

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

**BAZI *VINCETOXICUM* N.M. WOLF (*ASCLEPIADACEAE*)
TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Uzm. Bio. Sevda GÜZEL ÖZAY

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze KÖKDİL

MERSİN – 2013

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

**BAZI *VINCETOXICUM* N.M. WOLF (*ASCLEPIADACEAE*)
TÜRLERİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Uzm. Bio. Sevda GÜZEL ÖZAY

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze KÖKDİL

Tez No:31

MERSİN-2013

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “**Bazı *Vincetoxicum* N.M. Wolf (*Asclepiadaceae*) Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar**” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi: 25/12/2012



Prof. Dr. Gamze KÖKDİL

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmakognozi Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ayşegül GÜVENÇ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR

Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü

Jüri Üyesi



Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ayşe EVEREST

Biyoloji Bölümü

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetin Kurulunun 07.01.2013..tarihli ve 2013/07...sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELİKOĞLU

Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim boyunca ve tez konumun seçilmesi, çalışmalarımın yönlendirilmesi sürecinde değerli yardım ve katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gamze KÖKDİL'e,

Hayatımın her aşamasında beni yalnız bırakmayan ve sürekli olarak her açıdan destekleyen kıymetli annem Zeynep GÜZEL, babam D. Yaşar GÜZEL, eşim Yusuf ÖZAY ve arazi çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan sevgili kardeşim Murat GÜZEL'e sonsuz teşekkürler.

Çalışma materyallerimin teşhisindeki katkılarından dolayı Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ahmet İLÇİM'e, biyolojik aktivite çalışmalarım sırasında insekt feedant/antifeedant ve antifungal aktivite çalışmalarını yapan Çek Cumhuriyeti Prag Crop Res. Inst. Öğretim üyesi Sayın Roman PAVELA'ya ve laboratuvar imkanlarından ve teknik hizmetlerinden yararlanma olanağı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM) Müdürü Sayın Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serkan GÜRGÜL ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Yahya NURAL'a; analizler sırasında yardımlarından dolayı Sayın Uzm. Esmâ YORULMAZ ve Sayın Uzm. Tuncay İNCE'ye ve Arş. Gör. Ş. Selma URAS GÜNGÖR, Samet BELVEREN ve Müge GEMİLİ'ye teşekkürler.

Doktora eğitimim süresince 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs vererek beni destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı) teşekkürler.

Sevda GÜZEL ÖZAY

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
KROMATOGRAMLAR DİZİNİ	xvii
SPEKTRUMLAR DİZİNİ	xix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xx
ÖZET	xxiii
ABSTRACT	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Botanik Bilgiler	9
2.1.1. <i>Asclepiadaceae</i> Familyası	9
2.1.2. <i>Vincetoxicum</i> N. M. Wolf K. BROWICZ	10
2.1.3. Çalışılan Türlerin Özellikleri	11
2.2. <i>Vincetoxicum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Fitokimyasal Araştırmalar	13
2.2.1. Alkaloitler	13
2.2.1.1. <i>Vincetoxicum</i> Türlerinde Bulunan Fenantroindolizidin Alkaloitleri	14
2.2.1.2 <i>Vincetoxicum</i> cinsine yakın cinslerde bulunan alkaloitler	17
2.2.1.2.1 Fenantroindolizidin Alkaloitleri	17
2.2.1.2.2. Fenantrokinolizidin ve Diğer Alkaloitler	32
2.2.2. Glikozitler	33
2.2.2.1. <i>Vincetoxicum</i> Türlerinde Bulunan Glikozitler	33
2.2.2.2. <i>Vincetoxicum</i> Cinsine Yakın Cinslerde Bulunan Glikozitler	34
2.2.3. <i>Vincetoxicum</i> ve <i>Cynanchum</i> Türlerinde Bulunan Uçucu bileşikler	57
2.2.4. <i>Vincetoxicum</i> ve <i>Cynanchum</i> Türlerinde Bulunan Triterpenler	57

ve Steroller	
2.2.5. <i>Vincetoxicum</i> ve <i>Cynanchum</i> Türlerinde Bulunan Asetofenonlar	59
2.2.6. <i>Vincetoxicum</i> ve <i>Cynanchum</i> Türlerinde Bulunan Diğer Bileşikler	61
2.3. <i>Vincetoxicum</i> Türleri ve Fenantroindolizidin Alkaloitleri ile İlgili Biyoaktivite Çalışmaları	62
2.3.1. <i>Vincetoxicum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış İnsekt-feedant ve İnsekt-antifeedant Aktivite Çalışmaları	62
2.3.2. <i>Vincetoxicum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Antifungal Aktivite Çalışmalar	85
2.3.3. <i>Vincetoxicum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Antiprotozoal Aktivite Çalışmaları	91
2.3.4. <i>Vincetoxicum</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Antidiareik ve Antispazmodik Etki Çalışmaları	93
2.3.5. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Amibisit Etkileri Üzerinde Yapılmış Çalışmalar	94
2.3.6. <i>Vincetoxicum</i> Türleri ve Yakın Cinslere Ait Türlerin Fitotoksik Aktiviteleri	95
2.3.7. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Antiviral Aktivitesi	95
2.3.8. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Antiinflamatuvar Aktivitesi	98
2.3.9. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Nörotoksik Etkisi	101
2.3.10. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Antitümör ve Sitotoksik Aktiviteleri	102
2.4. <i>Vincetoxicum</i> Türü İçeren Homeopatik Preparatlar ve İlgili Araştırmalar	117
2.5. <i>Vincetoxicum</i> Cinsine Ait Bazı Türlerin Yayılma Özelliği ve Çevreye Etkileri	122
2.6. Fenantroindolizidin Alkaloitleri ile İlgili Yapı-Aktivite Çalışmaları	136
2.6.1. <i>İn vivo</i> Aktivite ve Farmakokinetik	152
2.7 Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Sentezi ile İlgili Araştırmalar	156
3. GEREÇ ve YÖNTEM	168
3.1. Gereç	168
3.1.1. Bitkisel Materyal	168
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Reaktifler	175
3.1.2.1. Kimyasal Malzemeler	175

3.1.2.2. Kullanılan Reaktifler	175
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	176
3.2. Yöntem	176
3.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar	176
3.2.1.1. Teşhis Reaksiyonları	176
3.2.1.1.1. Alkaloid Teşhisi	177
3.2.1.1.2. Kardiyoaktif Heterozit Teşhisi	177
3.2.1.1.3. Saponozit Teşhisi	178
3.2.1.1.4. Flavonoid Teşhisi	178
3.2.1.1.5. Antosiyanozit Teşhisi	179
3.2.1.1.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi	179
3.2.1.1.7. Tanen Teşhisi	179
3.2.1.1.8. Antrasenozit Teşhisi	180
3.2.1.1.9. Kumarin Teşhisi	180
3.2.1.1.10. Nişasta Teşhisi	181
3.2.1.1.11. Oz Teşhisi	181
3.2.1.1.12. Uçucu Yağ Teşhisi	181
3.2.1.1.13. Sabit Yağ Teşhisi	182
3.2.1.2. Ekstraksiyon Çalışmaları	182
3.2.1.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması	182
3.2.1.2.2. Alkaloid Fraksiyonlarının Hazırlanması	185
3.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi	185
3.2.1.4. Alkaloid Fraksiyonlarının LC/MS/MS Analizleri	187
3.2.1.5. Kolon Kromatografisi	187
3.2.1.6. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	188
3.2.2. Biyoaktivite Çalışmaları	189
3.2.2.1. İnsekt Antifeedant Aktivite	189
3.2.2.1.1. Antifeedant Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Böcekler	189
3.2.2.1.2. Antifeedant Aktivite Testi	189
3.2.2.2. Antifungal Aktivite	190
3.2.2.3. İstatistiksel Analizler	191

