olmayan bir yerde belirdiği gözlenmiştir.

3.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizisi Dedektör (HPLC-DAD) İle Sekoiridoit Miktar Tayini

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının içerdiği sekoiridoitlerin miktar tayinleri ters-faz C₁₈ kolon ve gradient elüsyon çözücü sistemiyle Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Diode Array Dedektör (HPLC-DAD) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Öztürk, 1997).

Cihaz: Shimadzu 20 AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan)

İşlemci: Class VP Chromatography Manager Software (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Pompa: Shimadzu LC20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Kolon: INERTSIL ODS3-C₁₈ kolon (100 mm, 4.6 mm ID, 3 µm partikül çapı) (GL Sciences Inc.)

Degazer: DGU-20A₅ (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Enjektör: SIL 20A (Shimadzu, Japan)

Akış hızı: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Dedektör: SPD-M 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan) 242 nm

Çözücü Sistemi: Çözücü A; % 0,4 meta fosforik asit (suda), Çözücü B: Metanol

Gradient program: 0'da % 20 B ile başlanıp, 10 dk'da % 30 B'ye, 15. dk'da % 40 B'ye, 19. dkda %30 B'de devam etmiş 20. dk'da, % 20 başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart maddelerin (loganik asit, svertiamarin, gentiopikrozit, sverozit) derişimlerine karşı PN oranlarının grafiği çizilerek yapılan regresyon analizi sonucunda eğri denklemleri elde edilmiş, korelasyon (r) katsayıları bulunmuştur. Korelasyon eşitlikleri kullanılarak ekstredeki madde miktarları, daha sonra da ekstre verimleri kullanılarak sekoiridoit bileşiklerin bitkideki konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.7. Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) Sistemi İle Fitokimyasal Bileşimlerinin Belirlenmesi

Gentiana metanol ekstrelerinin bileşimleri Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Yüksek Çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) çalışmaları için Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Japonya) sistemi kullanılmıştır.

Cihaz: Shimadzu LCMS-IT-TOF (Kyoto, Japonya)

İşlemci: Shimadzu LCMSsolution yazılımı

Pompa: LC-20AD ikili pompa

Kolon: C-18 dolgu maddeli Inertsil ODS-3 (150 mm × 1.5 mm, 5 um) ve Shim-pack FC-ODS (150 mm × 2 mm, 3 um) kolon

Kolon fırın sıcaklığı: 40°C

CDL sıcaklığı: 200°C

Isı bloğu sıcaklığı: 200°C

Nebulizatör gaz akışı: 1.5 L/dk

Degazer: DGU-20A3R gaz giderici ünite

Enjektör: SIL-20AC otomatik örnekleyici

Akış hızı: 0.15 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 3 µL

Dedektör: SPD-M20A PDA detektör

Çözücü Sistemi: % 0.1 formik asit ihtiva eden asetonitril:su karışımı

Kütle analizleri iyon tuzaklı uçuş zamanlı kütle spektrometresinde (IT-TOF) elektron sprey iyonizasyon (ESI) pozitif ve negatif mod kullanılarak Shimadzu LCMSsolution yazılımı ile yapılmıştır.

3.8. Biyolojik Aktivite Yöntemleri

3.8.1. Antioksidan aktivite yöntemleri

3.8.1.1. DNA hasarı koruyucu yöntem

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının DNA hasarı koruyucu antioksidan aktiviteleri J. M. Al-Fartosy'nin çalışması modifiye edilerek tayin edilmiştir (J. M. Al-Fartosy, 2011, s. 15). 1 mM FeCl₃, 1.04 mM EDTA, 60 mM 2-deoksi-D-riboz sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Örneğin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. 50 mM pH 7.4'de fostat tamponu ve 10 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı

37°C'de 1 saat inkübe edilmiş ve % 25'lik HCl ve 10 g L⁻¹'lik tiyobarbitürik asit çözeltileri ilave edilip 15 dk su banyosunda kaynar suda bekletilmiştir. Son olarak test çözeltilisi ve kontrolün absorbansı 532 nm'de okunmuştur. Pozitif kontrol olarak butilhidroksi tolüen (BHT) ve askorbik asit kullanılmıştır.

$$\% \text{ Hidroksil radikali giderici aktivite} = [A_0 - (A_1 - A_2)] \times 100/A_0$$

A₀; örnek hariç diğer tüm bileşenlerin absorbansı

A₁; deneyin absorbansı

A₂; deneyin deoksiriboz eklenmemiş halde absorbansı

3.8.1.2. *Metal şelatlayıcı yöntem*

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının demir iyonlarını şelatlama kapasitesi Orhan ve arkadaşlarının çalışması modifiye edilerek tayin edilmiştir (Orhan ve Üstün 2011, s. 387).

0.2 mg/mL konsantrasyonda 400 µL örnek üzerine 40 µL FeCl₂ (2mM) ve 80 µL Ferrozin (5mM) eklenmiştir, metanolle 2 mL'ye tamamlanmıştır. 10 dk bekletildikten sonra 562 nm'de absorbansları okunmuş, pozitif kontrol olarak EDTA (0.2 mg/mL) kullanılmıştır (n=3).

Metal şelatlatlama kapasitesi (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Metal Şelatlama kapasitesi} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}})]/A_{\text{kontrol}} \times 100$$

3.8.1.3. *ABTS⁺ radikal katyon renksizleştirme yöntemi*

Reaktif çözeltilisinin hazırlanması; 10 mL 7 mM ABTS⁺ çözeltilisi ile 176 µL 140 mM K₂S₂O₈ karıştırılarak 12-16 saat karanlıkta bekletilmiştir. ABTS'in potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucunda ABTS⁺ radikal katyonu oluşmaktadır. Her çalışma öncesi taze hazırlanması gereken bu reaktif, 753 nm'de absorbansı 0,700 (± 0.02) olacak şekilde etanol ile seyreltilerek antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.

Reaksiyon için, 10 µL örnek çözeltilisi (0.5 mg/mL konsantrasyonda) üzerine 1 mL reaktif çözeltilisi ilave edilerek 5 dk beklenmiş ve 734 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Çalışmada kör olarak etanol, pozitif kontrol olarak trolox çözeltilisi (0.5 mg/mL) kullanılmıştır (Re vd., 1999, s. 1232-1234).

Deney sonunda, ABTS⁺⁺ radikal katyonunun % giderimi aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır:

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

A_{kontrol} : ABTS⁺⁺ reaktif çözeltisinin 734 nm'deki absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Ekstre içeren reaktif çözeltisinin 734 nm'deki absorbansı

Elde edilen sonuçlar eşitlikte yerine konarak % inhibisyon hesaplanmış, sonuçlar pozitif kontrolün sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

3.8.1.4. Redükleyici güç ölçümü

Redükleyici güç tayini Shon vd. tarafından geliştirilen metoda uygun olarak yapılmıştır (Shon vd., 2003, s. 594). Öncelikle % 1'lik K₄[Fe(CN)₆].3H₂O (potasyum ferrisiyanid) ve 200 mM fosfat tamponu (pH 6,6) hazırlanmıştır. 200 µL örnek çözeltisi (0.5 mg/mL konsantrasyonda) üzerine 500 µl fosfat tamponu ve 500 µL % 1'lik K₄[Fe(CN)₆].3H₂O eklenmiş, karışım 50 °C'de etüvde 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 500 µL % 10'luk trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 4000 g' de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 500 µL süpernatant, 500 µL distile su ve 200 µL 0,1'lik FeCl₃ ile karıştırılarak elde edilen reaksiyon çözeltisinin absorbansı, 700 nm'de örnek içeren reaksiyon karışımına (kör) karşı okunmuştur (n=3). 700 nm'de ölçülen absorbansın 0.5 olduğu konsantrasyon (mg/mL) EC₅₀ değeri olarak verilmiştir. Pozitif kontrol olarak askorbik asit ve BHT kullanılmıştır (Lee vd., 2007, s. 4,5).

3.8.1.5. DPPH serbest radikal süpürücü yöntem

Kararlı bir radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali bir elektron veya hidrojen kabul eder. Antioksidanların, DPPH• radikale bir hidrojen atomu verme yetenekleri üzerinden süpürücü etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bu yöntem ile antioksidanların stabil DPPH• radikalini, indirgenmiş DPPH (DPPH-H) formuna getirme yetenekleri değerlendirilir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kısa zamanda sonuç veren bir yöntemdir (Molyneux, 2004, s. 212-218).

Test edilen ekstrelerden hazırlanan çözeltilerin DPPH• üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno vd. 1998, s. 272-274 tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir.

Metanol içerisinde hazırlanmış 9.6×10^{-4} - 3.6×10^{-3} mg/mL konsantrasyonlardaki örnek çözeltilerinden 0.1, 0.2 ve 0.4 mL alınarak, üzerlerine metanolde hazırlanmış 3 mL DPPH• (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek vortekste 30 sn karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra 517 nm’de absorbans değerleri kaydedilmiş, serbest radikal süpürücü etki (Antioksidan İndeks) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

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

A_{kontrol} : kontrol absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: örneğin absorbansı

Radikal süpürücü etki (% inhibisyon) konsantrasyona karşı korele edilmiştir. Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, pozitif kontrol olarak BHT kullanılmıştır.

3.8.2. Enzimatik aktivite deneyleri

3.8.2.1. MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite yöntemi

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivitesi ticari BioVision Monoamin Oksidaz inhibitör kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Han vd., 2001, s. 52; BioVision Procedure).

3.8.2.2. AChE ve BChE inhibitör aktivite yöntemi

Ekstre ve fraksiyonların AChE ve BChE inhibitör aktivitesi Ellman Testi ile belirlenmiştir. Enzimatik çalışmalarda, AChE (E.C.3.1.1.7, tip VIS), BChE, (E.C. 3.1.1.8, at serumundan izole), Ellman belirteci; 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), tampon çözelti bileşikleri (potasyum dihidrojen fosfat, potasyum hidroksit), sodyum hidrojen karbonat, asetiltiyokolin iyodür, butiriltiyokolin iyodür, jelatin, dimetilsülfoksit ve donepezil kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçümler mikropilaya okuyucu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin her aşamasında Milipor, Milli-Q Synthesis A10 saflaştırma cihazından elde edilen distile su kullanılmıştır. Kullanılan bütür çözeltilerin taze hazırlanmasına ve hazırlandıktan sonra 1 hafta içerisinde tüketilmesine özen gösterilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmasında hazırlanan çözeltilerin porsiyonlar halinde ayrılması, test bileşiklerinin 96 kuyucuklu plakalara uygulanması, enzim substrat çözeltilerinin ilave edilmesi işlemlerinde BioTek-Precision Power robotik pipetleme sisteminden yararlanılmıştır. Enzim protokolünün oluşturulması, izlenmesi ve spektrofotometrik ölçümlerin alınması işlemleri, BioTek-Synergy H1 Microplate Reader cihazında yapılmıştır (Çakıroğlu, 2009; Orhan vd., 2007, s. 1249).

3.8.2.2.1. AChE ve BChE enzim çözeltilisinin hazırlanması

Liyofilize haldeki AChE/BChE enzimini çözmek için %1'lik jelatin çözeltisi hazırlanmıştır. AChE/BChE enzimi jelatin çözeltisinde 500 U/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Enzim çözeltisinden 1 mL alınarak balon jöje içerisinde hacim suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 5 U/mL'ye seyreltilmiş stok enzim solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti 0.7 mL'lik porsiyonlar halinde -20 °C'de saklanmıştır. Enzim çözeltileri, aktivite çalışmalarına başlamadan önce oda ısısına getirilmiş ve metot konsantrasyonu olan 2.5 U/mL'ye seyreltmek için suyla 1.4 mL'ye tamamlanarak kullanılmıştır.

3.8.2.2.2. Asetiltiyokolin iyodür (ATC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M)

ATC (0.217 g) bir miktar suda çözülmüş ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 0.4 mL'lik kısımlar halinde -20 °C 'de saklanmıştır.

3.8.2.2.3. Bütiriltiyokolin iyodür (BTC) çözeltisinin hazırlanması (0.075 M)

BTC (0.237 g) bir miktar suda çözülmüş ardından suyla 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 0.4 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

3.8.2.2.4. 5-5-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) solüsyonunun hazırlanması (0.01 M)

DTNB (0.396 g) tartılarak bir miktar suda çözülmüştür. Bu çözeltiliye sodyum bikarbonat (0.15 g) ilave edilmiş ve hacim suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 3 mL'lik kısımlar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

3.8.2.2.5. Fosfat tamponunun hazırlanması (pH=8.0)

Potasyum dihidrojen fosfat (13.61 g), 1 L suda çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 8.0±0.1'e 0.1 N potasyum hidroksit çözeltisi ile pHmetre kullanılarak kontrollü biçimde ayarlanmıştır. Ayarlı tampon çözelti 0.22 µm por çapı olan tek kullanımlık filtrelerden süzülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan çözelti, kullanılıncaya kadar 4 °C'de saklanmıştır.

3.8.2.2.6. AChE ve BChE inhibisyon çalışması

Ekstrelerin ve fraksiyonların enzim inhibitör aktiviteleri 100, 150, 200 ve 250 µg/mL'lik dört konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Aktivite değerleri % 0-100 aralığında inhibisyon şeklinde değerlendirilmiştir.

Biyoaktivite çalışmalarında kolorimetrik Ellman metodu modifiye edilerek enzim inhibisyonu incelemesi yapılmıştır. Test işlemine başlamadan önce bütün çözeltiler 20-25 °C'ye getirilmiştir. Çalışmalarda 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Her bir hücrede 140 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim solüsyonu, 20 µL ekstre, 20 µL DTNB çözeltisi, 10 µL ATC/BTC çözeltisi olacak şekilde toplam 210 µL hacme ulaşılmıştır. Çözeltiler, 96 kuyucuğa yetecek miktarlarda iki farklı test çözeltisi meydana getirecek şekilde karıştırılmıştır. Birinci test çözeltisi; 1 kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu, 20 µL enzim çözeltisi ve 20 µL DTNB çözeltisi, ikinci çözelti ise; 1 kuyucuk için 70 µL fosfat tamponu ve 10 µL asetiltiyokolin iyodür (ATC)/bütiriltiyokolin iyodür (BTC) çözeltisi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Öncelikle birinci test çözeltisi ve farklı konsantrasyonlardaki ekstre ve fraksiyonlar (20 µL), 96 kuyucuklu plakalara Biotek Precision XS robotik sistemi kullanılarak eklenmiştir. Ekstre ve fraksiyonların her konsantrasyonu plaklara 4 tekrarlı olarak

uygulanmıştır. Plakalar, BioTek-Synergy H1 mikropilaka okuyucusuna konarak önce 5 dk süreyle karıştırılmış daha sonra 25 °C’de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde mikropilaka okuyucusu dispenser haznesinde bulunan ikinci test çözeltisinin her bir kuyucuğa 80 µL olacak şekilde ilavesi sağlanmıştır. İkinci test çözeltisi eklendikten sonra 30 sn’lik hızlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Bu aşamada 412 nm’de birinci absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Mikropilakalar, reaksiyonun sürmesi için 5 dk daha karışmaya bırakılmış ve bu süre sonunda ikinci absorbans okuması yapılmıştır. İki okuma arasındaki absorbans farkları alınarak aşağıdaki formüle göre % inhibisyon oranları hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{[(A(K)-A(B))-(A(\dot{I})- A(B))]}{(A(K)-A(B))} \times 100$$

B: Blank (Ekstre ve substratın eklenmediği kuyucuk)

K: Kontrol (Sadece ekstre eklenmediği kuyucuk)

A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı

A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı

A(İ): Ekstre veya fraksiyona ait absorbans okuma farkı

3.8.2.3. COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite yöntemi (*Antiinflamatuvar etki*)

In vitro COX-1 ve COX-2 inhibitör etki tayini için saflaştırılmış COX-1 ve COX-2 enzimleri kullanılmıştır. PGE₂ miktarı EIA ile ölçülmüştür (Vgquez vd., 1997, s. 531; Xingxian vd., 2009).

3.8.3. Genotoksik etki yöntemi

Gentiana türlerine ait metanol ekstralarının farklı konsantrasyonları çimlendirilen *Allium cepa* L. (soğan) kök uçlarına uygulanmıştır. DNA izolasyonu ile elde edilen DNA örneklerindeki genotoksik etki moleküler belirteçler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelenmiştir (Bakry vd., 2015, s. 26; Williams vd., 1990, s. 6532).

3.8.3.1. *Allium cepa* kök ucu testi

Bu çalışmada, ticari olarak satın alınmış *Allium cepa* L. bulbları kullanılmıştır. Kök primordial halkasının kolay köklenmesi için buraya yakın kısım etrafındaki pullar temizlenmiştir. Soğanlar distile suda 20 mm kök uzunluğu elde edilene kadar köklendirilmiştir. Köklenen soğanlar, kontrol grubu ve her ekstre için 72 saat süre ile 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL şeklinde üç konsantrasyonda incelenmiştir.

3.8.3.1.1. Mitotik indeks (MI)

Mitotik indeks, hazırlanan preparatlarda profaz, metafaz, anafaz ve telofaz fazlarında gözlenen hücre sayılarının, incelenen toplam hücre sayısına bölünüp, 100 ile çarpılması ile elde edilen değerdir. Dozların artmasına bağlı olarak MI'nın azalması, ekstrelerin *A. cepa* kök hücreleri üzerinde mitozu azaltıcı etkisi olduğunu göstermektedir (Akinboro ve Bakare 2007; Fiskesjo, 1985, s. 99).

3.8.3.1.2. Mikroskop analizi

Mikroskop analizlerinde kullanılmak üzere, örneklerin kök ucundan yaklaşık 5 mm'lik parçalar alınmış ve alkol:glasiyel asetik asit (3:1) karışımı fiksatif çözeltisine alınarak -20°C'de muhafaza edilmiştir. *A. cepa* kök uçlarından alınan örneklerin mikroskop analizi için ezme preparat yöntemi uygulanmıştır. 72 saat fiksatif solüsyonunda bekletilmiş kök uçları, lam üzerine alınmış ve % 2'lik orsein boyası damlatılarak 60 dk bekletilmiştir. Preparat hazırlığında, boyada bekleyen örnekler ısıtılmış ve fiksatif solüsyonu ile yıkanarak lam üzerine alınmıştır. Üzerinde örnek bulunan lam'a lamel kapatılmış ve ezme işlemi gerçekleştirilmiştir. Preparatların devamlılığını sağlamak için lamel çevresi kanada balsamı ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar Olympus BX51 binoküler ışık mikroskobu ile incelenmiş ve kamera (Kameram 122CU) ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.8.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR yöntemi)

3.8.3.2.1. Çalışma materyalinin hazırlanması

Çimlendirilen *A. cepa* örnekleri, kontrol grubu ve test grubu olarak ayrılmıştır. Kontrol grubunun dışında 10 ekstre örneği için 3 farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) toplam 30 örnek test edilmiştir. 72 saat sonunda kontrol ve test gruplarına ait tüm *A. cepa* örneklerinin kök uçları sıvı azotta öğütülmüş ve -20°C'de DNA izolasyonu aşamasına kadar muhafaza edilmiştir.

3.8.3.2.2. DNA izolasyonu

Sıvı azotta öğütülmüş *A. cepa* köklerinden, EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification DNA izolasyon kiti kullanılarak her bir örneğin DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.8.3.2.3. DNA'nın spektrofotometrik ölçümü

İzole edilen genomik DNA'ların sonraki basamaklarda kullanımına geçmeden önce miktar ve kalite (saflık) tayinleri gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA'ların Nanodrop Spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okuması yapılmış, nanogram cinsinden miktarları ve saflik dereceleri tespit edilmiştir (Çizelge 3.2). Abs_{260}/Abs_{280} oranı 1,8-2 aralığında olan DNA örnekler yüksek saflikta kabul edilmektedir.

Çizelge 3.2. DNA Örneklerinin Miktar ve Kalite (Saflik) Tayini

Örnek Adı (Konsantrasyon mg/mL)	Miktar (ng/ µL)	Kalite (Saflik) (Abs_{260}/Abs_{280})
Kontrol	121.64	1.88
<i>G. asclepiadea</i> metanol ekstresi (0.05)	158.50	1.83
<i>G. boissieri</i> metanol ekstresi (0.05)	76.14	1.90
<i>G. brachyphylla</i> metanol ekstresi (0.05)	122.50	1.85
<i>G. cruciata</i> metanol ekstresi (0.05)	52.18	1.90
<i>G. gelida</i> metanol ekstresi (0.05)	77.54	1.87
<i>G. olivieri</i> metanol ekstresi (0.05)	95.55	1.83
<i>G. pyrenaica</i> metanol ekstresi (0.05)	20.85	1.93
<i>G. septemfida</i> metanol ekstresi (0.05)	137.86	1.86
<i>G. verna</i> subsp. <i>balcanica</i> metanol ekstresi (0.05)	723.62	2.06

[Çizelge 3.2. (Devam) DNA Örneklerinin Miktar ve Kalite (Saflık) Tayini]

Örnek Adı (Konsantrasyon mg/mL)	Miktar (ng/ µL)	Kalite (Saflık) (Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀)
<i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> metanol ekstresi (0.05)	46.27	1.80
<i>G. asclepiadea</i> metanol ekstresi (0.1)	393.14	2.04
<i>G. boissieri</i> metanol ekstresi (0.1)	29.95	1.77
<i>G. brachyphylla</i> metanol ekstresi (0.1)	244.75	1.84
<i>G. cruciata</i> metanol ekstresi (0.1)	61.53	1.88
<i>G. gelida</i> metanol ekstresi (0.1)	29.67	1.86
<i>G. olivieri</i> metanol ekstresi (0.1)	217.80	1.85
<i>G. pyrenaica</i> metanol ekstresi (0.1)	100.29	1.85
<i>G. septemfida</i> metanol ekstresi (0.1)	146.06	1.82
<i>G. verna</i> subsp. <i>balcanica</i> metanol ekstresi (0.1)	66.30	1.95
<i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> metanol ekstresi (0.1)	101.21	1.86
<i>G. asclepiadea</i> metanol ekstresi (0.5)	67.78	1.82
<i>G. boissieri</i> metanol ekstresi (0.5)	29.70	1.79
<i>G. brachyphylla</i> metanol ekstresi (0.5)	73.23	1.88
<i>G. cruciata</i> metanol ekstresi (0.5)	64.59	1.89
<i>G. gelida</i> metanol ekstresi (0.5)	499.15	2.04
<i>G. olivieri</i> metanol ekstresi (0.5)	23.01	1.89

[Çizelge 3.2. (Devam) DNA Örneklerinin Miktar ve Kalite (Saflık) Tayini]

Örnek Adı (Konsantrasyon mg/mL)	Miktar (ng/ µL)	Kalite (Saflık) (Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀)
<i>G. pyrenaica</i> metanol ekstresi (0.5)	154.84	2.03
<i>G. septemfida</i> metanol ekstresi (0.5)	103.80	1.81
<i>G. verna</i> subsp. <i>balcanica</i> metanol ekstresi (0.5)	580.88	2.05
<i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i> metanol ekstresi (0.5)	214.29	1.84

3.8.3.2.4. PCR için kalıp DNA hazırlığı

Genomik DNA'lardan basit dizi tekrarları arası-polimeraz zincir reaksiyonu (ISSR-PCR) yönteminde kullanmak amacıyla izole edilen *A. cepa* DNA örneklerinden çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için µL'sinde 2 ng DNA olacak şekilde genomik DNA'lar steril deiyonize su ile seyreltilmiştir.

3.8.3.2.5. PCR analizleri

Tüm PCR reaksiyonları 25 µl hacimde 1X TaqBuffer, 2 µM MgCl₂, 2.5 µM DNTP, 2.5 µM primer, 6 ng kalıp DNA ve 1U Taqpolimeraz enzimi kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir primer için hazırlanan negatif kontrol kullanılmıştır. Primerlerin negatif kontrollerinde herhangi bir bant oluşumu görülmemiş ve reaksiyon koşullarında yabancı DNA kontaminasyonuna rastlanmamıştır. Negatif kontrol gösterimi için bulgularda bir tane agaroz jel görüntüsüne yer verilmiştir.

3.8.3.2.6. Rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) analizi

RAPD primerlerin kullanıldığı PCR temelli bu yöntem ile, kontrol grubu (ekstre uygulanmamış) ve farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) ekstre uygulanmış *A. cepa* DNA'larındaki olası bant değişimleri belirlemek için 10 farklı RAPD primeri test

edilmiş (Çizelge 3.3) ve tüm örnekler için PCR sonucu amplifikasyon sağlanan 4 primer kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada Kullanılan RAPD Primerleri

Primerler	Primer dizisi (5'-3')	Tm (°C)	Uygunluk
OPC-04	CCGCATCTAC	32	+
OPC-07	GTCCCAGACGA	34	+
P-9	GGGAAGAGAG	32	+
P-11	GGCCGATGAT	32	-
P-13	ACCGCCTTGT	32	-
P-14	CAGCACTGAC	32	-
P-16	TGGTGGCCTT	32	-
P-17	GTAGCACTCC	32	-
P-21	ACGGTGCCTG	34	-
OPD-09	CTCTGGAGAC	32	+

RAPD-PCR reaksiyonları Çizelge 3.4'te verilen koşullarda, Thermo Arktik Thermal Cyclers marka döngü aleti kullanılarak Çizelge 3.5'teki uygulama protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Kullanılan RAPD-PCR Bileşenleri ve Miktarları

Bileşen	Miktar
dH ₂ O	11.8 µL
10X TaqBuffer (Fermantas)	2.5 µL (1x)
25mM MgCl ₂ (Fermantas)	1.5 µL (2.5 µM)
2.5mM DNTP (Fermantas)	2 µL (2.5 µM)
2.5mM Primer	4 µL (2.5 µM)
Kalıp DNA	3 µL
TaqPolimeraz (Fermantas)	0.2 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.5. RAPD-PCR Uygulama Protokolü

	Döngü Sayısı	Sıcaklık(°C)	Süre
Başlangıç Denaturasyonu	1	95	4 dk
Denaturasyon		94	55 sn
Bağlanma	45	30-34	60 sn
Uzama		72	90 sn
Final Uzaması	1	72	7 dk

3.8.3.2.7. Basit dizi tekrarları arası-polimeraz zincir reaksiyonu (ISSR-PCR) analizi

ISSR-PCR yöntemi kullanarak, kontrol grubu (ekstre uygulanmamış) ve farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) ekstre uygulanmış *A. cepa* DNA'larındaki olası bant değişimleri belirlemek için 10 primer (Çizelge 3.3) test edilmiş ve tüm örnekler için amplifikasyon gözlenen 2 farklı ISSR primeri kullanılmıştır

Çizelge 3.6. Çalışmada Kullanılan ISSR Primerleri

Primerler	Primer Dizisi (5'-3')	Tm (°C)	Uygunluk
ISSR-01	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52.8	+
ISSR-04	ACACACACACACACACC	52.8	+
ISSR-06	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.8	+
ISSR-10	GGGTGGGTTGGGGTG	58.8	-
ISSR-27	GTGCGTGCGTGCGTGC	59.4	-
ISSR-829	TCTCTCTCTCTCTCG	52.8	-
ISSR-847	CACACACACACACARC	53.7	-
ISSR-861	ACCACCACCACCACC	60.5	-
ISSR-862	AGCAGCAGCAGCAGC	60.5	-

[Çizelge 3.6. (Devam) Çalışmada Kullanılan ISSR Primerleri]

Primerler	Primer Dizisi (5'-3')	Tm (°C)	Uygunluk
ISSR-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	60.5	-

(Y= (C,T) B= (C,G,T) D= (A,G,T) V= (A,G,C))

ISSR-PCR reaksiyonları Çizelge 3.4'te verilen koşullarda, Thermo Arktik Thermal Cylers marka döngü aleti kullanılarak Çizelge 3.5'teki uygulama protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir

Çizelge 3.7. Kullanılan ISSR-PCR Bileşenleri ve Miktarları

Bileşen	Miktar
dH ₂ O	13.3 µL
10X TaqBuffer (Fermantas)	2.5 µL (1x)
25mM MgCl ₂ (Fermantas)	1.5 µL (2.5 µM)
2.5mM DNTP (Fermantas)	2 µL (2.5 µM)
2.5mM Primer	2,5 µL (2.5 µM)
Kalıp DNA	3 µL
TaqPolimeraz (Fermantas)	0.2 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.8. ISSR-PCR Uygulama Protokolü

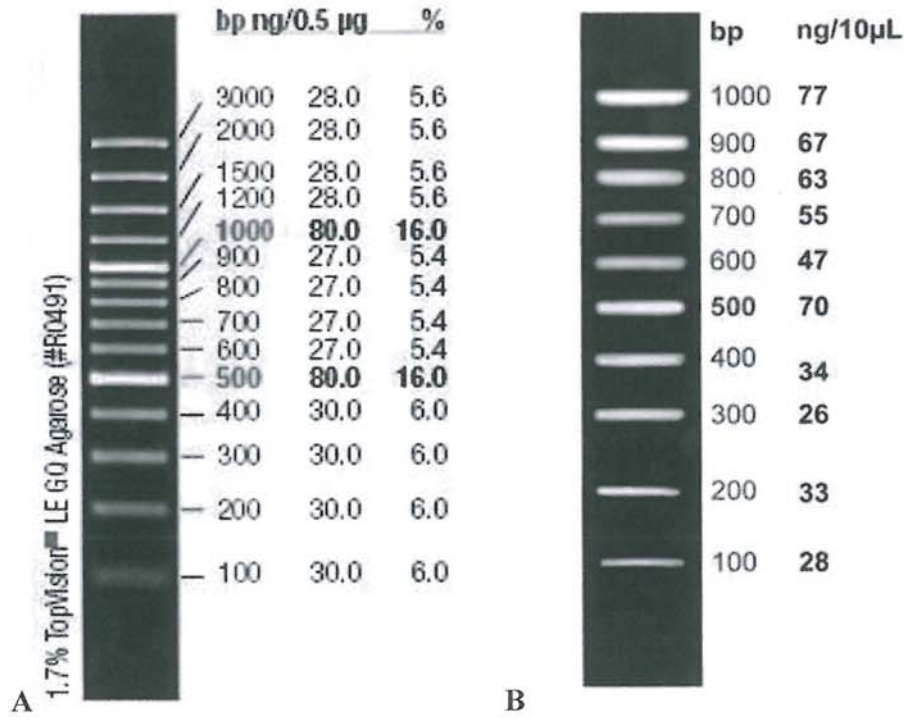
	Döngü Sayısı	Sıcaklık(°C)	Süre
Başlangıç Denaturasyonu	1	95	4 dk
Denaturasyon		94	45 sn
Bağlanma	45	49.2-60.5	45 sn
Uzama		72	90 sn
Final Uzaması	1	72	7 dk

3.8.3.2.8. Agaroz jel elektroforezi ile PCR ürünlerinin yürütülmesi

Her iki PCR yönteminin sonuçları, yatay jel elektroforezi (Thermo, MidicellPromo) ile % 1.3'lük agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. 0.5X

TBE tampon ile birlikte kaynatılan % 1.3'lük agarozu 10X'lik 7 µL etidyumbromür ilave edilerek karıştırılmış ve jel tablasına dökülmüştür.

PCR ürünleri her bir kuyucuğa 9 µL örnek 1 µL yükleme tamponu olmak üzere 10 µl yüklemiş ve 85 V'ta 75 dk yürütülmüştür. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla her jelde ilk ve son kuyucuklara 100 bp DNA ladder ve 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas) yüklenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA ladder Plus (100-3000 bp) B- 100 bp DNA ladder (100-1000 bp).*

3.8.3.2.9. Agaroz jel elektroforezin fotoğraflanması

Agaroz jel elektroforezinde yürütme işleminden sonra oluşan bant profilleri UV ışık altında Carestream Gel Logic 212 Pro marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Bant büyüklükleri Şekil 3.1'deki 100 bp DNA ladder (100-1000 bp) ve 100 bp DNA ladder Plus (100-3000 bp) (Fermentas) markörleri ile kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. *Gentiana* Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyonların Verimleri

Gentiana türlerine ait ekstre ve fraksiyonların % a/a verimleri kuru drog üzerinden hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Gentiana* Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyon Verimleri

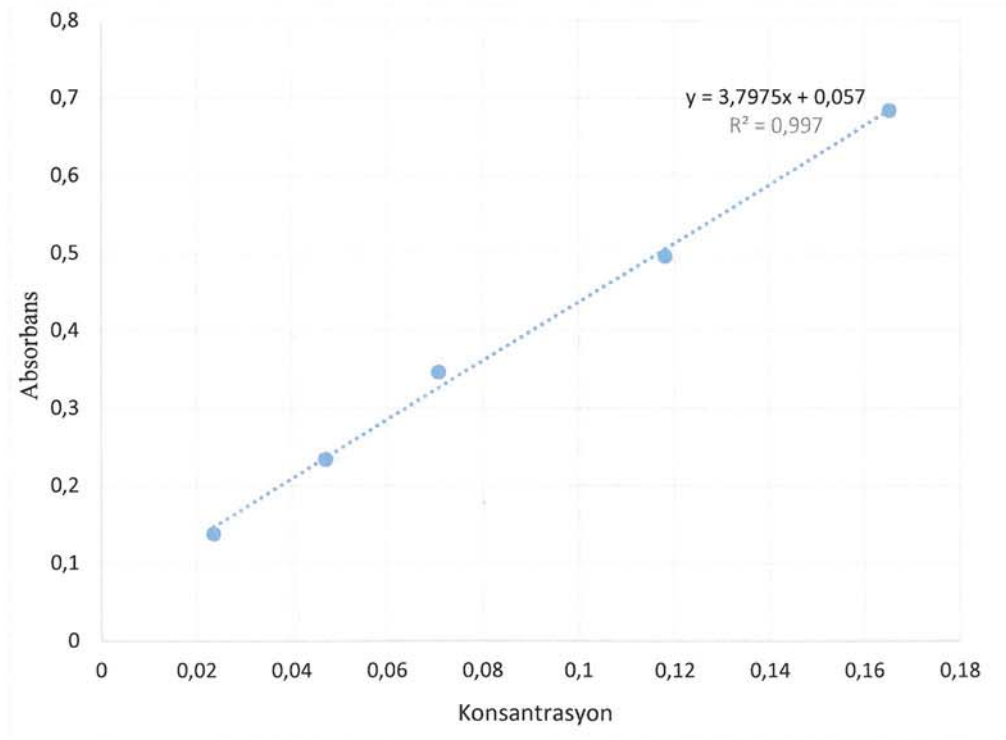
Ekstre ve Fraksiyonlar	% Verim
GAME	32.2
GADMeF	6.56
GAEAF	2.75
GAMEF	23.45
GBOME	29.5
GBODMeF	5.37
GBOEAF	1.15
GBOMeF	33.63
GBME	32.9
GBDMeF	12.57
GBEAF	2.09
GBMEF	18.72
GCME	22.4
GCDMeF	7.25
GCEAF	1.01
GCMEF	27.66
GGME	32.05
GGDMeF	6.98
GGEAF	0.92
GGMEF	23.56
GOME	23.3
GODMeF	6.94
GOEAF	2.19
GOMEF	21.95
GPME	22.1
GPDMeF	5.75
GPEAF	1.31
GPMEF	17.04
GSME	26.14
GSDMeF	5.62
GSEAF	0.84
GSMEF	19.92
GVBME	33.1
GVBDMeF	11.13
GVBEAF	1.26
GVBMEF	29.74
GVPME	25.6
GVPDMeF	10.31
GVPEAF	1.36
GVPMEF	20.77

4.2. *Gentiana* Ekstre ve Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları

Polifenolik bileşikler, yapıları gereği taşıdıkları fonksiyonel gruplardan dolayı elektron ve hidrojen verebilme kapasitesine sahip en önemli antioksidan bileşiklerdir. Bu gruplar onlara polar olma özelliği katarken antioksidan özelliklerini artırır, aynı zamanda da serbest radikalleri ve oksitleyici grupları elimine ederler.

Yöntemin temeli, kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdene elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenmektedir.

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarının içerdiği toplam fenolik madde konsantrasyonları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak Şekil 4.1’de verilen gallik asitin metanol çözeltisinin kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemden yararlanılarak gram ekstrede gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon eşitliği $y = 3,7975x + 0,057$ ’dir.