4. BULGULAR	192
4.1. Fitokimyasal Çalışmalar	192
4.1.1. Teşhis Reaksiyonları	192
4.1.1.1. Alkaloit Teşhisi	192
4.1.1.2. Kardiyookaktif Heterozit Teşhisi	193
4.1.1.3. Saponozit Teşhisi	193
4.1.1.4. Flavonoit Teşhisi	194
4.1.1.5. Antosiyanozit Teşhisi	194
4.1.1.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi	195
4.1.1.7. Tanen Teşhisi	195
4.1.1.8. Antrasenozit Teşhisi	196
4.1.1.9. Kumarin Teşhisi	196
4.1.1.10. Nişasta Teşhisi	197
4.1.1.11. Oz Teşhisi	197
4.1.1.12. Uçucu Yağ Teşhisi	198
4.1.1.13. Sabit Yağ Teşhisi	198
4.1.2. Ekstraksiyon Çalışmaları	198
4.1.2.1. Ekstre Miktarları ve Verimleri	198
4.1.2.2. Alkaloit Fraksiyonları	199
4.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi	200
4.1.4. Alkaloit Fraksiyonlarının LC/MS/MS Analizleri	203
4.1.5. Kolon Kromatografisi	222
4.1.6. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	222
4.2. Biyoaktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	225
4.2.1. İnsekt Antifeedant Aktivite	225
4.2.2. Antifungal Aktivite	228
5. TARTIŞMA	231
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	240
7. KAYNAKLAR	242
ÖZGEÇMİŞ	260

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitlerinin genel kimyasal yapısı.	13
Şekil 2.2. <i>V. hirundinaria</i> türünden elde edilen alkaloitler.	15
Şekil 2.3. <i>V. pumilum</i> türünün kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloitler.	16
Şekil 2.4. <i>V. rossicum</i> türünden elde edilen (-)- antofin.	16
Şekil 2.5. <i>C. vincetoxicum</i> türünden elde edilen alkaloitler.	18
Şekil 2.6. Vinceten alkaloiti.	18
Şekil 2.7. <i>C. vincetoxicum</i> türünden izole edilen alkaloitler.	19
Şekil 2.8. <i>T. crebriflora</i> türünden izole edilen tilokrebrin alkaloiti.	19
Şekil 2.9. <i>T. asthmatica</i> ve <i>P. pallida</i> türlerinin köklerinden izole edilen tiloforininin alkaloiti.	20
Şekil 2.10. <i>T. hirsuta</i> türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloitler.	21
Şekil 2.11. <i>T. hirsuta</i> türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen 13a-hidroksitiloforin.	21
Şekil 2.12. <i>T. hirsuta</i> türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloitler.	21
Şekil 2.13. <i>T. indica</i> türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloitler.	22
Şekil 2.14. <i>T. indica</i> türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloitler.	23
Şekil 2.15. <i>T. tanakae</i> türünün yapraklarından izole edilen fenantroindolizidin alkaloitleri.	24
Şekil 2.16. <i>P. pallida</i> türünün köklerinden elde edilen pergularinin ve tiloforininin alkaloitleri.	25
Şekil 2.17. <i>T. tanakae</i> türünden elde edilen bazı alkaloitler.	25
Şekil 2.18. (+)-6-demetiltilokrebrin, (+)-izotilokrebrin, (+)-3-demetilizotilokrebrin ve (-)-7-demetiltiloforin alkaloitleri.	27
Şekil 2.19. <i>I. similis</i> türünün pupa ve imajlarının metanollü ekstresinden elde edilen alkaloitler.	28

Şekil 2.20. <i>T. indica</i> türünün yapraklarından elde edilen Tiloindisin alkaloitleri.	28
Şekil 2.21. <i>T. atrofoliculata</i> türünden elde edilen alkaloitler.	29
Şekil 2.22. <i>F. septica</i> türünün yapraklarından izole edilen (+)-Fikuseptin A.	30
Şekil 2.23. <i>T. atrofoliculata</i> türünün köklerinden elde edilen alkaloitler.	31
Şekil 2.24. <i>T. atrofoliculata</i> ve <i>T. ovata</i> türlerinin köklerinden elde edilen S-(+)-deoksitiloforininin.	32
Şekil 2.25. Kriptopleurin alkaloiti.	33
Şekil 2.26. <i>V. hirundinaria</i> türünün köklerinden izole edilen pregnan glikozitler.	34
Şekil 2.27. Hirundigenin (I) ve anhidrohirundigenin (II) bileşikleri.	36
Şekil 2.28. <i>C. bungei</i> türünün köklerinden izole edilen β -sitosterol glikozit ve 7-O-glikosil liquiritigenin.	36
Şekil 2.29. <i>C. chekiangense</i> türünün köklerinden izole edilen C ₂₁ steroidal glikozitler.	39
Şekil 2.30. <i>C. amplexicaule</i> türünün köklerinden elde edilen sekopregnan ve pregnan tip glikozitler.	41
Şekil 2.31. <i>C. bungei</i> türünden elde edilen C ₂₁ steroidal glikozitler.	43
Şekil 2.32. <i>C. atratum</i> türünün köklerinden izole edilen steroidal glikozitler.	44
Şekil 2.33. <i>C. paniculatum</i> türünden elde edilen iki yeni C ₂₁ steroidal glikozit.	45
Şekil 2.34. <i>C. wilfordii</i> türünün köklerinden elde edilen C ₂₁ steroidal glikozitler.	46
Şekil 2.35. <i>C. atratum</i> türünün köklerinden elde edilen bileşikler.	47
Şekil 2.36. <i>C. auriculatum</i> türünün köklerinden elde edilen bileşikler.	49
Şekil 2.37. <i>C. wallichii</i> türünün köklerinden elde edilen C ₂₁ steroidal glikozitler.	50
Şekil 2.38. <i>C. amplexicaule</i> türünün köklerinden elde edilen iki yeni C ₂₁ steroidal glikozit.	50
Şekil 2.39. <i>C. auriculatum</i> türünden elde edilen bileşikler.	51
Şekil 2.40. <i>C. auriculatum</i> türünün köklerinden elde edilen üç yeni steroidal glikozit.	52
Şekil 2.41. <i>C. auriculatum</i> türünün köklerinden elde edilen steroidal	53

glikozitler.	
Şekil 2.42. <i>C. otophyllum</i> türünün köklerinden izole edilen glikozitler.	54
Şekil 2.43. <i>C. otophyllum</i> türünün köklerinden izole edilen steroidler.	56
Şekil 2.44. <i>T. atrofoliculata</i> türünün köklerinin etanol ekstresinden elde edilen tiloforizit A.	56
Şekil 2.45. Hankokinol.	58
Şekil 2.46. <i>C. bungei</i> türünün köklerinden elde edilen 2,4-dihidroksiasetofenon, 4-hidroksiasetofenon ve bungeizit A-D.	60
Şekil 2.47. <i>C. bungei</i> türünün köklerinden elde edilen blumenol A ve (-)-leucanthemitol.	61
Şekil 2.48. Kontrol (taşıyıcı solvent-sudaki % 0.5 etanol), <i>V. rossicum</i> türünün ham kök ekstresi ve (-)-antofin uygulandıktan sonra <i>A. cinctus</i> larvalarının (üst) gül yaprağı tüketimi ve <i>D. arcuata</i> larvalarının (alt) huş ağacı yaprağı tüketimi.	79
Şekil 2.49. <i>T. tanakae</i> türünün metanollü ekstresinden izole edilen alkaloidler.	137
Şekil 2.50. Sentetik bazı Antofin analogları.	140
Şekil 2.51. <i>T. atrofoliculata</i> türünden izole edilen alkaloidler ve sentetik bazı fenantroindolizidin alkaloidleri.	142
Şekil 2.52. L-[³⁵ S]-metionin, [¹⁴ C]-timidin ve [¹⁴ C]-üridin katımı üzerinden tilofora alkaloidleri ve fenantren-bazlı tiloforin türevlerinin etkisi.	147
Şekil 2.53. Antofin Analogları	148
Şekil 2.54. Enantiyomerlerin yapısal benzerlikleri.	151
Şekil 2.55. C14-Hidroksillenmiş analogların tiloforin'le karşılaştırılması.	154
Şekil 3.1. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinin toplandığı lokaliteler.	169
Şekil 3.2. <i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i> türünün 1: genel görünüşü, 2-3: çiçekli-meyveli görünüşü.	170
Şekil 3.3. <i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> türünün 1: genel-çiçekli görünüşü, 2-3: meyveli görünüşü.	171
Şekil 3.4. <i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i> türünün 1-3: genel görünüşü, 4: çiçekli-meyveli görünüşü.	172
Şekil 3.5. <i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> türünün 1: genel görünüşü, 2: çiçekli, 3: meyveli görünüşü.	173

Şekil 3.6. <i>V. parviflorum</i> türünün 1-3 genel ve çiçekli görünüşü.	174
Şekil 3.7. Ekstre A, ekstre B ve ekstre C serilerinin elde edilişi.	184
Şekil 3.8. Alkaloit fraksiyonu A ve alkaloit fraksiyonu B serilerinin elde edilişi.	186
Şekil 4.1. Toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstre A (A) ve Ekstre B (B) serilerinin İTK sonuçları.	201
Şekil 4.2. Fraksiyon A (A) ve fraksiyon B (B) serilerinin İTK sonuçları.	202
Şekil 4.3. Fraksiyon A (A) ve Fraksiyon B(B) serilerinin 254 nm deki İTK sonuçları.	203
Şekil 4.4. Antofin <i>N</i> -oksit (1), Sekoantofin <i>N</i> -oksit (2) ve Sekoantofin (3) alkaloitlerinin kimyasal yapısı.	215
Şekil 4.5. Çalışılan türlerden elde edilen ekstrelerin 1 mg/mL konsantrasyonda <i>A. fumigatus</i> 'a karşı % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması.	230

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Vincetoxicum</i> N.M. Wolf cinsinin nomenklatürel sinonimleri ve Kuzey Amerika’da ilk kayıtları.	3
Çizelge 2.1. Ham ekstrelerin <i>H. armigera</i> larvalarının beslenme inhibisyonu üzerine etkileri ve regrasyon eşitlikleri.	76
Çizelge 2.2. <i>S. littoralis</i> larvalarında kontrol ile karşılaştırıldığında % 50 (ED ₅₀) ve % 90 (ED ₉₀) beslenme caydırıcılığına neden olan etkili dozlar.	81
Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan dört bitki ekstresinin antifungal aktivitesi.	86
Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan dört bitki ekstresinin inhibisyon zonları (mm)	87
Çizelge 2.5. <i>V. rossicum</i> ekstresinin (2 mg/disk) disk difüzyon yönteminde anlamlı inhibisyon zonları (\pm SD) ve kullanılan suşlar.	88-89
Çizelge 2.6. (-)-antofin’in minimum inhibitör konsantrasyonları ve disk deneyinde inhibisyon zon çapları ile birlikte seçilmiş geniş aralıkta konak bitkisi olan bitki patojeni funguslar.	89
Çizelge 2.7. <i>V. rossicum</i> bitkisinin kök ekstresinin ve (-)-antofin’in minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin karşılaştırması.	90
Çizelge 2.8. (-)-antofin’in antimikrobiyal aktivitesi.	91
Çizelge 2.9. <i>Gentiana olivieri</i> , <i>Carum copticum</i> , <i>Zygophyllum fabago</i> ve <i>V. stocksii</i> türlerinin etanollü ekstrelerinin antiprotozoal aktiviteleri.	92
Çizelge 2.10. <i>V. stocksii</i> türünden elde edilen fraksiyonların <i>in vitro</i> antimalaryal ve antilayşmanyal aktiviteleri	93
Çizelge 2.11. <i>V. stocksii</i> türünün ham ekstresinin farelerde hintyağı ile indüklenmiş diyare üzerine etkisi.	94
Çizelge 2.12. (+)-deoksitiloforinin ve (-)-antofin’in TMV’ye karşı inhibitör aktiviteleri (%).	97
Çizelge 2.13. (-)-antofin ve analoglarının RAW 264.7 hücrelerinde LPS-	101