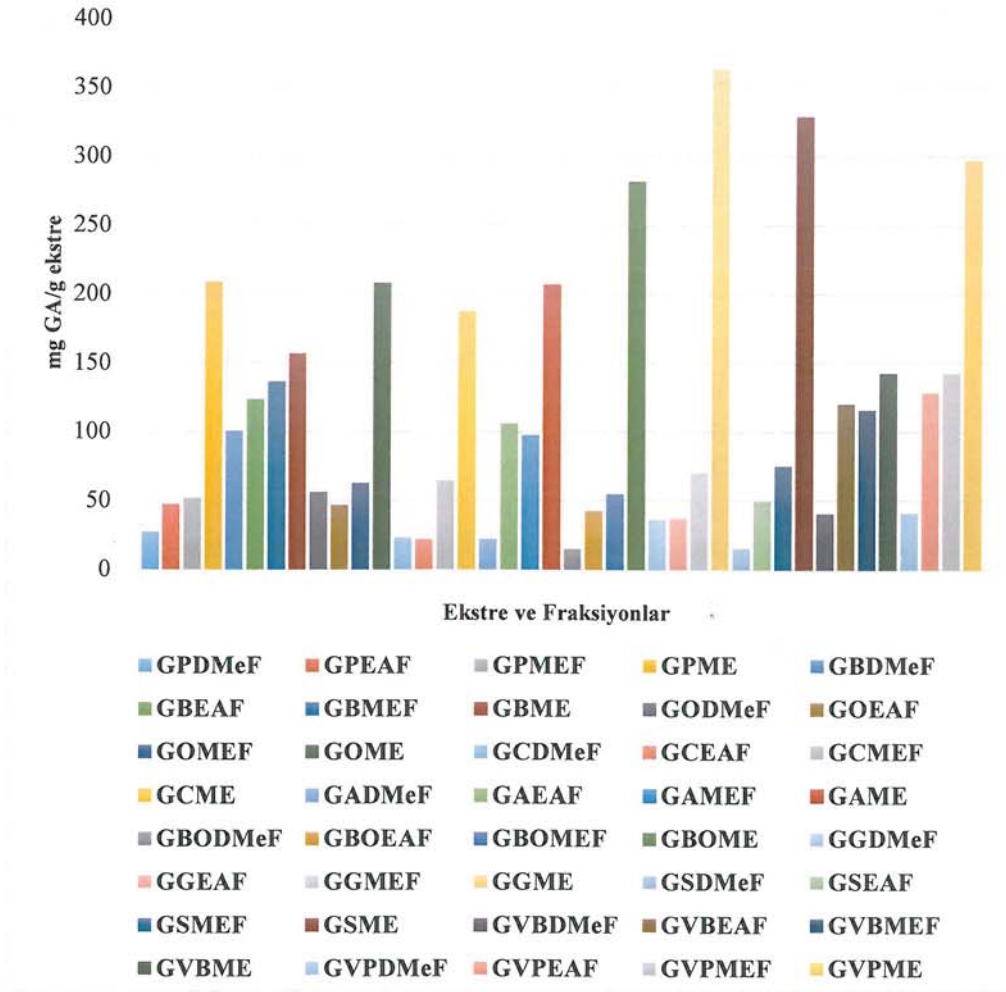
Şekil 4.1. Gallik Asit Kalibrasyon Eğrisi

Sonuçlara göre, en yüksek toplam fenolik madde miktarının *G. gelida* ve *G. septemfida*’ya ait metanol ekstralarında (sırasıyla 363.53 ± 5.73 ; 328.84 ± 2.24 mg

GAE/g ekstre); en düşük toplam fenolik madde miktarının ise *G. boissieri* ve *G. septemfida*'ya ait diklorometan fraksiyonlarında (sırasıyla 14.52 ± 1.96 ve 15.22 ± 2.12 mg GAE/g ekstre) bulunmuştur (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. *Gentiana Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları*

Ekstreler	Toplam Fenolik Madde Miktarları (mg GA/g ekstre)
GADMeF	21.89 ± 1.49
GAEAF	105.53 ± 1.36
GAMEF	97.17 ± 4.98
GAME	206.68 ± 1.61
GBODMeF	14.52 ± 1.96
GBOEAF	42.25 ± 2.94
GBOMEF	54.64 ± 2.01
GBOME	281.58 ± 0.82
GBDMeF	100.14 ± 4.96
GBEAF	123.25 ± 0.85
GBMEF	136.15 ± 2.34
GBME	156.23 ± 2.73
GCDMeF	22.88 ± 2.97
GCEAF	21.46 ± 0.88
GCMEF	64.12 ± 1.11
GCME	187.14 ± 3.52
GGDMeF	36.21 ± 0.64
GGEAF	36.97 ± 2.28
GGMEF	70.09 ± 1.27
GGME	363.53 ± 5.73
GODMeF	55.77 ± 1.71
GOEAF	46.27 ± 1.12
GOMEF	62.29 ± 1.96
GOME	207.47 ± 1.98
GPDMeF	26.85 ± 0.88
GPEAF	46.98 ± 1.07
GPMEF	51.52 ± 1.61
GPME	208.46 ± 7.97
GSDMeF	15.22 ± 2.12
GSEAF	49.43 ± 0.94
GSMEF	74.77 ± 1.47
GSME	328.84 ± 2.24
GVBDMeF	40.32 ± 2.97
GVBEAF	120.13 ± 2.59
GVBMEF	115.60 ± 1.12
GVBME	142.42 ± 3.25
GVPDMeF	41.03 ± 1.91
GVPEAF	128.36 ± 0.85
GVPMEF	142.67 ± 2.70
GVPME	297.52 ± 2.73



Şekil 4.2. *Gentiana* Ekstre ve Fraksiyonlarının Toplam Fenolik Madde Miktarları

4.3. Ters-Faz Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Fenolik Asitlerin Tayini

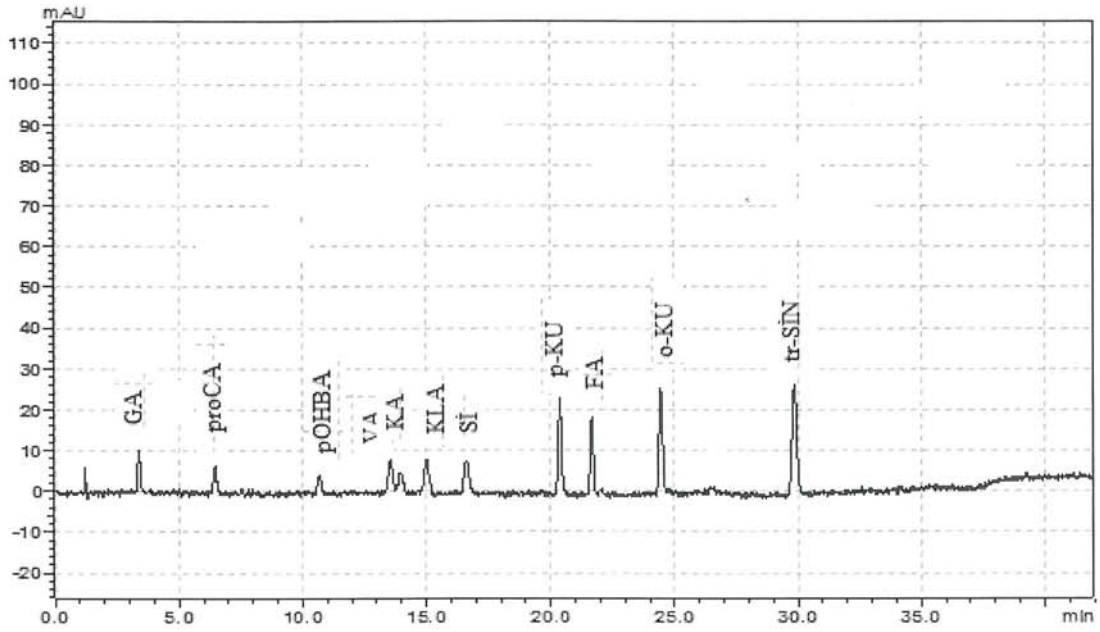
Shimadzu LC 20A Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı kullanılarak analizi gerçekleştirilen *Gentiana* ekstre ve fraksiyonlarında bulunan fenolik asitlerin [*p*-hidroksi benzoik (*p*-OH-BA), kafeik (KA), klorojenik (KLA), sirinjik (Sİ), *o*-kumarik (*o*-KU) ve *p*-kumarik (*p*-KU), ferulik (FA)] ayırımı C₁₈ kolonda deneysel kısımda belirtildiği koşullarda gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Gentiana Türlerine Ait Ekstre ve Fraksiyonlarında Ters-Faz HPLC İle Tespit Edilen Fenolik Asit Miktarları*

Ekstreler ve fraksiyonlar	Fenolik asit miktarları							
	(µg/g bitki)							
	<i>p</i> -OHBA	KA	KLA	SİA	<i>p</i> -KU	FA	<i>o</i> -KU	tr-SİN
GAEAF					0.99	0.82	1.27	0.71
GAMEF	1.24	0.78	4.81	28.83	1.28	1.84	0.84	0.77
GAME	0.46	0.65	1.67	0.54	39.6	1.87	0.84	0.55
GBOEAF				6.05		0.98	1.59	0.76
GBOMEF				5.12	0.77	2.15	2.03	0.81
GBOME	0.26	0.20	67.55	0.20	0.86	1.05	0.76	0.25
GBEAF					4.20		1.63	1.15
GBMEF					16.81	8.10	4.63	1.52
GBME		0.34	0.69	0.32	4.37	1.65	0.52	0.69
GCEAF		0.61	1.36	3.67	7.59	0.52	0.76	
GCMEF	0.94	2.53	1.49	12.08	1.01	1.77	0.65	0.79
GCME	0.23	0.21	0.78	0.28	5.73	0.23	0.42	0.22
GGEAF				0.98	1.02	4.72	1.36	0.84
GGMEF	1.89	1.01	2.26	2.85	2.73	1.31	2.43	1.10
GGME	0.31	0.99	7.77	0.21	0.25	5.26	0.56	0.46
GOEAF				45.86	0.75		2.52	0.81
GOMEF	1.94	0.78	7.18	20.27	1.96	0.92	1.53	0.96
GOME	0.32	0.43	34.67	0.53	0.85	1.34	0.87	0.25
GPEAF				1.14	1.01	1.68	2.89	0.90
GPMEF			1.82	0.84	3.11	2.99	0.61	
GPME	0.44	0.42	0.79	0.34	0.59	0.46	1.89	0.89
GSEAF			0.80	3.41		0.47	1.47	0.47
GSMEF	1.80	0.96	0.94	7.16	0.9	1.63	1.10	0.84
GSME	0.45	0.16	8.23	0.25	0.30	5.34	0.56	0.51
GVBEAF					0.98	1.34	1.18	1.13
GVBMEF			0.99	0.84	15.80	3.42	1.44	0.79
GVBME	0.59	0.24	0.45	0.41	0.67	3.56	3.87	0.30
GVPEAF		1.23	1.79	1.18	10.80	1.13	1.69	2.92
GVPME			1.21	0.30	3.59	0.69	0.53	0.49

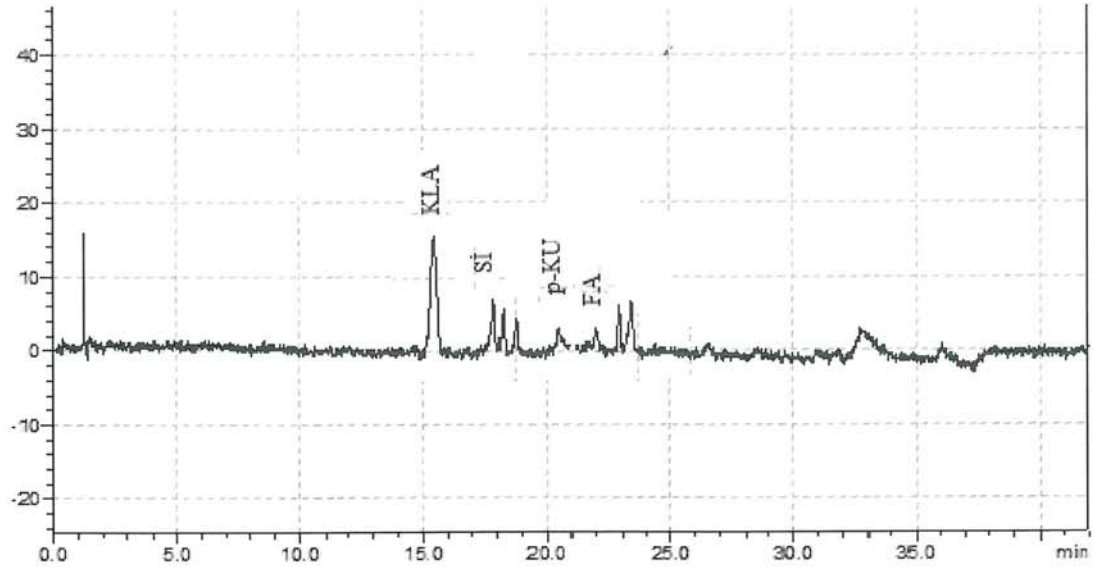
(*p*OH-BA: *para*-Hidroksi Benzoik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, Sİ: Sirinjik Asit, *p*-KU: *para*-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, *o*-KU: *orto*-Kumarik Asit, tr-SİN: trans Sinamik asit)

Toplam fenolik madde miktarı fazla olan *Gentiana gelida*'ya ait metanol ekstresinde (GGME) ve *G. septemfida*'ya ait metanol (GSME) ekstresinde HPLC ile tespit edilen başlıca fenolik asitler; gallik protokateşik, *para*-hidroksi benzoik, klorojenik, kafeik, sirinjik, *para*-kumarik, *orto*-kumarik ve ferulik asitlerdir. Fenolik asitlerden sirinjik asit en fazla *G. olivieri*'ye ait etil asetat fraksiyonunda (GOEAF) 45.86 µg/g bitki olarak; *p*-kumarik asit *G. asclepiadea*'ya ait metanol ekstresinde (GAME) 39.6 µg/g bitki olarak ve klorojenik asit *G. boissieri* (GBOME) ve *G. olivieri*'ye (GOME) ait metanol ekstralarında sırasıyla 67.55 ve 34.67 µg/g bitki olarak tespit edilmiştir.



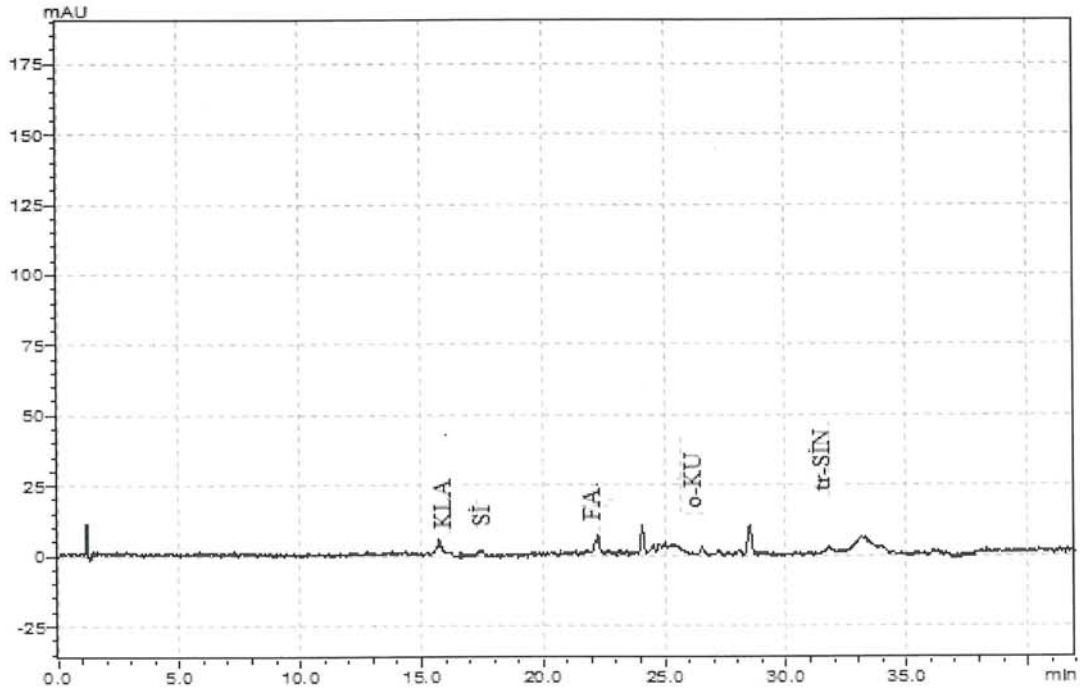
Şekil 4.3. Çalışılan Standart Fenolik Asitlerin HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, *p*-hid-BA: *para*-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, SI: Sirinjik Asit, *p*-KU: *para*-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, *o*-KU: *orto*-Kumarik Asit, tr-SIN: *trans*-Sinamik Asit



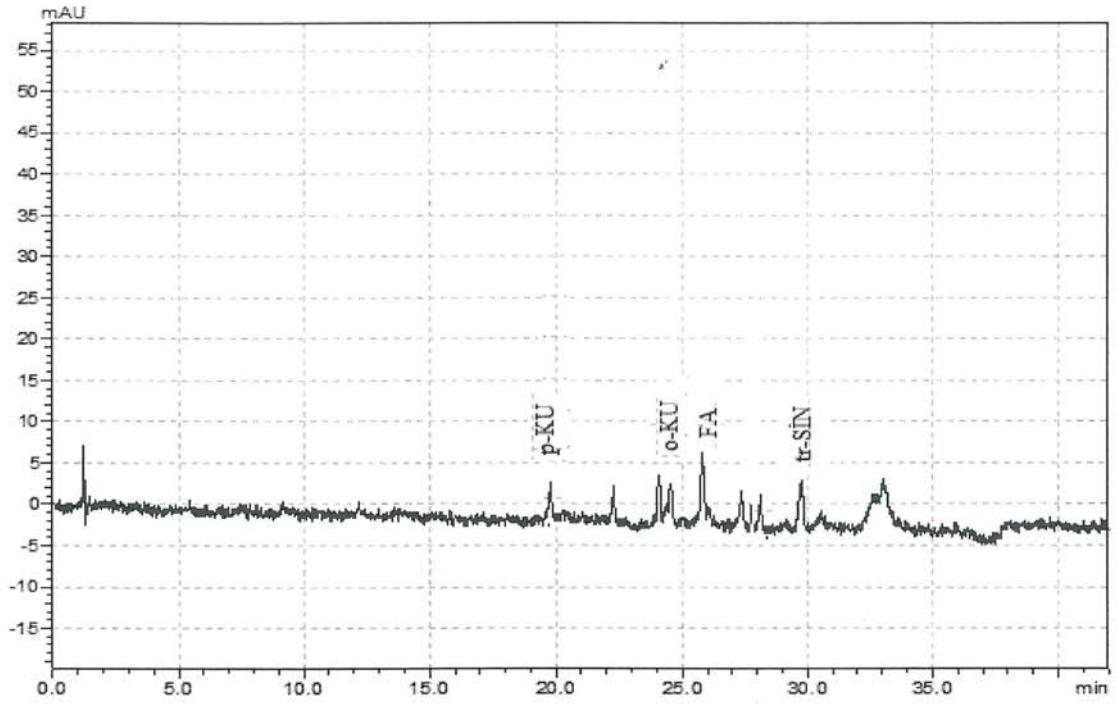
Şekil 4.4. GOME'nin HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, SI: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SIN: trans-Sinnamik Asit



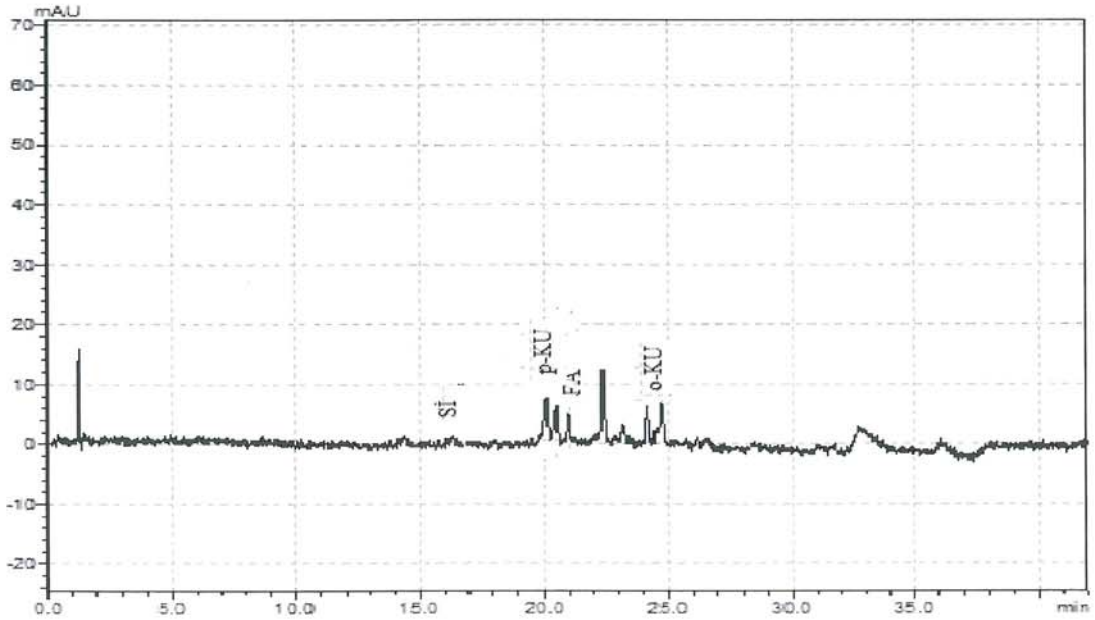
Şekil 4.5. GPME'nin HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, SI: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SIN: trans-Sinnamik Asit



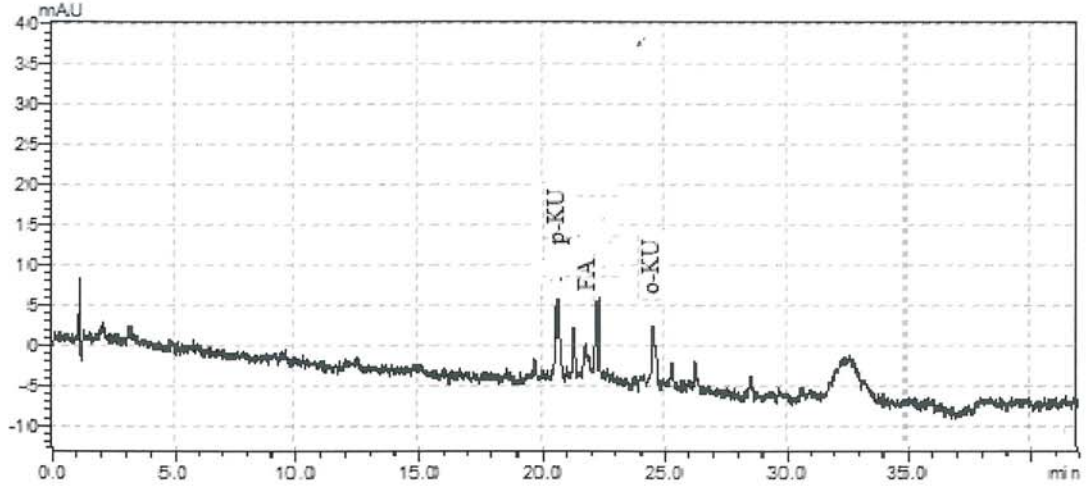
Şekil 4.6. GBME'nin HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, Sİ: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SİN: trans-Sinamik Asit



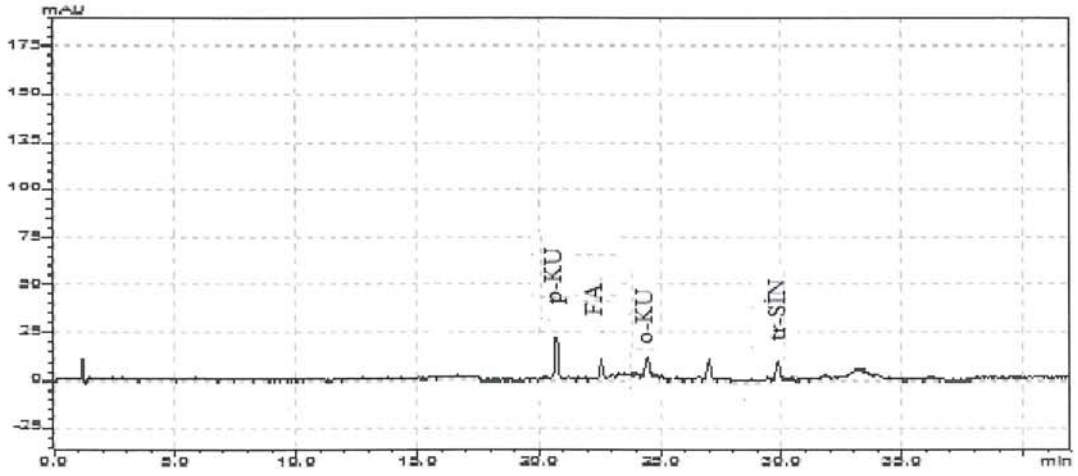
Şekil 4.7. GVPME'nin HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, Sİ: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SİN: trans-Sinamik Asit



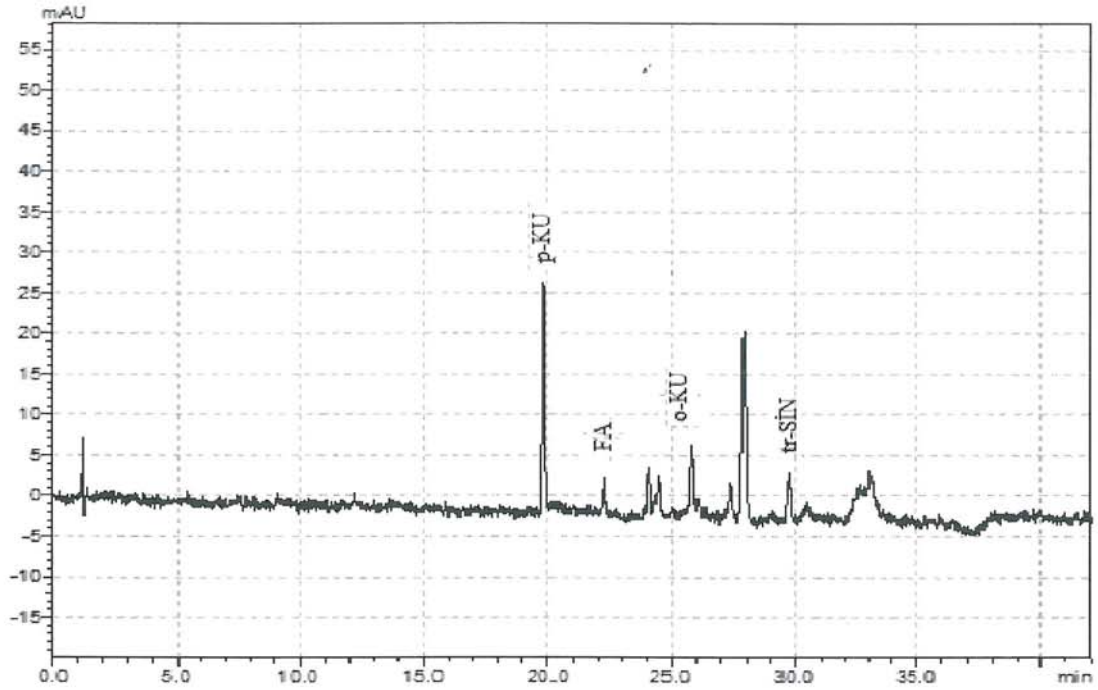
Şekil 4.8. GPMEF'nun HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, SI: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SİN: trans-Sinamik Asit



Şekil 4.9. GBMEF'nun HPLC Kromatogramı

GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, SI: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SİN: trans-Sinamik Asit



Şekil 4.10. *GVPMEF'nun HPLC Kromatogramı*

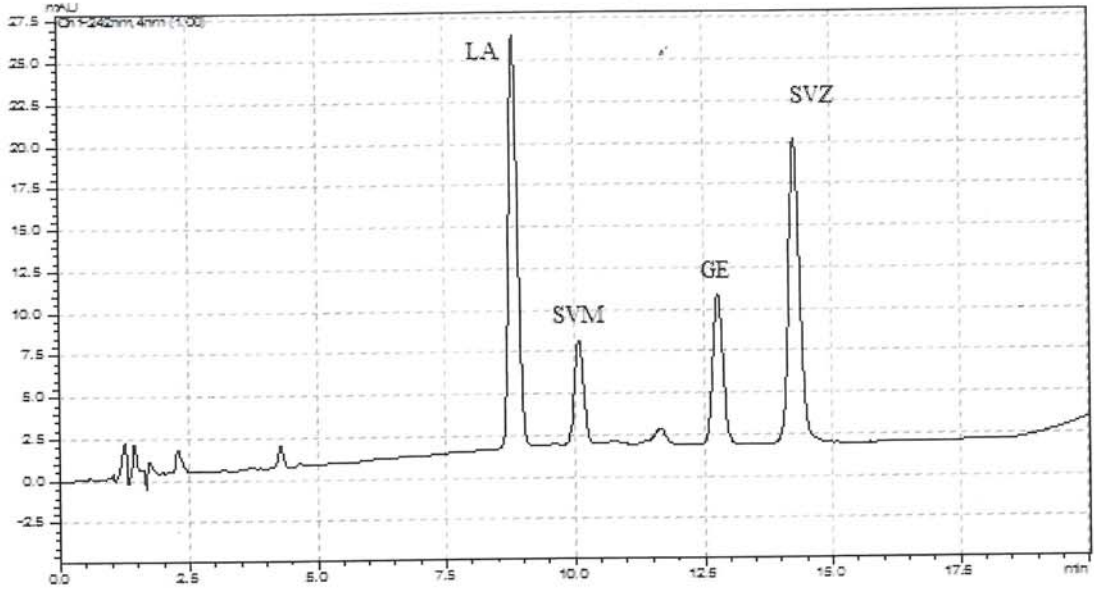
GA: Gallik Asit, pro-KA: Protokateşik Asit, p-hid-BA: para-Hidroksi Benzoik Asit, VA: Vanilik Asit, KA: Kafeik Asit, KLA: Klorojenik Asit, Sİ: Sirinjik Asit, p-KU: para-Kumarik Asit, FA: Ferulik Asit, o-KU: orto-Kumarik Asit, tr-SİN: trans-Sinamik Asit

4.4. Ters-Faz HPLC İle Sekoiridoit Miktar Tayini

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarında Ters-Faz HPLC ile tespit edilen başlıca sekoiridoitler; loganik asit, svertiamarin, gentiopikrozit ve sverozittir. Sekoiridoitlerden loganik asit en fazla *G. olivieri*'ye ait etil asetat fraksiyonunda (GOEAF) 94.92 mg/g ekstre; svertiamarin en fazla *G. asclepiadea*'ya ait etil asetat fraksiyonunda (GAEAF) 149.18 mg/g ekstre; gentiopikrozit en fazla *G. boissieri*'ye ait metanol ekstresinde (GBOME) 63.51 mg/g ekstre ve sverozit en fazla *G. verna* subsp. *pontica*'ya ait etil asetat fraksiyonunda (GVPEAF) 65.56 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir.

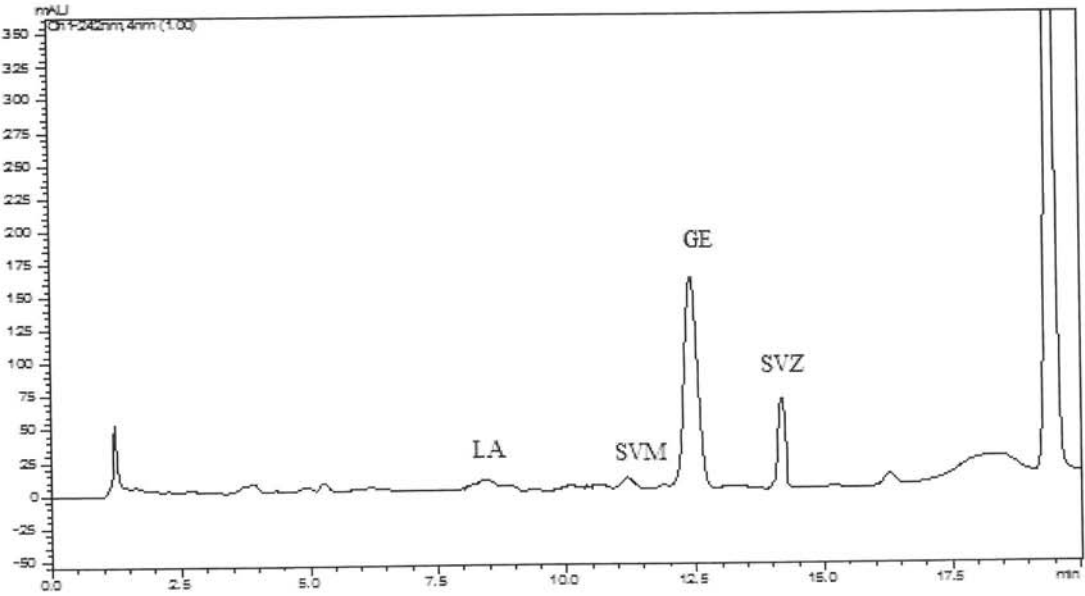
Çizelge 4.4. *Gentiana Ekstre ve Fraksiyonlarında Ters-Faz HPLC İle Tespit Edilen Sekoiridoit Miktar Tayinleri*

Ekstre ve fraksiyonlar	Sekoiridoit miktarları mg/g ekstre			
	Loganik asit	Svertiamarin	Gentiopikrozit	Sverozit
GAEAF	21.02	149.18	6.16	1.2
GAMEF	11.75	57.53	3.18	3.72
GBOEAF	59,38	27.32	16,71	4.57
GBOMEF	21.20	8.29	1.26	5.22
GBOME	7.25	0.54	63.51	-
GBEAF	0.96	4.01	4.34	1.26
GBMEF	0.43	36.22	0.66	0.66
GBME	3.34	1.09	34.57	7.53
GCEAF	7.28	2.96	8.20	-
GCMEF	8.55	12.04	20.45	22.85
GGEAF	71.90	13.14	2.28	6.00
GGMEF	1.82	7.27	0.19	4.27
GGME	3.92	9.26	9.76	0.26
GOEAF	94.92	51.04	1.52	1.30
GOMEF	51.66	34.12	45.19	1.63
GOME	10.66	15.57	42.53	45.52
GPEAF	0.74	0.37	3.96	-
GPMEF	10.30	0.36	6.82	0.45
GPME	3.93	0.27	3.41	7.44
GSEAF	12.53	6.13	3.02	4.96
GSMEF	6.73	11.60	13.07	2.45
GSME	5.48	15.84	9.20	2.36
GVBEAF	3.13	3.57	5.62	0.33
GVBMEF	2.24	0.86	52.14	12.82
GVBME	0.91	4.49	44.17	19.53
GVPEAF	7.90	5.00	4.91	65.56
GVPMEF	0.39	0.57	25.70	0.20
GVPME	12.70	2.85	19.70	7.27



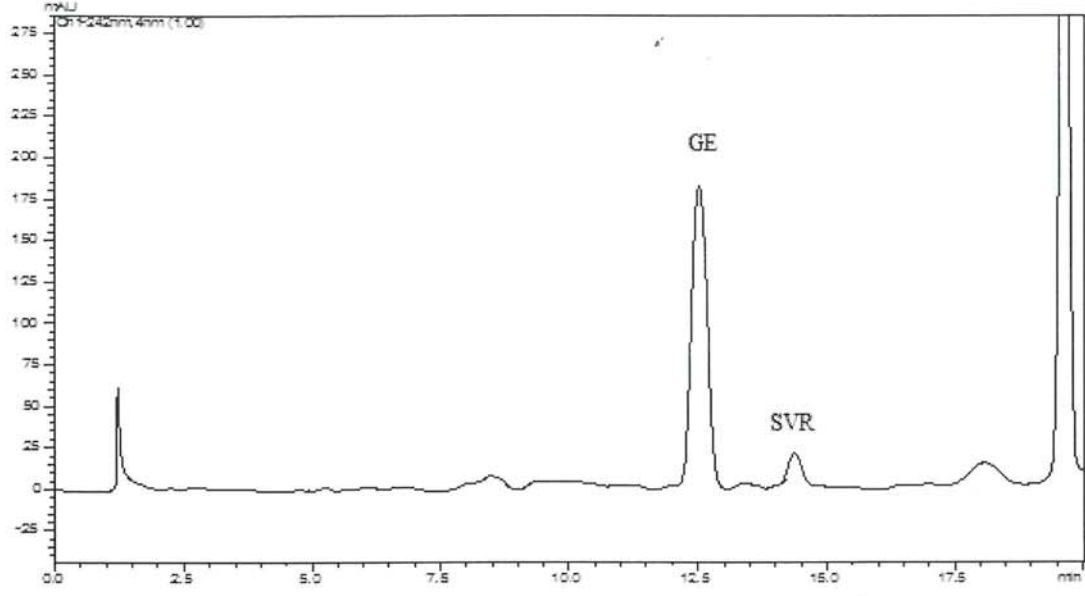
Şekil 4.11. Standart Sekoirdoit HPLC Kromatogramı

Loganik asit (LA); Svertiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE); Sverozit (SVZ)



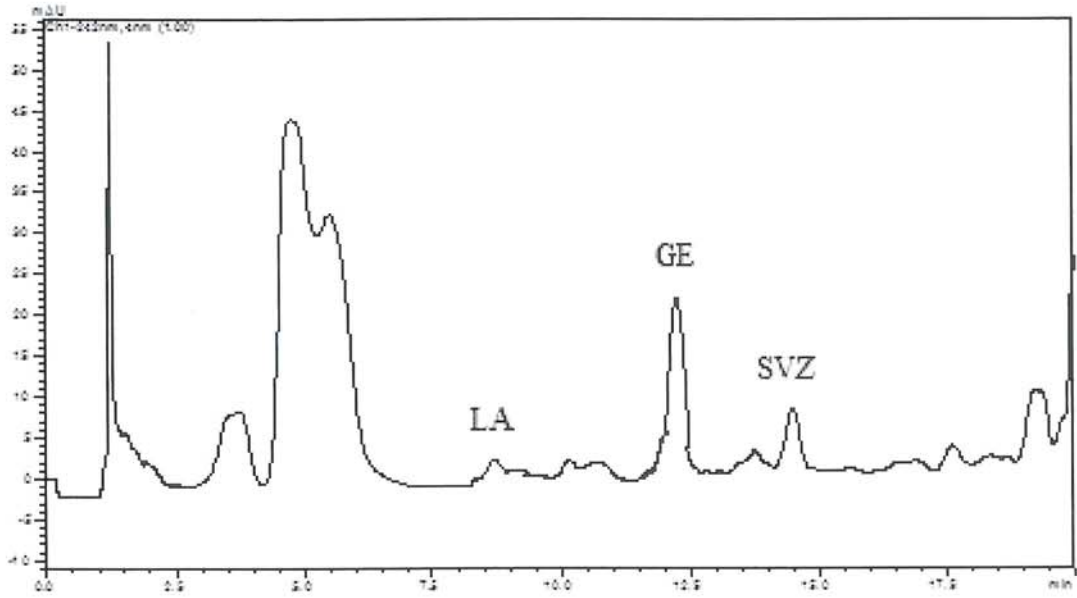
Şekil 4.12. GVPMEF'nun HPLC Kromatogramı

Loganik asit (LA); Svertiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE); Sverozit (SVZ)



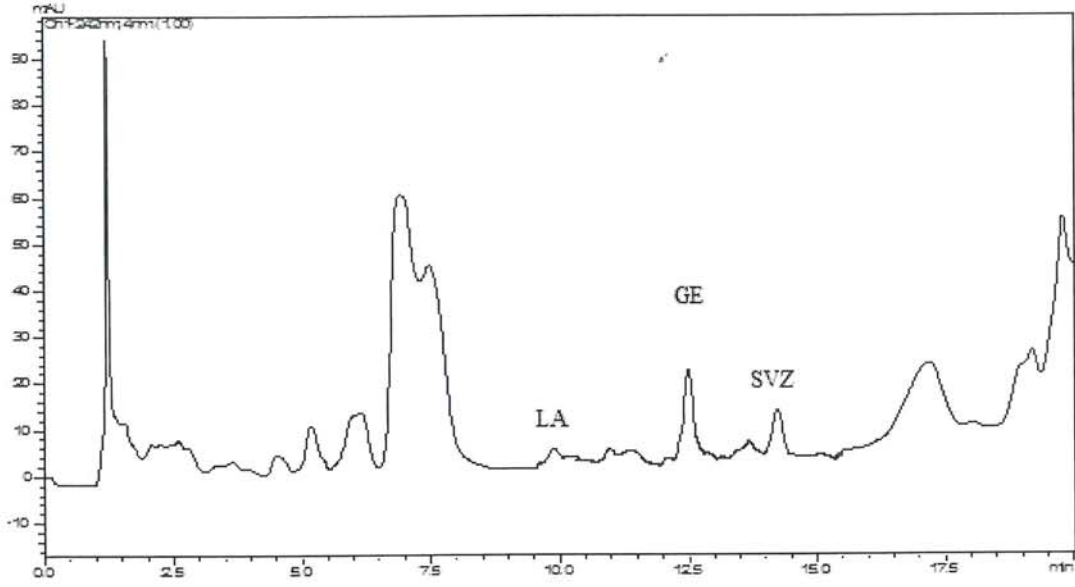
Şekil 4.13. GBME'nin HPLC Kromatogramı

Loganik asit (LA); Svertiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE); Sverozit (SVZ)



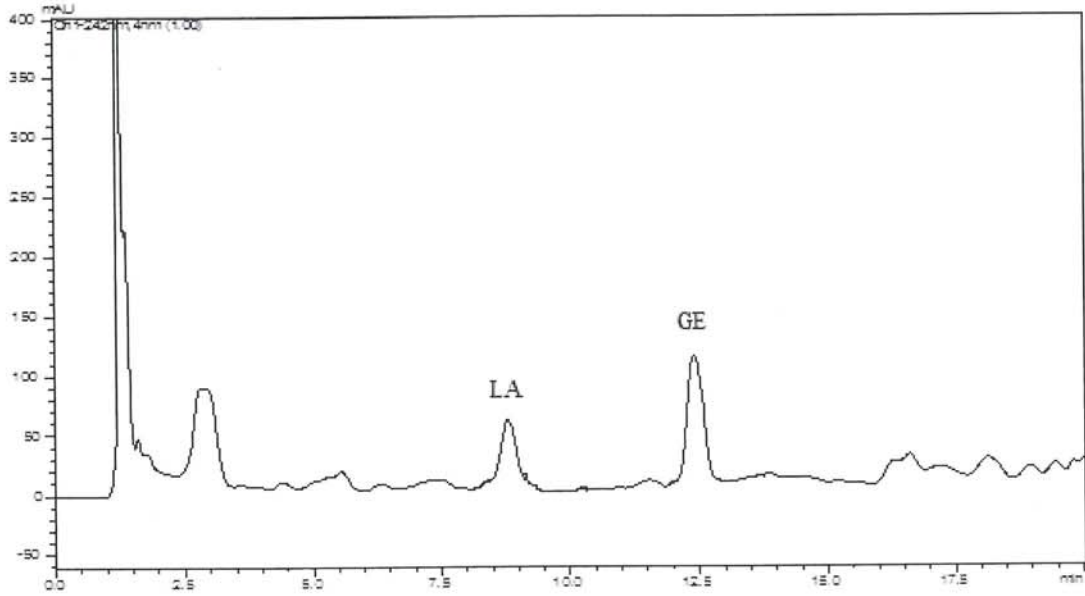
Şekil 4.14. GPME'nin HPLC Kromatogramı

Loganik asit (LA); Svertiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE); Sverozit (SVZ)



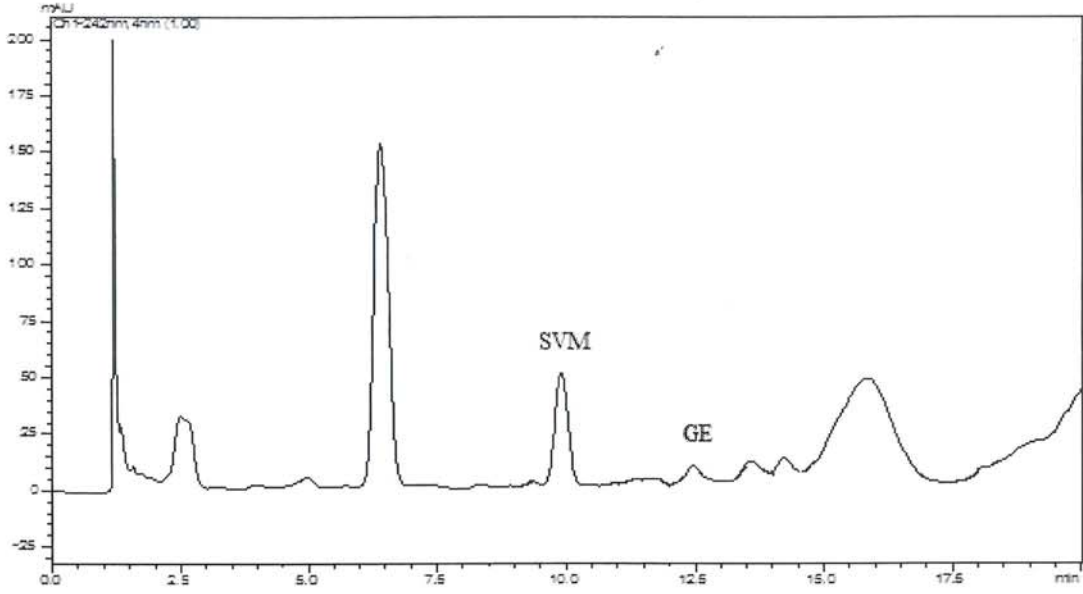
Şekil 4.15. GPMEF'nun HPLC Kromatogramı

Loganik asit (LA); Svertiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE); Sverozit (SVZ)



Şekil 4.16. GVPME'nin HPLC Kromatogramı

Loganik asit (LA); Svertiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE); Sverozit (SVZ)



Şekil 4.17. GBMEF'nun HPLC Kromatogramı

Svtiamarin (SVM); Gentiopikrozit (GE)

4.5. Sıvı Kromatografisi/İyon Tuzağı ve Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) Sistemi İle Fitokimyasal İçeriklerin Belirlenmesi

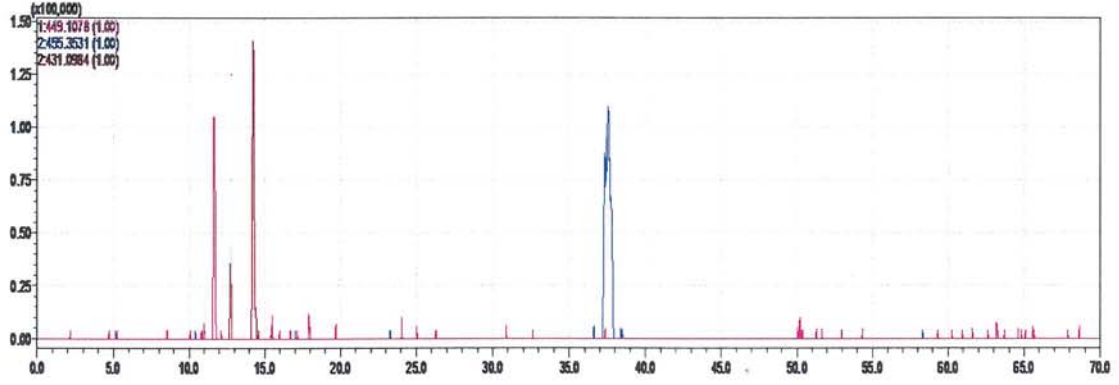
G. asclepiadea, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. olivieri*, *G. pyrenaica*, *G.septemfida*, *G. verna* subsp. *pontica*, *G. verna* subsp. *balcanica*'ya ait toprak üstü kısımların metanol ekstralarının fitokimyasal içerikleri, Sıvı kromatografisi/iyon tuzağı ve uçuş zamanlı kütle spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) sistemi ile belirlenmiştir. LC/MS-IT-TOF sonuçlarına göre ekstralarda; loganin iridoit glikoziti, gentiopikrozit, sverozit, svtiamarin, 3'-asetil sverozit ve östomoruzzit sekoiridoit glikozitleri, viteksin ve orientin flavon glikozitleri, bellidin, bellidifolin, svtianolin, norsvtianolin ve mangiferin ksanton-C glikozitleri ve oleanolik asit tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge. 4.5. Gentiana Türlerine Ait Metanol Ekstrelerinde LC/MS-IT-TOF İle Tespit Edilen Bileşikler

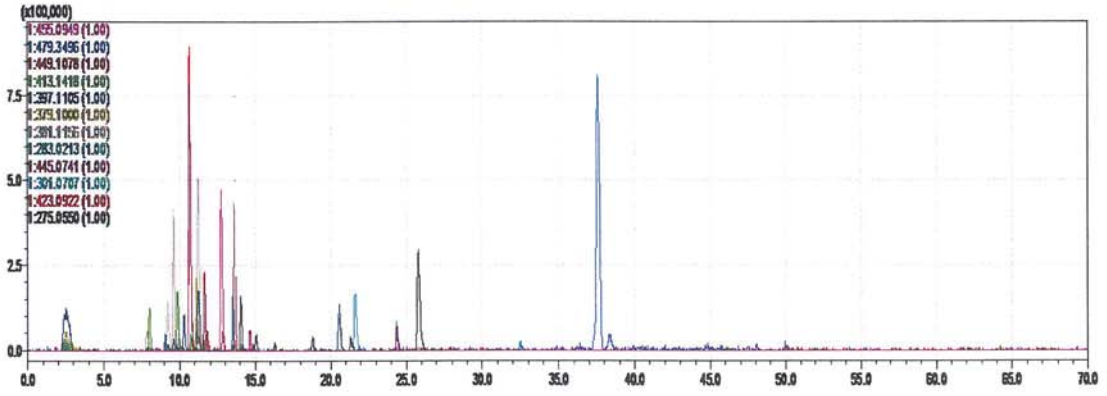
Bileşik adı	Tür adı									
	<i>G. asclepiadea</i>	<i>G. boissieri</i>	<i>G. brachyphylla</i>	<i>G. cruciata</i>	<i>G. gelida</i>	<i>G. olivieri</i>	<i>G. pyrenica</i>	<i>G. septemfida</i>	<i>G. verna subsp. balcanica</i>	<i>G. verna subsp. pontica</i>
Gentiopikrozit	X	X	X	X	X	X		X		X
Sverozit	X	X	X	X	X	X		X		X
Svertiamarin	X	X	X	X	X	X		X		X
Loganin			X							
Svertianolin		X				X				
Norsvertianolin			X					X		
3'-Asetil sverozit						X				X
Östomorzit	X	X		X	X			X		X
Viteksin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Orientin	X	X	X	X	X	X	X			X
Bellidin			X						X	
Bellidifolin			X						X	
Mangiferin	X		X						X	
Oleanolik asit	X	X		X	X	X	X	X	X	X

4.5.1. *Gentiana* türlerine ait metanol ekstralarının LC/MS-IT-TOF kromatogramları

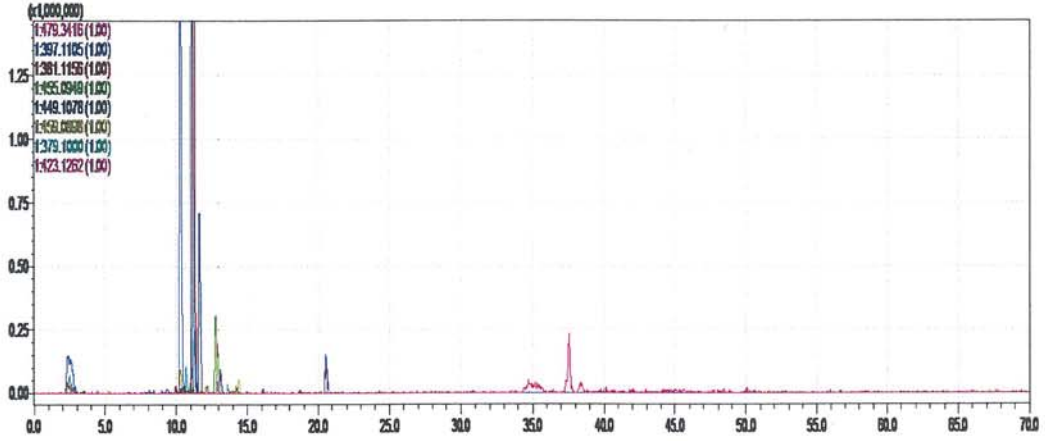
Gentiana türlerine ait metanol ekstralarının fitokimyasal bileşimleri LC/MS-IT-TOF sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Kromatogramlardan elde edilen piklerin kolonda geliş zamanları (tR) ve Kütle spektroskopisi ile elde edilen kütle spektrumları ile literatürdeki kütle spektrumları karşılaştırılarak bileşikler tespit edilmiştir.