indüklenmiş NO üretimine karşı inhibitör aktivitesi (IC ₅₀) ve sitotoksik etkisi.	
Çizelge 2.14. <i>C. vincetoxicum</i> türünden izole edilen fenantroindolizidin <i>N</i> -oksit alkaloidleri 1-3'ün sitotoksik aktivitesi.	108
Çizelge 2.15. KB hücreleri ve bunun drug-resistant hücrelerinin büyüme inhibisyonu üzerine DCB-3500, DCB-3501, DCB-3502 ve DCB-3503 bileşiklerinin EC ₅₀ değerleri.	110
Çizelge 2.16. Kanser hücrelerinin büyüme inhibisyon değerleri.	113
Çizelge 2.17. İnsan kanser hücrelerinde proliferasyon üzerine antofin'in inhibitör etkisi.	114
Çizelge 2.18. Çeşitli kanser hücre dizilerinde CAT'm <i>in vitro</i> büyüme inhibisyonu.	116
Çizelge 2.19. H22 mürin hepatoma ksenografları üzerine CAT'm etkileri.	116
Çizelge 2.20. Engystol [®] 'ün farklı dilüsyonlarının ve kontrolün (NaCl solüsyonu) uygulanmasından sonra interferon- γ salınımı yapan T-lenfositlerin yüzdesi.	119
Çizelge 2.21. İnsan hücre dizilerinde enfeksiyon denemelerinin özeti.	121
Çizelge 2.22. Hayvan hücre dizilerinde (Çeşitli türlerde) enfeksiyon denemelerinin özeti.	122
Çizelge 2.23. Kanser hücre kültürlerine ^a (GI ₅₀ : ng/ml) alkaloidlerin sitotoksik aktiviteleri.	138
Çizelge 2.24. Fenantroindolizidin alkaloidlerinin sitotoksik aktivitesi.	139
Çizelge 2.25. HepG2 ve PANC-1 hücrelerinde PA analoglarının sitotoksitesisi.	143
Çizelge 2.26. HepG2 hücrelerinde NF- κ B, CRE ve AP-1'in aracılık ettiği transkripsiyon üzerine PA analoglarının inhibitör etkisinin IC değerleri.	143
Çizelge 2.27. Tilofoa alkaloidleri ve PBT'lerin HepG2, PANC-1 ve CEM hücrelerinde büyüme inhibisyonlarının GI ₅₀ değerleri.	144
Çizelge 2.28. Tilofoa alkaloidleri ve PBTs'lerin HepG2 hücrelerinde stimüle edilmiş NF- κ B, CRE, AP-1 ve GRE yollarına karşı inhibitör etkisinin IC ₅₀ değerleri.	145
Çizelge 2.29. Fenantren substituentli antofin analogları: HCT 116 ^a	149

Çizelge 2.30. Çeşitli kanser hücre dizilerinde bazı fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidinlerin GI ₅₀ değerleri.	150
Çizelge 2.31. <i>R</i> -antofin, <i>R</i> -kriptopleurin, E7, 17 ve 18 bileşiklerinin antikanser aktiviteleri (GI ₅₀).	154
Çizelge 3.1. Türlerin toplandığı lokaliteler, toplama zamanları ve herbaryum numaraları.	168
Çizelge 3.2. İTK için kullanılan çözücü sistemleri.	185
Çizelge 3.3. Kolon Kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri ve elde edilen fraksiyonlar.	188
Çizelge 4.1. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde alkaloit teşhis reaksiyonları sonuçları.	192
Çizelge 4.2. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde kardiyoaaktif heterozit teşhis reaksiyonları sonuçları.	193
Çizelge 4.3. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde saponozit teşhis reaksiyonları sonuçları.	193
Çizelge 4.4. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde flavonoit teşhis reaksiyonları sonuçları.	194
Çizelge 4.5. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde antosiyanozit teşhis reaksiyonları sonuçları.	194
Çizelge 4.6. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde siyanogenetik heterozit teşhis reaksiyonları sonuçları.	195
Çizelge 4.7. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde tanen teşhis reaksiyonları sonuçları.	195
Çizelge 4.8. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde antrasenozit teşhis reaksiyonları sonuçları.	196
Çizelge 4.9. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde kumarin teşhis reaksiyonları sonuçları.	196
Çizelge 4.10. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde nişasta teşhis reaksiyonları sonuçları.	197
Çizelge 4.11. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde oz teşhis reaksiyonları sonuçları.	197

Çizelge 4.12. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde uçucu yağ teşhis reaksiyonları sonuçları.	198
Çizelge 4.13. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde sabit yağ teşhis reaksiyonları sonuçları.	198
Çizelge 4.14. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinin toprak üstü kısımlarından elde ekstre % verimleri.	199
Çizelge 4.15. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloid fraksiyonu A ve alkaloid fraksiyonu B serilerinin miktarları.	199
Çizelge 4.16. İTK plaklarında kullanılan çözücü sistemleri ve İTK sonuçları.	201
Çizelge 4.17. Çalışılan <i>Vincetoxicum</i> türlerinde bulunan ana alkaloidler.	214
Çizelge 4.18. Alkaloid fraksiyonlarında bulunduğu düşünülen sekoantofin, sekoantofin N-oksit ve antofin N-oksit alkaloidlerinin kütle spektrumları.	215
Çizelge 4.19. Test edilen ekstrelerin <i>L. decemlineata</i> larvalarına karşı 500 µg/cm ² konsantrasyonda antifeedant aktivitesi ve LD ₅₀ değerleri.	226
Çizelge 4.20. Test edilen ekstrelerin <i>S. littoralis</i> larvalarına karşı 500 µg/cm ² konsantrasyonda antifeedant aktivitesi ve LD ₅₀ değerleri.	227
Çizelge 4.21. Test edilen ekstrelerin <i>S. littoralis</i> larvalarına karşı mg/g da larva mortalitesi ve büyüme inhibisyon değerleri.	228
Çizelge 4.22. Test edilen ekstrelerin 1 mg/mL konsantrasyonda <i>A. fumigatus</i> 'a karşı % inhibisyon değerleri.	229
Çizelge 5.1. Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarında incelenen ana etken madde gruplarına genel bakış.	233

KROMATOGRAMLAR DİZİNİ

Kromatogram 4.1. <i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i> türünün diklorometan ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	204
Kromatogram 4.2. <i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i> türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	205
Kromatogram 4.3. <i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> türünün diklorometan ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	206
Kromatogram 4.4. <i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	207
Kromatogram 4.5. <i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i> türünün diklorometan Ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	208
Kromatogram 4.6. <i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i> türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	209
Kromatogram 4.7. <i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> türünün diklorometan ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	210
Kromatogram 4.8. <i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	211
Kromatogram 4.9. <i>V. parviflorum</i> türünün diklorometan ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	212

Kromatogram 4.10. <i>V. parviflorum</i> türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloid fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	213
Kromatogram 4.11. <i>V. parviflorum</i> türünün diklorometanlı ekstresinin alkaloid fraksiyonundan elde edilen Fr-11 fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).	223

SPEKTRUMLAR DİZİNİ

Spektrum 4.1. <i>V. parviflorum</i> türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda sekoantofin'in ESI-MS ¹ spektrumu.	216
Spektrum 4.2. <i>V. parviflorum</i> türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda sekoantofin'in ESI-MS ² spektrumu.	217
Spektrum 4.3. <i>V. parviflorum</i> türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda sekoantofin <i>N</i> -oksit'in ESI-MS ¹ spektrumu	218
Spektrum 4.4. <i>V. parviflorum</i> türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda sekoantofin <i>N</i> -oksit'in ESI-MS ² spektrumu	219
Spektrum 4.5. <i>V. parviflorum</i> türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda antofin <i>N</i> -oksit'in ESI-MS ¹ spektrumu.	220
Spektrum 4.6. <i>V. parviflorum</i> türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda antofin <i>N</i> -oksit'in ESI-MS ² spektrumu.	221
Spektrum 4.7. Fr-11 fraksiyonunda sekoantofin'in ESI-MS ² spektrumu.	224

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AMF	Arbuskular Mikorizal Fungus
ANK	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariumu
a	Ağırlık
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CD	Sirküler Dikroizm
CDKs	Siklin-Dependent Kinaz
Chi	Kikare
COX	Siklo-Oksijenaz
c.	Yaklaşık
cm	Santimetre
cm²	Santimetre Kare
DHFR	Dihidrofolat Redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dak.	Dakika
ED	Etkili Doz
EC	Etkilili Konsantrasyon
ESI/MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FT-IR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometresi
GC/MS	Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi
GI	Büyüme İnhibitör Etki
GAZI	Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbariumu
g	Gram
HPUS	American Homeopathic Pharmacopeia
HomBRex	Homeopathic Basic Research Experiments
HUB	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Herbariumu
h	Hacim
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi

IFN	İnterferon
IC	İnhibitör Konsantrasyon
Kg	Kilogram
LC/MS/MS	Sıvı Kromatografisi/Kütle/Kütle Spektrometresi
LPS	Lipopolisakkarit
LD	Letal Doz
L	Litre
MIC	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MDR	Multidrug Resistans
MTX	Metotreksat
MS	Kütle Spektrometresi
MHz	Megahertz
M	Molar
mm	Milimetre
mL	Mililitre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans Spektrometresi
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NCI	National Cancer Institute
NF-κB	Nükleer Faktör-κB
nM	Nanomolar
ND	Tanımlanamayan
nm	Nanometre
Nt	Test Edilmemiş
PGL	Pergularinin
RNA	Ribonükleik Asit
SAR	Yapı Aktivite Bağlantıları
TPD	Tiloforininin
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TS	Timidilat Sentaz
TMV	Tütün Mozaik Virüsü
UV	Ultraviole Spektroskopisi
YBSK	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

ÖZET

Bazı *Vincetoxicum* N.M. Wolf (*Asclepiadaceae*) Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Vincetoxicum N.M. Wolf cinsi (*Asclepiadaceae*) yaklaşık 100 türü bulunan, Asya'da özellikle dağlık bölgelerde yayılış gösteren bir cinstir. *Vincetoxicum* familyanın Anadolu'da yetişen en zengin taksonu olup 3'ü endemik olmak üzere 10 takson ile temsil edilmektedir. *Vincetoxicum* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda glikozitler, fenantroindolizidin alkaloidleri, β -sitosterol, triterpenler, flavonoidler, saponozit ve fenolik bileşikler içerdikleri saptanmıştır. Bu bileşiklerden özellikle alkaloidlerin antiviral, antifungal, antibakteriyal, antiamebik, sitotoksik, antitümör, antilösemik, insektisit ve insekt antifeedant aktivite gibi geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir. Tez konusu olarak üçü endemik olmak üzere beş takson (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. parviflorum*) seçilmiştir. Bugüne kadar Türkiye'de yetişen *Vincetoxicum* cinsine ait türlerle yapılmış herhangi bir fitokimyasal ve biyoaktivite çalışması bulunmamaktadır. Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı polaritelerdeki ekstraktların alkaloid fraksiyonları ve bunlardan kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar LC/MS/MS ile incelenmiştir. Türlerin fenantroindolizidin alkaloidlerinden sekoantofin *N*-oksid, antofin *N*-oksid ve sekoantofin olabileceği düşünülen bileşikler içerdikleri saptanmıştır. Ayrıca ekstraktlar *Spodoptera littoralis* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvalarına karşı insekt-antifeedant aktiviteleri ve *Aspergillus fumigatus*'a karşı antifungal aktiviteleri için test edilmiştir. *L. decemlineata* türünün larvalarına karşı *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün EtOH, MeOH ve MeOH:CH₂Cl₂(1:1) ekstraktları; *V. parviflorum* türünün EtOH ve CH₂Cl₂ ekstraktları; *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. canescens* subsp. *canescens* türlerinin EtOH ekstraktları; *S. littoralis* türünün larvalarına karşı ise *V. parviflorum* türünün MeOH:CH₂Cl₂ (1:1) ekstresi; *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* türlerinin EtOH ekstraktları ve *V. canescens* subsp. *canescens* türünün CH₂Cl₂ ekstresi çok yüksek antifeedant aktivite göstermiştir (100.0±0.0). Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarında elde edilen ekstraktların *A. fumigatus*'a karşı 1 mg/mL konsantrasyonda inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiş ve en yüksek % inhibisyon değeri *V. parviflorum* türünün CH₂Cl₂ ekstresinde gözlenmiştir (% 45.86).

Anahtar Sözcükler: *Vincetoxicum*, *Asclepiadaceae*, fenantroindolizidin alkaloidleri, insekt-antifeedant aktivite, antifungal aktivite.

ABSTRACT

Pharmacognostical Investigations on Some *Vincetoxicum* N.M. Wolf (*Asclepiadaceae*) Species

The genus *Vincetoxicum* N.M. Wolf (*Asclepiadaceae*) comprises approximately 100 species distributed in Asia, especially in mountain ranges. *Vincetoxicum* is the largest taxon of family growing in Anatolia and represented 10 taxa three of them are endemic. Studies on *Vincetoxicum* species were showed that they contain glycosides, phenanthroindolizidine alkaloids, β -sitosterol, triterpenoids, flavonoids, saponins and phenolic compounds. In these compounds especially alkaloids have broad-spectrum of biological activities like antiviral, antifungal, antiamoebic, cytotoxic, antitumor, antileucemic, insecticidal and insect antifeedant. In this thesis five taxa (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* and *V. parviflorum*) were chosen for investigation three of them are endemic. Until now there is no study concerning phytochemical and bioactivity of *Vincetoxicum* species growing in Turkey. Alkaloid fractions obtained from different polarity of extracts of aerial parts of the plants were analysed by LC/MS/MS. On the basis of spectral data of the alkaloid fractions, major peaks were tentatively identified as secoantofine *N*-oxide, antofine *N*-oxide and secoantofine in the extracts. Also extract were tested for their insect-antifeedant activities against *Spodoptera littoralis* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvae, and for their antifungal activities against *Aspergillus fumigatus*. The ethanol, methanol and dichloromethane: methanol (1:1) extracts of *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*; the ethanol and dichloromethane extracts of *V. parviflorum*; the ethanol extracts of *V. fuscatum* subsp. *boissieri* and *V. canescens* subsp. *canescens* were shown highest antifeedant activity against *L. decemlineata* larvae (100.0 \pm 0.0). The dichloromethane : methanol (1:1) extract of *V. parviflorum*; the ethanol extracts of *V. fuscatum* subsp. *boissieri* and *V. canescens* subsp. *pedunculata*; dichloromethane extract of *V. canescens* subsp. *canescens* were shown highest antifeedant activity against *S. littoralis* larvae (100.0 \pm 0.0). At 1 mg/mL concentration extracts of aerial part of all investigated species have inhibitory effect on *A. fumigatus* and dichloromethane extract of *V. parviflorum* shown highest % inhibition (% 45.86).