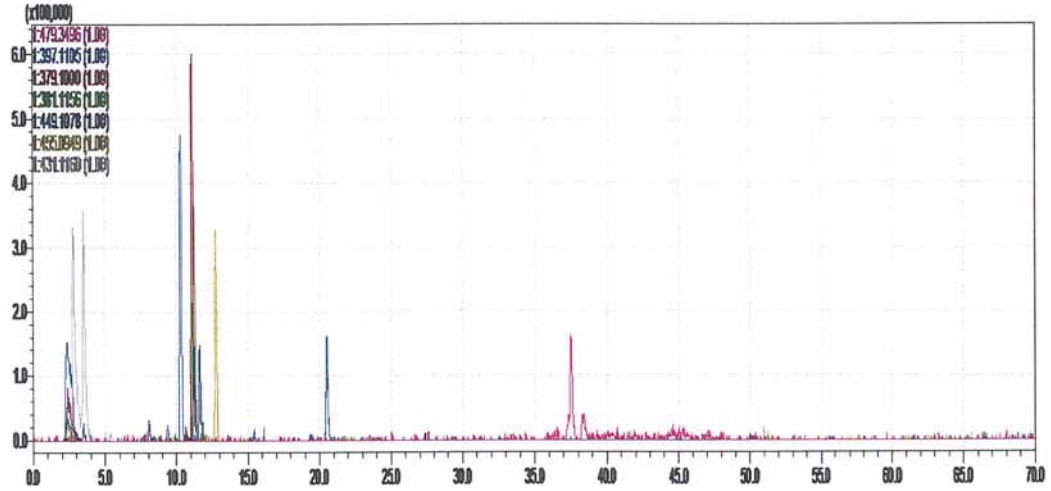
Şekil 4.18. GPME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



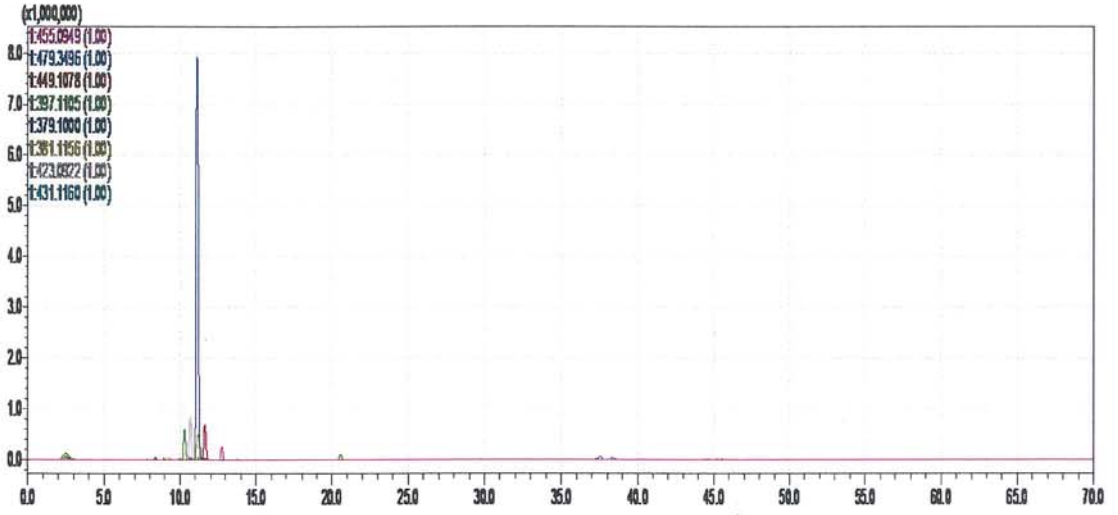
Şekil 4.19. GBME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



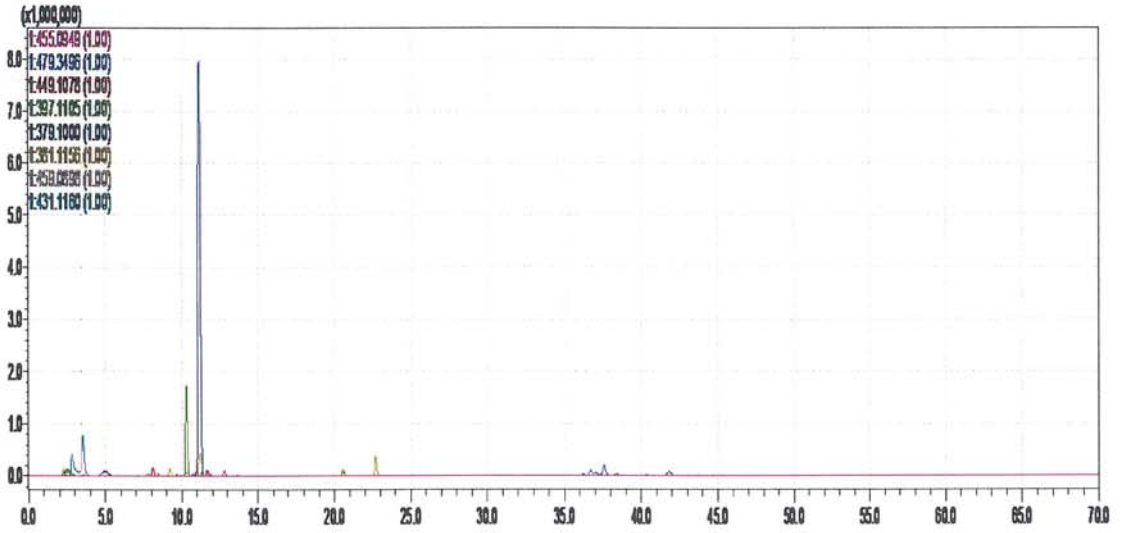
Şekil 4.20. GOME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



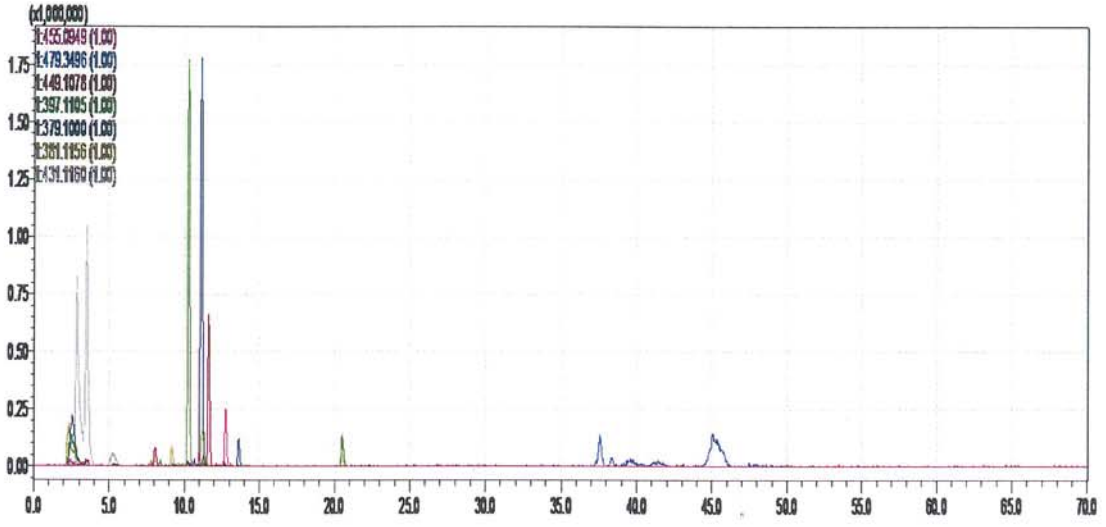
Şekil 4.21. GCME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



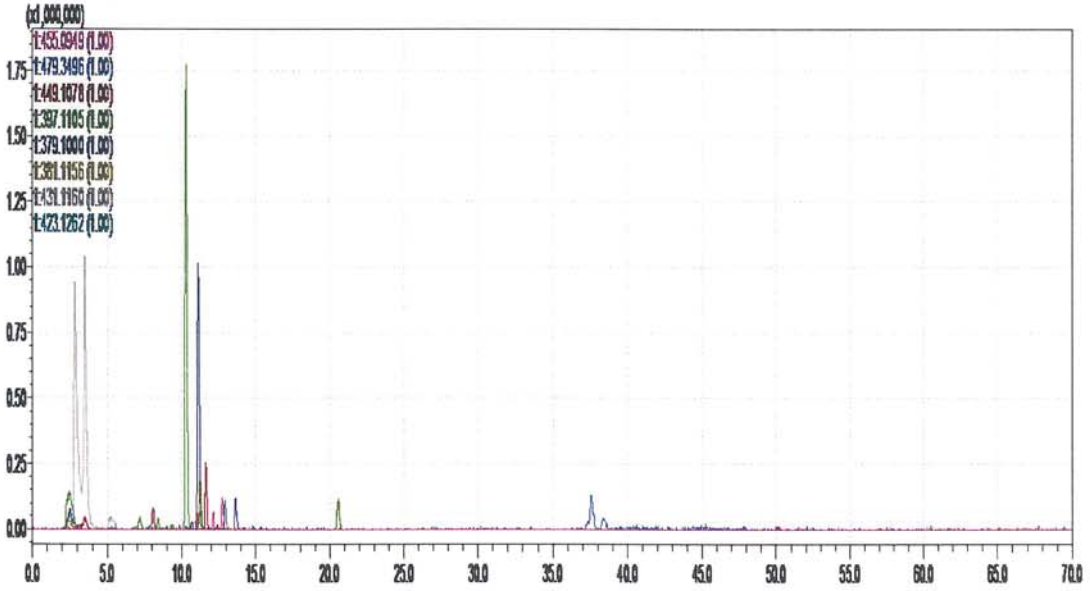
Şekil 4.22. GAME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



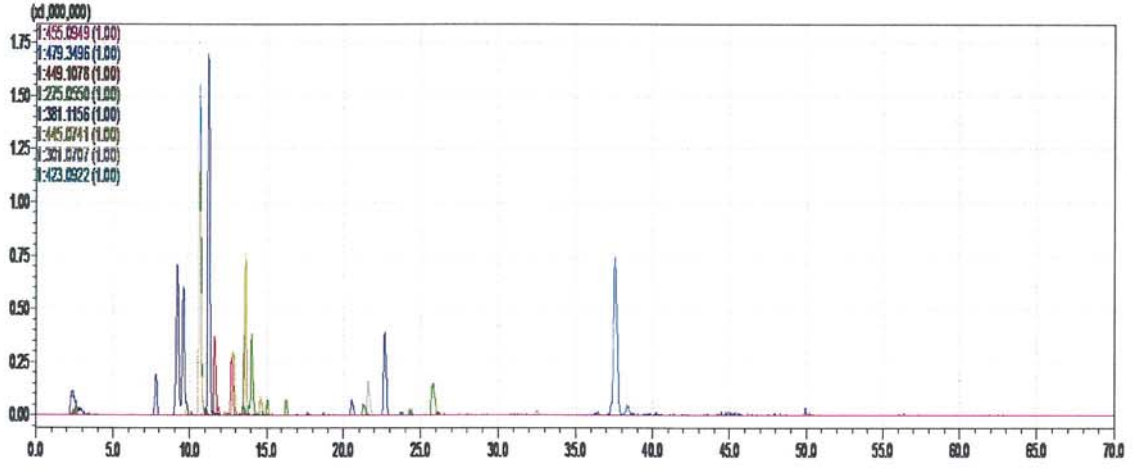
Şekil 4.23. GBOME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



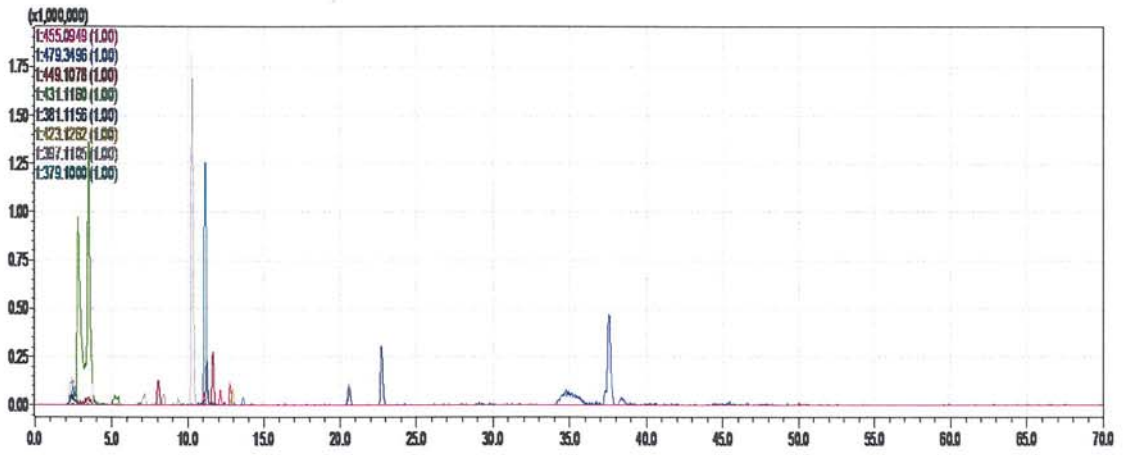
Şekil 4.24. GGME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



Şekil 4.25. GSME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



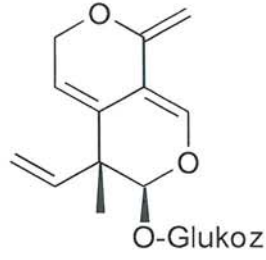
Şekil 4.26. GVBME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



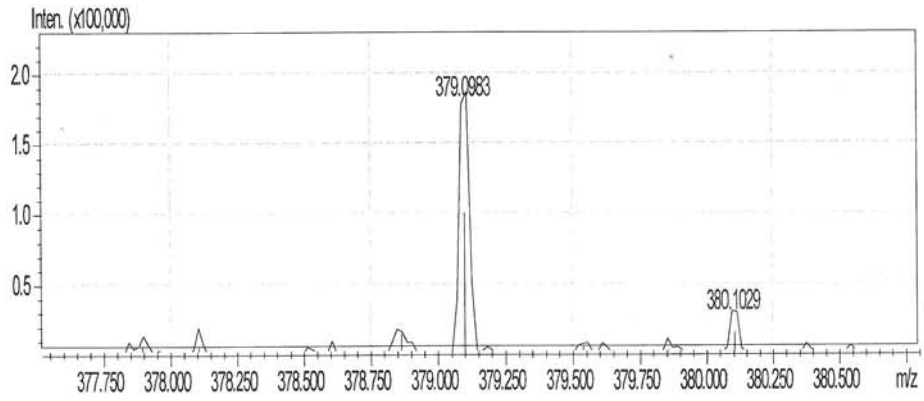
Şekil 4.27. GVPME'nin LC/MS-IT-TOF Kromatogramı

4.5.2. *Gentiana* türlerine ait metanol ekstralarında LC/MS-IT-TOF ile tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları

Gentiopikrozit (Na⁺ = 379.1000. tR=11.10)

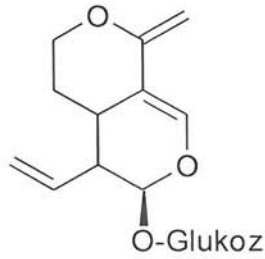


Şekil 4.28. *Gentiopikrozit*

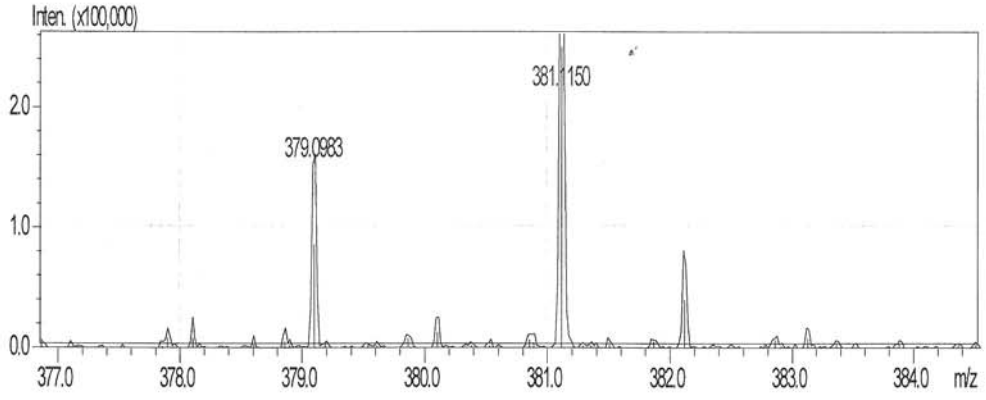


Şekil 4.29. *Gentiopikrozit*'in Kütle Spektrumu

Sverozit (Na⁺ = 381.1156. tR=11.25)

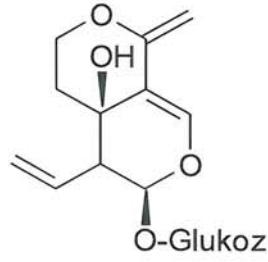


Şekil 4.30. *Sverozit*

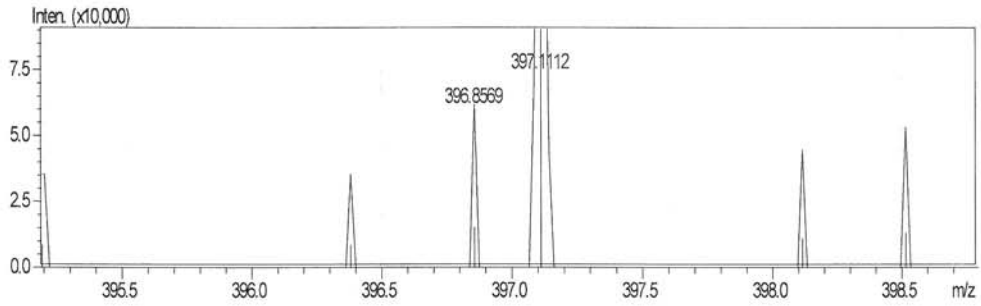


Şekil 4.31. Sverozit'in Kütle Spektrumu

Svertiamarin ($\text{Na}^+ = 397.1105$, $t_R=10.35$)

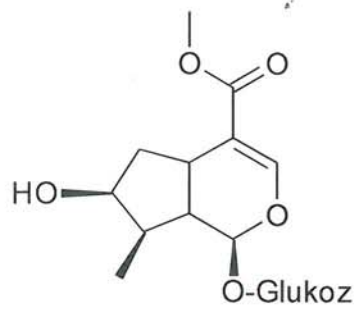


Şekil 4.32. Svertiamarin

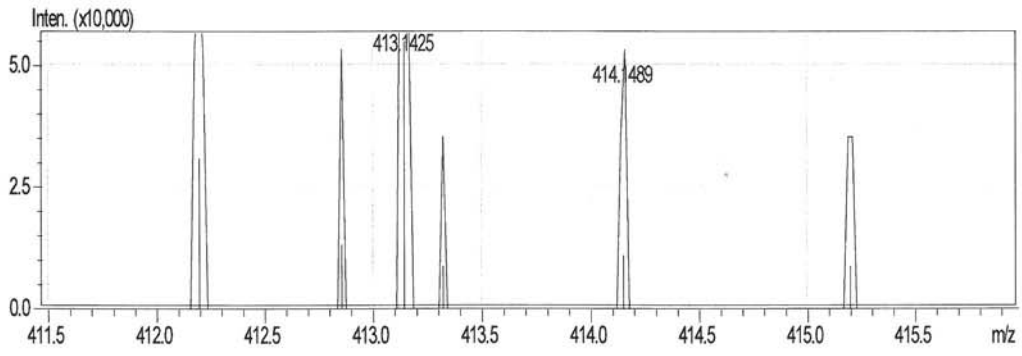


Şekil 4.33. Svertiamarin'in Kütle Spektrumu

Loganin (Na⁺ = 413.1418. tR=10.75)

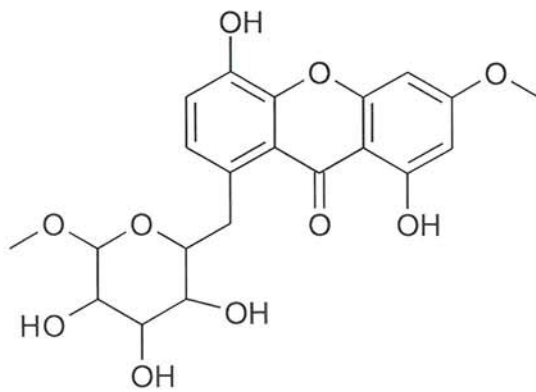


Şekil 4.34. Loganin

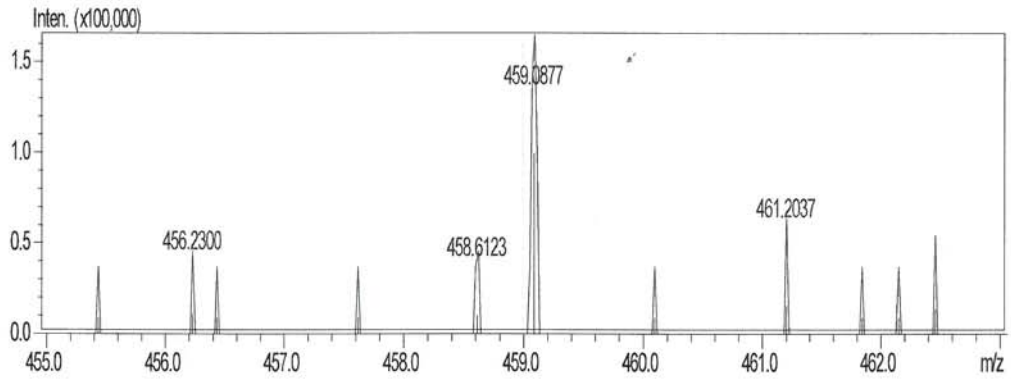


Şekil 4.35. Loganin'in Kütle Spektrumu

Svertianolin (Na⁺= 459.0898. tR=10.40)

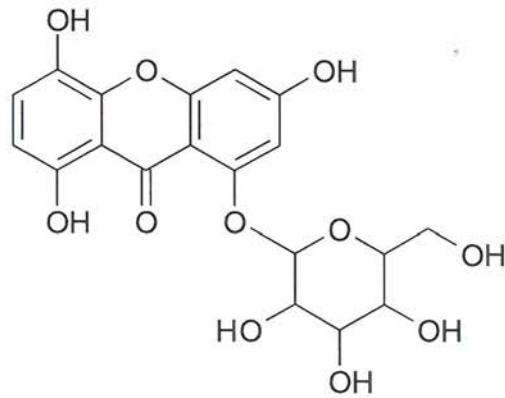


Şekil 4.36. Svertianolin

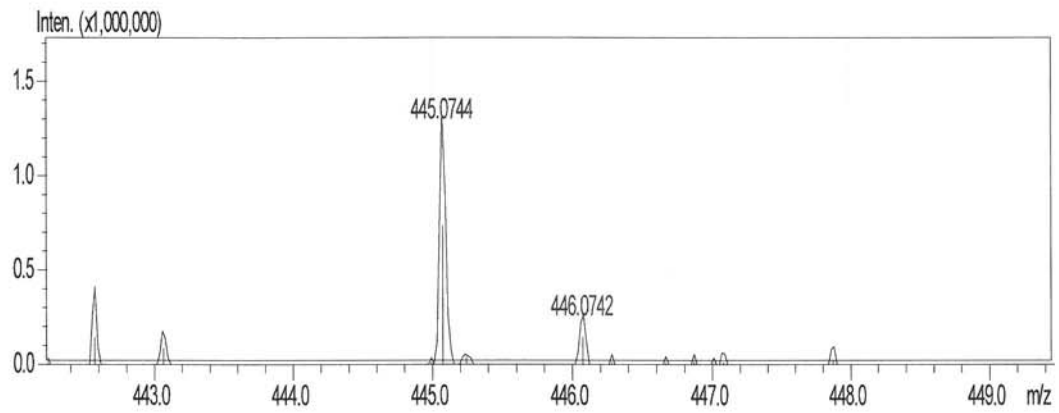


Şekil 4.37. Svertianolin'in Kütle Spektrumu

Norsvertianolin (Na⁺ = 445.0741. tR=10.70)

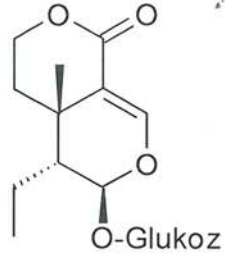


Şekil 4.38. Norsvertianolin

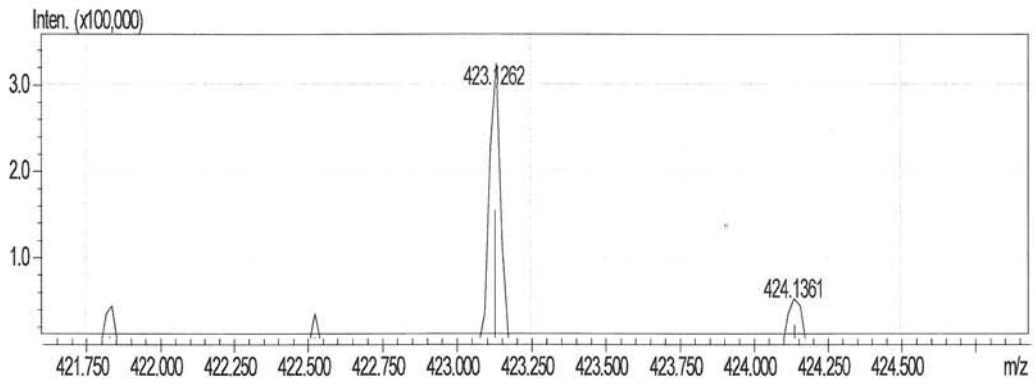


Şekil 4.39. Norsvertianolin'in Kütle Spektrumu

3'-Asetilsverozit (Na⁺= 423.1262. tR=12.95)

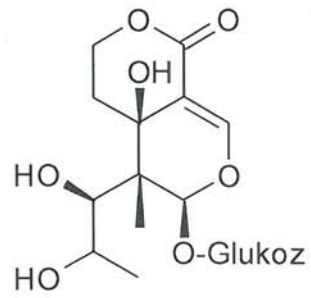


Şekil 4.40. 3'-Asetilsverozit

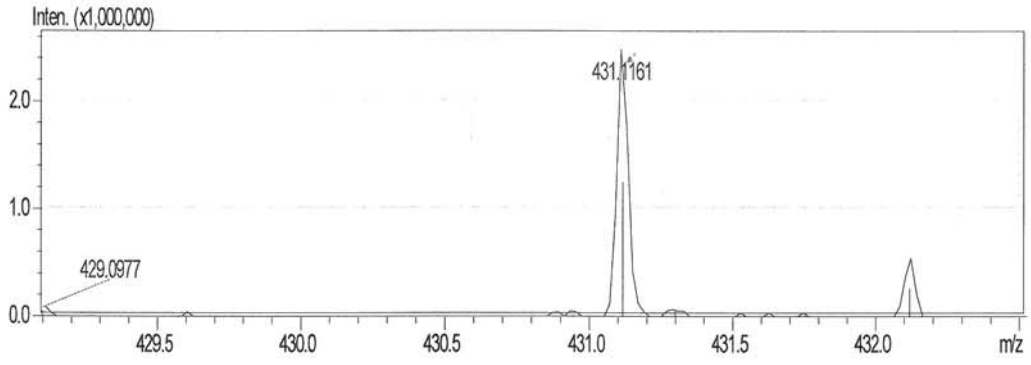


Şekil 4.41. 3'-Asetilsverozit'in Kütle Spektrumu

Östomoruzzit (Na⁺ =431.1160. tR=3.60)

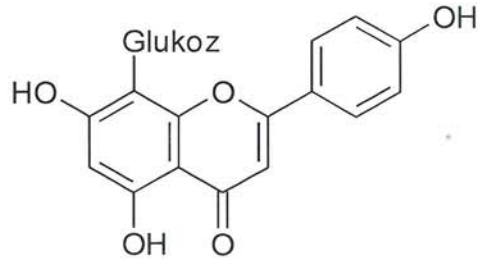


Şekil 4.42. Östomoruzzit

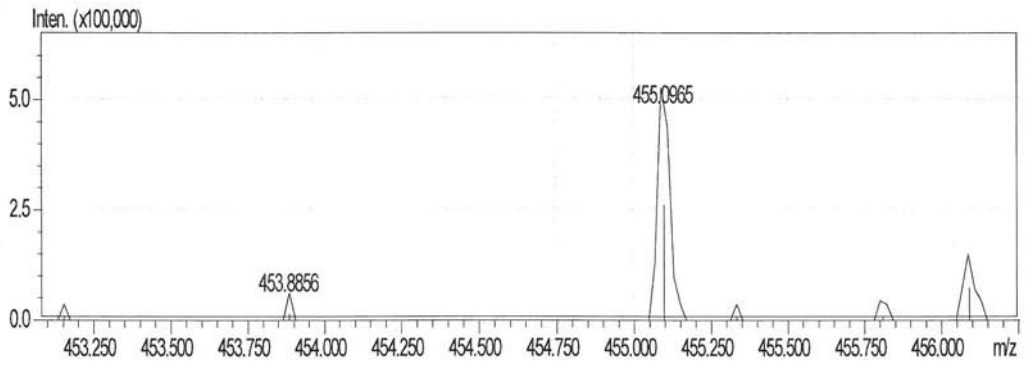


Şekil 4.43. Östomoruzzit'in Kütle Spektrumu

Viteksin (Na⁺ = 455.0949. tR=12.7)

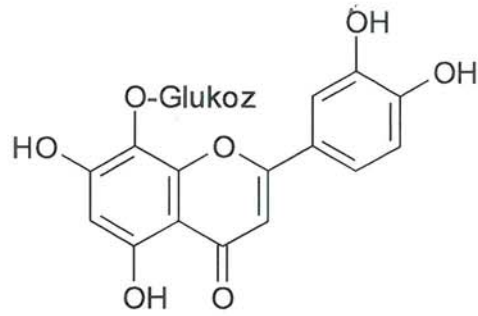


Şekil 4.44. Viteksin

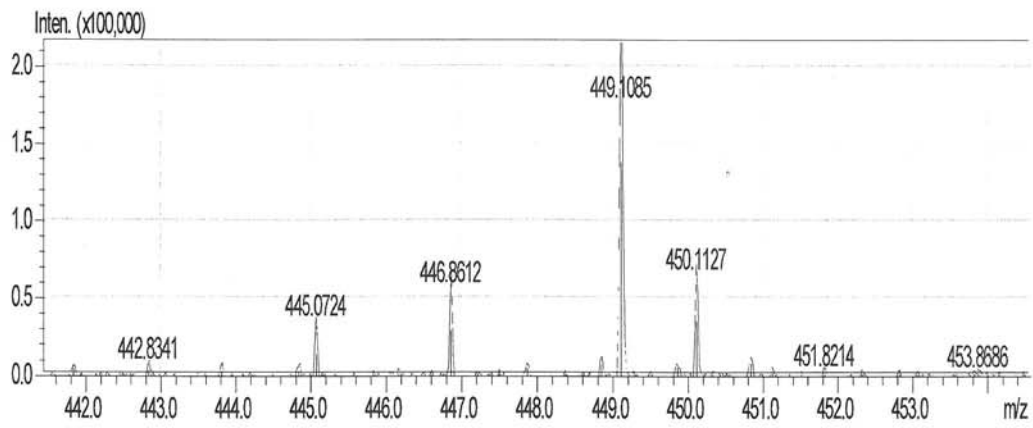


Şekil 4.45. Viteksin'in Kütle Spektrumu

Orientin ($M^+ = 449.1078$, $tR = 11.6$)

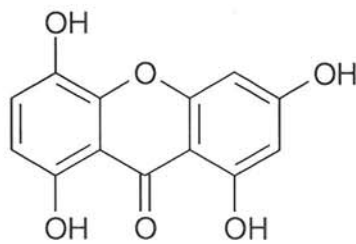


Şekil 4.46. *Orientin*

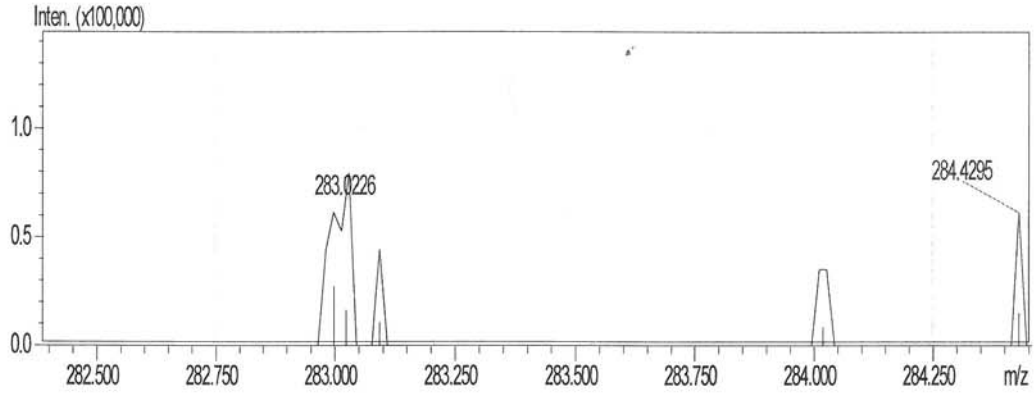


Şekil 4.47. *Orientin*'in Kütüle Spektürümü

Bellidin ($Na^+ = 283.0213$, $tR = 49.95$)

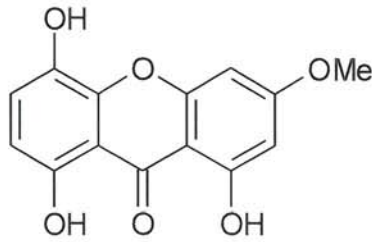


Şekil 4.48. *Bellidin*

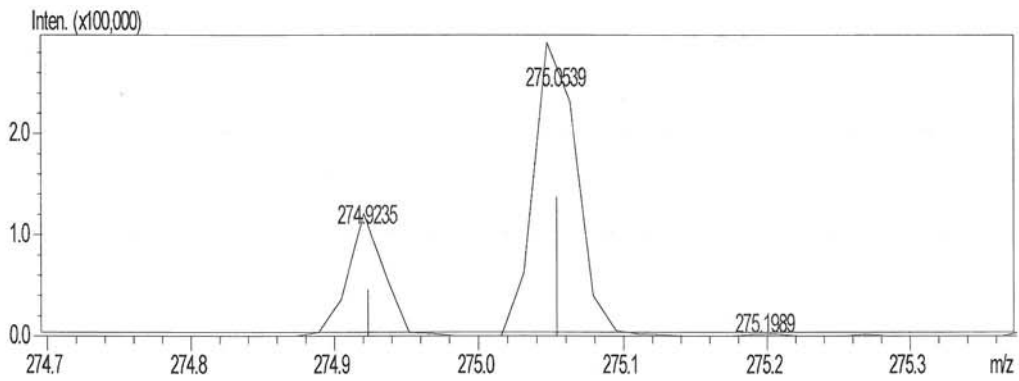


Şekil 4.49. Bellidin'in Kütle Spektrumu

Bellidifolin (+ = 275.0550. tR=25.80)

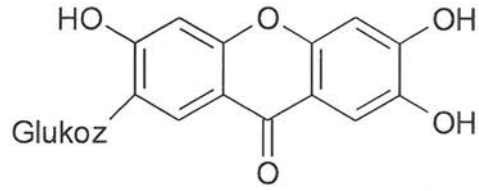


Şekil 4.50. Bellidifolin

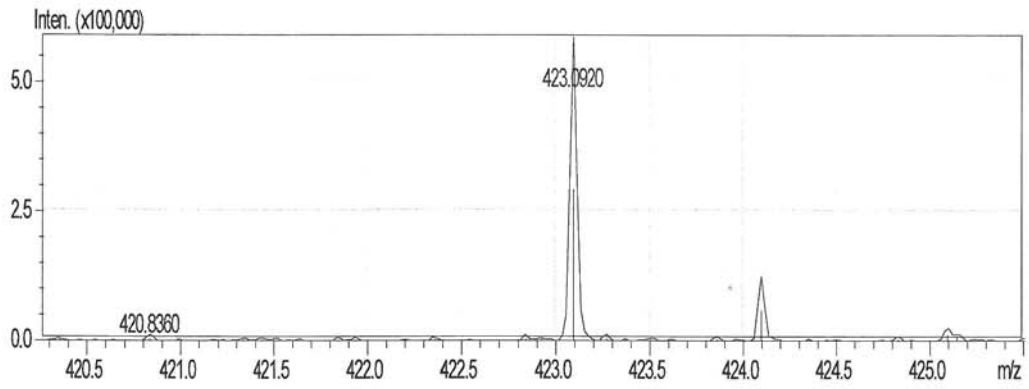


Şekil 4.51. Bellidifolin'in Kütle Spektrumu

Mangiferin ($M^+ = 423.0922$. $tR=10.70$)

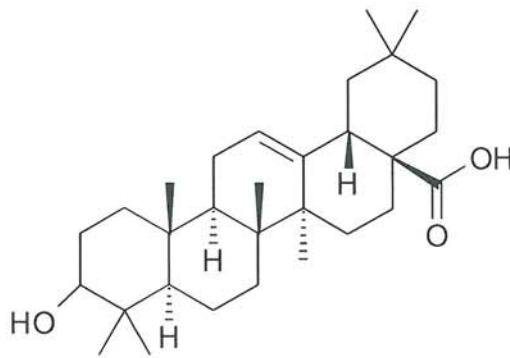


Şekil 4.52. *Mangiferin*

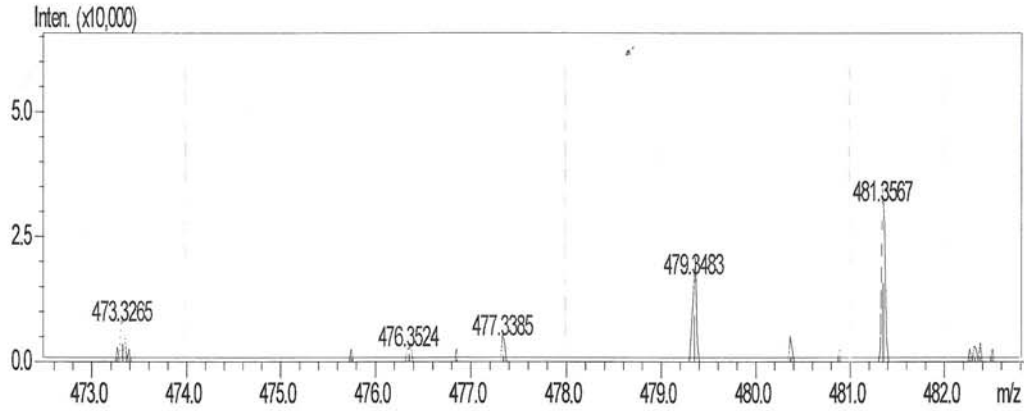


Şekil 4.53. *Mangiferin*'in Kütlev Spektrumu

Oleanolik asit ($H^- = 455.3531$. $tR=37.6$)