Keywords: *Vincetoxicum*, *Asclepiadaceae*, phenanthroindolizidine alkaloids, insect-antifeedant activity, antifungal activity.

1. GİRİŞ

Asclepiadaceae familyası çok yıllık otsu, çalı, odunsu tırmanıcı veya ağaç; bazen sukkulent ve genellikle sütsü özsu taşıyan bitkilerin bulunduğu (1-5), *Stapelia*, *Huernia*, *Caralluma* ve *Ceropegia* gibi birçok sukkulent türü, bazı *Asclepias* türlerini, *Hoya carnosa* (mum bitkisi) ve *Stephanotis floribunda* gibi sıcak bölgelerde süs bitkisi olarak bilinen birçok cinsi ve türü içeren geniş bir familyadır (1). Özellikle tropiklerde ve subtropiklerde yetişen (1-4, 6), yaklaşık 130 cins ve 2000 türü bulunan (2) *Asclepiadaceae* familyası uzun süre *Apocynaceae* familyasının apomorfik bir türevi olarak düşünülmüştür (7). Fakat yakın ilişkili olduğu *Apocynaceae* familyasından özelleşmiş androkeum, polen transfer sistemi ve ginostegium varlığı ile ayrılmıştır (1). Bu familyaya ait bitkilerden bazılarının buldukları yörelerde geleneksel tedavide kullanıldığı bildirilmiştir (3). Örneğin lokal Hindistan popülasyonlarında emetik ve pürgatif etkilerinden dolayı geleneksel kullanımları bulunmaktadır (1). Ayrıca birçok türü ok zehiri olarak kullanılırken; Amerika'nın güney kısımlarında yer alan bazı bölgelerde ise koma tüyleri düşük kaliteli "kuş tüyü" olarak kullanılmaktadır (1, 3).

Asclepiadaceae familyasının Anadolu'da 6 cinsi ve 13 kadar türü yetişmektedir (5, 5). *Vincetoxicum* N.M. Wolf cinsi *Asclepiadaceae* familyasına ait ve yaklaşık 100 türü bulunan, Asya'da özellikle dağlık bölgelerde yayılış gösteren bir cinstir. En iyi bilinen türleri Çin ve Japonya'da dır (7, 8). Yaklaşık 100 *Vincetoxicum* türünün yayılış merkezi Asya dağ silsilesi olmak üzere eski Dünya'ya sıkışmış durumdadır. Sadece *V. nigrum* (L.) Moench türü aynı zamanda Batı Amerika'da neofit olarak bilinmektedir (9). *Vincetoxicum*, bu familyanın Anadolu'da yetişen en zengin taksonu olup 8 tür ile temsil edilmektedir (5).

Bunlar:

- *Vincetoxicum canescens* (Willd.) Decne.
 - *V. canescens* subsp. *canescens*
 - *V. canescens* subsp. *pedunculata* Browicz
- *V. hirundinaria* Medicus
- *V. tmoleum* Boiss.
- *V. scandes* Somm. and Lev.
- *V. speciosum* Boiss. and Spruner
- *V. funebre* Boiss and Kotschy
- *V. fuscatum* (Hornem.) Reichb.
 - *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*
 - *V. fuscatum* subsp. *boissieri* (Kusn) Browicz
- *V. parviflorum* Decne. taksonlarıdır.

Bu türlerden *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. parviflorum* taksonları endemik türler olarak kayıtlara geçmiştir (4).

Birçok *Vincetoxicum* cinsi iç döllenme düzeyinin yüksek olması nedeniyle oldukça yayılcıdır (10). Bazıları hibridize olmuş ve birçoğu oldukça benzer türleri içeren zor bir gruptur (4). Bu nedenle yıllardır *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin taksonomisi netleştirilememiştir (11). Vejetatif özellikler aynı bitkide bile oldukça çeşitlidir. Özellikle korona şekli ve tozlaşma mekanizması ile ilgili floral özellikler çok karmaşık ve ne yazık ki stabil değildir. En kullanışlı özellikler ise çiçek rengi ve büyüklüğü; korolla loblarının kısa yumuşak tüyleri ve sapsız veya saplı, yoğun veya dağınık infloresans şeklidir (4).

Bu cinsin zorluğunun yaygın nedenlerinden bir diğeri de aynı türler için birçok farklı bilimsel ismin kullanılmasıdır. Örneğin; *V. rossicum* (Kleo.) Barb., *Cynanchum medium* (11, 12), *C. rossicum* (Kleo.) Borhidi. (13-16) olarak isimlendirilirken; *V. nigrum*, *C. louiseae* Kartesz and (14, 16); *V. pumilum* Decne., *Alexitoxicon pumilum* (Decne.) Pobed., *Antitoxicum pumilum* (Decne.) Pobed., *C. pumilum* (Decne.) Bornm. (7); *V. hirundinaria* Medic., *C. vincetoxicum* (L.) Pers., *V. officinale* Moench (17, 18), *C. nivale* Nym., *C. hirundinaria* Medic, *Asclepias alba* Mill., *A. vincetoxicum* L., ve *V. nivale* Boiss

and Heldr. (19) olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca *C. nigrum* (L.) Pers.'u *V. nigrum*'un sinonimi olarak kullanan literatürlere de rastlanmıştır (4, 12). Sheeley ve Raynal tarafından 1996 yılında yapılan bir çalışmada *V. nigrum*, *V. rossicum* ve *V. hirundinaria* türlerinin Kuzey Amerika ve Kanada'da yayılışları, taksonomik ve nomenklatürel durumları incelenmiş ve *Vincetoxicum* cinsinin nomenklatürel sinonimleri ve Kuzey Amerika'da ilk kayıtları bulunmuştur (Çizelge 1.1.) (20).

Çizelge 1.1. *Vincetoxicum* N.M. Wolf cinsinin nomenklatürel sinonimleri ve Kuzey Amerika'da ilk kayıtları (20).

Cins	Yıl
<i>Vincetoxicum</i> Wolf	1776
<i>Vincetoxicum</i> Medik.	1790
<i>Alexitoxicum</i> St. Lag.	1880
<i>Cynanchum</i> (L.) Pers.	1805
<i>Cynanchum</i> (L.) R. Br.	1810
<i>Antitoxicum</i> Pobed.	1952
Tür	
<i>Vincetoxicum rossicum</i> (Kleo.) Barb.	1950
• <i>Cynanchum medium</i> R. Br.	1809
• <i>Vincetoxicum medium</i> (R. Br.) Decne.	1844
• <i>Cynanchum rossicum</i> Kleo.	1929
• <i>Antitoxicum rossicum</i> (Kleo.) Pobed.	1952
• <i>Cynanchum rossicum</i> (Kleo.) Borhidi	1966
<i>Vincetoxicum nigrum</i> (L.) Moench	1802
• <i>Cynanchum nigrum</i> (L.) Pers.	1805
• <i>Cynanchum louiseae</i> Kartesz and Gandhi	1994
<i>Vincetoxicum hirundinaria</i> Medik.	1790
• <i>Vincetoxicum officinale</i> Moench	1794
• <i>Cynanchum vincetoxicum</i> (L.) Pers.	1805
• <i>Cynanchum medium</i> R. Br.	1809
• <i>Vincetoxicum album</i> (Mill.)Aschers.	1864
• <i>Antitoxicum officinale</i> (Moench) Pobed.	1952

Bu cinsin isimlendirmesinde kullanılan kelimelerden; *Cynanchum* kelimesi Yunanca bir kelime olup kyon=köpek+anchein=boğazlayan veya zehir anlamına gelirken; *Vincetoxicum* kelimesi ise Latince bir kelime olup vinco=fetheden, üstesinden gelen, efendi, üstün olan veya boyunduruk altına alan + toxicum=zehir, zehirlenmelerde antidot olarak kullanılan anlamına gelmektedir (14). Bitki İngilizce ise dog-strangling vine (=

köpek boğan asması) veya swallow-wort olarak bilinmektedir (21-24).