Şekil 4.54. *Oleanolik asit*



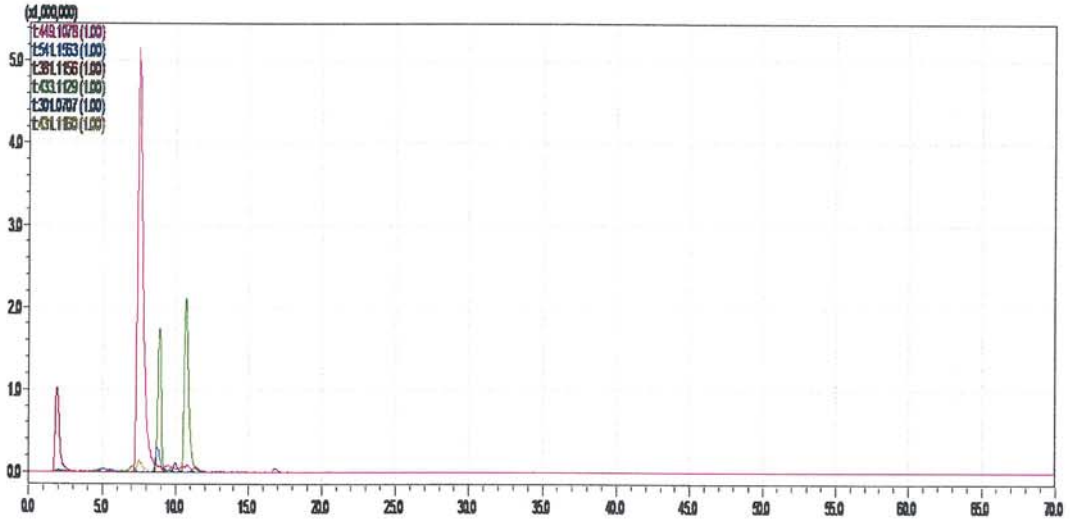
Şekil 4.55. *Oleanolik Asit'in Kütle Spektrumu*

G. brachyphylla, *G. pyrenaica* ve *G. verna* subsp. *pontica*'ya ait toprak üstü kısımların metanol fraksiyonlarının fitokimyasal içerikleri, Sıvı kromatografisi/iyon tuzağı ve uçuş zamanlı kütle spektroskopisi (LC/MS-IT-TOF) sistemi ile belirlenmiştir. LC/MS-IT-TOF sonuçlarına göre fraksiyonlarda; gentiopikrozit, sverozit, östomoruzzit ve oliverozit C sekoiridoit glikozitleri, izopirenin, viteksin, izoviteksin, orientin flavon glikozitleri ve bellidifolin, svertianolin ve norsvertianolin ksanton-C glikoziti tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

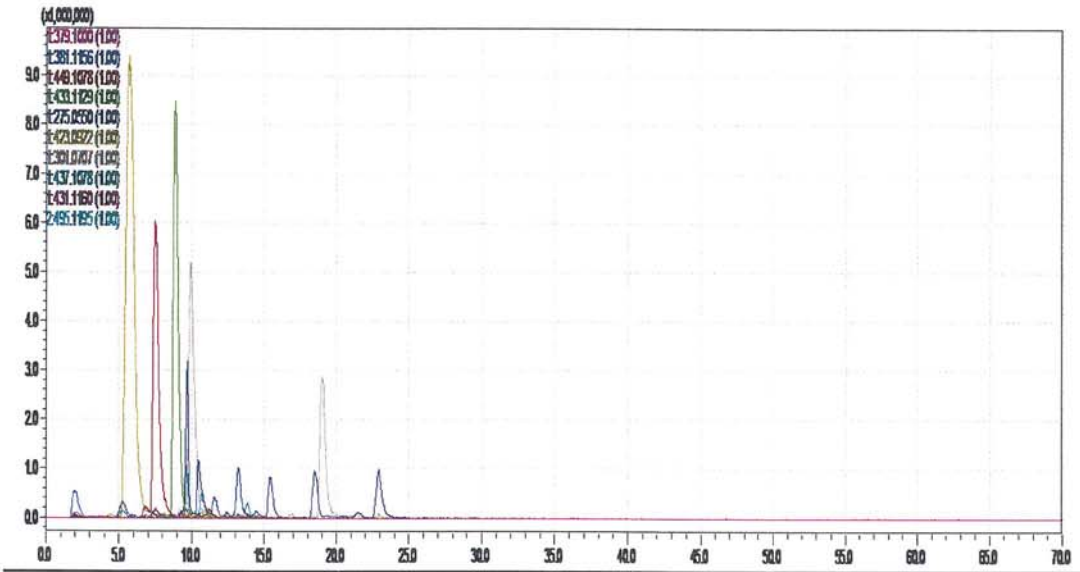
Çizelge 4.6. *Gentiana Türlerine Ait Metanol Fraksiyonlarında LC/MS-IT-TOF İle Tespit Edilen Bileşikler*

Bileşik adı	Tür adı		
	<i>G. brachyphylla</i>	<i>G. pyrenaica</i>	<i>G. verna</i> subsp. <i>pontica</i>
Gentiopikrozit	X		
Sverozit	X	X	X
Svertianolin	X		
Norsvertianolin	X		X
Oliverozit C		X	
Östomoruzzit	X	X	X
İzopirenin	X		X
Viteksin		X	X
İzoviteksin		X	
Orientin	X	X	X
Bellidifolin	X		X

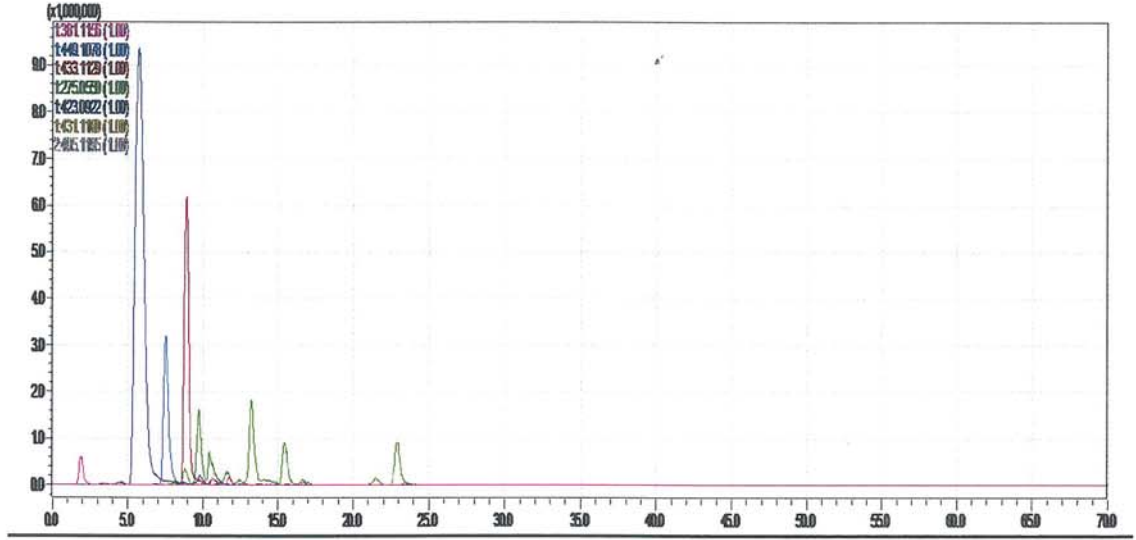
4.5.3. *Gentiana* türlerine ait metanol fraksiyonlarının LC/MS-IT-TOF kromatogramları



Şekil 4.56. GPMEF'nun LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



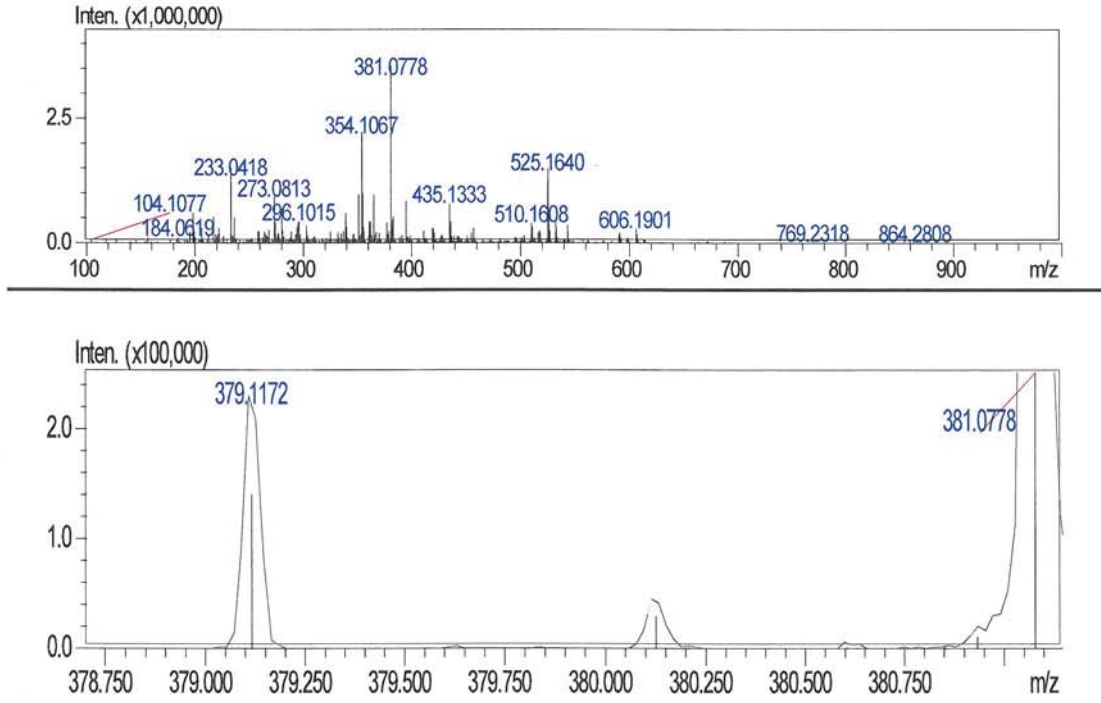
Şekil 4.57. GBMEF'nun LC/MS-IT-TOF Kromatogramı



Şekil 4.58. GVPMEF'nun LC/MS-IT-TOF Kromatogramı

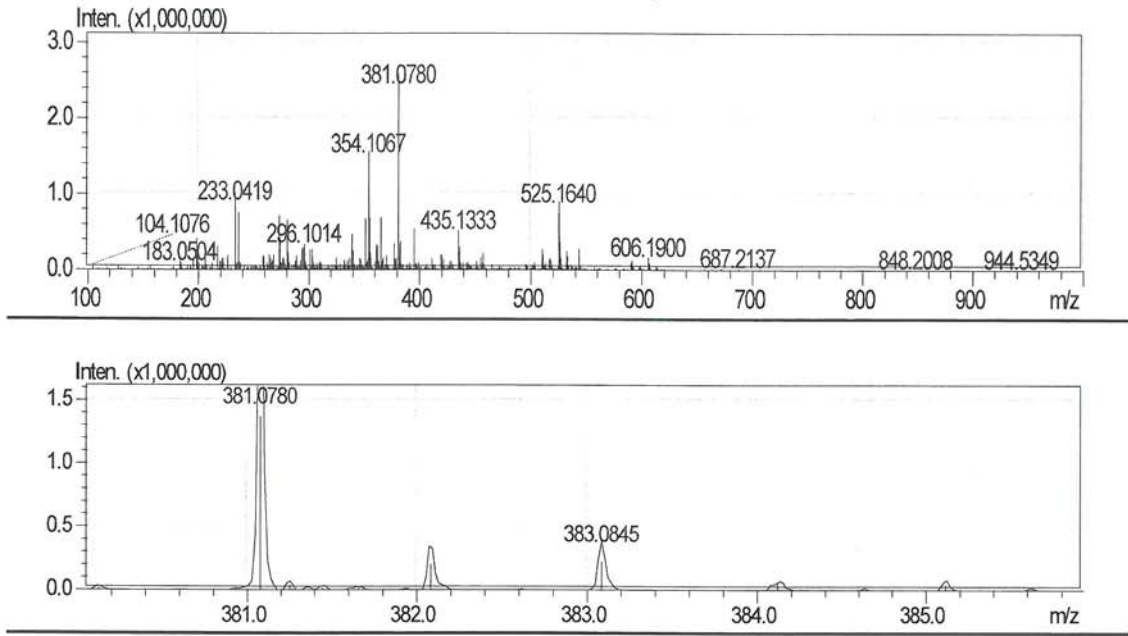
4.5.4. *Gentiana* türlerine ait metanol fraksiyonlarında LC/MS-IT-TOF ile tespit edilen bileşiklerin kütle spektrumları

Gentiopikrozit tR=2.13



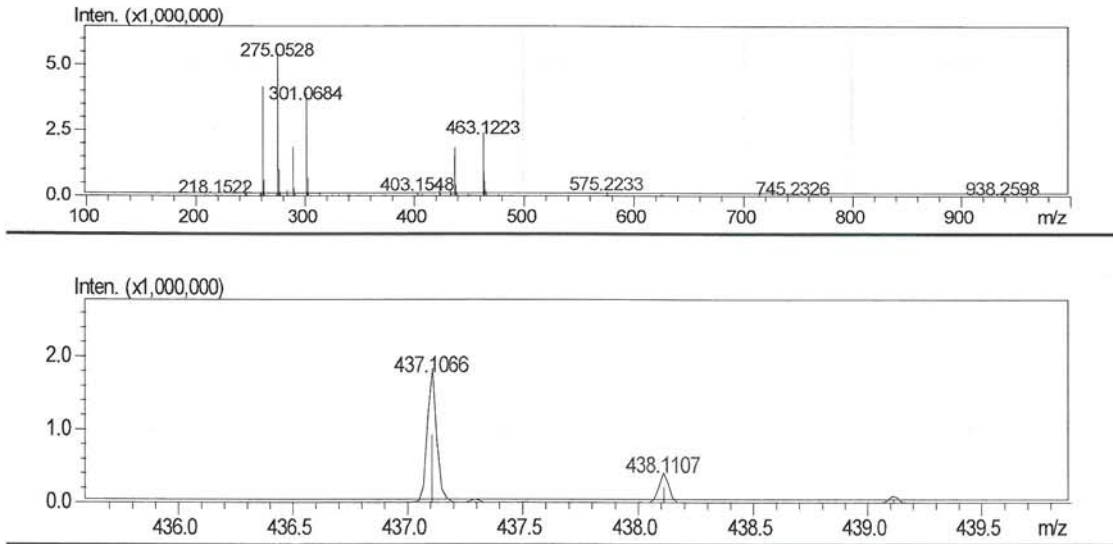
Şekil 4.59. Gentiopikrozit'in Kütle Spektrumu

Sverozit tR=1.91



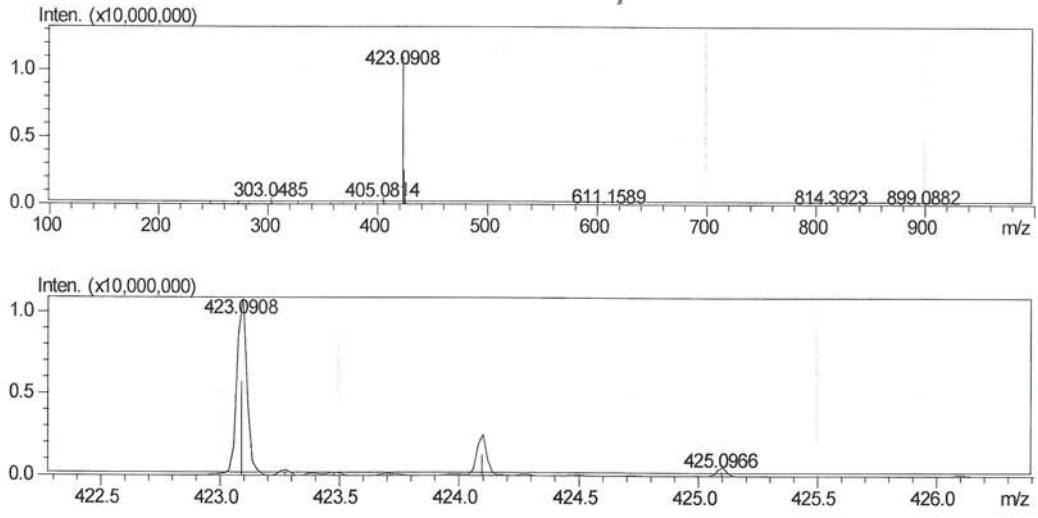
Şekil 4.60. Sverozit'in Kütle Spektrumu

Svertianolin tR=9.68



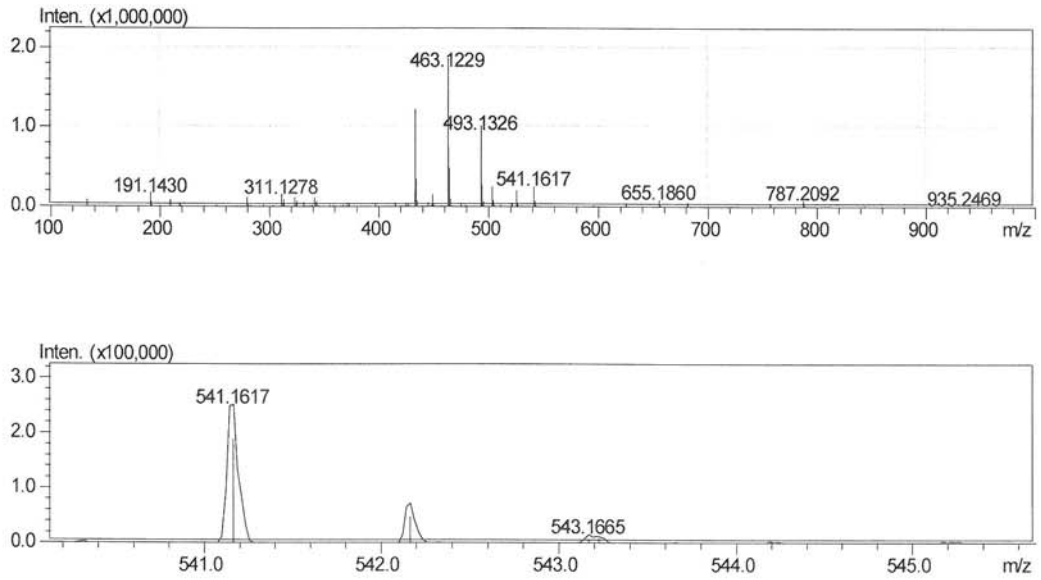
Şekil 4.61. Svertianolin'in Kütle Spektrumu

Norsvertianolin tR=5.66



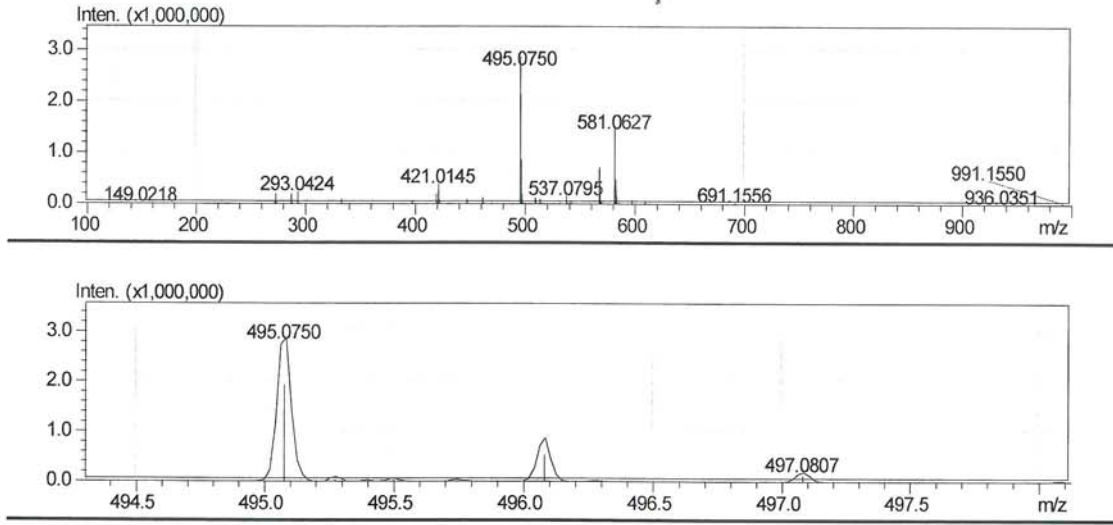
Şekil 4.62. Norsvertianolin'in Kütle Spektrumu

Oliverozit C tR=8.74



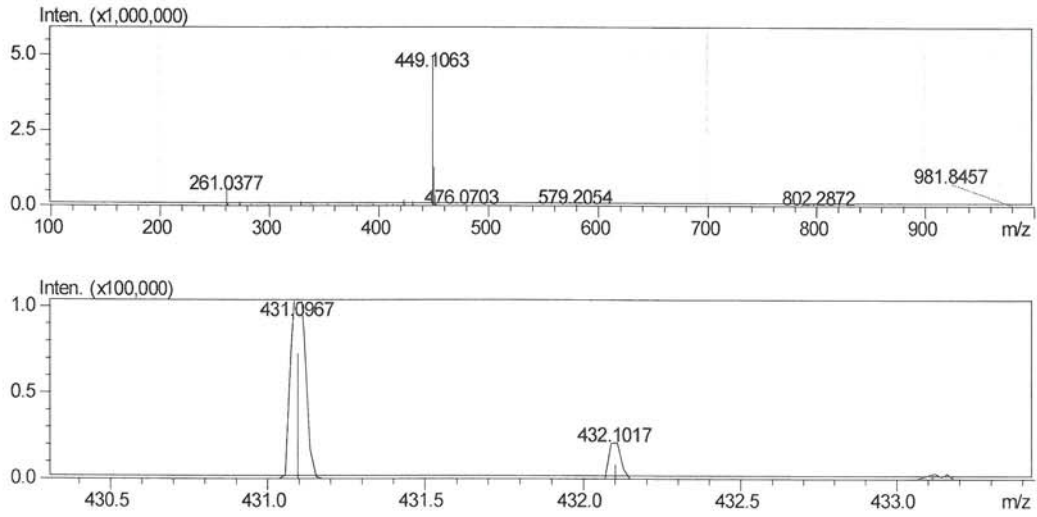
Şekil 4.63. Oliverozit C'nin Kütle Spektrumu

İzopirenin tR=10.8



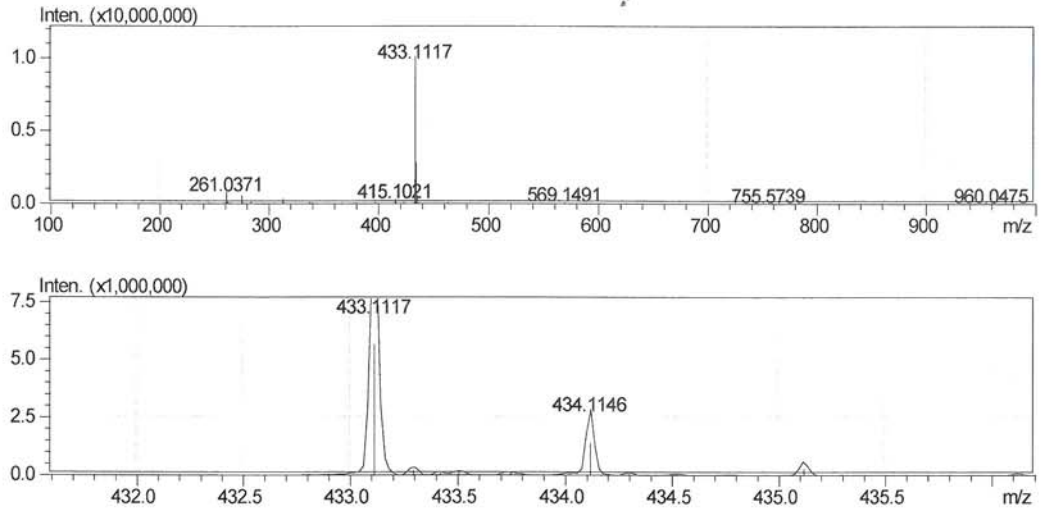
Şekil 4.64. İzopirenin'in Kütle Spektrumu

Östomoruzzit tR:7.53



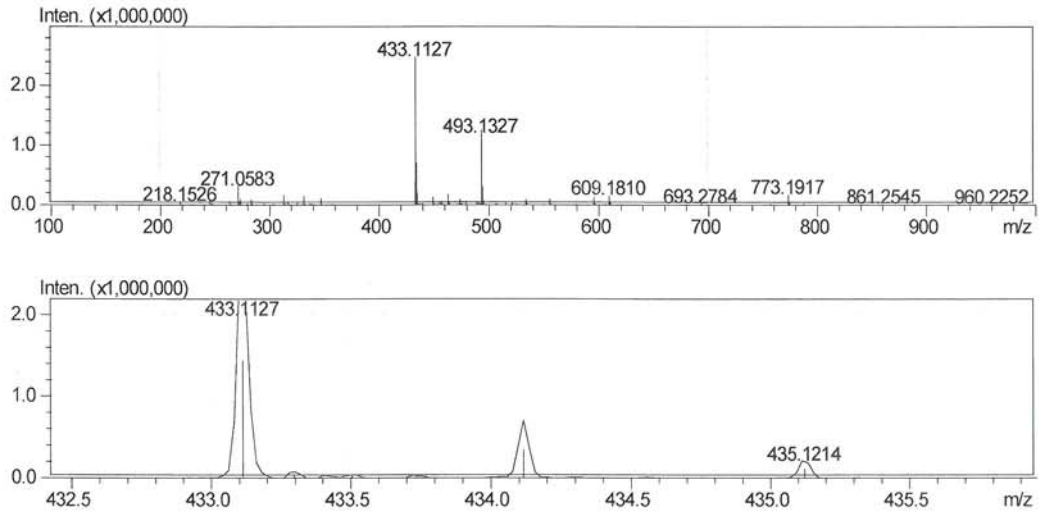
Şekil 4.65. Östomoruzzit'in Kütle Spektrumu

Viteksin tR= 8.90



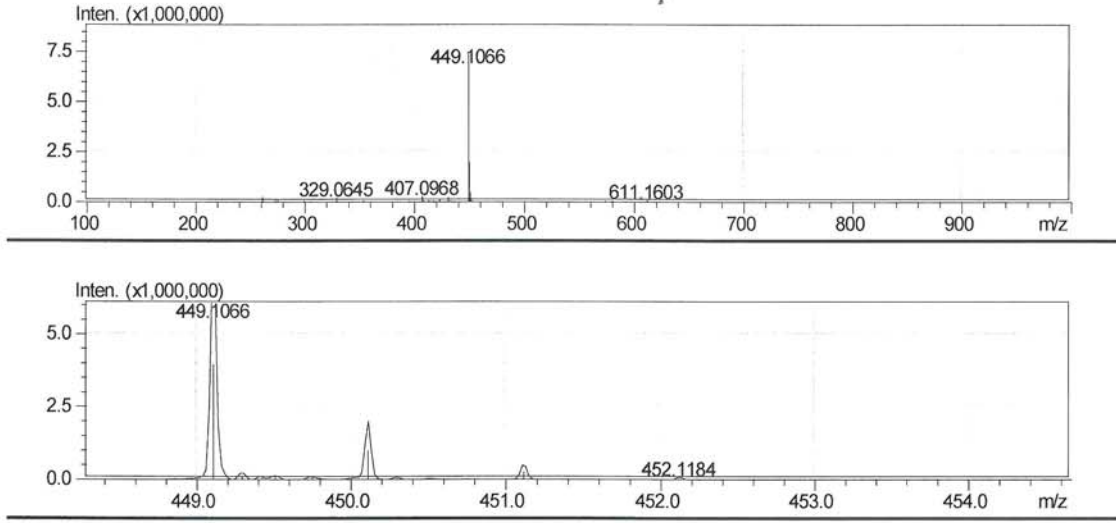
Şekil 4.66. Viteksin'in Kütle Spektrumu

İzoviteksin tR=10.73



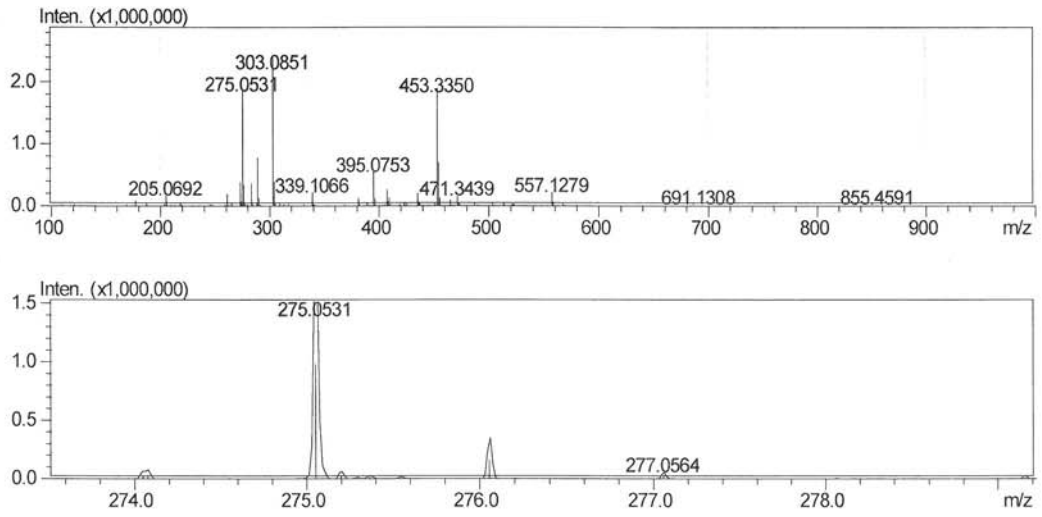
Şekil 4.67. İzoviteksin'in Kütle Spektrumu

Orientin tR=7.50



Şekil 4.68. Orientin'in Kütle Spektrumu

Bellidifolin tR= 13.90



Şekil 4.69. Bellidifolin'in Kütle Spektrumu

4.6. Biyolojik Aktivite Sonuçları

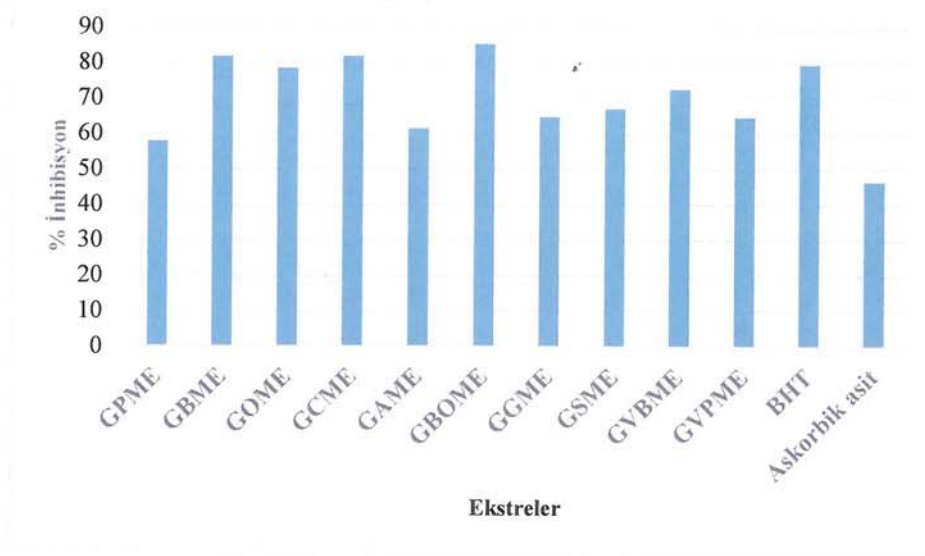
4.6.1. Antioksidan aktivite sonuçları

4.6.1.1. DNA hasarı koruyucu yöntem

Gentiana metanol ekstralarının DNA hasarı koruyucu antioksidan aktivite sonuçlarına göre; 0.5 mg/mL konsantrasyonda *G. boissieri* (GBOME) (inhibisyon % 85.23), *G. brachyphylla* (GBME) (% 81.82) ve *G. cruciata* metanol (GCME) (inhibisyon %81.80) ekstraları sentetik antioksidanlar BHT (% 79.55) ve askorbik asitten (% 46.59) daha yüksek aktivite göstermiştir (Çizelge 4.7). Diğer ekstraların de en az BHT ve askorbik asit kadar etkili olduğu görülmüş, en düşük antioksidan aktivite ise, *G. pyrenaica* metanol ekstresinde (GPME) (% 57.95 inhibisyon) tespit edilmiştir (Şekil 4.70).

Çizelge 4.7. *Gentiana* Türlerine Ait Metanol Ekstrelerinin DNA Hasarı Koruyucu Aktivite Sonuçları

Ekstreler	Antioksidan aktivite % inhibisyon (0.5 mg/mL)
GAME	61.36
GBOME	85.23
GBME	81.82
GCME	81.80
GGME	64.77
GOME	78.41
GPME	57.95
GSME	67.05
GVBME	72.73
GVPME	64.77
BHT	79.55
Askorbik asit	46.59



Şekil 4.70. *Gentiana* Türlerine ait Metanol Ekstrelerinin DNA Hasarı Korumucu Yöntem ile Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.6.1.2. Metal şelatlayıcı yöntem

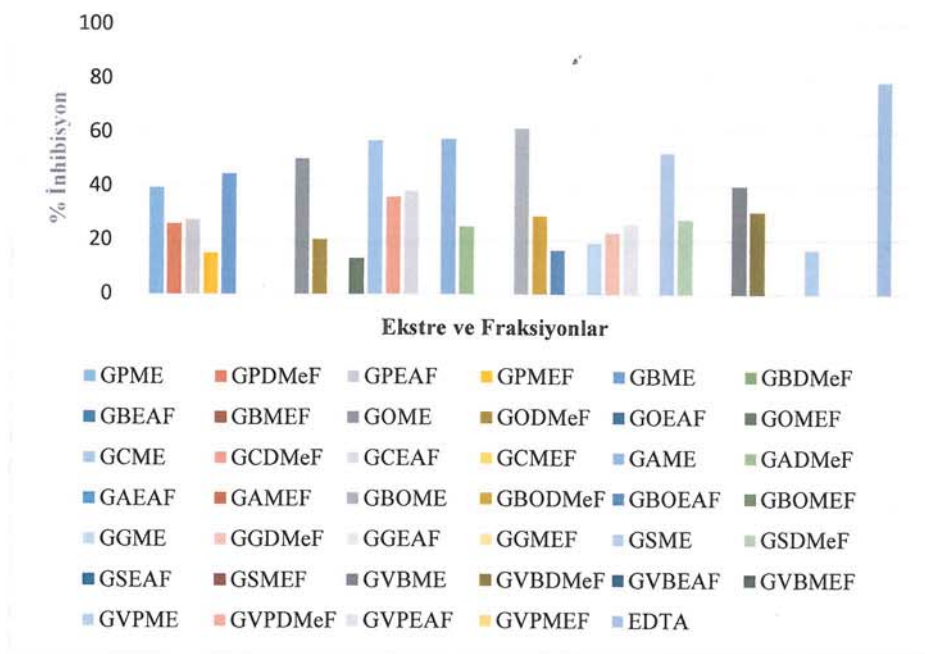
Metal iyonu şelatlama aktivitesi; *Gentiana* ekstre ve fraksiyonlarının çözeltideki Fe^{2+} iyonlarını bağlayabilmek için ferrozin ile yarışmasına göre değerlendirilmiş, pozitif kontrol olarak EDTA kullanılmıştır.

Sonuçlar 0.2 mg/mL konsantrasyonda EDTA ile karşılaştırıldığında (% 78.87); *G. cruciata* (GCME), *G. asclepiadea* (GAME) ve *G. boissieri* (GBOME) metanol ekstreleri sırasıyla % 56.95, 57.49 ve 61.48 inhibisyon oranları ile belirgin antioksidan aktivite göstermiştir. Genel olarak çalışılan *Gentiana* türlerinden elde edilen metanol ekstrelerinin, elde edilen fraksiyonlardan daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.71).

Çizelge 4.8. *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonlarının Metal Şelatlayıcı Aktivite Sonuçları*

Ekstre ve fraksiyonlar	Antioksidan aktivite % inhibisyon (0.2 mg/mL)
GAME	57.49
GADMeF	25.11
GAEAF	-
GAMEF	-
GBOME	61.48
GBODMeF	28.92
GBOEAF	16.05
GBOMEF	-
GBME	44.71
GBDMeF	14.87
GBEAF	-*
GBMEF	-
GCME	56.95
GCDMeF	36.00
GCEAF	38.17
GCMEF	-
GGME	18.92
GGDMeF	22.76
GGEAF	25.98
GGMEF	-
GOME	50.04
GODMeF	20.22
GOEAF	-
GOMEF	13.15
GPME	39.51
GPDMeF	26.02
GPEAF	27.70
GPMEF	15.19
GSME	52.38
GSDMeF	27.7
GSEAF	-
GSMEF	-
GVBME	40.09
GVBDMeF	30.5
GVBEAF	-
GVBMEF	-
GVPME	16.55
GVPDMeF	-
GVPEAF	-
GVPMEF	-
EDTA	78.87

*(-) aktivite görülmemiştir.



Şekil 4.71. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların Metal Şelatlayıcı Aktivite Sonuçları

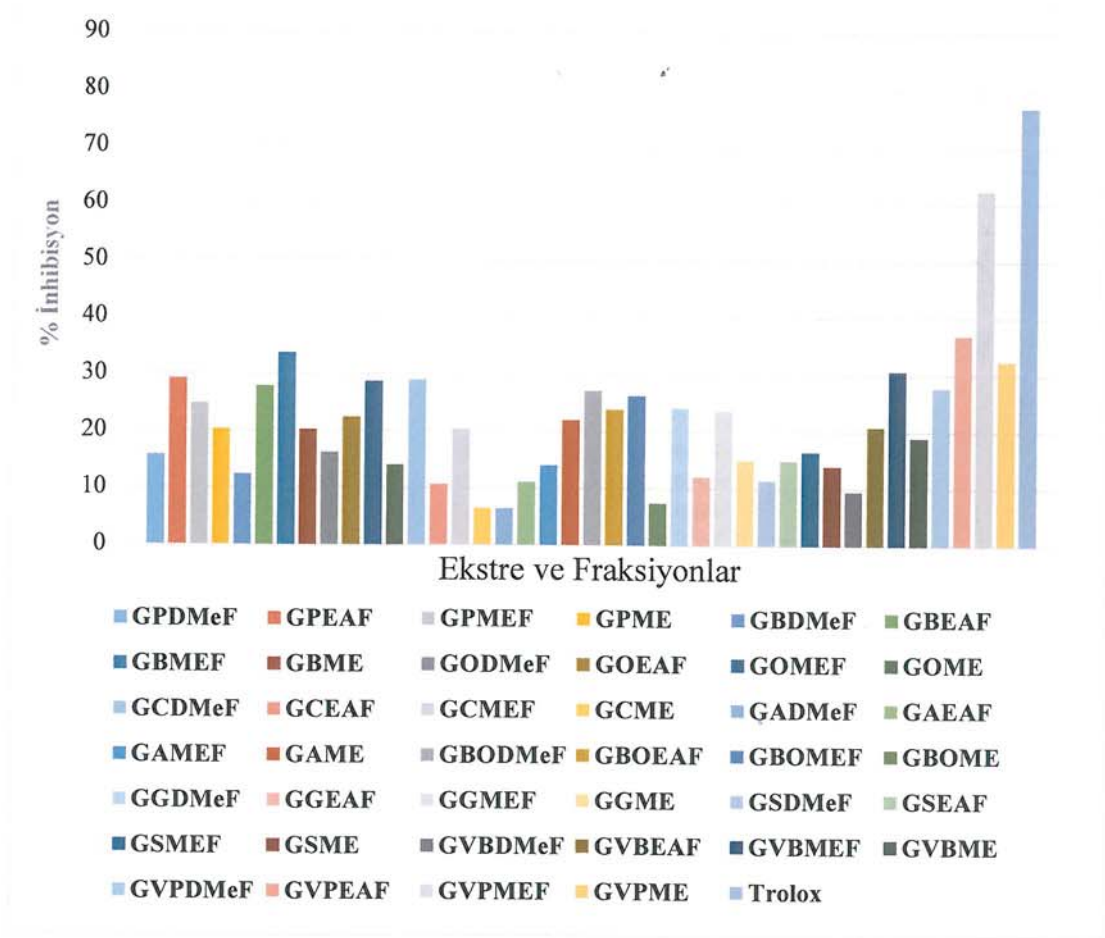
4.6.1.3. *ABTS^{•+}* radikal katyon renksizleştirme yöntemi ile antioksidan aktivite sonuçları

Bu yöntem 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (*ABTS^{•+}*) radikal katyonu tarafından tutulan antioksidatif maddelerin miktarının, sentetik bir antioksidan olan troloks'un (suda çözünen E vitamini analogu) standart miktarlarıyla kıyaslanarak bağlı ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, mavi/yeşil renkli stabil bir bileşik olan *ABTS^{•+}* radikalinin renginin indirgenmesinin spektrofotometrik olarak belirlenmesiyle yapılmıştır. Mavi/yeşil *ABTS^{•+}* kromoforu oluşturmak için *ABTS* ve potasyum persülfat arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılmıştır.

ABTS^{•+} radikal katyon renksizleştirme yöntemi antioksidan aktivite sonuçlarına göre 0.5 mg/mL konsantrasyonda troloks'un (% 76.89) sonuçları ile karşılaştırıldığında en yüksek inhibisyon gösteren *G. verna* subsp. *pontica* metanol fraksiyonu (*GVPMEF*) (% 62.40) olarak tespit edilmiştir. Diğer *Gentiana* türlerine ait ekstre ve fraksiyonlar troloks'a göre daha düşük antioksidan etki göstermişlerdir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.72).

Çizelge 4.9. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların ABTS⁺ Radikal Katyon Renksizleştirme Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ekstre ve fraksiyonlar	Antioksidan aktivite % inhibisyon (0.5 mg/mL)
GADMeF	6.31
GAEAF	11.00
GAMEF	13.93
GAME	21.90
GBODMeF	27.08
GBOEAF	23.84
GBOMEF	26.18
GBOME	7.33
GBDMeF	12.34
GBEAF	27.79
GBMEF	33.64
GBME	20.13
GCDMeF	28.91
GCEAF	10.57
GCMEF	20.33
GCME	6.35
GGDMeF	24.12
GGEAF	12.06
GGMEF	23.68
GGME	14.94
GODMeF	16.15
GOEAF	22.28
GOMEF	28.63
GOME	13.94
GPDMeF	15.66
GPEAF	29.06
GPMEF	24.76
GPME	20.27
GSDMeF	11.42
GSEAF	14.90
GSMEF	16.43
GSME	13.87
GVBDMeF	9.47
GVBEAF	20.75
GVBMEF	30.64
GVBME	18.92
GVPDMeF	27.72
GVPEAF	36.91
GVPMEF	62.40
GVPME	32.43
Troloks	76.89



Şekil 4.72. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların ABTS⁺ Radikal Katyon Renksizleştirme Yöntemi İle Antioksidan Aktivite Sonuçları

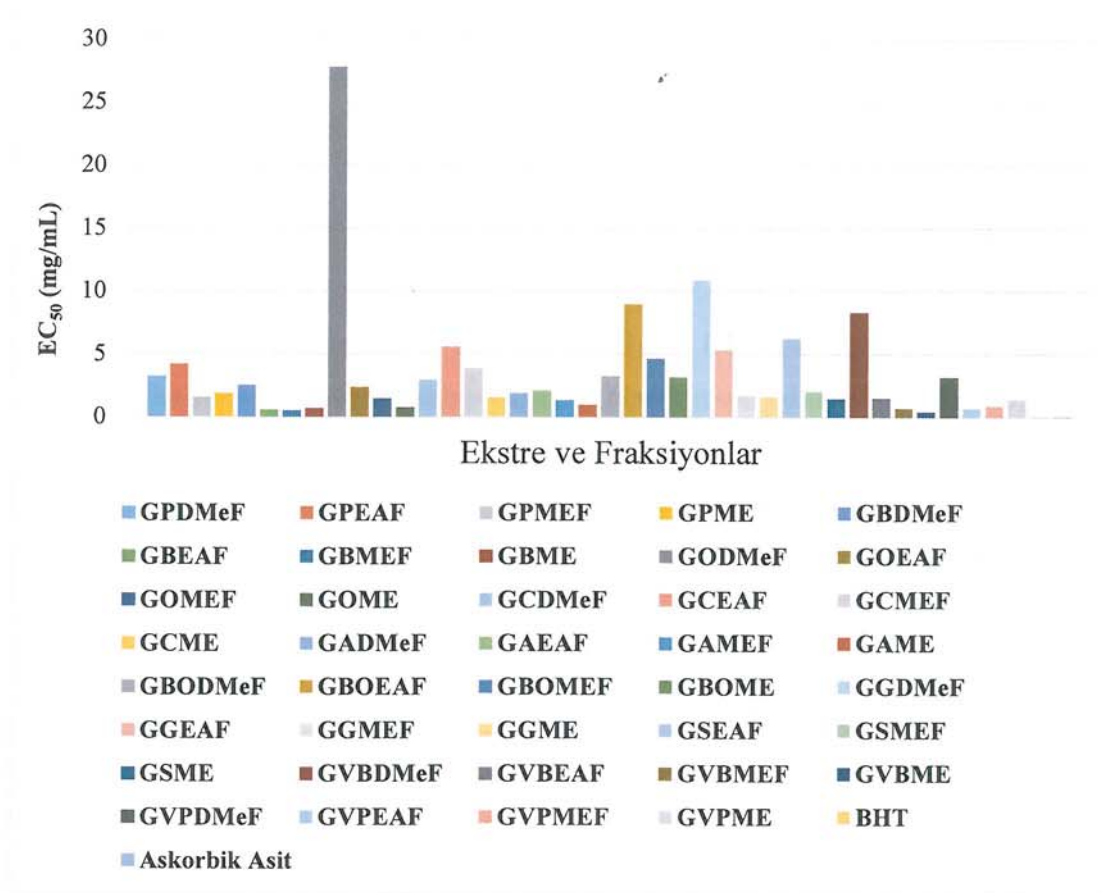
4.6.1.4. Redükleyici güç ölçümü antioksidan aktivite sonuçları

Ekstrelerin redükleyici güç ölçümü, potasyum ferrosiyandır redükleyici metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin hidrojen verme kabiliyetlerinden kaynaklandığı düşünülen indirgeme gücü genellikle redüktonların varlığı ile ilişkilendirilmektedir (Shon vd., 2003, s. 595).

Redükleyici güç ölçümü sonucu elde edilen EC₅₀ değerleri BHT (0.1) ve askorbik asit (0.076) ile karşılaştırılmış, en yüksek redükleyici güç aktivitesine sahip ekstrenin *G. verna* subsp. *balcanica* metanol ekstresi (GVBME) (0.42) olduğu, en düşük aktiviteye sahip ekstrenin ise EC₅₀ değeri 27.78 olan *G. olivieri* diklorometan fraksiyonu (GODMeF) olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.10)

Çizelge 4.10. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların Redükleyici Güç Ölçümü İle Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ekstre ve fraksiyonlar	EC₅₀ (mg/mL)
GADMeF	1.89
GAEAF	2.10
GAMEF	1.33
GAME	0.95
GBODMeF	3.25
GBOEAF	8.93
GBOMEF	4.63
GBOME	3.16
GBDMeF	2.53
GBEAF	0.55
GBMEF	0.51
GBME	0.65
GCDMeF	2.94
GCEAF	5.56
GCMEF	3.85
GCME	1.52
GGDMeF	10.87
GGEAF	5.32
GGMEF	1.70
GGME	1.61
GODMeF	27.78
GOEAF	2.34
GOMEF	1.46
GOME	0.74
GPDMeF	3.21
GPEAF	4.17
GPMEF	1.55
GPME	1.84
GSDMeF	-
GSEAF	6.25
GSMEF	2.05
GSME	1.46
GVBDMeF	8.3
GVBEAF	1.51
GVBMEF	0.7
GVBME	0.42
GVPDMeF	3.16
GVPEAF	0.67
GVPMEF	0.87
GVPME	1.40
BHT	0.1
Askorbik Asit	0.076



Şekil 4.73. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların Redükleyici Güç Ölçümü İle Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.6.1.5. DPPH radikal süpürücü antioksidan aktivite sonuçları

Genel olarak, kimyasal maddelerin elektron verme yetenekleri lipit oksidasyona karşı gösterdikleri antioksidan aktivitelerinin sonucudur. DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini; hidrojen verme potansiyelinin araştırılması için en kısa, en ucuz yöntemlerden birisidir (Kikuzaki vd., 2002, s. 2161). Doğadaki birçok radikal iyonu değişik kimyasal reaksiyonlarla bazı bileşikler tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Kararlı bir organik radikal olan DPPH farklı ekstreler ve bileşiklerin antioksidan aktivitesini belirlemede de kullanılmaktadır (Brand-Williams vd., 1995, s. 25).

Metanol ile hazırlanmış 0.1, 0.2 ve 0.4 mL örnek çözeltileri (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonları 9.6×10^{-4} , 1.8×10^{-3} , 3.6×10^{-3} mg/mL) üzerine metanolde

hazırlanmış 3 ml DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek 30 dk karanlıkta beklenmiş, daha sonra spektrofotometrede 517 nm'de absorbanları ölçülmüştür. İşlem sonunda her üç konsantrasyondaki (9.6×10^{-4} , 1.8×10^{-3} ve 3.6×10^{-3} mg/mL) örneklerde % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

DPPH serbest radikal süpürücü etki sonuçlarına göre, *G. brachyphylla* etil asetat ve metanol fraksiyonları; 3.6×10^{-3} mg/mL konsantrasyonda, sırasıyla 37.64 ± 0.71 ve 31.90 ± 0.34 inhibisyon yüzdeleriyle BHT'ye (% 44.14 ± 1.84) yakın antioksidan aktivite göstererek en yüksek aktiviteye sahip ekstreler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *G. verna* subsp. *balcanica* etil asetat fraksiyonu; % 30.75 ± 0.86 inhibisyonla orta düzeyde antioksidan aktivite gösterirken diğer ekstre ve fraksiyonlar 7.30 ± 1.96 - 28.28 ± 0.51 inhibisyon aralığında daha az antioksidan etki göstermiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.74).

Çizelge 4.11. *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Aktivite Sonuçları*

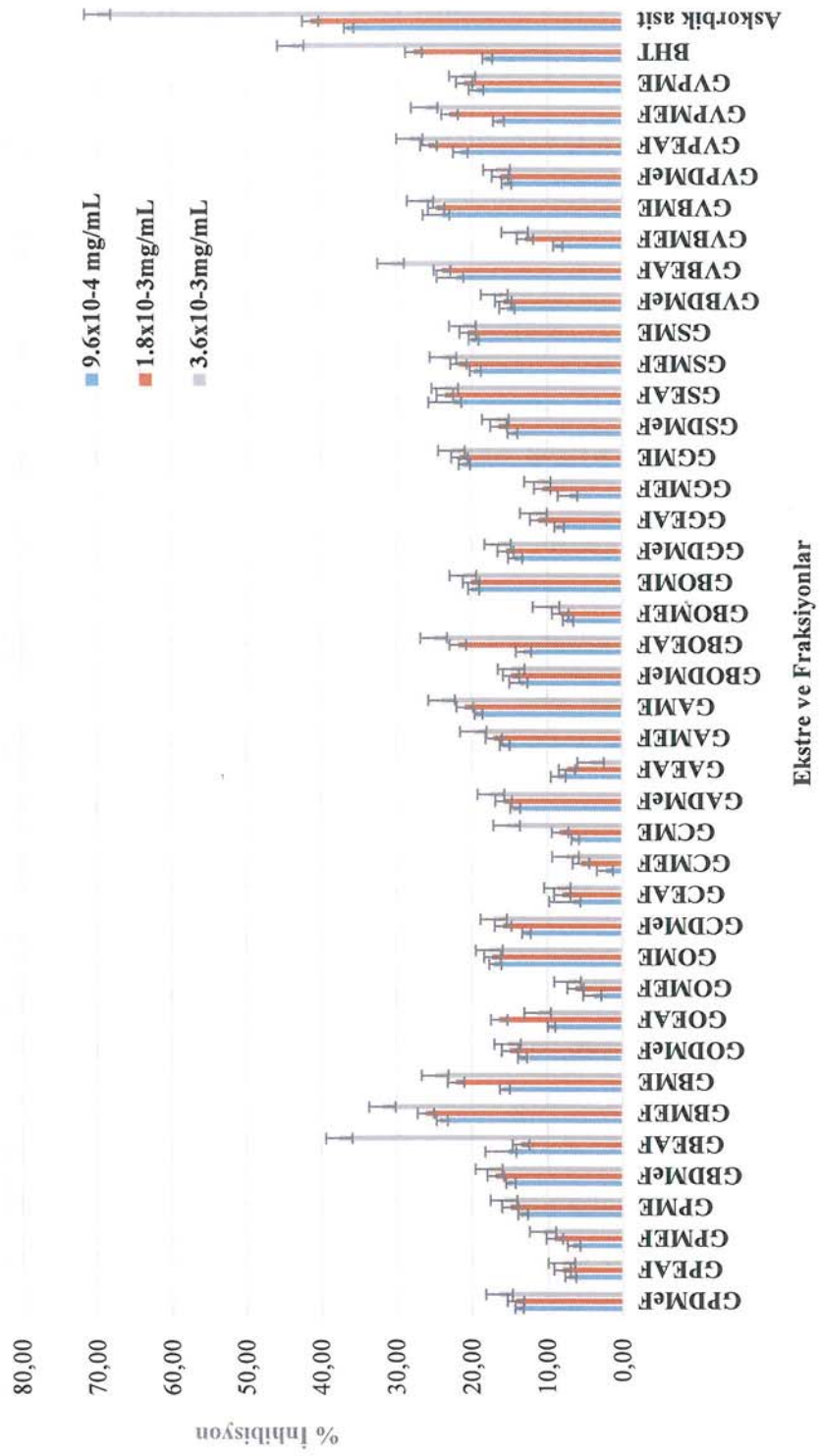
Ekstre	Konsantrasyon/% İnhibisyon		
	9.6×10^{-4} mg/mL	1.8×10^{-3} mg/mL	3.6×10^{-3} mg/mL
GADMeF	14.54 ± 0.33	15.73 ± 0.62	17.44 ± 0.52
GAEAF	8.55 ± 0.92	7.34 ± 1.20	4.20 ± 3.93
GAMEF	15.94 ± 0.32	17.07 ± 1.43	19.77 ± 0.35
GAME	19.51 ± 0.08	20.89 ± 0.42	23.97 ± 0.29
GBODMeF	13.59 ± 1.42	14.75 ± 1.21	14.75 ± 1.02
GBOEAF	13.10 ± 0.99	21.80 ± 1.08	25.00 ± 0.62
GBOMEF	7.45 ± 0.41	8.22 ± 0.71	10.10 ± 0.18
GBOME	19.99 ± 0.42	20.03 ± 0.33	21.15 ± 0.19
GBDMeF	15.22 ± 0.26	16.91 ± 0.69	17.76 ± 0.95

[Çizelge 4.11. (Devam) *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Aktivite Sonuçları*]

Ekstre	Konsantrasyon/% İnhibisyon		
	9.6×10^{-4} mg/mL	1.8×10^{-3} mg/mL	3.6×10^{-3} mg/mL
GBMEF	24.22 ± 0.46	26.10 ± 0.46	31.90 ± 0.34
GBME	15.99 ± 0.31	22.12 ± 5.81	24.89 ± 1.62
GCDMeF	13.16 ± 0.15	15.84 ± 0.51	17.08 ± 1.21
GCEAF	6.55 ± 3.19	7.97 ± 0.57	8.64 ± 0.89
GCMEF	2.23 ± 1.13	5.47 ± 0.35	7.56 ± 0.08
GCME	6.74 ± 0.00	8.27 ± 0.39	15.35 ± 0.70
GGDMeF	14.25 ± 0.89	15.48 ± 2.32	16.53 ± 0.94
GGEAF	8.75 ± 0.23	11.15 ± 1.04	11.80 ± 0.81
GGMEF	6.94 ± 1.61	10.63 ± 1.50	11.27 ± 0.49
GGME	21.22 ± 0.47	21.61 ± 0.27	22.65 ± 0.39
GODMeF	13.72 ± 0.17	14.94 ± 0.31	15.27 ± 0.19
GOEAF	9.94 ± 0.00	16.37 ± 0.46	11.29 ± 0.36
GOMEF	3.83 ± 1.40	6.23 ± 0.95	7.30 ± 1.96
GOME	17.07 ± 0.62	17.28 ± 0.51	17.70 ± 0.00
GPDMeF	14.23 ± 0.08	14.25 ± 0.31	16.43 ± 0.52

[Çizelge 4.11. (Devam) *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Aktivite Sonuçları*]

Ekstre	Konsantrasyon/% İnhibisyon		
	9.6×10^{-4} mg/mL	1.8×10^{-3} mg/mL	3.6×10^{-3} mg/mL
GPMEF	6.68 ± 0.71	9.09 ± 0.27	10.63 ± 0.52
GPME	13.62 ± 0.29	14.96 ± 0.23	15.79 ± 0.00
GSDMeF	14.89 ± 0.35	16.41 ± 2.07	16.85 ± 0.60
GSEAF	22.36 ± 3.38	23.55 ± 1.98	23.55 ± 1.32
GSMEF	19.77 ± 0.47	21.74 ± 1.77	23.79 ± 0.51
GSME	20.06 ± 0.31	20.50 ± 0.42	21.21 ± 1.84
GVBDMeF	15.32 ± 1.01	15.80 ± 1.15	17.01 ± 1.39
GVBEAF	22.10 ± 2.52	23.92 ± 0.55	30.75 ± 0.86
GVBMEF	8.95 ± 0.23	12.92 ± 0.69	14.31 ± 1.79
GVBME	23.96 ± 2.51	24.72 ± 0.57	26.84 ± 0.55
GVPDMeF	15.79 ± 0.23	16.26 ± 0.63	16.72 ± 1.39
GVPEAF	21.53 ± 0.93	25.73 ± 0.60	28.28 ± 0.51
GVPMEF	16.77 ± 0.41	22.97 ± 1.30	26.32 ± 0.09
GVPME	19.49 ± 0.93	21.03 ± 0.34	21.29 ± 0.24
BHT	18.32 ± 0.31	27.75 ± 0.42	44.14 ± 1.84
Askorbik asit	36.70 ± 0.26	41.47 ± 0.69	70.00 ± 0.95



Şekil 4.74. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Ekstre ve Fraksiyonların DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.6.2. Enzimatik aktivite deneyleri

4.6.2.1. MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite sonuçları

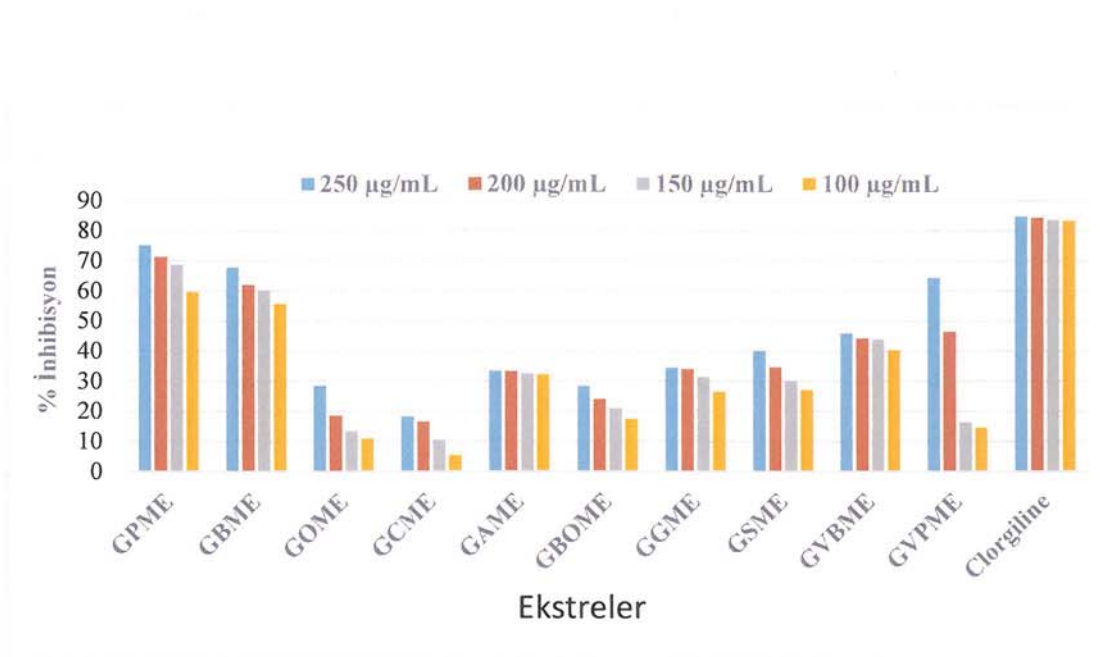
Gentiana türlerinden elde edilen metanol ekstralarının MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite sonuçlarına göre; sentetik MAO-A inhibitörü klorjilin'le (% 84.75 inhibisyon) karşılaştırıldığında 250 µg/mL konsantrasyonda *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* ve *G. verna* subsp. *pontica* metanol ekstralarının sırasıyla % 75.18, 67.86 ve 64.35 inhibisyonla yüksek MAO-A inhibitör aktivite gösterdikleri bulunurken MAO-B inhibitörü selejilin'le (% 93.05 inhibisyon) karşılaştırıldığında *G. pyrenaica* metanol ekstresinin % 75.90 düzeyinde inhibisyon yüksek MAO-B inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.12, Şekil 4.75 ve 4.14, Şekil 4.76).

MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivitesi oldukça yüksek bulunan (sırasıyla % 75.18, 75.90) *G. pyrenaica* türüne ait toprak üstü kısımlardan hazırlanan metanol fraksiyonunun (GPMEF) ve MAO-A inhibitör etkisi yüksek bulunan *G. brachyphylla* (% 67.86) ve *G. verna* subsp. *pontica* (% 64.35) toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol fraksiyonlarının (GBMEF ve GVPMEF) MAO-A ve MAO-B inhibitör aktiviteleri incelenmiştir.

Sonuçlara göre 250 µg/mL konsantrasyonda *G. pyrenaica* türüne ait metanol fraksiyonu (GPMEF) referans maddelerle karşılaştırıldığında MAO-A enzimini % 78.25 ve MAO-B enzimini % 77.10 oranında inhibe ederek çok yüksek aktivite göstermiştir. Aynı konsantrasyonda *G. brachyphylla* türüne ait metanol fraksiyonu (GBMEF) MAO-A enzimini % 64.50 ve MAO-B enzimini % 54.90; *G. verna* subsp. *pontica* türüne ait metanol fraksiyonu (GVPMEF) MAO-B enzimini % 46.33 oranında inhibe ederek metanol ekstralarına göre daha düşük aktivite göstermişlerdir. *G. verna* subsp. *pontica* türüne ait metanol fraksiyonu (GVPMEF) MAO-B enzimini % 23.54 oranında inhibe etmiş ve metanol ekstresine göre çok düşük aktivite göstermiştir (Çizelge 4.13 ve 4.15).

Çizelge 4.12. *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-A İnhibitör Aktivite Sonuçları*

Ekstreler	MAO-A % İnhibisyon			
	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
GAME	32.18	32.50	33.24	33.43
GBOME	17.46	21.05	23.97	28.29
GBME	55.75	60.27	62.04	67.86
GCME	5.32	10.53	16.57	18.26
GGME	26.57	31.52	34.05	34.52
GOME	11.02	13.36	18.47	28.53
GPME	59.69	68.65	71.19	75.18
GSME	27.20	30.07	34.66	40.09
GVBME	40.25	43.97	44.20	45.89
GVPME	14.57	16.41	46.47	64.35
Klorjilin	83.32	83.60	84.23	84.75



Şekil 4.75. *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-A İnhibitör Aktivite Sonuçları*

Çizelge 4.13. *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* ve *G. verna subsp. pontica* Türlerinden Elde Edilen Metanol Fraksiyonlarının MAO-A İnhibitör Aktivite Sonuçları

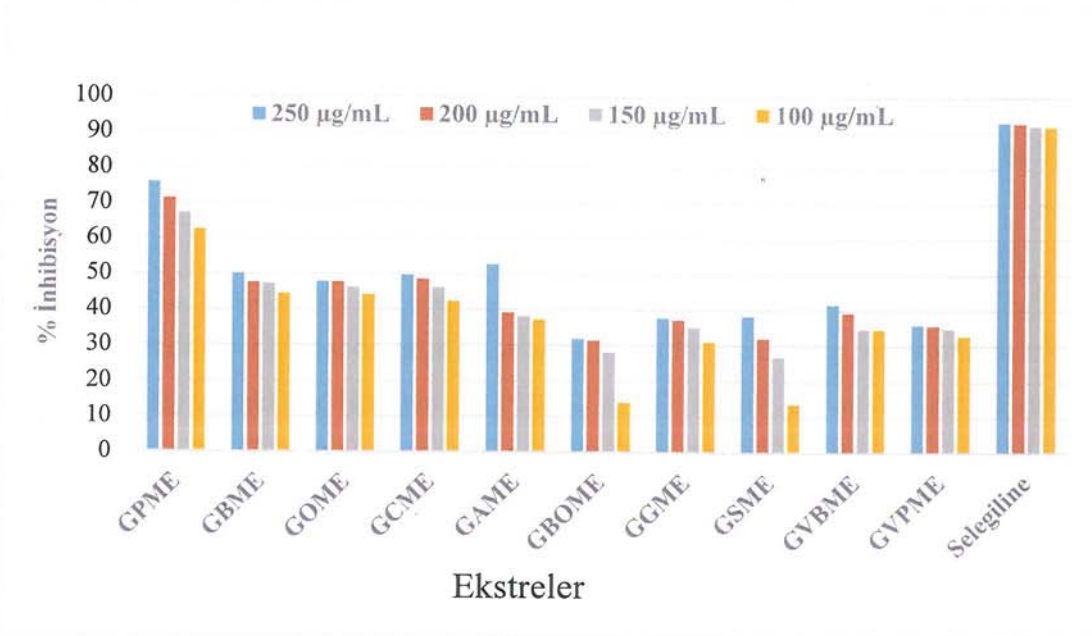
Fraksiyonlar	MAO A % İnhibisyon			
	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
GBMEF	48.12	52.07	58.41	64.50
GPMEF	61.87	67.42	73.33	78.25
GVPMEF	10.75	16.37	20.19	23.54
Klorjilin	83.32	84.23	83.60	84.75

Çizelge 4.14. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-B İnhibitör Aktivite Sonuçları

Ekstreler	MAO-B % İnhibisyon			
	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
GAME	37.23	38.12	39.11	52.76
GBOME	14.05	27.96	31.36	31.77
GBME	44.42	47.18	47.57	50.06
GCME	42.38	46.20	48.51	49.71
GGME	31.01	35.16	37.14	37.79
GOME	44.16	46.21	47.69	47.85
GPME	62.50	67.12	71.17	75.90
GSME	13.69	26.75	31.99	38.25
GVBME	34.58	34.71	39.22	41.63
GVPME	32.72	34.86	35.68	35.97
Selejilin	91.80	91.95	92.77	93.05

Çizelge 4.15. *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* ve *G. verna subsp. pontica* Türlerinden Elde Edilen Metanol Fraksiyonlarının MAO-B İnhibitör Aktivite Sonuçları

Fraksiyonlar	MAO B % İnhibisyon			
	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
GBMEF	40.26	46.48	52.30	54.90
GPMEF	60.48	68.85	75.95	77.10
GVPMEF	36.62	38.18	40.04	46.33
Selejilin	91.80	91.95	92.77	93.05



Şekil 4.76. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin MAO-B İnhibitör Aktivite Sonuçları

4.6.2.2. AChE ve BChE inhibitör aktivite sonuçları

Alzheimer hastalığı, kolinerjik sistemdeki eksiklikler ve β -amiloit ($A\beta$)'in nörofibriler ağlar ve amiloit plaklar formunda birikimi ile karakterize, nörodejeneratif bir rahatsızlıktır. Kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek proseslerinin düzenlenmesi üzerindeki rolü nedeniyle antikolinerjik yaklaşım, anti-Alzheimer ilaçlarının geliştirilmesinde önem taşımaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolini hidroliz eden AChE enzimini inhibe ederek kolinerjik iletimi artırmaktadırlar. Hem AChE, hem de bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi yaşlılık plağı oluşumunun ilk evreleri boyunca meydana gelen $A\beta$ agregasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle AChE ve BChE inhibisyonu, beyinde $A\beta$ birikimini azaltmak ve asetilkolin kullanımını artırmak suretiyle Alzheimer hastalığının etkili tedavisinde kritik hedefler teşkil etmektedirler. Aktivite deneylerinde kullanılan takrin, donepezil ve galantamin Alzheimer tedavisinde klinikte şu anda kullanılan kolinesteraz inhibitörü ilaçlardandır (Anand ve Singh, 2013, s. 375).

İlk defa Ellman vd. tarafından 1961'de uygulanan yöntem, asetilkolin AChE tarafından hidroliz olduğunda ortama salınan tiyokolin miktarının kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (Ellman vd., 1961, s. 88). Belirli bir süre sonunda ortama salınan tiyokolin ile 5,5'-bisditiyonitrobenzoik asit (DTNB) reaksiyona girerek 490 nm'de maksimum absorbans veren turuncu renkli bir ürüne dönüşmektedir. Metot, konsantrasyonu bilinen belirli hacimde substrat ile sabit dozda AChE'in absorbansı inhibitör etkili bileşik ya da ekstre eklenmiş durumdaki absorbans ile karşılaştırılarak uygulanmaktadır (Houghton vd., 2006, s. 181).

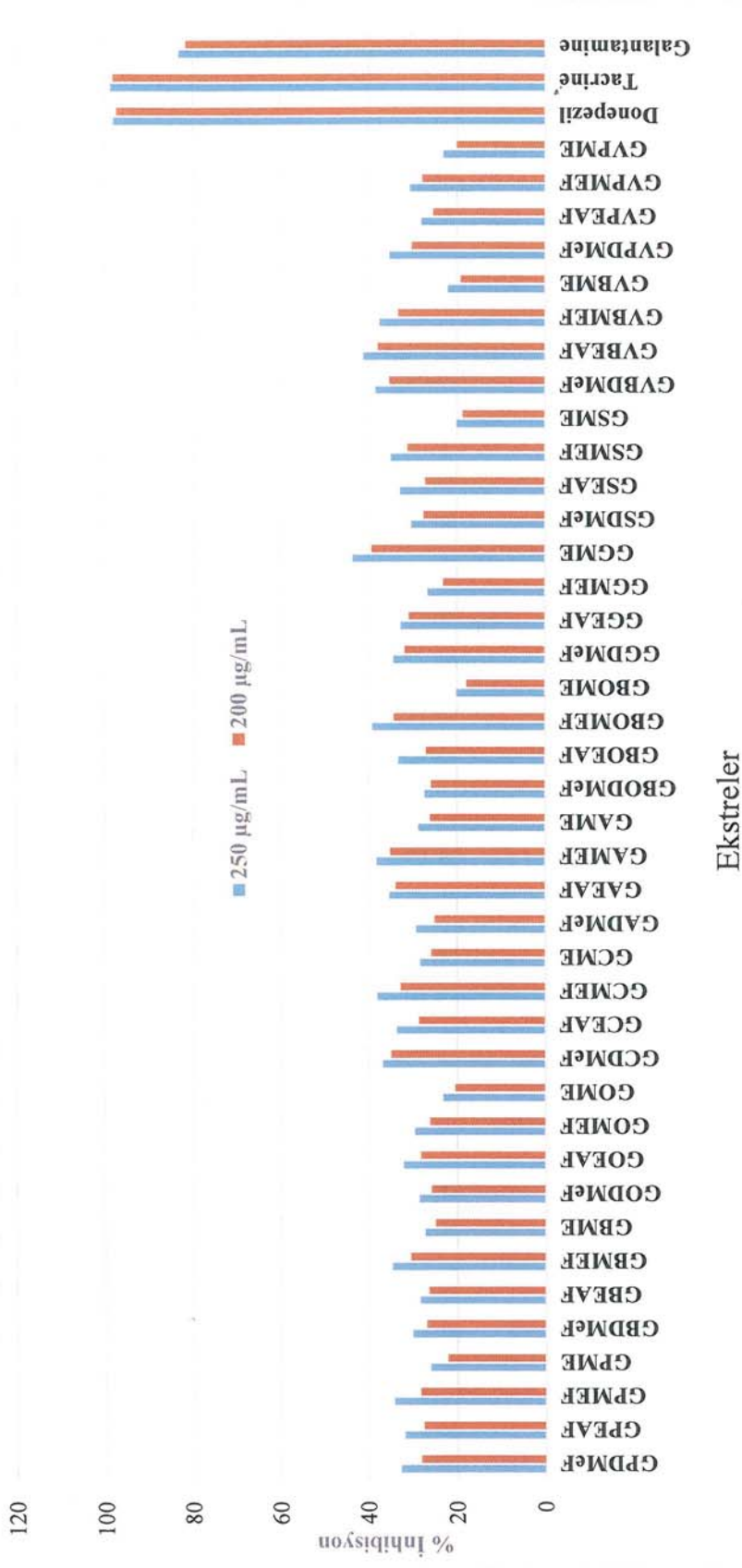
AChE ve BChE enzim inhibitör aktivite sonuçlarına göre; referans maddeler donepezil, takrin ve galantaminle karşılaştırıldığında 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda sadece % 74.82 inhibisyon gösteren *G. olivieri* metanol ekstresinin (GOME) yüksek BChE inhibitör aktivite gösterdiği, diğer türlere ait metanol ekstralarının ise daha düşük AChE ve BChE inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.16, Şekil 4.77 ve Çizelge 4.17, Şekil 4.78).

Çizelge 4.16. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları

Ekstre ve fraksiyonlar	AChE (% İnhibisyon)	
	200 µg/mL	250 µg/mL
GADMeF	25.03	29.18
GAEAF	33.87	35.30
GAMEF	35.07	38.16
GAME	26.00	28.75
GBODMeF	25.81	27.32
GBOEAF	26.97	33.20
GBOMEF	34.26	39.14
GBOME	17.88	20.14
GBDMeF	26.89	30.05
GBEAF	26.41	28.39
GBMEF	30.48	34.69
GBME	24.88	27.21
GCDMeF	34.88	36.79
GCEAF	28.62	33.58
GCMEF	32.75	37.99
GCME	25.75	28.32
GGDMeF	31.77	34.28
GGEAF	30.81	32.62
GGMEF	23.08	26.60
GGME	39.30	43.52
GODMeF	25.74	28.51
GOEAF	28.19	32.01
GOMEF	26.10	29.55
GOME	20.41	23.22

[Çizelge 4.16. (Devam) *Gentiana* türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları]*

Ekstre ve fraksiyonlar	AChE (% İnhibisyon)	
	200 µg/mL	250 µg/mL
GPDMeF	28.19	32.75
GPEAF	27.58	31.83
GPMEF	28.35	34.18
GPME	22.18	26.04
GSDMeF	27.52	30.29
GSEAF	27.20	32.81
GSMEF	31.21	34.88
GSME	18.71	20.02
GVBDMeF	35.25	38.40
GVBEAF	37.90	41.15
GVBMEF	33.26	37.55
GVBME	19.15	22.05
GVPDMeF	30.14	35.23
GVPEAF	25.27	28.09
GVPMEF	27.81	30.62
GVPME	20.07	23.08
Donepezil	97.56	98.19
Takrin	98.33	98.85
Galantamin	81.55	83.21



Şekil 4.77. *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının AChE İnhibitör Aktivite Sonuçları*

Çizelge 4.17. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının BChE İnhibitör Aktivite Sonuçları

Ekstre ve fraksiyonlar	BChE (% İnhibisyon)	
	200 µg/mL	250 µg/mL
GADMeF	27.14	30.94
GAEAF	24.96	28.17
GAMEF	25.58	26.63
GAME	26.40	29.32
GBODMeF	27.98	31.74
GBOEAF	30.49	33.46
GBOMEF	34.00	35.37
GBOME	18.64	20.87
GBDMeF	21.48	24.63
GBEAF	31.09	32.72
GBMEF	27.10	30.97
GBME	18.63	20.23
GCDMeF	34.95	36.29
GCEAF	28.12	31.51
GCMEF	25.99	28.82
GCME	21.69	25.07
GGDMeF	34.67	36.31
GGEAF	30.35	33.60
GGMEF	28.49	29.57
GGME	21.99	23.10
GODMeF	25.98	26.33
GOEAF	30.09	33.87
GOMEF	26.58	31.77
GOME	70.19	74.82
GPDMeF	20.46	23.15
GPEAF	26.66	28.70
GPMEF	26.80	29.63
GPME	11.85	14.02

[Çizelge 4.17. (Devam) *Gentiana Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstre ve Fraksiyonlarının BChE İnhibitör Aktivite Sonuçları*]

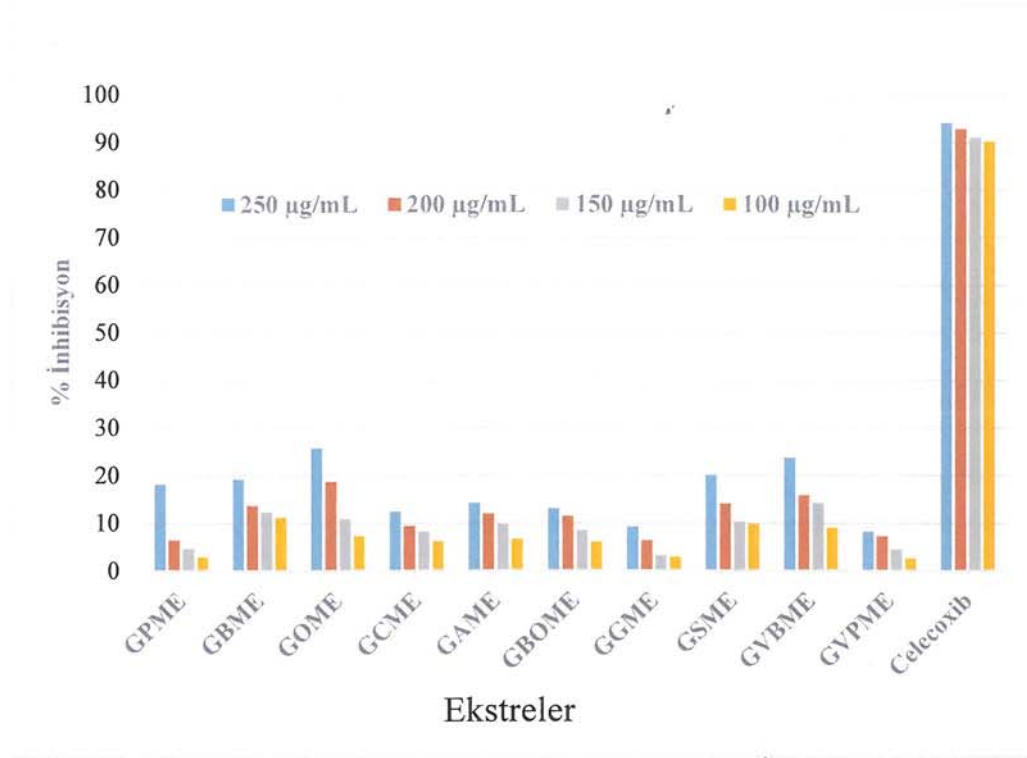
Ekstre ve fraksiyonlar	BChE (% İnhibisyon)	
	200 µg/mL	250 µg/mL
GSDMeF	27.29	30.44
GSEAF	28.94	32.04
GSMEF	30.60	34.53
GSME	28.54	31.12
GVBDMeF	26.90	28.03
GVBEAF	24.92	27.78
GVBMEF	28.27	29.30
GVBME	26.74	28.22
GVPDMeF	28.05	31.15
GVPEAF	30.61	33.54
GVPMEF	31.47	34.26
GVPME	27.15	30.40
Donepezil	75.11	79.28
Takrin	97.89	98.50
Galantamin	60.68	62.47

4.6.2.3. COX-1 ve COX-2 inhibitör aktivite (Antiinflamatuar etki) sonuçları

Antiinflamatuar etki COX-1 ve COX-2 % inhibisyon değerleri, selekoksib'in % inhibisyon (% 97.23) değerleri ile karşılaştırıldığında 250 µg/ml konsantrasyonda *G. olivieri* metanol ekstresi (GOME) % 50.48 inhibisyonla orta düzeyde COX-2 inhibitör etki gösterirken, diğer *Gentiana* türlerinden elde edilen metanol ekstraları antiinflamatuar etki göstermemiştir (Çizelge 4.18, Şekil 4.79 ve Çizelge 4.19, Şekil 4.80).