Vincetoxicum cinsinin akraba cinsleriyle olan bağlantısı ile ilgili iki farklı yorum bulunmaktadır. Birinci yoruma göre *Vincetoxicum* cinsi yakından ilişkili olduğu *Cynanchum* cinsi ile gruplandırılmıştır. Bir diğer yoruma göre ise bu iki cins farklı düşünülmelidir (8). 1989 yılında Qui ve arkadaşları glikozitlerinin steroidal aglikonlarını çalışmış ve elde ettikleri kanıtlara dayanarak *Vincetoxicum* cinsinin *Cynanchum* cinsinden ayrıldığını düşünmüştür. Son zamanlarda *Vincetoxicum* ve *Cynanchum* cinsleri korona karakteristiği, alkaloidleri ve aglikonları gibi kimyasal bileşenlerine dayandırılarak bağımsız cinsler olarak değerlendirilmiştir (9). 1996 yılında Liede morfolojik ve kimyasal karakterlerin analizine dayanarak alternatif bir hipotez ortaya atmıştır (8). Buna göre *Vincetoxicum* cinsi *Cynanchum* cinsine göre *Tylophora* cinsi ile daha benzerdir (7, 8). Ayrıca alışılmamış iskelet tipi taşıyan bazı glikozitlerin *Asclepiadaceae* familyasında bulunduğu görülmüştür. Bu sekopregnan iskeleti taşıyan glikozitler sadece *Vincetoxicum* ve *Tylophora* cinslerine ait türlerde tespit edilmiştir. Fenantroindolizidin alkaloidlerinin ve sekopregnan iskeleti taşıyan pregnan glikozitlerinin varlığı *Tylophora* ve *Vincetoxicum* cinslerinin kardeş cinsler olduğunu gösteren güçlü kanıtlardır (7, 9, 25). Bu bulgularla *Vincetoxicum* cinsi *Cynanchum* cinsinden tamamen ayrılmıştır (8, 9, 12). Buna ek olarak *Vincetoxicum* cinsi korona morfolojisi ve pollinia oryantasyonuna dayandırılarak *Tylophora* cinsinden morfolojik olarak ayrılmıştır. *Vincetoxicum* türünün korona lobları ginostegium'un tabanından geçmekte ve pollinia'ları sarkık pozisyonda bulunmakta iken; *Tylophora* türünün korona lobları ise arterlerin arkasından geçmekte ve pollinia pozisyonları yataydan dik pozisyona kadar çeşitlenmektedir. Son moleküler filogenetik çalışmalar *Vincetoxicum* ve yakın akrabaları arasındaki bağlantılarla ilgili yeni yönler ortaya çıkartmıştır. Fakat *Vincetoxicum* cinsinin kökeni hala açık değildir, çünkü bu monofiletik grubu destekleyen kanıtlar çok zayıftır ve *Vincetoxicum* cinsinin örnek türleri çok azdır (8). Bütün bunlara rağmen günümüzde Avrupalılar *Vincetoxicum*'u bağımsız bir cins olarak tanımaktadır (9).

Vincetoxicum cinsine ait türlerin halk tıbbında; laksatif, antitümör (14, 26, 27), diüretik (18, 26, 28), emetik (27-29), antimalaryal, antilayşmanyal (30), diyaforetik (14, 27), ekspektoran (18, 29), depuratif, digitaloidik (29), yara iyi edici, fungal enfeksiyonların

ve incinmelerin tedavisi (30, 31) ve mantar zehirlenmelerine karşı antidot (29) olarak kullanımlarının olduğu rapor edilmiştir.

V. stocksii türü hem zehirli olması hem de tıbbi özellikleri nedeniyle bilinmektedir. Bitkinin eksternal kanserlerin tedavisinde ve insan ve hayvanlarda yara ve zedelenmelerin tedavisinde lapa şeklinde kullanıldığı bildirilmiştir (30, 31). Ayrıca antilayşmanyal etkili bir bitki olarak *V. stocksii* türünün yerli kabilelerde geleneksel kullanımlarına da rastlanmıştır (30). *V. nigrum* türünün ise Avrupa'da geleneksel tıpta laksatif, diyaforetik, diüretik, emetik ve antitümör ajan olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (27).

Küçük polimorfik bir bitki olan *V. officinale* (Syn: *V. hirundinaria*) türüne Avrupa'da sıklıkla rastlanmaktadır. Tıbbi özellikleriyle ve zehirli bir bitki olması nedeniyle Orta çağdan bu yana tanınmaktadır (32). Ayrıca bitkinin geleneksel tıpta kullanımlarının da olduğu bildirilmiştir (26). Anadolu'da ise bu bitki Kırlangıçkuyruğu veya Panzehirotu olarak bilinmekte olup köklerinin kusturucu olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (33). Bunlara ek olarak *V. officinale* bitkisinin mikrobiyal orijinli hastalıkların tedavisinde kullanıldığını gösteren literatürlere de rastlanmıştır (24). *V. hirundinaria* türü sekonder metabolitlerin alkaloit gibi çeşitli tiplerini içermekte olup; memeliler ve bazı böcekler için oldukça toksiktir (17, 34-36). Toksisitesine rağmen *V. hirundinaria* türü bazı özelleşmiş böcekler için konak bitkidir (10, 34-36). Ayrıca Finlandiya'nın güney-batı takımadalarında bulunan bazı *V. hirundinaria* popülasyonları koyun ve inekler tarafından otlanmaktadır (11, 35). İskandinavya'da yapılan bazı otlatma çalışmaları koyunların *V. hirundinaria* türünü yemediğini veya nadiren yediğini doğrulamakta fakat bu durum koyunların bu türü yedikten sonra öldüklerini belirten önceki raporları desteklememektedir (14). *V. hirundinaria* ve *V. rossicum* türünün kökleri insanlar ve memeliler için oldukça zehirli olan vinsetoksin isimli bir hemolitik glikozit içermektedir (14, 15). *V. hirundinaria* türü Avrupa geleneksel tıbbında ekspektoran (18, 28), diüretik, emetik (14, 18, 26, 28), diaforetik (14), laksatif ve anti tümör ajan (14, 26) olarak oldukça geniş kullanıma sahiptir. Kökleri veteriner tıbbında su toplaması ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (14). İtalya'da içerisinde *V. hirundinaria* türünün de olduğu 181 bitkinin çeşitli hastalıklara karşı yerel kullanımlarının araştırıldığı bir çalışmada çalışılan birçok türün farklı yerlerde aynı veya benzer kullanımlarının bulunduğu, bazı türlerin ise spesifik kullanımlarının olduğu