Çizelge 4.18. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-1 İnhibitör Aktivite Sonuçları

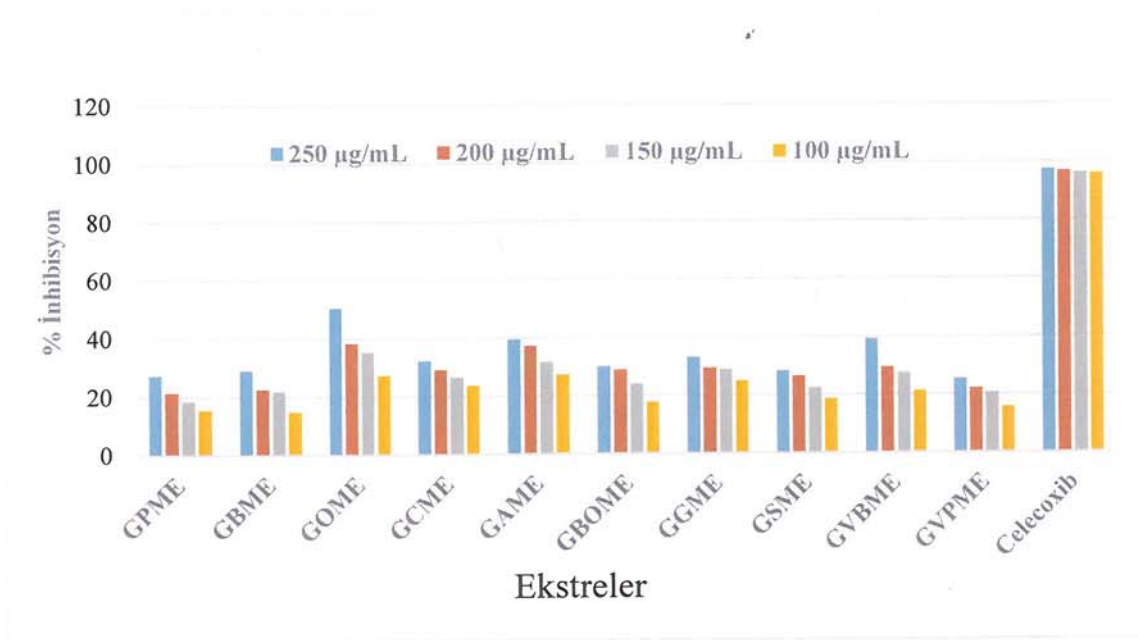
Ekstreler	COX-1 (% İnhibisyon)			
	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
GAME	6.61	9.74	12.01	14.25
GBOME	6.03	8.52	11.40	13.02
GBME	11.15	12.33	13.69	19.14
GCME	6.15	8.20	9.36	12.44
GGME	2.89	3.21	6.31	9.23
GOME	7.33	10.87	18.62	25.67
GPME	2.90	4.69	6.35	18.16
GSME	9.77	10.22	14.04	20.09
GVBME	9.04	14.16	15.81	23.66
GVPME	2.61	4.50	7.23	8.21
Selekoksib	90.17	91.07	92.81	94.05



Şekil 4.79. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-1 İnhibitor Aktivite Sonuçları

Çizelge 4.19. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-2 İnhibitor Aktivite Sonuçları

Ekstreler	COX-2 (% İnhibisyon)			
	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL	250 µg/mL
GAME	27.30	31.48	37.15	39.36
GBOME	17.71	23.86	28.78	30.01
GBME	14.77	21.85	22.53	29.11
GCME	23.57	26.40	29.02	32.22
GGME	24.84	28.78	29.27	32.96
GOME	27.25	35.35	38.23	50.48
GPME	15.44	18.48	21.52	27.42
GSME	18.57	22.38	26.32	28.29
GVBME	21.17	27.45	29.37	39.11
GVPME	15.54	20.49	22.03	25.28
Selekoksib	95.74	96.02	96.58	97.23

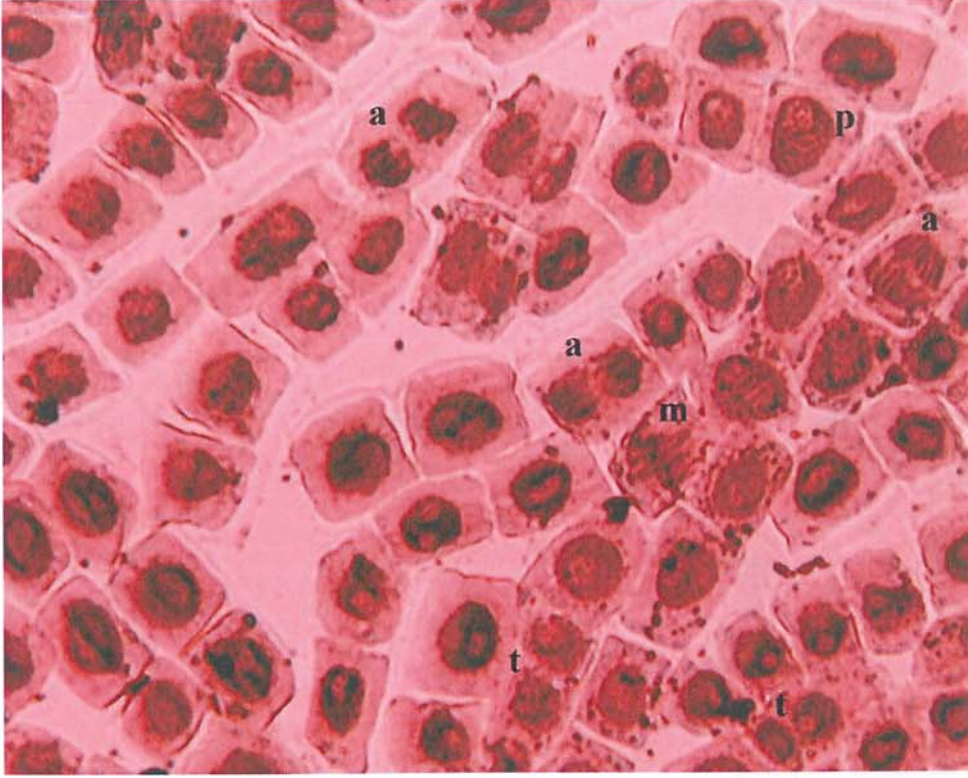


Şekil 4.80. *Gentiana* Türlerinden Elde Edilen Metanol Ekstrelerinin COX-2 İnhibitör Aktivite Sonuçları

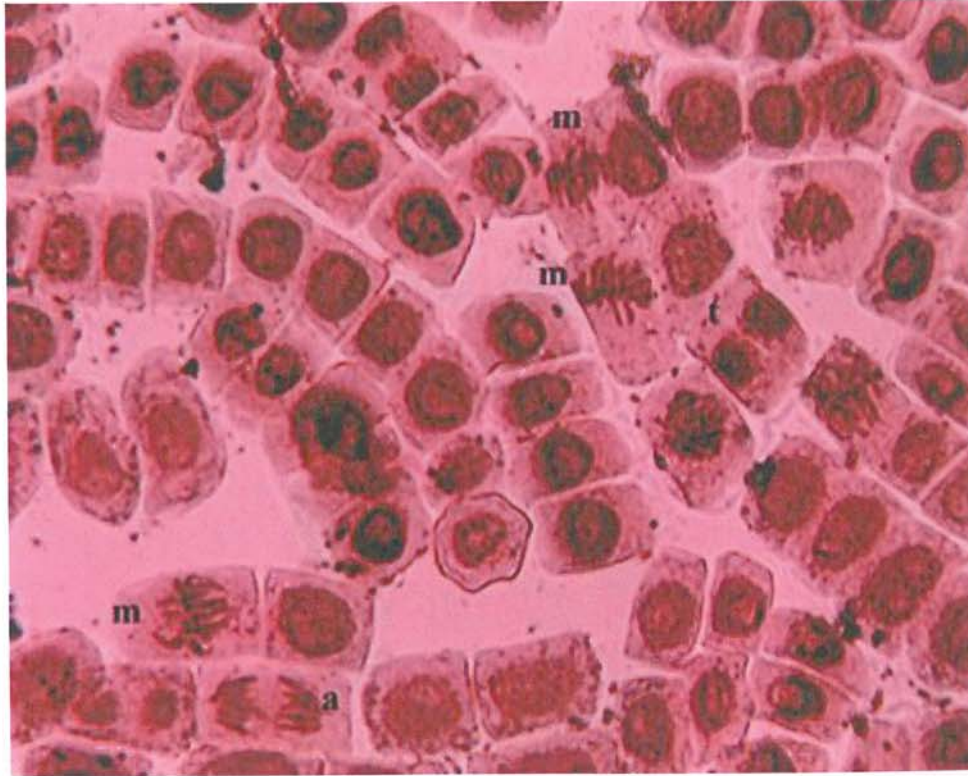
4.6.3. Genotoksik aktivite sonuçları

4.6.3.1. Mikroskop analizi

Gentiana türlerine ait metanol ekstrelerinin uygulandığı *A. cepa* kök uçlarının orseinle boyanıp hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunun 4,10,20,40, 100'lük objektifleri ile incelenmiş ve mitotik indeks değerleri hesaplanmıştır. Kontrol grubuna ve test edilen konsantrasyon aralığında en düşük mitotik indeks değerine sahip ekstreler olan GCME, GSME, GOME ve GPME'nin uygulandığı *A. cepa* kök uçlarından hazırlanan ezme preparatlara ait fotoğraflar; kontrol grubu (Görsel 4.1), 0.05 mg/mL (Görsel 4.2-4.5), 0.1 mg/mL (Görsel 4.6-4.9) ve 0.5 mg/mL (Görsel 4.10-4.13) aşağıda verilmiştir.

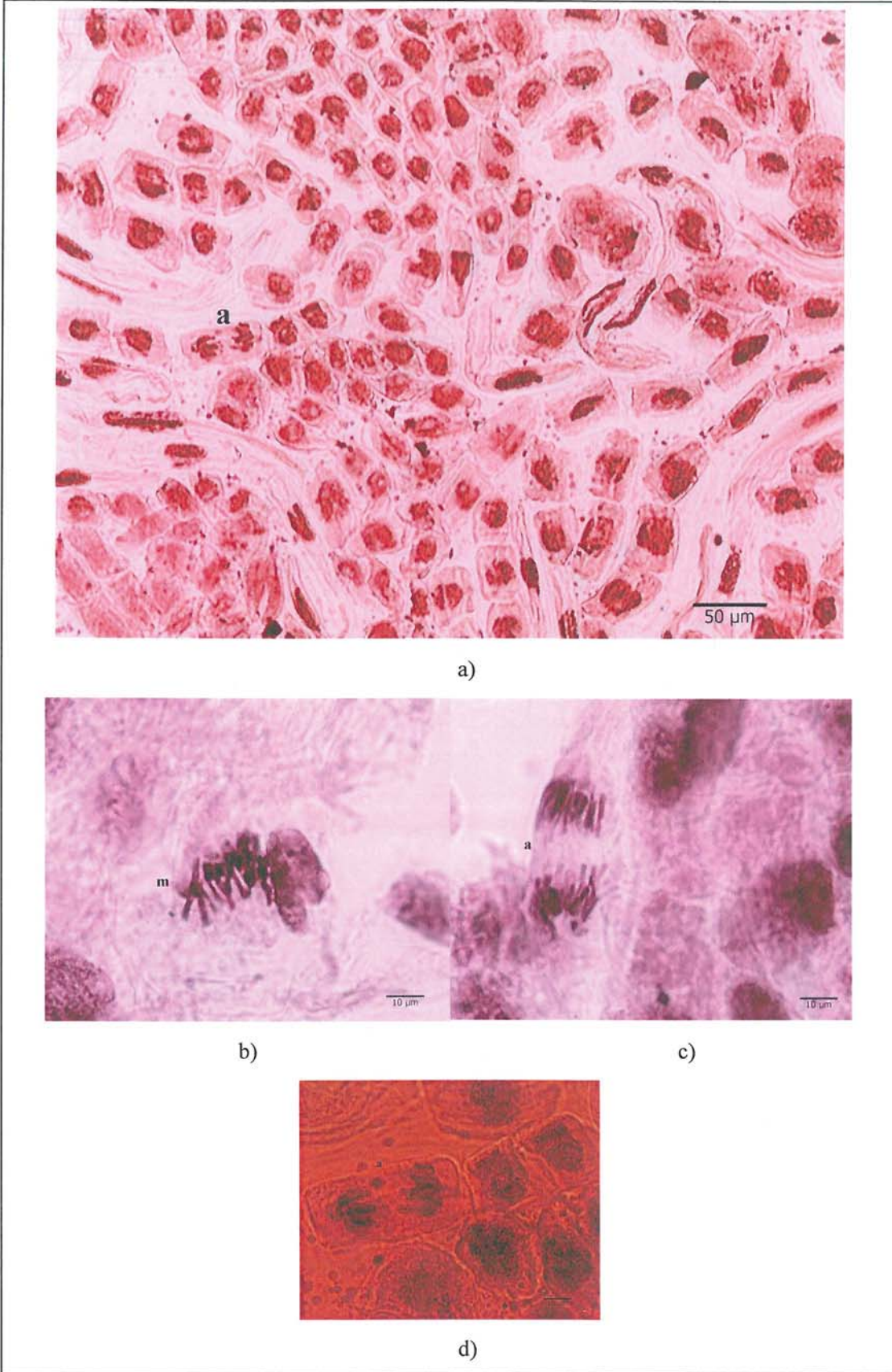


a)

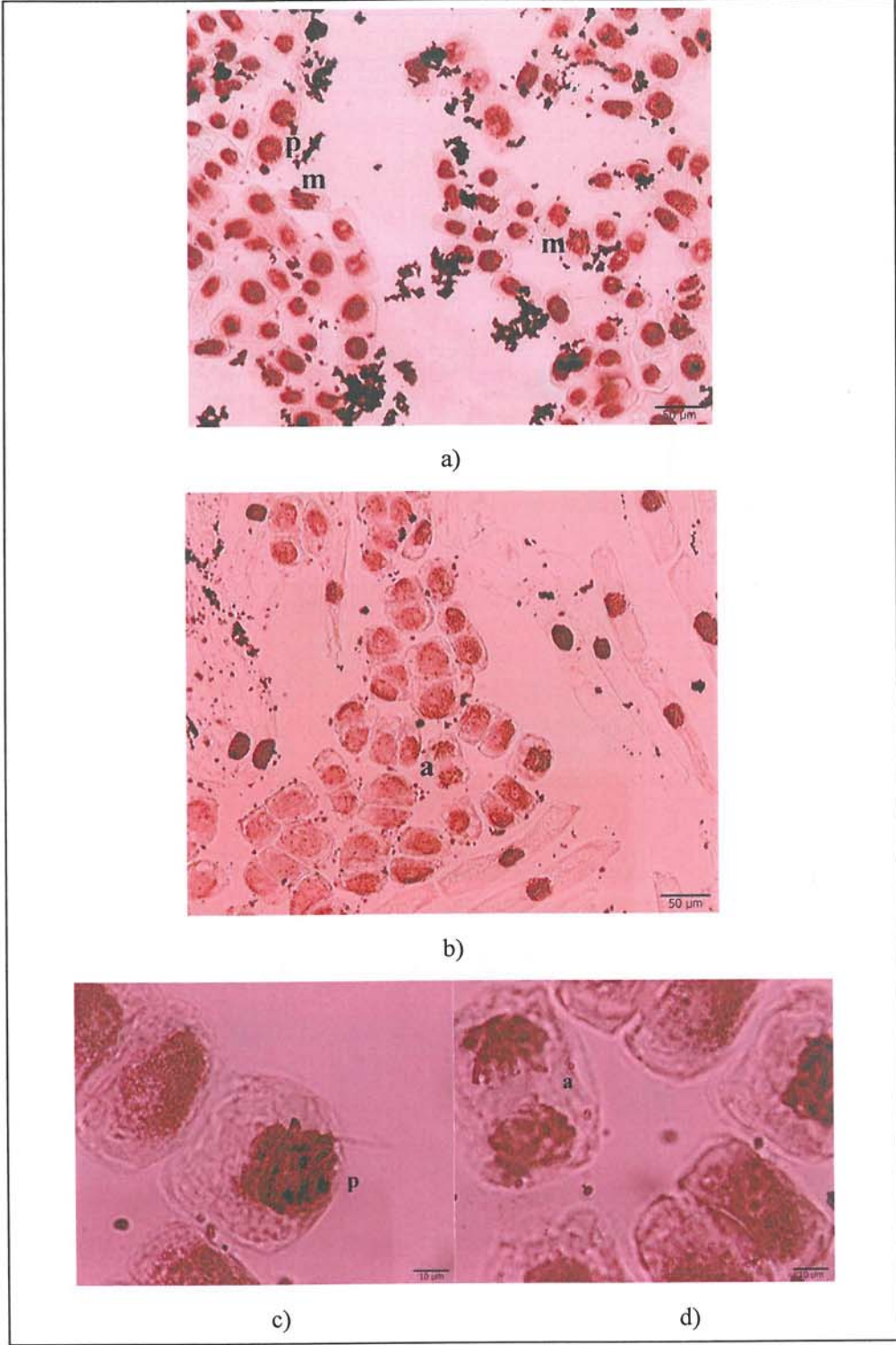


b)

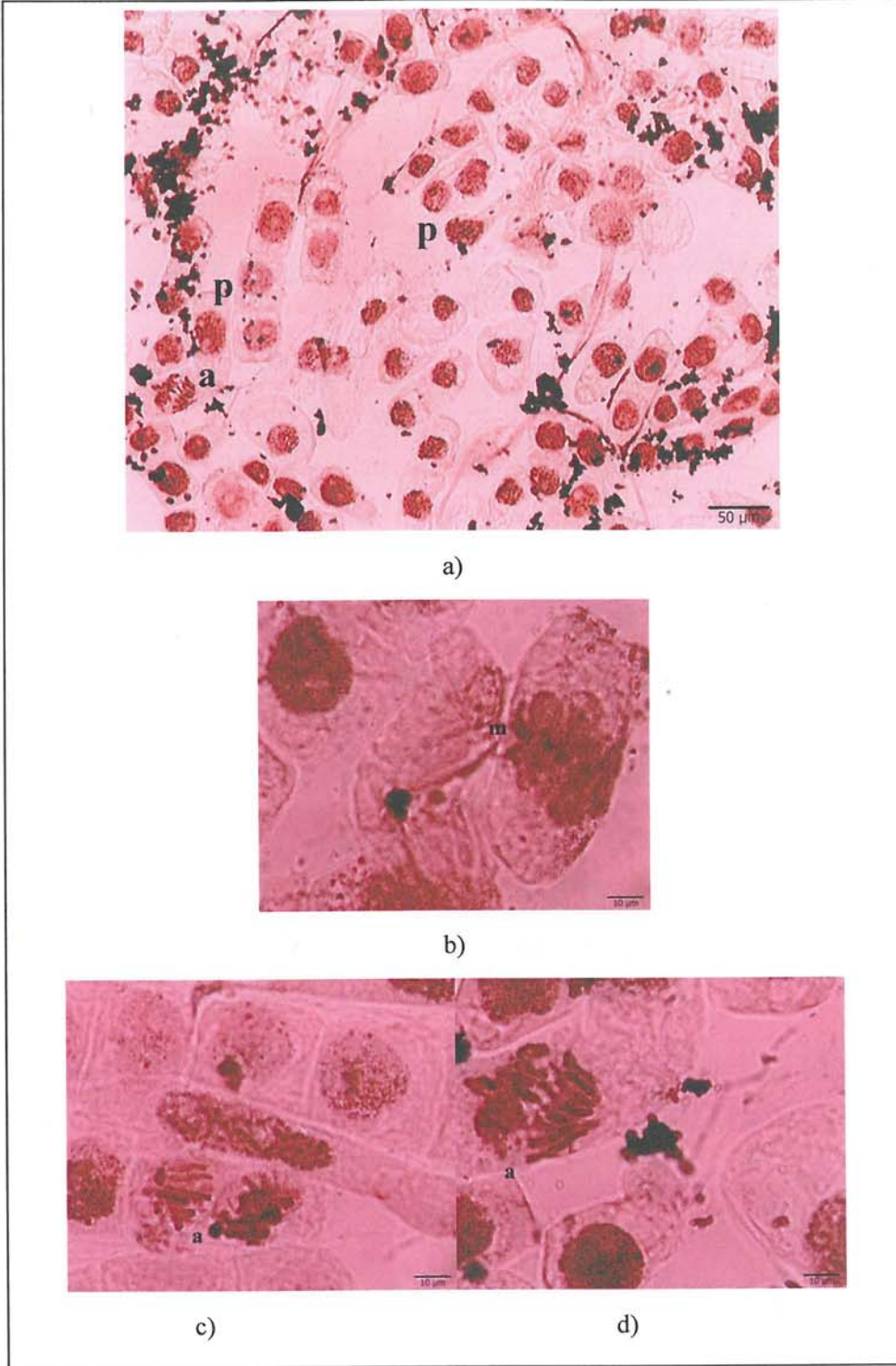
Görsel 4.1. *A. cepa* Kök Hücrelere Ait Kontrol Grubu Preparatlarının Mikroskop Görüntüleri
a) ve b) 20'lik objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz, t telofaz.



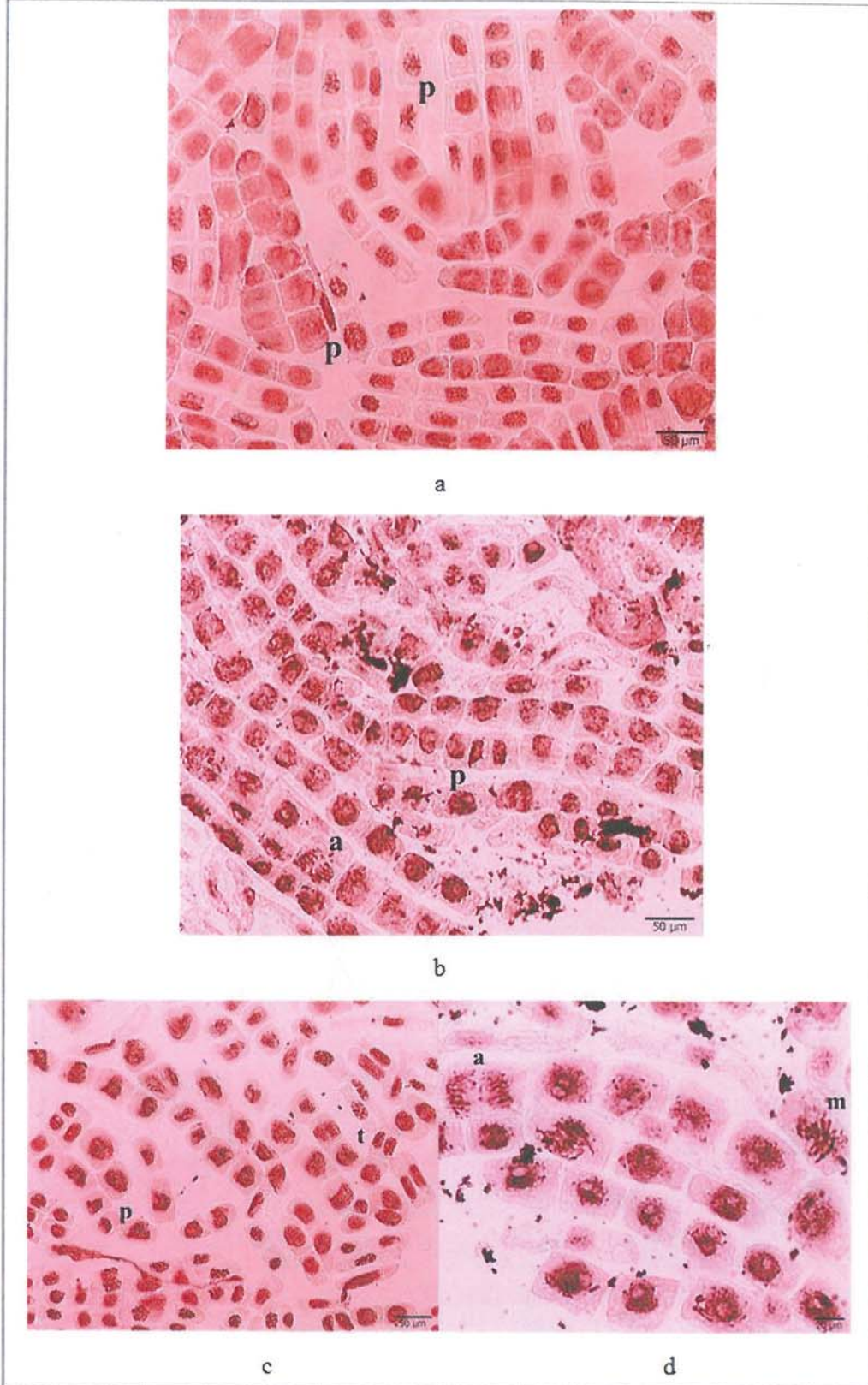
Görsel 4.2. 0.05 mg/mL'lik GPME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) 20'lik; b), c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. m metafaz, a anafaz hücreleri.



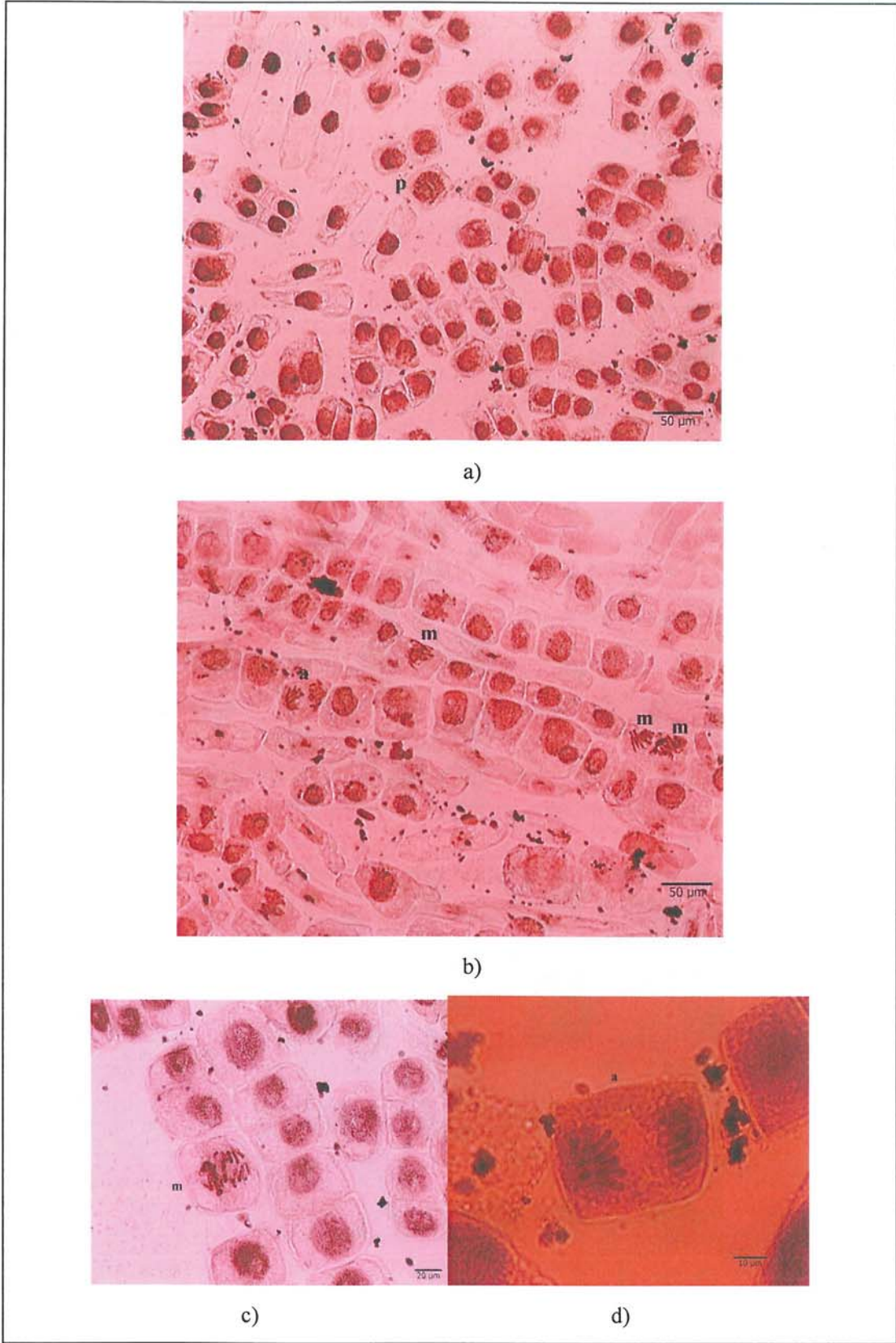
Görsel 4.3. 0.05 mg/mL'lik GOME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) ve b) 10'lük; c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz.



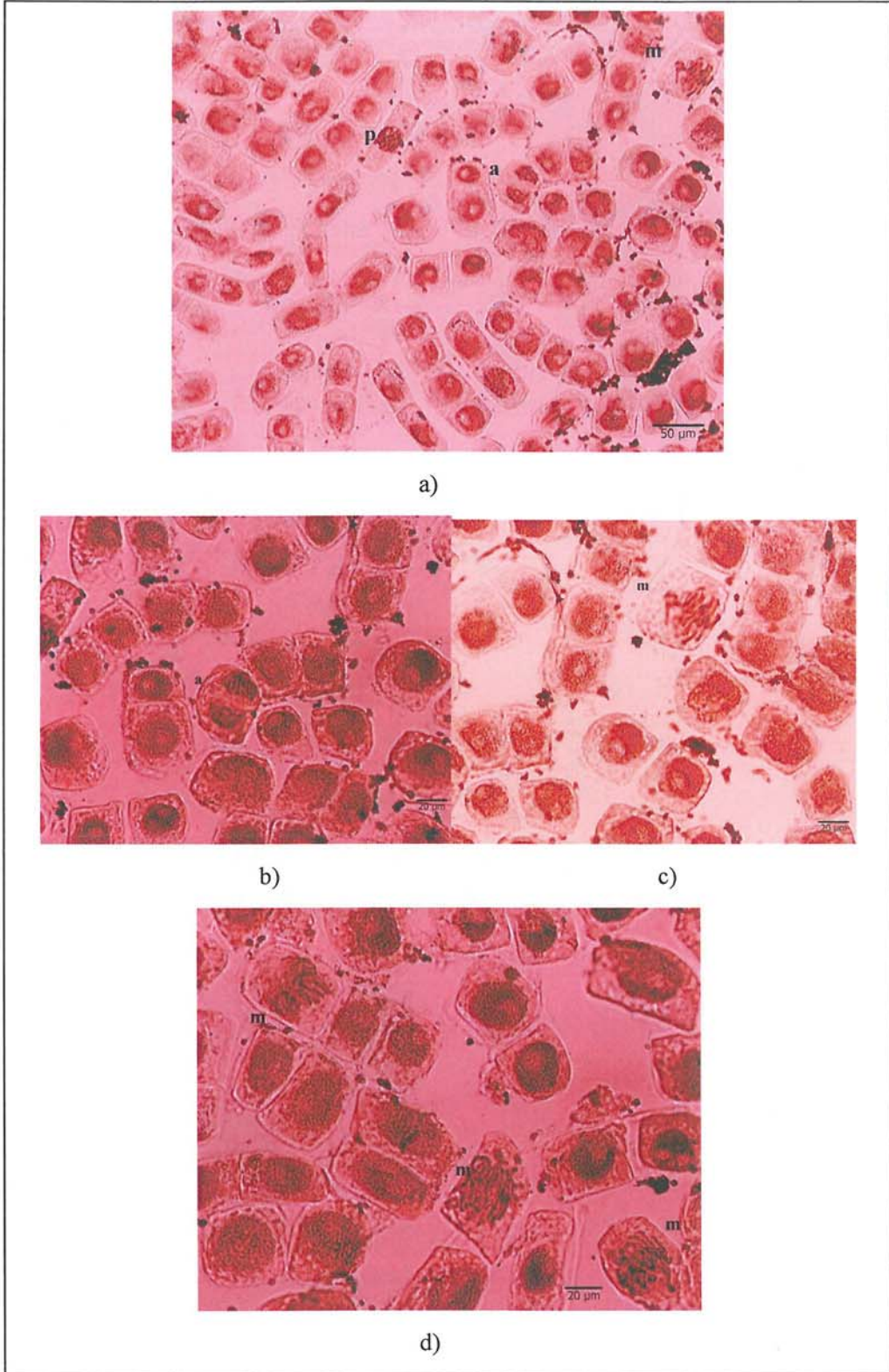
Görsel 4.4. 0.05 mg/mL'lik GCME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) 20'lik; b), c), d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz.



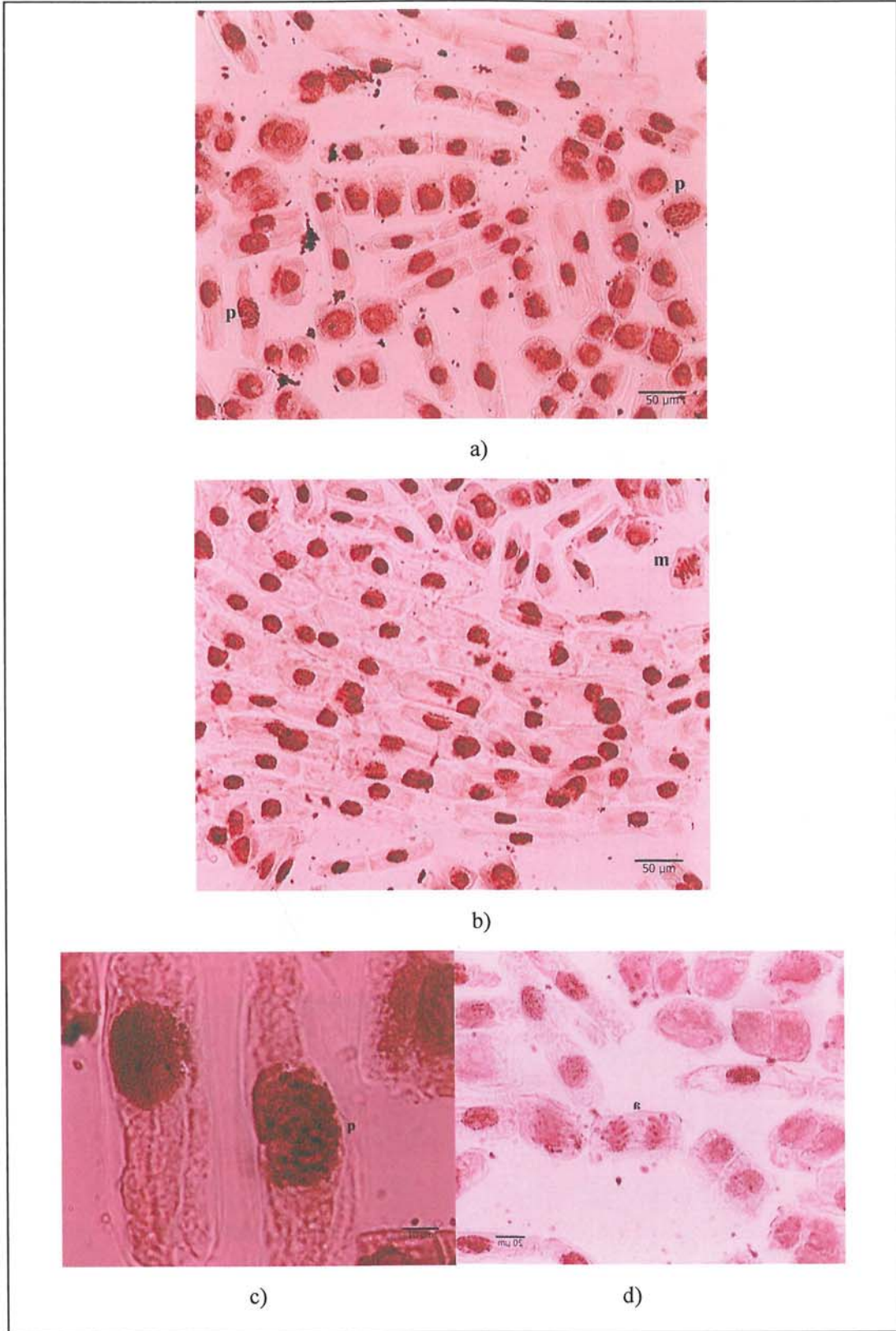
Görsel 4.5. 0.05 mg/mL'lik GSME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) 20'lik; b) 10'luk; c) 20'lik; d) 10'luk objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz, t telofaz.



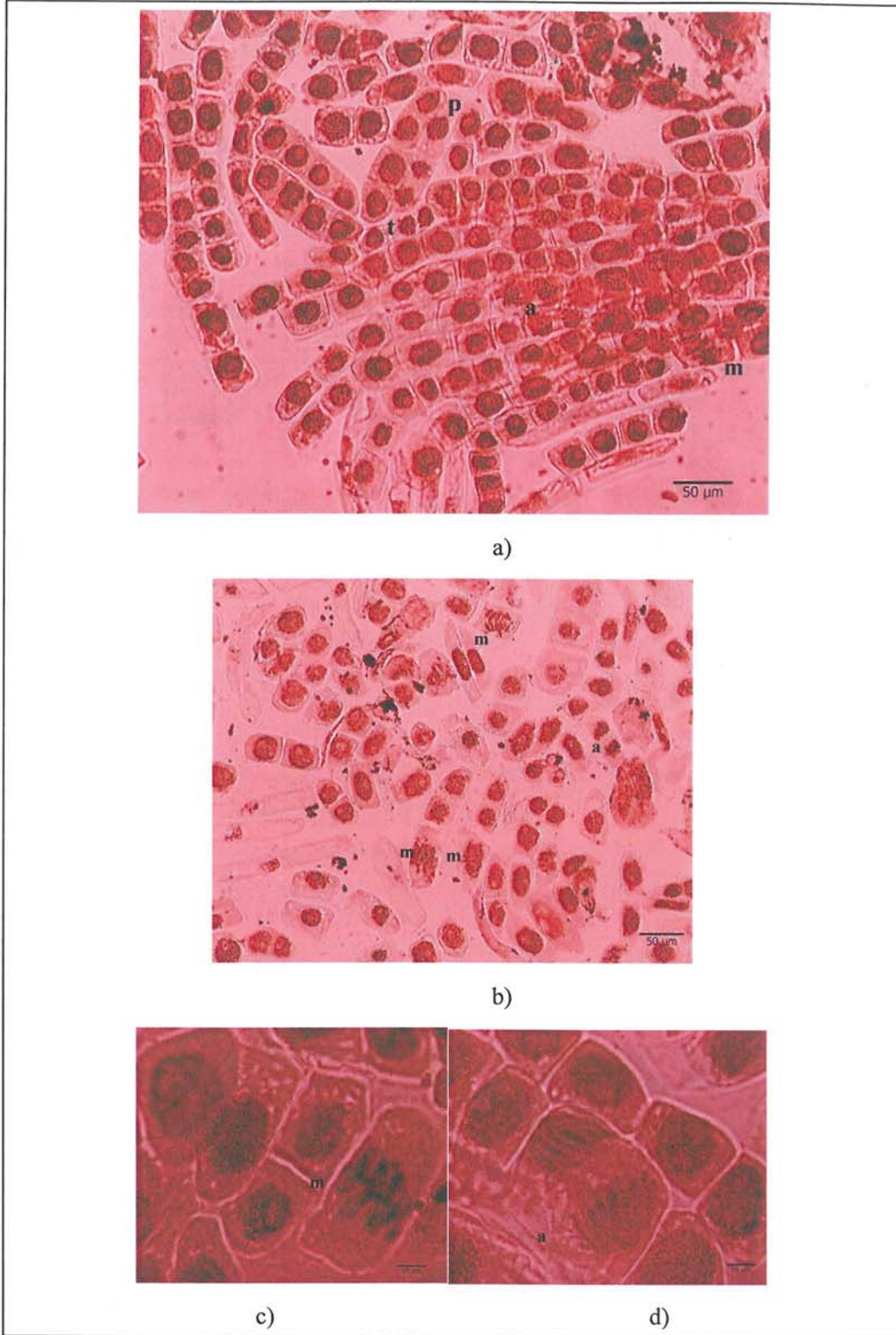
Görsel 4.6. 0.1 mg/mL'lik GPME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) ve b) 20'lik; c) 40'lık; d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz.



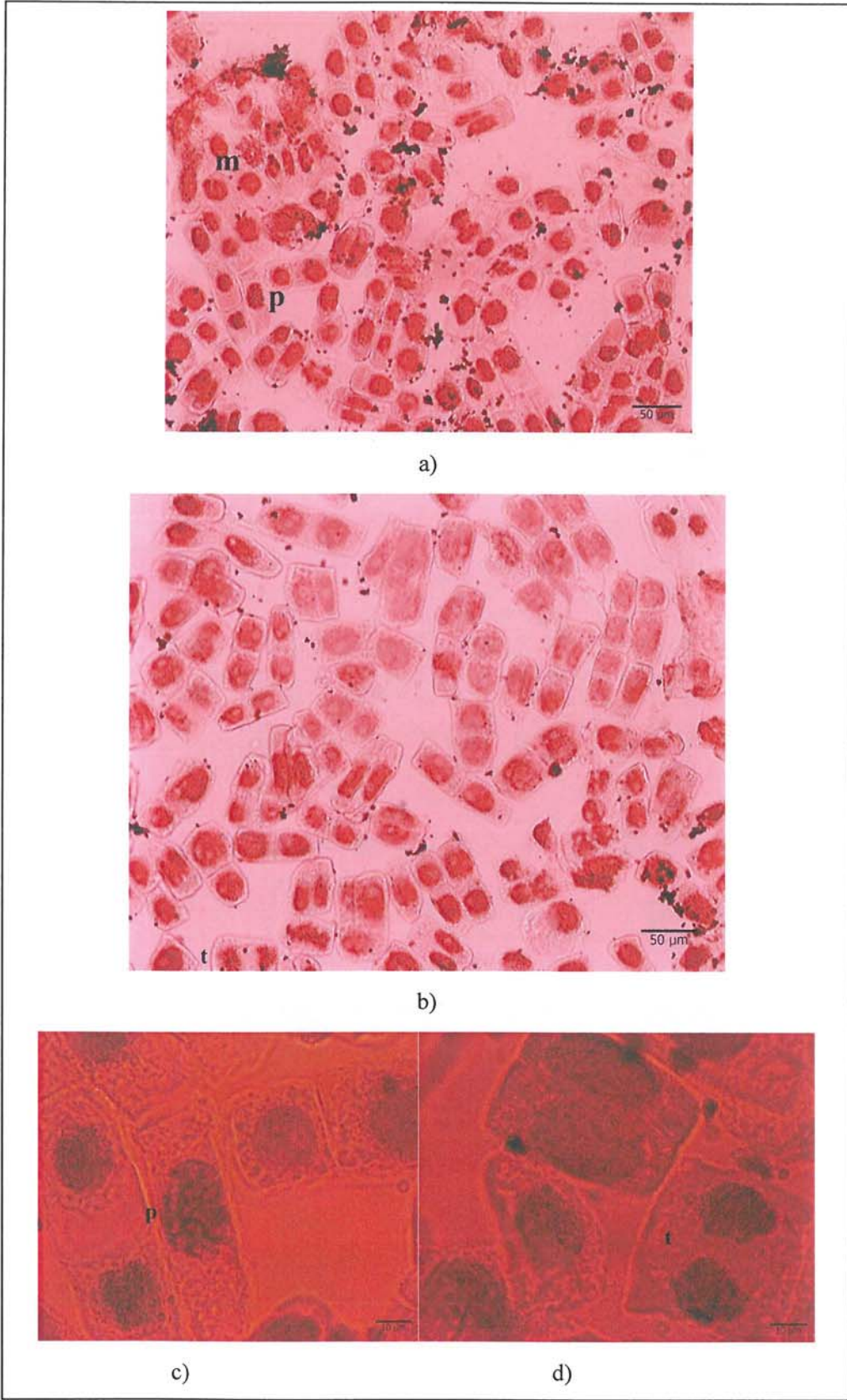
Görsel 4.7. 0.1 mg/mL'lik GOME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) 20'lik; b), c), d) 40'lık objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz.



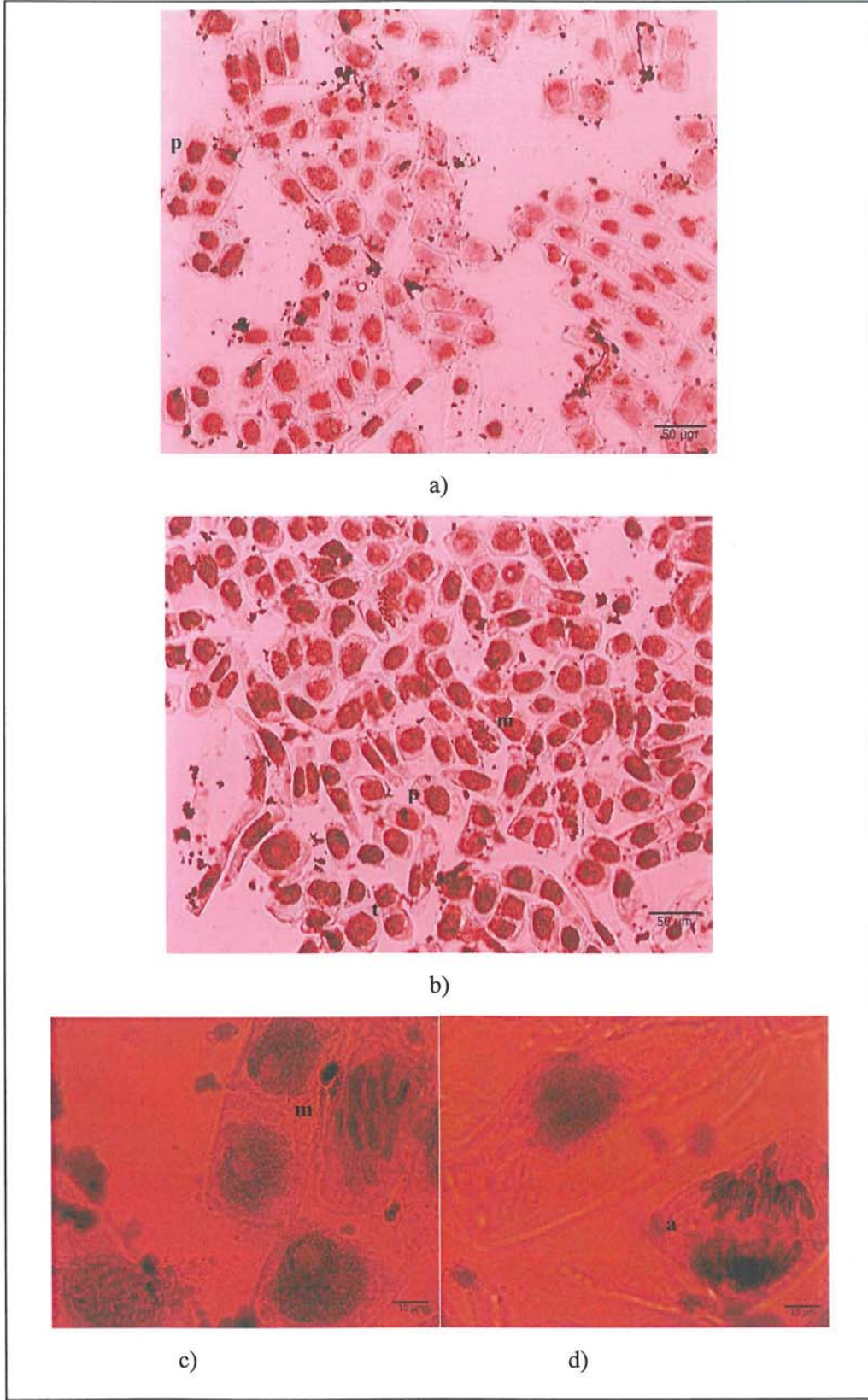
Görsel 4.8. 0.1 mg/mL'lik GCME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) ve b) 20'lik; c) 100'lük; d) 40'lık objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz.



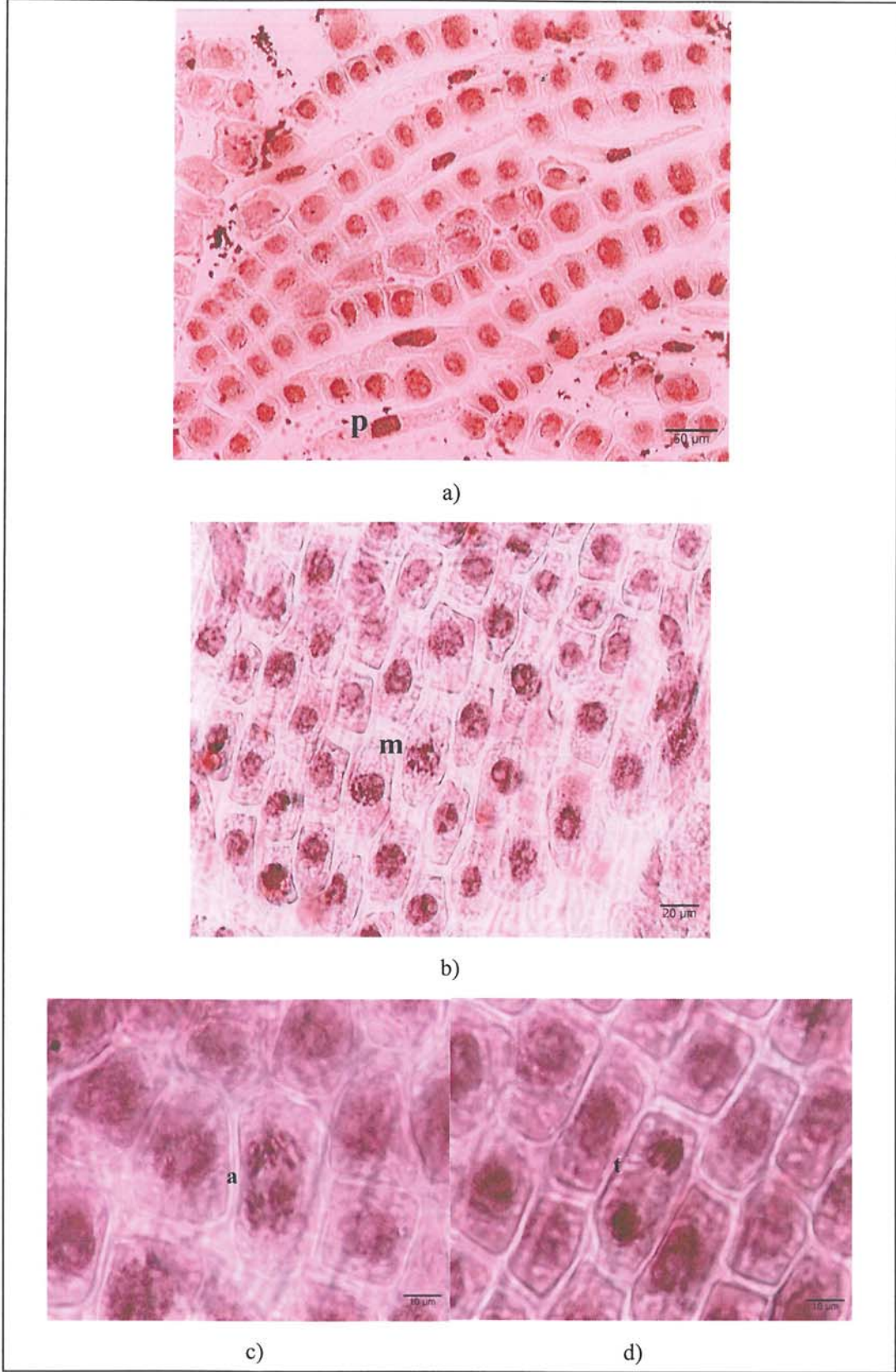
Görsel 4.9. 0.1 mg/mL'lik GSME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) ve b) 20'lik; c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz, t telofaz.



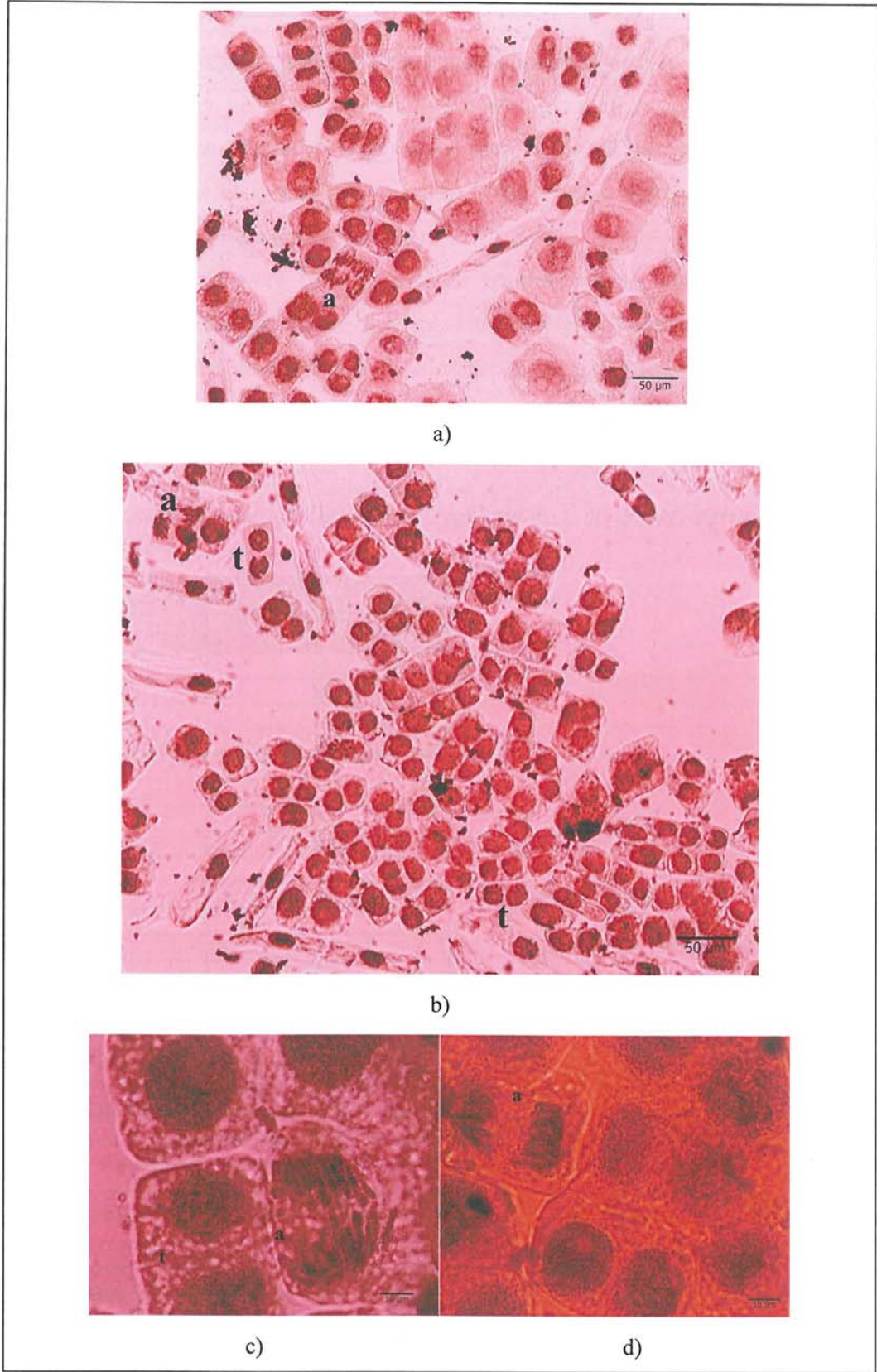
Görsel 4.10. 0.5 mg/mL'lik GPME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) ve b) 20'lik; c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, t telofaz.



Görsel 4.11. 0.5 mg/mL'lik GOME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) ve b) 20'lik; c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz.



Görsel 4.12. 0.5 mg/mL'lik GCME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) 20'lik; b) 40'lık; c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. p profaz, m metafaz, a anafaz, t telofaz.



Görsel 4.13. 0.5 mg/mL'lik GSME'nin Uygulandığı *A. cepa* Kök Hücrelerinin Mikroskop Görüntüleri a) 20'lik; b) 40'lık; c) ve d) 100'lük objektif görüntüsü. a anafaz, t telofaz.

4.6.3.1.1. Mitotik indeks

Mitotik indeks, hazırlanan preparatlarda hücre mitozunun profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarında gözlenen hücre sayılarının, incelenen toplam hücre sayısına bölünüp, 100 ile çarpılması ile elde edilen değerdir. Dolayısıyla doza bağlı MI'nın azalması, test edilen ekstrenin *A. cepa* kök hücreleri üzerinde mitozu azaltıcı etkisi olduğunu göstermektedir (Akinboro ve Bakare 2007; Fiskesjo, 1985, s. 99).

İncelenen preparatlara göre Çizelge 4.20'de görülen mitotik indeks sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre *Gentiana* türlerine ait ekstrelerin konsantrasyonları arttıkça mitotik indeksin azaldığı, özellikle en yüksek konsantrasyonda (0.5 mg/mL) mitoz geçişin yavaşladığı gözlenmiştir. 0.5 mg/mL konsantrasyonda en düşük mitotik indeks değerine sahip ekstreler; GCME (4.4), GSME (4.6), GOME (5.1) ve GPME (5.6)'dir.

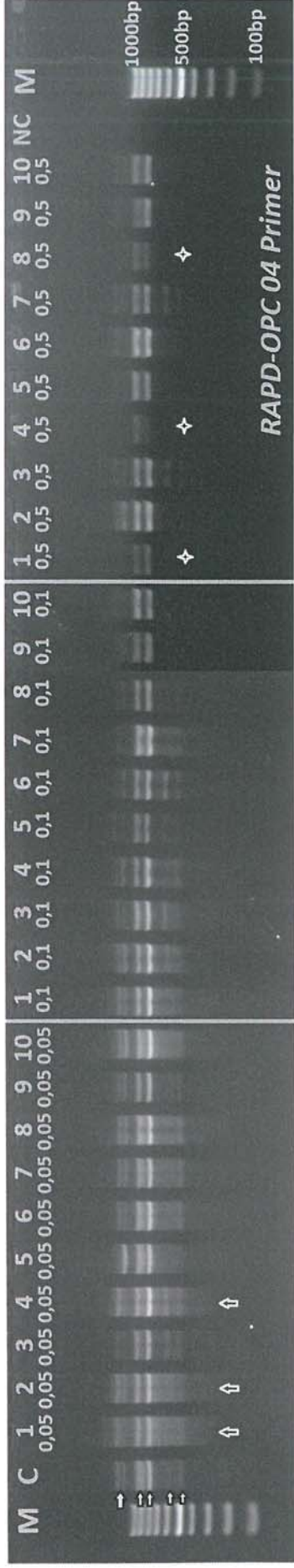
Çizelge 4.20. *Gentiana* Türlerine Ait Ekstrelerin Uygulandığı *A. cepa* Hücrelerinde Belirlenen Mitotik İndeks Değerleri

Ekstreler (konsantrasyon (mg/mL))	MI (Mitotik İndeks)
Kontrol	15.6
GPME (0.05)	10.3
GBME (0.05)	11.6
GOME (0.05)	9.6
GCME (0.05)	9.6
GAME (0.05)	12.2
GBOME (0.05)	9.4
GGME (0.05)	9.7
GSME (0.05)	8.2
GVBME (0.05)	8.5
GVPME (0.05)	9.8
GPME (0.1)	9.8
GBME (0.1)	8.1
GOME (0.1)	7.6
GCME (0.1)	6.8
GAME (0.1)	7.7
GBOME (0.1)	10.1
GGME (0.1)	9.0
GSME (0.1)	6.3
GVBME (0.1)	7.7
GVPME (0.1)	8.4
GPME (0.5)	5.6
GBME (0.5)	6.2
GOME (0.5)	5.1
GCME (0.5)	4.4
GAME (0.5)	8.2
GBOME (0.5)	6.8
GGME (0.5)	6.5
GSME (0.5)	4.6
GVBME (0.5)	6.6
GVPME (0.5)	7.6

4.6.3.2. RAPD-PCR sonuçları

RAPD ve ISSR primerleri tür içi ve türler arası DNA örneklerinin ayırımında etkin olarak kullanılmaktadır (Williams vd, 1990, s. 6531; Zietkiewicz vd.,1994, s. 176). Bu nedenle verimli olan primerler arasında, testlerde kullanılan her bir *A. cepa* örneği için tür içi birey ayırımı yapmayan primerler öncelikli tercih edilmektedir. Tüm primer sonuçlarında her bir test için *A. cepa* DNA örneklerindeki korunmuş bantlar ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak non-spesifik bant oluşumları belirlenmiştir. Birey ayırımı yapabilen primerler de dahil tüm sonuçlarda korunmuş bantlarda değişim (kaybolma/yer değiştirme) takip edilmiştir. Jel resimlerinde korunmuş bantlar siyah kenarlı beyaz dolgulu oklar ile, non-spesifik olduğu düşünülen bantlar beyaz kenarlı dolgunsuz oklarla ve bant değişimi gözlenen örnekler beyaz yıldız şeklinde işaretlenmiştir. Tüm PCR reaksiyonları için negatif kontrol kullanılmış ve reaksiyonlarda herhangi bir yabancı DNA kontaminasyonuna rastlanmamıştır. Bu durum ilk PCR jel örneğinde negatif kontrol şeklinde gösterilmiştir.

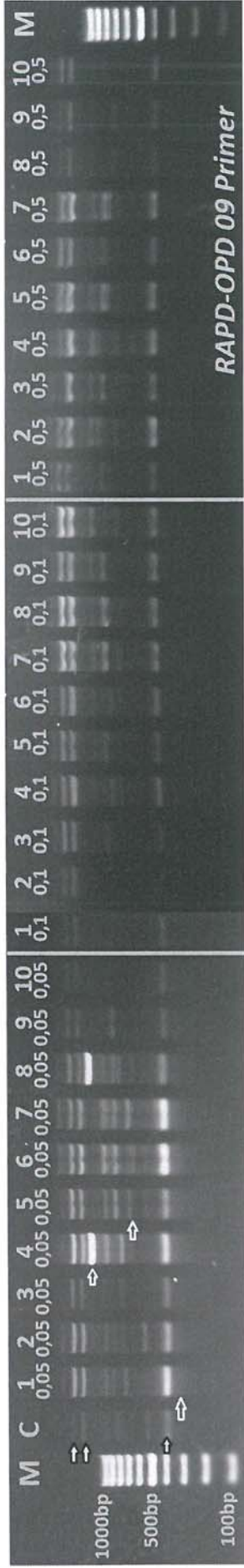
RAPD-PCR yöntemiyle, kontrol grubu (ekstre uygulanmamış) ve farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) ekstre uygulanmış *A. cepa* DNA'larındaki olası bant değişimleri gözlenmiştir. Test edilen 10 primerden 4 tanesi (RAPD-OPC 04, RAPD-OPC 07, RAPD-OPD 09 ve RAPD-P9) tüm örnekler için verimli bant sonuçları vermiştir. RAPD-OPC 04 primeri için PCR amplifikasyon sonuçları Görsel 4.14'te, RAPD-OPC 07 primeri için Görsel 4.15'te, RAPD-OPD 09 primeri için Görsel 4.16'da ve RAPD-P9 primeri için Görsel 4.17'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre RAPD-OPD 09 primerinin tür içi genom ayırımını yaptığı ve korunmuş bantlara göre bant çeşitliliğinin çok fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle RAPD-OPD 09 primerinin uygulamaya bağlı olası DNA değişimlerini değerlendirmede uygun olmadığı görülmüştür. RAPD-P9 primeri, yüksek miktarda korunmuş bant içeriği sayesinde, kontrol grubu ile test gruplarını karşılaştırmada en uygun primer olarak göze çarpmaktadır.



Görsel 4.14. A. cepa Kök Hücre Genomundan RAPD-OPC 04 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü M: 100 bp DNA markör; C: Kontrol grubu; 1-10: farklı ekstre örneklerine ait test edilen farklı konsantrasyon örnekleri; NC: Negatif kontrol; Beyaz dolgu oklar: korunmuş bant/lar; Dolgunsuz oklar: non-spesifik bant oluşumları; Yıldız: Bant değişimleri (1. GPME 2. GBME 3. GOME 4. GCME 5. GAME 6. GBOME 7. GGME 8. GSME 9. GYBME 10. GYPME)



Görsel 4.15. A. cepa Kök Hücre Genomundan RAPD-OPC 07 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü M: 100 bp DNA markör; C: Kontrol grubu; 1-10: farklı ekstre örneklerine ait test edilen farklı konsantrasyon örnekleri; NC: Negatif kontrol; Beyaz dolgu oklar: korunmuş bant/lar; Dolgunsuz oklar: non-spesifik bant oluşumları; Yıldız: Bant değişimleri (1. GPME 2. GBME 3. GOME 4. GCME 5. GAME 6. GBOME 7. GGME 8. GSME 9. GYBME 10. GYPME)



Görsel 4.16. *A. cepa* Kök Hücre Genomundan RAPD-OPD 09 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü M: 100 bp DNA markör; C: Kontrol grubu; 1-10: farklı ekstre örneklerine ait test edilen farklı konsantrasyon örnekleri; NC: Negatif kontrol; Beyaz dolgu oklar: korunmuş bantlar; Dolgusuz oklar: non-spesifik bant oluşumları (1. GPME 2. GBME 3. GOME 4. GCME 5. GAME 6. GBOME 7. GGME 8. GSME 9. GVPME 10. GVPME)



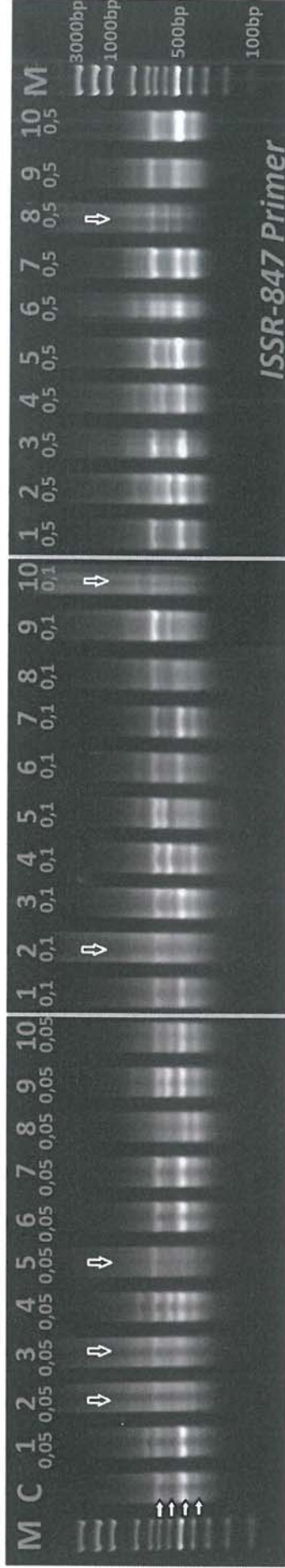
Görsel 4.17. *A. cepa* Kök Hücre Genomundan RAPD-P9 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü M: 100 bp DNA markör; C: Kontrol grubu; 1-10: farklı ekstre örneklerine ait test edilen farklı konsantrasyon örnekleri; NC: Negatif kontrol; Beyaz dolgu oklar: korunmuş bantlar; Dolgusuz oklar: non-spesifik bant oluşumları; Yıldız: Bant değişimleri (1. GPME 2. GBME 3. GOME 4. GCME 5. GAME 6. GBOME 7. GGME 8. GSME 9. GVPME 10. GVPME)

4.6.3.3. ISSR-PCR sonuçları

ISSR-PCR yöntemiyle, kontrol grubu (ekstre uygulanmamış) ve farklı konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) *Gentiana* ekstresi uygulanmış *A. cepa* DNA'larındaki olası bant değişimleri gözlenmiştir. Test edilen 10 primerden 2 tanesi (ISSR-1 ve ISSR-847) tüm örnekler için verimli bant sonuçları vermiştir. ISSR-1 primeri için PCR amplifikasyonunun agaroz jel sonuçları Görsel 4.18'de ve ISSR-847 primeri için Görsel 4.19'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ISSR-847 primerinin tür içi genom ayrımını yaptığı ve korunmuş bantlara göre bant çeşitliliğinin çok fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle ISSR-847 primeri, uygulamaya bağlı olası DNA değişimlerini değerlendirmede uygun olmadığı görülmüştür. ISSR-1 primeri, yüksek miktarda korunmuş bant içeriği sayesinde, kontrol grubu ile test gruplarını karşılaştırmada en uygun ISSR primeri olarak değerlendirilmiştir.



Görsel 4.18. *A. cepa* Kök Hücre Genomundan ISSR-1 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü M: 100 bp DNA markör; C: Kontrol grubu; 1-10: farklı ekstre örneklerine ait test edilen farklı konsantrasyon örnekleri; NC: Negatif kontrol; Beyaz dolgu oklar: korunmuş bant/ lar; Dolgu oklar: non-spesifik bant oluşumları (1. GPME 2. GBME 3. GOME 4. GCME 5. GAME 6. GBOME 7. GGME 8. GSME 9. GYBME 10. GYPME)



Görsel 4.19. *A. cepa* Kök Hücre Genomundan ISSR-847 Primeri İle Çoğaltılan PCR Bant Profillerinin Agaroz Jel Görüntüsü M: 100 bp DNA markör; C: Kontrol grubu; 1-10: farklı ekstre örneklerine ait test edilen farklı konsantrasyon örnekleri; NC: Negatif kontrol; Beyaz dolgu oklar: korunmuş bant/ lar; Dolgu oklar: non-spesifik bant oluşumları (1. GPME 2. GBME 3. GOME 4. GCME 5. GAME 6. GBOME 7. GGME 8. GSME 9. GYBME 10. GYPME)

5. TARTIŞMA

Doğal kaynaklarda bulunan biyoaktif bileşiklerin; biyolojik sistemlerde ateroskleroz, diyabet, kronik inflamasyon, nörojeneratif rahatsızlıklar ve çeşitli kanser türleri gibi patolojilere yol açan oksidatif strese karşı koyarak bu hastalıkların tedavisinde etkin rol oynadığı için doğal kaynaklı bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi literatür açısından önem kazanmaktadır.

Gentiana türleri halk arasında sindirimi kolaylaştırıcı, tonik, hipoglisemik, antiinflamatuvar, antikonvülzan, hepatoprotektif ve antihipertansif gibi pek çok tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Ayrıca anemi, anoreksi ve romatizma gibi hastalıkların yanısıra mental rahatsızlıkların tedavisinde kullanıldıkları da bilinmektedir. Literatürde bazı *Gentiana* türlerine ait ekstre ve türlerden izole edilen biyoaktif bileşiklerin hepatoprotektif, antiinflamatuvar, sitotoksik, antikanser, antimikrobiyal, antioksidan, monoamin oksidaz inhibitör, kolinesteraz inhibitör ve immunomodülatör aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Pan, vd. 2016, s. 108). Etnomedikal kullanımları ve literatür çalışmaları ışığında bu tez kapsamında; *Gentiana asclepiadea* L., *G. brachyphylla* Vill., *G. cruciata* L., *G. gelida* Bieb., *G. olivieri* Griseb., *G. pyrenaica* L., *G. septemfida* Pallas., *G. verna* L. subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek, *G. verna* L. subsp. *balcanica* Pritchard ve ülkemiz için endemik olan *G. boissieri* Schott et Kotschy ex Boiss. türlerinden hazırlanan farklı polaritedeki ekstreler üzerinde bazı fitokimyasal araştırmaların yanısıra antioksidan, antikolinesteraz, MAO-A, MAO-B inhibitör, COX-1, COX-2 inhibitör etkileri ve genotoksik aktiviteleri araştırılmıştır.

Bu çalışmada öncelikle; *G. asclepiadea*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. olivieri*, *G. pyrenaica*, *G. septemfida*, *G. verna* subsp. *pontica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. boissieri* türlerine ait toprak üstü kısımlardan hazırlanan metanol ekstrelerinin yanısıra diklorometan, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş ve en yüksek toplam fenolik madde miktarı *G. gelida* ve *G. septemfida* metanol (GGME ve GSME) ekstrelerinde (sırasıyla 363.53 ± 5.73 ; 328.84 ± 2.24 mg GAE/g ekstre); en düşük toplam fenolik madde miktarı ise *G. boissieri* ve *G. septemfida* diklorometan fraksiyonlarında (sırasıyla 14.52 ± 1.96 ve 15.22 ± 2.12 mg GAE/g ekstre) görülmüştür.

Şenol vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada; *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. olivieri*, *G. septemfida* ve *G. verna* türlerine ait çiçek, yaprak ve köklerden hazırlanan diklorometan, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının toplam fenolik madde miktarları belirlenmiş ve sonuçlara göre; en yüksek toplam fenolik madde miktarı *G. asclepiadea* türüne ait yaprak metanol ekstresinde (148.9 ± 9.90 mg GAE/g ekstre), en düşük toplam fenolik madde miktarı ise *G. cruciata* türüne ait yaprak etil asetat ekstresinde (38.9 ± 2.83) tespit edilmiştir (Şenol vd., 2012, s. 804).

Mihailović vd.'nin 2015'te yaptığı çalışmada, *G. cruciata* toprak üstü ve kök metanol ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 59.42 ± 1.62 ve 28.64 ± 1.42 mg GAE/g ekstre olarak bulunmuştur (Mihailović vd., 2015, s. 53). Tez çalışmamızda *G. cruciata* toprak üstü kısımlarına ait ekstrenin toplam fenolik madde miktarı 187.14 ± 3.52 mg GAE/g olarak tespit edilmiş olup Mihailovic vd.'nin bulduğu sonuçtan oldukça yüksektir.

Toplam fenolik madde miktarı fazla olan *Gentiana gelida*'ya ait metanol ekstresinde (GGME) ve *G. septemfida*'ya ait metanol (GSME) ekstresinde HPLC ile tespit edilen başlıca fenolik asitler; gallik protokateşik, *para*-hidroksi benzoik, klorojenik, kafeik, sirinjik, *para*-kumarik, *orto*-kumarik ve ferulik asitlerdir. Fenolik asitlerden sirinjik asit en fazla *G. olivieri*'ye ait etil asetat fraksiyonunda (GOEAF) 45.86 µg/g bitki olarak; *p*-kumarik asit *G. asclepiadea*'ya ait metanol ekstresinde (GAME) 39.6 µg/g bitki olarak ve klorojenik asit *G. boissieri* (GBOME) ve *G. olivieri*'ye (GOME) ait metanol ekstrelerinde sırasıyla 67.55 ve 34.67 µg/g bitki olarak tespit edilmiştir.

Gentiana ekstre ve fraksiyonlarında Ters-Faz HPLC ile tespit edilen başlıca sekoiridoitler; loganik asit, svertiamarin, gentiopikrozit ve sverozittir. Sekoiridoitlerden loganik asit en fazla *G. olivieri*'ye ait etil asetat fraksiyonunda (GOEAF) 94.92 mg/g ekstre; svertiamarin en fazla *G. asclepiadea*'ya ait etil asetat fraksiyonunda (GAEAF) 149.18 mg/g ekstre; gentiopikrozit en fazla *G. boissieri*'ye ait metanol ekstresinde (GBOME) 63.51 mg/g ekstre ve sverozit en fazla *G. verna* subsp. *pontica*'ya ait etil asetat fraksiyonunda (GVPEAF) 65.56 mg/g ekstre olarak tespit edilmiştir.

G. asclepiadea, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. olivieri*, *G. pyrenaica*, *G. septemfida*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerine ait toprak üstü kısımlardan hazırlanan metanol ekstralarının LC/MS-IT-TOF sonuçlarına göre ekstralarda literatürü destekler biçimde *G. asclepiadea* metanol ekstresinde; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, östomorzit, viteksin, orientin, mangiferin ve oleanolik asit, *G. boissieri* metanol ekstresinde; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, svertianolin, östomorzit, viteksin, orientin ve oleanolik asit, *G. brachyphylla* metanol ekstresinde; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, loganin, norsvertianolin, viteksin, orientin, bellidin, bellidifolin ve mangiferin, *G. cruciata* ve *G. gelida*'ya ait metanol ekstralarında; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, östomorzit, viteksin, orientin ve oleanolik asit, *G. olivieri* metanol ekstresinde; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, svertianolin, 3'-asetil sverozit, viteksin, orientin ve oleanolik asit, *G. pyrenaica*'ya ait metanol ekstresinde; viteksin, orientin ve oleanolik asit, *G. septemfida*'ya ait metanol ekstresinde; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, östomorzit, viteksin ve oleanolik asit, *G. verna* subsp. *balcanica* metanol ekstresinde; sverozit, norsvertianolin, viteksin, orientin, bellidin, bellidifolin, mangiferin ve oleanolik asit, *G. verna* subsp. *pontica* metanol ekstresinde ise; gentiopikrozit, sverozit, svertiamarin, östomorzit, 3'-asetil sverozit, viteksin, orientin ve oleanolik asit tespit edilmiştir.

Ayrıca *G. brachyphylla* metanol fraksiyonunda; gentiopikrozit, sverozit, svertianolin, norsvertianolin, östomorzit, izopirenin, orientin ve bellidifolin, *G. pyrenaica* metanol fraksiyonunda; sverozit, oliverozit C, östomorzit, viteksin, izoviteksin ve orientin, *G. verna* subsp. *pontica*'ya ait metanol fraksiyonunda; sverozit, norsvertianolin, östomorzit, izopirenin, viteksin, orientin ve bellidifolin tespit edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında *G. asclepiadea* köklerinde; 3,4-dihidro-1H,6H,8H-nafto[1,2-c',d']dipirano-1,8-dion (Kitanov ve Spasov, 1992, s. 1067), izogentisin, β -sitosterol, ursolik asit (Kitanov ve Dam The Van, 1991, s. 425), gentiopikrozit, 6'-O- β -D-glukozilgentiopikrozit (Mpondo Mpondo ve Chulia, 1988, s. 185), gentianin, gentianidin (Rulko, 1976, s. 3), sverozit, svertiamarin (Mihailović vd., 2013, s. 807), yapraklarında ise izoviteksin, izorientin ve mangiferin tespit edilmiştir (Kitanov ve Dam The Van, 1991, s. 425); *G. cruciata* toprak üstü kısımlarında;

mangiferin, izoorientin, izoviteksin ve gentiopikrozit (Savikin-Fodulovic vd., 2003, s. 371), köklerinde; gentiopikrozit, gentianoz (Bridel; 1913, s. 392), yaprak ve gövde kısımlarında; flavon ve ksanton-C glikozitleri (Goetz vd., 1976, s. 2015); *G. gelida* toprak üstü kısımlarında; gelidozit ve gentomozit gibi kuvvetli acı açılsekoiridoitler, triflorozit, gentiopikrozit, svertiamarin, östomozit ve östomoruzzit gibi sekoiridoit glikozitler (Çalış vd., 1990, s. 406); *G. olivieri*'de oliverozit A, oliverozit B ve oliverozit C, gentiopikrozit, sverozit, 6'-*O*- β -D-glukozilgentiopikrozit, svertiapunimarin, östomozit, östomoruzzit ve septemfidozit (Takeda vd., 1999, s. 1338), gentianin ve gentianadin alkaloitleri (Mansoor vd., 2000, s. 105) ile oleanolik asit (Singh vd., 2012, s. 241); *G. pyrenaica* toprak üstü kısımlarında; izoorientin, izotakiyozit ve arbutin (Kaya, 2013, s. 202), 6'-vanilloil kingisit, kingisit, 7-demetil alpigenozit (Garcia vd., 1990, s. 3353), 8-epikingisit, 6'-vanilloil 8-epikingisit (Garcia vd., 1989, s. 2199), 3-(3-*O*- β -D-glukozilpropil) fitalit (pediglukozit), 3-[3-(6-vanilloiloksi-*O*- β -D-glukozil) propil] fitalit (6'-vanilloilpediglukozit) (Garcia vd., 1989, s. 1759), 6'-[2(*R*)-metil-3-veratroiloksi propanoil] loganin, loganin (Garcia vd., 1989, s. 423), izopirenin, izopirenin 7-*O*-glukozit, izoskoparin 7-*O*-glukozit, izositozit 7-*O*-glukozit, izoviteksin 7-*O*-glukozit, izokersitrin (Marston vd., 1976, s. 2596), morronizit, 4'-*p*-kumaroilmorronizit, 6'-*O*-(2*R*)-metil-3-veratroiloksipropanoil) morronizit, pirenozit, (Garcia vd., 1989, s. 996), yapraklarında ise 6'-*O*-[(2*R*)-metil-3-veratroiloksipropanoil] arbutin ve 4'-*O*-[(2*R*)-metil-3-veratroiloksipropanoil] arbutin (Garcia vd., 1989, s. 858); *G. septemfida* toprak üstü kısımlarında; floroglusinol, protokateşik asit, luteolin (Nikitina ve Bukreeva, 1967, s. 162), septemfidozit, gelidozit, sverozit, gentiopikrozit, svertiamarin, östomozit, östomoruzzit, östozit ve loganik asit (Çalış vd., 1992, s. 385); *G. verna* toprak üstü kısımlarında ise, sverozit, sekologanin, 7-diokzolanilsekologanin (Mpondo Mpondo ve Garcia, 1990, s. 125), 4'-asetil-2'-*m*-hidroksibenzoilloganin, 6'-asetil-2'-*m*-hidroksibenzoilloganin (Mpondo Mpondo ve Garcia, 1990, s. 643), loganetin, loganin, 4'-*m*-hidroksibenzoil loganin (Mpondo Mpondo ve Garcia, 1989, s. 2503), sekologanol, 7-asetilsekologanol, 7-(2,5-dihidroksibenzoil) sekologanol (Mpondo Mpondo vd., 1989, s. 1146), yapraklarında; izoorientin 2''-*O*-glukozit, izoorientin 4'-*O*-glukozit (Hostettmann ve Jacot-Guillarmod, 1975, s. 130), 1,7-dihidroksi-3-metoksiksanton-8-*O*- β -D-glukopiranozit, 1-hidroksi-3,7,8-trimetoksiksanton-1-*O*-primeverozit, 1,7,8-trihidroksi-3-metoksiksanton, 7-hidroksi-3,8-dimetoksiksanton-1-*O*-primeverozit, 7,8-dihidroksi-3-metoksiksanton-1-*O*-primeverozit, mangiferin ve izoorientin (Hostettmann

ve Jacot-Guillarmod, 1974, s. 1155), *G. verna* subsp. *balcanica* toprak üstü kısımlarında; sverozit, 2,4,3'-trihidroksibenzofenon 6-*O*- β -glukopiranozit ve norsvertianin-1-*O*- β -glukopiranozit, mangiferin, izoorientin 7-*O*- β -glukopiranozit, izoorientin (Kaya, 2013, s. 202), *G. verna* subsp. *pontica* toprak üstü kısımlarında; 2,3'-dihidroksi-4-metoksi-benzofenon-6-*O*- β -glukopiranozit, 2,4,3',4'-tetrahidroksi-benzofenon-6-*O*- β -glukopiranozit (maklurin-6-*O*- β -glukopiranozit) ve 2,4,3'-trihidroksi-benzofenon-6-*O*- β -glukopiranozit (Kaya vd., 2011, s. 459; Kaya, 2013, s. 202), gentiovernozit, mangiferin, norsvertianin-1-*O*- β -glukopiranozit ve izoorientin tespit edilmiştir (Kaya, 2013, s. 202).

Tez kapsamında çalışılan *Gentiana* türlerine ait ekstre ve fraksiyonların metal şelatlayıcı antioksidan aktivite sonuçlarına göre 0.2 mg/mL konsantrasyonda EDTA (% 78.87) ile karşılaştırıldığında; *G. cruciata* (GCME), *G. asclepiadea* (GAME) ve *G. boissieri* (GBOME) metanol ekstreleri sırasıyla % 56.95, 57.49 ve 61.48 inhibisyon oranları ile belirgin antioksidan aktivite göstermiştir. Genel olarak çalışılan *Gentiana* türlerinden hazırlanan metanol ekstrelerinin, fraksiyonlardan daha yüksek metal şelatlayıcı antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür.

DNA hasarı koruyucu antioksidan aktivite sonuçlarına göre, 0.5 mg/mL konsantrasyonda en yüksek etki GBOME (% 85.23), GBME (% 81.82) ve GCME (% 81.80) ekstrelerinde görülmüştür. DNA hasarı koruyucu ve metal şelatlayıcı antioksidan aktivite sonuçları birbirini destekler niteliktedir.

Çalışılan ekstrelerin redükleyici güç ölçümleri sonucunda elde edilen EC₅₀ değerleri BHT (0.1) ve askorbik asitin (0.076) EC₅₀ değerleri ile karşılaştırılmış, en yüksek demir redükleme kapasitesine sahip ekstrenin *G. verna* subsp. *balcanica* metanol ekstresi (GVBME) (EC₅₀ = 0.42) olduğu, en düşük aktiviteye sahip ekstrenin ise EC₅₀ değeri 27.78 olan *G. olivieri* diklorometan fraksiyonu (GODMeF) olduğu belirlenmiştir.

DPPH serbest radikal süpürücü aktivite sonuçlarına göre, *G. brachyphylla* etil asetat ve metanol fraksiyonları (GBEAF ve GBMEF); 3.6×10^{-3} mg/mL konsantrasyonda, sırasıyla % 37.64 ± 0.71 ve % 31.90 ± 0.34 inhibisyon yüzdeleriyle sentetik antioksidan madde BHT'ye (% 44.14 ± 1.84) yakın antioksidan aktivite göstererek en yüksek aktiviteye sahip ekstreler olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *G. verna* subsp. *balcanica* etil asetat fraksiyonu; % 30.75 ± 0.86 inhibisyonla orta düzeyde antioksidan aktivite gösterirken; diğer ekstre ve fraksiyonlar 7.30 ± 1.96 - 28.28 ± 0.51 inhibisyon aralığında daha düşük antioksidan etki göstermişlerdir. Şenol vd. tarafından 2012'de yapılan

çalışmada; beş *Gentiana* türü *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. olivieri*, *G. septemfida* ve *G. verna*'nın yaprak, kök ve çiçeklerinin metanol ekstralarının antioksidan aktiviteleri DPPH radikal süpürücü, metal şelatlayıcı ve redükleyici güç ölçümü yöntemleri kullanılarak belirlenmiş, üç yöntemde de en yüksek antioksidan aktivite *G. verna* ekstralarında görülmüştür. Bu çalışmada, genel olarak metanol ekstraları doza bağlı olarak diklorometan ve etilasetat ekstralarından daha yüksek DPPH radikal süpürücü etki göstermiştir. *G. verna* ve *G. olivieri* çiçeklerinden hazırlanan diklorometan ekstraları sırasıyla % 82.60 ± 1.05 ve % 82.13 ± 2.18 inhibisyonla yüksek metal şelatlayıcı antioksidan aktivite göstermiştir (Şenol vd., 2012, s. 804).

Ekstre ve fraksiyonların DPPH ve Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite sonuçları karşılaştırıldığında; 3.6×10^{-3} mg/mL konsantrasyonda belirgin DPPH süpürücü antioksidan aktivite gösteren GBEAF (% 37.64 ± 0.71) ve GBMeF (% 31.90 ± 0.34) fraksiyonları, sırasıyla 0.55 ve 0.51 EC₅₀ değerleri ile belirgin redükleyici antioksidan aktivite göstermiştir. Bu nedenle DPPH ve redükleyici güç ölçümü ile antioksidan aktivite sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz.

Demans, nörolojik bozukluklara veya rahatsızlıklara eşlik eden ve çoğunlukla yaşlı nüfusta görülen bir grup semptomdur. Bellek, düşünme, anlama, hesaplama ve dil gibi birden fazla bilişsel işlevin bozulması ile karakterizedir. Demansın en yaygın eşlik ettiği hastalıklar arasında Alzheimer (AD), Parkinson gibi nörodejeneratif bozukluklar sayılabilir. AD'nin patolojisi; yaşlılık plaklarında plazma β -amiloit ($A\beta$)'in hücre dışı birikimi, nörofibriler yumruların hücre içi oluşumu ve sinir sinapslarının ve piramidal nöronların kaybı ile karakterizedir. Bu patolojiyi destekleyen başlatıcı faktörler açıklığa kavuşturulmamasına rağmen, AD'nin merkezi sinir sistemindeki (CNS) ana nörotransmitter olan asetilkolin (ACh) düzeylerinin azalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Brühlmann vd., 2001, s. 3196).

AChE, ACh hidrolizinde ve AD gelişiminde rol oynayan başlıca enzim olarak düşünülmektedir. Kolinerjik hipoteze göre, AD ilerlemesi sırasında giderek kaybolan ACh düzeylerinin restorasyonu, bilişsel işlev kaybını geciktirir. Son yıllarda yapılan çalışmalar AChE inhibitörlerinin nöropsikiyatrik AD hastalarında semptomları azaltabilir ve sinaptik bölgede ACh düzeylerini artırarak bilişsel yeteneğe faydalı etkiler sağlayabilir (Meng vd., 2012, s. 4463).

AChE'nin inhibisyonu aynı zamanda senil demans, ataksi, Miyastenia gravis ve Parkinson hastalığı gibi diğer nörolojik rahatsızlıkların tedavisi için iyi bir strateji oluşturmaktadır.

Çeşitli nörodejeneratif süreçlerde patolojik olarak önemli olduğu düşünülen bir başka faktör, hastalığın ilerlemesi sırasında erken bir olay olarak AD'de patojen olarak anahtar rol oynayan oksidatif strestir. D vitamini gibi doğal antioksidanların yokluğunun bir fare modelinde AD'yi şiddetlendirdiği ve artmış serbest radikal seviyelerinin, AD'in gelişimini arttırdığı bilinen inflamatuvar sürece katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Custódio vd., 2012, s. 135) .

Nörolojik rahatsızlıkların gelişiminde çeşitli metallerin beyinde birikmesinin de rol oynadığı tesbit edilmiştir. Örneğin, demir homeostazındaki değişiklikler, hipokampusta ve serebral kortekste değişen demir, ferritin ve transferrin seviyelerinin artışı AD hastalarında görülen farklılıklardır. Demir, A β 'in birikimine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, demir ve diğer redoks aktif metallerin (örneğin bakır) şelasyonunu içeren terapiler, AD'de değerli bir strateji olarak düşünülmektedir (Liu vd., 2005, s. 247). Oksidatif stres nedeniyle oluşan serbest radikallerin beyinde nöron ve metal akümülyasyonuna verdiği hasar AD'nin patojenezine doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle AD'ye karşı kullanılan terapötik bir ajanın hem asetilkolin esteraz inhibitörü, hem de metal şelatlayıcı antioksidan -hastalığın patojenezinde oluşan β -amiloit plaklarda metal birikimi nedeniyle- özelliğe sahip olması tedavide önem taşımaktadır (Şenol vd., 2012, s. 803).

Çalışılan *Gentiana* türlerine ait ekstre ve fraksiyonların asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) inhibitör aktivite sonuçları referans maddeler donepezil, takrin ve galantamin ile karşılaştırıldığında 250 μ g/mL konsantrasyonda sadece % 74.82 inhibisyon gösteren *G. olivieri* metanol ekstresinin (GOME) yüksek BChE inhibitör aktivite gösterdiği, diğer türlere ait metanol ekstralarının ise daha düşük AChE ve BChE inhibitör aktivite gösterdiği bulunmuştur. Şenol vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada en yüksek AChE inhibitör aktiviteyi *G. verna* türüne ait çiçeklerin diklorometan ekstresi (% 53.65 \pm 1.03) gösterirken, en yüksek BChE inhibitör aktivite *G. cruciata* köklerinin etil asetat ekstresinde görülmüştür (Şenol vd., 2012, s. 804).

AChE ve BChE inhibitör aktivite sonuçları ve metal şelatlayıcı antioksidan aktivite sonuçları karşılaştırıldığında AChE'yi 0.2 mg/mL konsantrasyonda belirgin bir şekilde

inhibe eden GGME (% 39.30)'nin aynı konsantrasyonda zayıf metal şelatlayıcı aktivite (% 18.92) gösterdiği ancak yüksek BChE inhibitör aktivite gösteren GOME (% 70.19)'nin % 50.04 inhibisyon yüzdesiyle belirgin metal şelatlayıcı etki gösterdiği görülmüştür. 0.2 mg/mL'de yüksek metal şelatlayıcı etki gösteren GCME (% 56.95), GAME (% 57.49) ve GBOME (% 61.48), aynı konsantrasyonda AChE'yi sırasıyla % 25.75, 26.00, 17.88 oranında inhibe ederek ve BChE'yi sırasıyla % 21.69, 26.40 ve 18.64 oranında inhibe ederek düşük kolinesteraz etki göstermiştir.

Gentiana türlerinden elde edilen metanol ekstralarının MAO-A ve MAO-B inhibitör aktivite sonuçları sentetik MAO-A inhibitörü klorjilin ile (% 84.75 inhibisyon) karşılaştırıldığında, 250 µg/mL konsantrasyonda *G. pyrenaica*, *G. brachyphylla* ve *G. verna* subsp. *pontica* metanol ekstralarının sırasıyla % 75.18, 67.86 ve 64.35 inhibisyonla yüksek MAO-A inhibitör aktivite gösterdikleri; MAO-B inhibitörü selejilinle (% 93.05 inhibisyon) karşılaştırıldığında ise *G. pyrenaica* metanol ekstresinin % 75.90 düzeyinde inhibisyon ile yüksek MAO-B inhibitör aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir. Söz konusu 3 türün ham metanol ekstralarının yüksek MAO inhibitör etki profillerinden yola çıkılarak farklı polaritede fraksiyonları hazırlanmış (diklorometan, etilasetat ve metanol), yine metanol fraksiyonlarının MAO A-B inhibitör etki bakımından öne çıktığı görülmüştür. Bu bağlamda, metanol fraksiyonlarının fitokimyasal analizi yapıldığında özellikle 250 µg/mL konsantrasyonda % 78.25 MAO-A, % 77.10 MAO-B inhibitör etki gösteren *G. pyrenaica* metanol fraksiyonunun yüksek miktarda flavonoit bileşiklerinden orientin başta olmak üzere viteksin ve izoviteksin içerdiği tespit edilmiştir. Literatür verilerimize göre; farklı sınıflara ait flavonoit bileşiklerinin MAO-A ve B inhibitör etkileri olduğu ve Alzheimer, Parkinson gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda tedavi edici etki gösterdikleri bilinmektedir (Jäger ve Saaby, 2011, s. 1471). Bu bilgi, *G. pyrenaica* metanol fraksiyonunun yüksek miktarda tespit edilen flavonoit içeriği, ekstrenin yüksek MAO inhibitör etkisini kanıtlar niteliktedir.

'Bazı *Gentiana* türleri üzerinde farmakognozik araştırmalar' adlı doktora tezinde *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstralarından hazırlanan sulu fraksiyonlarının MAO-A inhibisyonu etkisi test edilmiş, *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerine ait su fraksiyonlarının ve *G. verna* subsp. *pontica*'ya ait su fraksiyonundan izole

edilen iki benzofenon glikozitinin MAO-A enzim inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir (Kaya, 2013, s. 195).

Ayrıca Kaya vd. tarafından 2014'te yapılan araştırmada, *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *Gentiana verna* subsp. *pontica* türlerine ait metanol ekstrelerinin sulu fraksiyonlarının MAO-A inhibitör aktiviteleri çalışılmış; *G. verna* subsp. *pontica* metanol ekstresinden hazırlanan sulu fraksiyonundan izole edilen 2,4,3',4'-tetrahidroksi-benzofenon-6-*O*- β -glukopiranozit ve 2,4,3'-trihidroksi-benzofenon-6-*O*- β -glukopiranozit benzofenon glikozitleri MAO-A enzimini belirgin bir şekilde inhibe etmiş olup IC₅₀ değerleri sırasıyla 31.3 \pm 4 μ M ve 41.0 \pm 4.7 μ M olarak bulunmuştur (Kaya vd., 2014, s. 505).

Genotoksik etkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan *A. cepa* kök ucu testi; değişik bileşenlerin bulunduğu bir bitki içeriğinin test edildiği sıvı ile direkt ilişkili olarak gelişen köklerin kullanıldığı ve ökaryotlarda olası DNA hasarlarını tahmin etmeyi sağlayan önemli bir testtir. Test verileri tüm hayvan ve bitki çeşitleri için fikir vermekte olup, bu yöntem temel mutajenite testi niteliğindedir. Canlı sistemlerdeki mutajenler ya da potansiyel karsinojenler kromozom değişimlerinin gözlenmesi süresince hasar etkilerinin gözlenmesini sağlayan, hasarı ölçmede kullanılabilen birkaç yöntemden biridir (Fiskesjo, 1985, s. 99; Pastori vd., 2013, s. 1249, Tedesco ve Launghinghouse, 2012, s. 137).

Bu çalışmada, üç farklı konsantrasyonda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) *Gentiana* türlerinden elde edilen metanol ekstreleri ile *A. cepa* kök ucu testi gerçekleştirilmiştir. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda ekstrele ait mikroskopik incelemelerde herhangi bir nükleus anomalisine rastlanmamıştır. Elde edilen MI (Mitotik İndex) değerleri (Çizelge 4.20) incelendiğinde, kontrol grubuna göre ekstrele ait MI değerlerinde azalma gözlenmiştir. MI değerindeki azalmanın konsantrasyon artışına bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalarda da MI değerlerinde azalma gözlenirse de herhangi bir nükleus anomalisine rastlanmamıştır (Chukwujekwu ve Van Staden 2014, s. 147; Cardoso vd., 2014, s. 886). En düşük MI değerleri 0.5 mg/mL konsantrasyonda GCME (4.4), GSME (4.4), GOME (5.1) ve GPME (5.6)'de görülmüştür. 0.5 mg/mL konsantrasyonda belirtilen türlerin metanol ekstrelerinin uygulandığı *A. cepa* kök uçlarında mitozun yavaşladığı açıkça görülmektedir (Çizelge 4.20 ve Görsel 4.2-4.13).

MI değerindeki azalma, profazın başlamasının engellenmesi ve mitoz fazlarından bir ya da birkaçında durma ya da mitoz sırasında hücre ilerleme oranının yavaşlaması nedeniyle oluşmaktadır (Chukwujekwu ve Van Staden 2014, s. 147). Sonuç olarak, uygulanan *Gentiana* türlerine ait metanol ekstrelerinin konsantrasyonu arttıa *A. cepa* hücrelerinin mitozu geçişlerinin yavaşladığı ve MI değerlerinin düştüğü görülmektedir. MI değerindeki azalmanın kromozomal veya DNA hasarı dışında *A. cepa* hücrelerinde mitozu indükleyen mekanizmaların herhangi birinin bloklanması yoluyla olabileceği tahmin edilmektedir.

DNA'nın yapısında meydana gelen genom düzeyindeki minör değişikliklerin kromozomal yöntemler ile belirlenmesi mümkün değildir. Moleküler seviyedeki genotoksik etkinin belirlenmesi için yeni, ekonomik ve hızlı yöntemler geliştirilmiştir (Atienzar ve Jha, 2006, s. 613; Zhou vd., 2011, s. 225; Martins vd., 2005, s. 755). PCR tabanlı moleküler markırlar, mutajenler tarafından indüklenen genom düzeyindeki mutasyonları belirlemede etkili araçlardır (Perera vd., 2015, s. 10). DNA da meydana gelen mutasyonları tespit etmek için kullanılan PCR güvenilir bir yöntemdir. Bu çalışmada sağladığı birçok avantajdan dolayı RAPD ve ISSR yöntemi kullanılmıştır. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ile test maddesi uygulanmış grupların DNA rneklerinin karşılaştırılmasında, kontrol grubuna göre test gruplarında meydana gelen olası bant kaybı veya yer değiştirmesi gibi gözlenen değişimler, uygulanan maddeye bağlı genotoksik etkiyi göstermektedir (Bakry vd., 2015, s. 24).

Bu çalışmada, 10 farklı *Gentiana* türüne ait metanol ekstrelerinin 3 farklı konstrasyonda *A. cepa* bitkisi üzerinde genotoksik etkisinin olup olmadığının, RAPD-PCR ve ISSR-PCR tekniği ile DNA dizilerindeki olası değişimleri gözlemleyerek ortaya çıkartılması amacıyla yapılan her iki PCR yöntemi için amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Değerlendirmeye yönelik en verimli sonuçlar RAPD primerler arasından RAPD-P9 ve ISSR primerler arasından ISSR-1 ile gözlenmiş, diğer primer verileri ile de sonuçlar desteklenmiştir. RAPD-OPC 07 primerinin de benzer şekilde verimli analiz sonuçlarına sahip olduğu görülmüştür. RAPD-OPC 04, RAPD-OPD 09, ISSR-847 primerleri tür içi ayırım yapan ve çok fazla non-spesifik bant içeriğinden dolayı değerlendirmede en az verime sahip primerler olarak gözlenmiştir. *G. asclepiadea*, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. olivieri*, *G. pyrenaica*, *G. septemfida*, *G. verna* subsp. *pontica*, *G. verna* subsp. *balcanica* türlerine ait metanol ekstrelerinin

0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL uygulama konsantrasyonlarına bağılı olarak tür içi korunmuş bantlarda önemli bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. Non-spesifik bantlar göz ardı edilerek yapılan değerlendirmede, korunmuş bantlarda konsantrasyon artışına bağılı olarak herhangi bir kaybolma veya yer değiştirmeye bu iki primerde rastlanmamıştır. En yüksek uygulama konsantrasyonu olan 0.5 mg/mL konsantrasyonda test grubunda, bant değişimi olduğu düşünülen GPME, GBOME, GSME ve GVBME ekstrelerinin amplifikasyon sonuçları, bu örnekler için konsantrasyon artışına bağılı olarak 0.5 mg/mL konsantrasyonda DNA'da düşük düzeyde genotoksik etki olabileceğini göstermektedir. Bu konsantrasyonlar için RAPD-P9 primer amplifikasyonunda gözlenen bant değişimleri, ISSR-1 primeri amplifikasyon sonucu ile karşılaştırıldığında, aynı örneklerde bantların korunmuş olduğu ve değişim olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında *Gentiana* ekstrelerinin test edilen 0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL konsantrasyonlarda *A. cepa* bitkisinin DNA'sı üzerinde ciddi bir genotoksik etkiye sahip olmadığı grlmştir. *A. cepa* kök ucu testi sonuçlarına göre 0.5 mg/mL konsantrasyonda en düşük MI değerine sahip metanol ekstrelerinden GPME (5.6) ve GSME (4.6)'nin PCR sonuçlarına göre aynı konsantrasyonda bant değişimine neden olarak düşük düzeyde genotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir (Görsel 4.14-4.19). Genotoksik aktivite deneyleri olan *A. cepa* kök ucu testi ve PCR yöntemlerinin sonuçlarının birbirini destekleyici nitelikte olduğu görülmektedir.

Ayrıca, *G. asclepiadea*, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. cruciata*, *G. gelida*, *G. olivieri*, *G. pyrenaica*, *G. septemfida*, *G. verna* subsp. *pontica*, *G. verna* subsp. *balcanica* türlerinin toprak üstü kısımlarını genotoksik aktiviteleri bu çalışmada ilk kez incelenmiştir.

Literatür taramalarında sadece *G. asclepiadea* ieklerinden ve köklerinden hazırlanan ekstre ve fraksiyonların genotoksik aktivite çalışmalarına rastlanmıştır. *G. asclepiadea* ieklerinden hazırlanan metanol ekstresinin 0.25-2.5 mg/mL konsantrasyon aralığında genotoksik etki göstermediği, 5 ve 25 mg/mL konsantrasyonlarda genotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Hudecov vd., 2010, s. 101). Ayrıca, başka bir çalışmada da *G. asclepiadea* kök ekstresinden hazırlanan fraksiyonların, EMS ile alkilasyon sonucu indüklenen DNA hasarına karşı antigenotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Mihailoviç vd., 2013, s. 807).

Sonuç olarak, *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. olivieri* ve *G. septemfida* türlerinin antioksidan ve antikolinesteraz; *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerinin MAO-A inhibitör etkileri daha önceden çalışılmışken, bu tez *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. gelida*, *G. pyrenaica*, *G. verna* subsp. *balcanica* ve *G. verna* subsp. *pontica* türlerinin antioksidan, antikolinesteraz etkileri; *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. boissieri*, *G. brachyphylla*, *G. gelida*, *G. olivieri* ve *G. septemfida* türlerinin MAO-A, tüm türlerin MAO-B inhibitör etkileri, *G. asclepiadea* hariç diğer türlerin genotoksik etkileri ve tüm türlerin antiinflamatuvar (COX-1 ve COX-2 inhibitör etki) etkileri ilk kez bu çalışmada bildirilmiştir.

Ayrıca ülkemiz için endemik bir tür olan *G. boissieri*'nin fitokimyası ve biyolojik aktiviteleri bu tezde ilk kez incelenmiştir.

Bu nedenlerle tezin ülkemizde yetişen *Gentiana* türleri hakkındaki bilimsel çalışmalara farklı bir bakış açısı getirerek, türlerin toprak üstü kısımlarının zengin flavonoit içeriklerinin hala kesin bir tedavisi bulunamayan farklı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde değerlendirilebilmesi için multidisipliner fitokimyasal ve farmakolojik çalışmalar hedeflemekteyiz.

KAYNAKÇA

- Akinboro, A. and Bakare, A.A. (2007). Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *J. Ethnopharmacol.*, 112, 470-475.
- Amakura, Y., Yoshimura, M., Morimoto, S., Yoshida, T., Tada, A., Ito, Y., Yamazaki, T., Sugimoto, N., Akiyama, H. (2016). Chromatographic Evaluation and Characterization of Components of Gentian Root Extract Used as Food Additives. *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 78-82.
- Anand, P. and Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res.*, 36(4), 375-399.
- Atienzar, F.A. and Jha, A.N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutat Res.*, 613, 76-102.
- Azman, N.A.M., Segovia, F., Martínez-Farré, X., Gil, E. and Almajano, M.P. (2014). Screening of antioxidant activity of *Gentiana lutea* root and its application in oil-in-water emulsions. *Antioxidants*, 3(2), 455-471.
- Bakry, F.A., Ismail, S.M., El-Atti, M.S.A. (2015). Glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails. *Pestic Biochem. Phys.*, 123, 24-30.
- Baran, E., Çakır, A. and Yazıcı, B. (2016). Inhibitory effect of *Gentiana olivieri* extracts on the corrosion of mild steel in 0.5 M HCl: Electrochemical and phytochemical evaluation. *Arab J Chem.*, p2.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. ve Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 25-30.
- Bridel, M. (1913). Gentiopicroin in the Leafy. Stems of *Gentiana ascepiadea* L., *Gentiana cruciata* L., and *Gentiana lutea* L. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 7, 486-92.
- Brühlmann, C., Ooms, F., Carrupt, P. A., Testa, B., Catto, M., Leonetti, F., Altomare, C. and Carotti, A. (2001). Coumarins derivatives as dual inhibitors of acetylcholinesterase and monoamine oxidase. *J. Med. Chem.*, 44(19), 3195-3198.

- Cai, W., Xu, H., Xie, L., Sun, J., Sun, T., Wu, X. and Fu, Q. (2016). Purification, characterization and *in vitro* anticoagulant activity of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots. *Carbohydr Polym.*, 140, 308-313.
- Cardoso, G. H. S., Dantas, E. B. S., Sousa, F. R. C., Peron, A.P. (2014). Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) in plant test system. *Braz. J. Biol.*, 74(4), 886-889.
- Chu, B., Shi, Y., Li, Z., Tian, H., Li, W. and Wang, Y. (2015). Optimization of Gentsides Extraction from *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. by Response Surface Methodology. *J Anal Methods Chem.*, 2015, 1-8 .
- Chukwujekwu, J.C. and Van Staden, J. (2014). Cytotoxic and genotoxic effects of water extract of *Distephanus angulifolius* on *Allium cepa* Linn. *S. Afr. J. Bot.*, 92, 147-150.
- Custódio, L., Justo, T., Silvestre, L., Barradas, A., Duarte, C. V., Pereira, H., Barreira, L., Rauter, A.P., Alberício, F. and Varela, J. (2012). Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chem.*, 131(1), 134-140.
- Çakıroğlu, G. (2009). Asetilkolinesteraz İnhibitörleri Olarak Bazı Piridin Türevleri Üzerinde Sentez ve Biyoaktivite Çalışmaları, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Çalis, I., Ersöz, T., Chulia, A. J. and Rüedi, P. (1992). Septemfidocide: a new bis-iridoid diglucoside from *Gentiana septemfida*. *J Nat Prod.*, 55(3), 385-388.
- Çalış, İ., Rügger, H., Chun, Z. and Sticher, O. (1990). Secoiridoid glucosides isolated from *Gentiana gelida*. *Planta Med.*, 56(04), 406-409.
- Davis, P.H. (1978). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, Vol. 6, p. 176.
- Deliorman Orhan, D., Aslan, M., Aktay, G., Ergun, E., Yesilada, E., Ergun, F. (2003). Evaluation of hepatoprotective effect of *Gentiana olivieri* herbs on subacute administration and isolation of active principle. *Life Sciences*, 72, 2273-2283.
- Edis, M. (2003) Türkiye’de yetişen bazı *Gentiana* L. türlerinin izoorientin yönünden değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Ellman, G. L., Courtney, K.D., Andres, J.R.V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7(2), 88-95.
- Ersöz, T. (1988). *Gentiana olivieri* Griseb. Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. *Doktora Tezi*. Hacettepe Üniversitesi. Ankara.
- European Medicines Agency (EMA) (2009). Assessment Report on *Gentiana lutea* L., Radix, (Doc.Ref. :EMA/HMPC/578322/2008), Committee on Herbal Medicinal Products, London, UK.
- Fiskesjo, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99-112.
- Garcia, J., Lavaitte, S. and Gey, C. (1989). 8-Epikingiside and its vanillate ester, isolated from *Gentiana pyrenaica*. *Phytochemistry*, 28(8), 2199-2201.
- Garcia, J., Mpondo, E. M. and Kaouadji, M. (1990). Kingiside and derivative from *Gentiana pyrenaica*. *Phytochemistry*, 29(10), 3353-3355.
- Garcia, J., Mpondo, E. M. and Nardin, R. (1989). Loganin and a new iridoid glucoside from *Gentiana pyrenaica*. *JNPR*, 52(2), 423-425.
- Garcia, J., Mpondo, E. M., Cartier, G. and Gey, C. (1989). Secoiridoids and a phenolic glucoside from *Gentiana pyrenaica*. *JNPR*, 52(5), 996-1002.
- Garcia, J., Mpondo, E. M., Chulia, A. J., Kaouadji, M. and Cartier, G. (1989). Two phthalide glucosides from *Gentiana pyrenaica*. *Phytochemistry*, 28(6), 1759-1760.
- Garcia, J., Mpondo, E. M., Kaouadji, M. and Mariotte, A. M. (1989). Arbutin derivatives in *Gentiana pyrenaica*. *JNPR*, 52(4), 858-860.
- Goetz, M., Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A. (1976). C-glucosides flavoniques et xanthoniques de *Gentiana cruciata*. *Phytochemistry*, 15(12), 2015.
- González-López, Ó., Pinto, C. G. and Casquero, P. A. (2015). Secoiridoids glycosides and root development in *Gentiana lutea* L. subsp. *aurantiaca* M. Lainz from the Northwest of the Iberian Peninsula. *Ind Crops Prod.* 77, 932-939.
- Han, Y. N., Choo, Y., Lee, Y., Moon, Y., Kim, S. D. and Choi, J. (2001). Monoamine oxidase B inhibitors from the fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Arch Pharm Res.*, 24(1), 51-54.

- Haraguchi, H., Tanaka, Y., Kabbash, A., Fujioka, T., Ishizu, T. and Yagi, A. (2004). Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*. *Phytochemistry*, 65(15), 2255-2260.
- Hostettmann, K. and Jacot-Guillarmod, A. (1974). Phytochemistry of *Gentiana*. VII. Flavonic and xanthonic compounds *Gentiana verna* leaves. *Helv. Chim. Acta.*, 57, 1155-1158.
- Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A. (1975). Phytochemistry of the *Gentiana* genus. X. Flavonic and xanthonic compounds in the leaves of *Gentiana verna*. *Helv. Chim. Acta.*, 58(1), 130-132.
- Houghton, P. J., Ren, Y. and Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 23(2), 181-199.
- Huang, C. Y., Hsu, T. C., Kuo, W. W., Liou, Y. F., Lee, S. D., Ju, D. T., Kuo, C. H. and Tzang, B. S. (2015). The root extract of *Gentiana macrophylla* Pall. alleviates cardiac apoptosis in lupus prone mice. *PLoS One*, 10(5), e0127440.
- Hudecová, A., Hasplová, K., Miadoková, E. (2010). Cytotoxic and genotoxic effect of methanolic flower extract from *Gentiana asclepiadea* on COS 1 cells. *Neuroendocrinol Lett.*, 31, 21-25.
- Hudecová, A., Hašplová, K., Miadoková, E., Magdolenová, Z., Rinna, A., Collins, A. R., Gálová, E., Vaculčíková, D., Gregář F. and Dušinská, M. (2012). *Gentiana asclepiadea* protects human cells against oxidation DNA lesions. *Cell Biochem Funct.*, 30, 101-107.
- J. M. Al-Fartosy, A. (2011). Antioxidant properties of methanolic extract from *Inula graveolens* L. *Turk. J. Agric. For.*, 35, 591-596.
- Jäger, A. K. and Saaby, L. (2011). Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16(2), 1471-1485.
- Jia, N., Chu, W., Li, Y., Ding, L., Duan, J., Cui, J., Cao, S., Zhao, C., Wu, Y. And Wen, A. (2016). Iridoid glycosides from the flowers of *Gentiana macrophylla* Pall. ameliorate collagen-induced arthritis in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 189, 1-9.
- Kaldas, M., Miura, I. and Hostettmann, K. (1978). Campestroside, a new tetrahydroxanthone glucoside from *Gentiana campestris*. *Phytochemistry*, 17(2), 295-297.

- Kaya, D. (2013). Bazı *Gentiana* Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar. *Doktora Tezi*. Hacettepe Üniversitesi. Ankara.
- Kaya, D., Jager, A. K., Yalçın, F. N. and Ersöz, T. (2014). MAO-A inhibition profiles of some benzophenone glucosides from *Gentiana verna* subsp. *pontica*. *Nat. Prod. Rep.*, 9(4), 505-506.
- Kaya, D., Yalçın, F. N., Bedir, E., Çalış, İ., Steinhauser, L., Albert, K. and Ersöz, T. (2011). New benzophenone glucosides from the aerial parts of *Gentiana verna* L. subsp. *pontica* (Soltok.) Hayek. *Phytochem. Lett.*, 4(4), 459-461.
- Kesavan, R., Chandel, S., Upadhyay, S., Bendre, R., Ganugula, R., Potunuru, U. R., Giri, H., Sahu, G., Kumar, P. D., Reddy, G. B., Joksic, G., Bera, A. K. and Dixit, M. (2016). *Gentiana lutea* exerts anti-atherosclerotic effects by preventing endothelial inflammation and smooth muscle cell migration. *Nutr Metab. Cardiovasc. Dis.*, 26(4), 293-301.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K. ve Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agr. Food Chem.*, 50, 2161-2168.
- Kitanov, G. M. and Spassov, S. L. (1992). A naphthodipyranodione from *Gentiana asclepiadea*. *Phytochemistry*, 31(3), 1067-1068.
- Kitanov, G. M., Dam The Van, A. I. (1991). Chemical composition of *Gentiana asclepiadea* root. *Khim. Prir. Soedin.*, (3), 425-7.
- Köhlein, F. (1991). *Gentians*, London, 183.
- Kubota, T. and Kamikawa, T. (1962). Derivation of gentianin from gentiopicrin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 35(6), 1046.
- Kusakari, K., Fukuhara, T., Motoyama, A., Ochiai, N., Watanabe, T. and Sugimoto, Y. (2016). The corrected structure of depressoside, an antioxidative iridoid glucoside extracted from the flowers of *Gentiana urnula* Harry Sm. *Nat. Prod. Res.* 30(8), 954-959.
- Küpel, E., Aslan, M., Gürbüz, I. and Yeşilada, E. (2004). Evaluation of *in vivo* biological activity profile of isoorientin. *Z Naturforsch C.*, 59, 787-790.
- Lee, Y. L., Yen, M. T., Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chem.*, 104(1), 1-9.

- Li, J., Gao, L., Sun, K., Xiao, D., Li, W., Xiang, L., Qi, J. (2016). Benzoate fraction from *Gentiana rigescens* Franch alleviates scopolamine-induced impaired memory in mice model *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.*, 193, 107-116.
- Li, W., Li, L. Y., Zhou, W., Hwang, I., Ma, J. Y. and Kim, Y. H. (2015). Triterpenoids isolated from the rhizomes and roots of *Gentiana scabra* and their inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Arch Pharm Res*, 38(12), 2124-2130.
- Li, W., Zhou, W., Shim, S. H., Kim, Y. H. (2015). Chemical constituents of the rhizomes and roots of *Gentiana scabra* (Gentianaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 61, 169-174.
- Li, Y., Li, R., Yuan, L., Chang, Y., Wang, X., Chen, L. (2015). Chemical constituents from flower of *Gentiana tibetica*. *Zhongcaoyao*, 46(14), 2052-2056.
- Liu, G., Garrett, M. R., Men, P., Zhu, X., Perry, G., & Smith, M. A. (2005). Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1741(3), 246-252.
- Mansoor, A., Zaidi, M. I. and Malghani, M.A.K. (2000). Isolation of bioactive alkaloids from *Gentiana olivieri* and its non-toxic effect. *Pakistan J Bot*, 32(1), 105-109.
- Marston, A., Hostettmann, K. and Jacot-Guillarmod, A. (1976). Contribution to the phytochemistry of genus *Gentiana*, XIX: Identification of new C-glycosylflavones in *Gentiana pyrenaica* L. *Helv. Chim. Acta.*, 59(7), 2596-600.
- Martins, N., Lopes, I., Brehm, A. and Ribeiro, R. (2005). Cytochrome B gene partial sequence and RAPD analysis of two *Daphnia longispina* lineages differing in their resistance to copper. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74, 755-760.
- Meng, F. C., Mao, F., Shan, W. J., Qin, F., Huang, L. and Li, X. S. (2012). Design, synthesis, and evaluation of indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors and metal-chelating agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22(13), 4462-4466.

- Menkovic, N., Juranic, Z., Stanojkovic, T., Raonic-Stevanovic, T., Savikin, K., Zdunić, G., Borojevic, N. (2010). Radioprotective activity of *Gentiana lutea* extract and mangiferin. *Phytother Res.*, 24, 1693-1696.
- Mihailović, V., Katanić, J., Mišić, D., Stanković, V., Mihailović, M., Uskoković, A., Arambašić, J., Solujić, S., Mladenović, M. and Stanković, N. (2014). Hepatoprotective effects of secoiridoid-rich extracts from *Gentiana cruciata* L. against carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Food Funct.*, 5, 1795-1803.
- Mihailović, V., Matić, S., Mišić, D., Solujić, S., Stanić, S., Katanić, J., Mladenović, M. and Stanković, N. (2013). Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of different fractions of *Gentiana asclepiadea* L. Roots Extract. *EXCLI Journal*, 12, 807-823.
- Mihailović, V., Mihailović, M., Uskoković, A., Arambašić, J., Mišić, D., Stanković, V., Katanić, J., Mladenović, M., Solujić and S., Matić, S. (2013). Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 52, 83-90.
- Mihailović, V., Mišić, D., Matić, S., Mihailović, M., Stanić, V., Vrvic, M. M., S., Katanić, J., Mladenović, M., Stanković, N., Boroja, T. and Stanković, M. S. (2015). Comparative phytochemical analysis of *Gentiana cruciata* L. roots and aerial parts, and their biological activities. *Ind. Crops Prod.*, 73, 49-62.
- Mihailovic, V., Vukovic, N., Niciforovic, N., Solujic, S., Mladenovic, M., Maskovic, P. and Stankovic, M. S. (2011). Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L. *J. Med. Plants Res.*, 5(7), 1164-1174.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- Mpondo, E. M. and Garcia, J. (1990). Two iridoid glucosides from *Gentiana verna*. *Phytochemistry*, 29(2), 643-644.
- Mpondo, E.M. and Chulia, A. J. (1988). 6'-O- β -d-Glucosyl gentiopicroside: a new secoiridoid from *Gentiana asclepiadea*. *Planta Med.*, 54(02), 185-186.
- Mpondo, E.M. and Garcia, J. (1989). Iridoids from *Gentiana verna*. *Phytochemistry*, 28(9), 2503-2504.

- Mpondo, E.M. and Garcia, J. (1990). Secologanin and derivatives from *Gentiana verna*. *Planta Med.*, 56(01), 125-125.
- Mpondo, E.M., Garcia, J. and Lestani, J. (1989). New secoiridoid glucosides from *Gentiana verna*. *J. Nat. Prod.*, 52(5), 1146-1149.
- Mustafa, A. M., Maggi, F., Öztürk, N., Öztürk, Y., Sagratini, G., Torregiani, E., Vittori, S. and Caprioli, G. (2016). Chemical and biological analysis of the by-product obtained by processing *Gentiana lutea* L. and other herbs during production of bitter liqueurs. *Ind. Crops Prod.*, 80, 131-140.
- Mustafa, A.M., Caprioli, G., Dikmen, M., Kaya, E., Maggi, F., Sagratini, G., Vittori, S. and Öztürk, Y. (2015). Evaluation of neurotogenic activity of cultivated, wild and commercial roots of *Gentiana lutea* L. *J. Funct. Foods*, 19, 164-173.
- Nikitina, I.K. and Bukreeva, T. V. (1967). Flavonoids of *Gentiana septemfida*. *Trudy Leningradskogo Khimiko-Farmatsevticheskogo Instituta*, 21, 162-166.
- Olennikov, D.N. and Chirikova, N.K. (2016). Algidisides I and II. New iridoid glycosides from *Gentiana algida*. *Chem. Nat. Compd.*, 52 (4), 637-641.
- Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K. and Tankhaeva, L.M. (2015). Iridoids and flavonoids of four Siberian gentians: Chemical profile and gastric stimulatory effect. *Molecules*, 20(10), 19172-19188.
- Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K., Koryakina, L.P. and Vladimirov, L.N. (2015). Bitter gentian teas: Nutritional and phytochemical profiles. Polysaccharide characterisation and bioactivity. *Molecules*, 20, 20014-20030.
- Orhan, I. and Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *J. Food Comp. Anal.*, 24, 386-390.
- Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yılmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Şener, B. and Choudhary, M. I. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chem.*, 103, 1247-1254.
- Öztürk, N. (1997). *Gentiana lutea* ssp. *symphyandra* Murb. (Hayek) İridoitleri. *Doktora Tezi*. Anadolu Üniversitesi. Eskişehir.
- Öztürk, N., Korkmaz, Y., Öztürk, Y. and Başer, K.H.C. (2006). Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian

- (*Gentiana lutea* ssp. *symphyandra*), on cultured chicken embryonic fibroblasts. *Planta Med.*, 72, 289-294.
- Öztürk, N., Tunçel, M., Tunçel, N.B. (2007). Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 30, 587-596.
- Pan, Y., Zhang, J., Shen, T., Zhao, Y., Zuo, Z., Wang, Y. and Li, W. (2016). Investigation of chemical diversity in different parts and origins of ethnomedicine *Gentiana rigescens* Franch using targeted metabolite profiling and multivariate statistical analysis. *Biomed. Chromatog.*, 30, 232-240.
- Pan, Y., Zhang, J., Zhao, Y.L., Wang, Y.Z. and Huang, H.Y. (2015). Investigation of metabolites accumulation in medical plant *Gentiana rigescens* during different growing stage using LC-MS/MS and FT-IR. *Bot. Stud.*, 56(1), 1-9.
- Pan, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Li, W. and Wang, Y. (2016). Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae). *Chem. Biodiversity*, 13, 107-150.
- Pastori, T., Flores, F. C., Boligon, A. A., Athayde, M. L., de Bona da Silva, C., do Canto-Dorow, T. S. and Tedesco, S. B. (2013). Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system. *Pharm. Biol.*, 51(10), 1249-1255.
- Perera, D., Barnes, D. J., Baldwin, B. S. and Reichert, N. A. (2015). Mutagenesis of *in vitro* cultures of *Miscanthus × giganteus* cultivar Freedom and detecting polymorphisms of regenerated plants using ISSR markers. *Ind. Crops Prod.*, 65, 10-116.
- Pritchard, N. M. (1978). *Gentiana*. In: Davis PH, editor, Flora of Turkey and East Aegean Islands. Vol. 6. Edinburgh, Edinburgh University Press, p. 183-190.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26 (9-10), 1231-7.
- Rodriguez-Delgado, M.A., Malovaná, S., Perez, J.P., Borges, T. and Montelongo, F.G. (2001). Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr.*, 912(2), 249-257.

- Rulko, F. (1976). Isolation and study of the structure of alkaloids from Gentianaceae plants. *Prace Naukowe Akademii Medycznej we Wroclawiu*, 8(1), 3-36.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H. and Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.*, 51(3), 571-581.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A. and Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agr.*, 76(2), 270-276.
- Savikin-Fodulovic, K., Jankovic, T., Krstic, D., Menkovic, N., Edited By: Majumdar, D. K., Govil, J. N., Singh, V. K. (2003). Xanthone compounds in some Gentianaceae species growing in Serbia and Montenegro. *J. Med. Plants*, 8, 371-401.
- Sezik, E., Aslan, M., Yesilada, E. and Ito, S. (2005). Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. *Life Sciences*, 76(11), 1223-1238.
- Shen, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Wang, Y. and Zhang, Q. (2016). Discrimination of *Gentiana rigescens* with different processing methods by using FTIR spectroscopy. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 36(5), 1369-1373.
- Shen, Y., Zhao, Y., Zhao, J., Zuo, Z., Wang, Y. and Zhang, Q. (2016). Different parts of wild and cultivated *Gentiana rigescens* with Fourier transform infrared spectroscopy. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 36(3), 667-671.
- Shon, M., Kim, T. and Sung, N. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chem.*, 82, 593-597.
- Singh, S., Yadav, C.P.S. and Noolvi, M.N. (2012). Quantification of oleanolic acid in the flower of *Gentiana olivieri* Griseb. by HPLC. *JBCP*, 3(2), 241.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol.*, 299, 152-178.
- Suyama, Y., Kurimoto, S. I., Kawazoe, K., Murakami, K., Sun, H.D., Li, S.L., Takaishi, Y. and Kashiwada, Y. (2013). Rigenolide A, a new secoiridoid

- glucoside with a cyclobutane skeleton, and three new acylated secoiridoid glucosides from *Gentiana rigescens* Franch. *Fitoterapia*, 91, 166-172.
- Şenol, F. S., Yağcı Tüzün, C., Toker, G. and Erdoğan Orhan, İ. (2012). An *in vitro* perspective to cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of five *Gentiana* species and *Gentianella caucasea*. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 63(7), 802-812.
- Takeda, Y., Masuda, T., Honda, G., Takaishi, Y., Ito, M., Ashurmetov, Ozodebek, Khodzhimatov, O., K. and Otsuka, H. (1999). Secoiridoid glycosides from *Gentiana olivieri*. *Chem Pharm. Bull.*, 47(9), 1338-1340.
- Tedesco, S.B. and Launghinghouse IV, H.D. (2012). Bioindicator of genotoxicity: The *Allium cepa* test. In: Tedesco S.B. and Launghinghouse IV H.D., eds. *Org. Environmental Contamination. Rijeka: Intech*, 137-56.
- Toker, G., Edis, M. and Yeşilada, E. (2011). Quantitative analysis of isoorientin in several Turkish *Gentiana* species by high performance liquid chromatography. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 36, 149-154.
- Vgquez, M.T., Rosell, G. and Pujol, M.D. (1997). Synthesis and anti-inflammatory activity of rat-2-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxin) propionic acid and its R and S enantiomers. *Eur. J. Med. Chem.*, 32, 529-534.
- Vinson, J.A. and Hontz, B.A. (1995). Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 43(2), 401-403.
- Wang, L., Duan, B., Nie, Q., Shang, F., Zhu, W. and Tao, R. (2015). Determination of three components in *Gentiana cephalantha* by HPLC. *Yiyao Daobao*, 34(4), 515-517.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- Wu, J., Zhao, Z., Wu, L. and Wang, Z. (2016). Authentication of *Gentiana straminea* Maxim. and its substitutes based on chemical profiling of iridoids using liquid chromatography with mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 1-6.

- Xingxian, Z., Kebin, H., Jiankun, N., Dunfeng, Z., Wenlong, C., Ping, Y. and Zhifeng, C. (2009). Process for preparation of loxoprofen sodium. Patent No: CN 101412670.
- Xu, H., Zheng, L. and Duo, B. (2015). Comparative analysis of the extracted volatile oil from *Gentiana apiata* N. E. Br. by means of MA and UME. *Xiandai Zhongyao Yanjiu Yu Shijian*, 29(1), 10-12.
- Xu, M., Wang, D., Zhang, Y. and Yang, C. (2005). A new secoiridoidal glucoside from *Gentiana rigescens* (Gentianaceae). *Acta Botanica Yunnanica*, 28(6), 669-672.
- Yalın, T. (2014). *Gentiana olivieri*'nin *in vitro* antitümöral aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.
- Yang, F., Tong, L., Rezengcaidan, L. and Wen-yuan, S. (2015). Determination of 4 kinds of components in Tibetan medicine *Gentiana straminea* by HPLC. *Zhongyaocai*, 38(7), 1439-1440.
- Yang, H., Que, S., Huang, H., Liu, H. and Jiang, Y. (2014). The chemical components of volatile oils in *Gentiana nubigenan* Edgew. *Medicinal Plant*, 5(11/12), 41-43.
- Yao, H.Q., Wu, L.H., Chou, G.X., Liu, Q. and Wang, Z.T. (2015). Two rare α -pyrone (= 2H-Pyran-2-one) derivatives from *Gentiana rhodantha* Franchet. *Helv. Chim. Acta*, 98(5), 657-662.
- Zhang, X., Mao, K., Zhang, P. and Xu, L. (2014). Screening of active part of *Gentiana macrophylla* Pall. in the liver protection. *Zhonghua Zhongyiyao Zazhi*, 29(12), 3933-3935.
- Zhou, L., Li, J., Lin, X. and Al-Rasheid, K.A.S. (2011). Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). *Aquat. Toxicol.*, 103, 225-232.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.