görülmüştür. *V. hirundinaria* türünün köklerinin ve tüm bitkinin, dekoksasyon ve infüzyon şeklinde zehirlenmelere ve intoksikasyonlara karşı antidot olarak günümüzde geleneksel tıpta kullanıldığı; tarihi tıbbi kullanımları arasında ise zehirli mantar antidotu olarak kullanımının olduğu; alkaloit ve steroid gibi bileşikleri içerdiği; farmakolojik olarak ekspektoran, depuratif, emetik, digitaloidik etkili olduğu belirtilmiştir (29). Ayrıca *V. hirundinaria* türü Fransa'da dompte-venin ismi ile bilinmekte ve geleneksel olarak emetik ve ekspektoran etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (37).

Tuzlacı ve arkadaşları tarafından Mayıs 2007-2008 tarihleri arasında Ovacık (Tunceli) yöresinde geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkilerin belirlenmesi amacıyla 33 köyde araştırma yapılmıştır. Bu çalışmada *V. canescens* subsp. *canescens* türünün yerel isminin “zehir otu” olduğu ve fungal enfeksiyonların tedavisinde bitkinin meyve ve yapraklarının ezilerek haricen kullanıldığı saptanmıştır (38). Altundağ ve Öztürk tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada 62 familyaya ait olan ve Doğu Anadolu'da doğal olarak yayılış gösteren 444 taksonun geleneksel kullanımları araştırılmıştır. Araştırılan türler arasında yer alan *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. toleum* türlerinin lokal isminin “Zilasur” olduğu ve geleneksel olarak uyuz tedavisinde bu iki türün dövülmüş halde dışardan kullanımlarının bulunduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak *V. canescens* subsp. *canescens* türünün fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanımlarının olduğu da saptanmıştır (39).

Asclepiadaceae familyasında lateks taşıyan bitkiler yer almakta (2, 5) ve genellikle triterpenlerce zengin lateks içermektedir. İndol alkaloitleri, fenantroindolizidin ve piridin grupları taşıyan alkaloitler, kardenolitler, siyanogenetik glikozitler, saponinler, tanenler ve siklitoller bu familya bitkilerinde bulunan diğer bileşiklerdir (3).

Vincetoxicum cinsine ait türler üzerinde yapılan çalışmalarda bazı glikozitlerin ve alkaloitlerin varlığı bildirilmiştir (31, 40). Örneğin *V. hirundinaria* bitkisinin oldukça aktif alkaloitler, C₂₁-steroid glikozitler, β -sitosteroller, triterpenler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler içerdiği saptanmıştır (28). Ayrıca *Vincetoxicum* cinsine ait bitkilerin köklerinin saponozit (vinsetoksozit) içerdiği rapor edilmiştir (5).

Fenantroindolizidin alkaloitleri tiloforin veya *Tylophora* alkaloitleri olarak bilinmekte olup öncelikle *Tylophora*, *Vincetoxicum*, *Pergularia* ve *Cynanchum* cinslerini

de içerisinde alan *Asclepiadaceae* familyası bitkilerinden izole edilmiş ve bu bitkilere özgü bileşiklerdir (32, 41-44). Ayrıca *Hypoestes verticillaris* (*Acanthaceae*), *Cryptocarya phyllostemmon* (*Lauraceae*) (45-47), *Ficus hispida* ve *F. septica* (*Moraceae*) (48, 49) türlerinde de varlığı rapor edilmiştir. Bu bileşikler alkaloidlerin küçük bir grubu olup belirgin sitotoksik aktiviteleri nedeniyle bilinmektedir (50-52). Bu alkaloidler aynı zamanda *Vincetoxicum* ve *Tylophora* cinslerine ait türlerin tıbbi kullanımlardan sorumlu ana bileşiklerdir (9, 24).

Fenantroindolizidin alkaloidlerini içeren bitkiler Doğu Asya ülkelerinde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (53). Bu alkaloidlerin: antiinflamatuvar (44, 51, 54-57), antiastmatik (58-60) ve antianflaktik özelliklerinin olduğu (53, 59, 60) *in vivo* çalışmalarla gösterilmiş (51); ayrıca antiviral (61-63), antifungal, antibakteriyal (24, 31, 43, 51, 64-66), antiamebik (37, 58, 67, 68), sitotoksik (61, 69, 70), antitümör (44, 48, 71-74), *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser hücre büyüme inhibisyonu (54, 68), antilösemik (58, 61), antialerjik (60), antiarthritis (43, 75), antiotoimmün (56), Santral Sinir Sistemi depresanı (53, 67), kardiyovasküler ve immünolojik etkilere sahip oldukları (55) ve *in vivo* antilupus (75) aktivite gibi geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinin (55) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fenantroindolizidin alkaloidlerinin insektisit ve insekt antifeedant aktivite ile ilişkili olduğu saptanmış (24, 58, 61) ve bu bileşiklerin böcekler (76, 77), tütün mozaik virüsü (78) ve bakterilere (53, 79) karşı antibiyotik aktiviteli olduğu da rapor edilmiştir.

Fenantroindolizidin alkaloidleri sitotoksik aktiviteleri nedeniyle bilinen bileşiklerdir ve bu nedenle antikanser ajan olarak potansiyel terapötik etkileri araştırılmaktadır (51). Bu alkaloidler belirgin sitotoksik aktiviteleri nedeniyle sentezi ve modifikasyonu hedeflenen bileşiklerdir (42, 53, 57, 71, 80, 81).

Yapılan literatür taramaları *Vincetoxicum* cinsine ait türler üzerinde yapılmış çok fazla fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmasının olmadığını göstermiştir. Ayrıca literatür bilgileri göz önüne alındığında Türkiye'de *Vincetoxicum* cinsine ait türler ile yapılmış bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu cins üzerinde az sayıda araştırmanın yapılmış olması *Vincetoxicum* taksonlarının fitokimyasal ve biyoaktivite açısından incelenmesini ve gerek etken madde gerekse aktivite açısından değerlendirilip değerlendirilmeyeceğinin

belirlenmesi konusunu gündeme getirmiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında Flora of Turkey and The East Aegean Islands'da kayıtlı *Vincetoxicum* cinsine ait kısım incelenerek endemik türleri içeren taksonlar olan *V. canescens* türünün alt türleri *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* (endemik), *V. fuscatum* türünün alt türleri *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* ve *V. fuscatum* subsp. *boissieri* (endemik) ve *V. parviflorum* (endemik) araştırma konusu olarak belirlenmiştir. Seçilen bu türlerin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden elde edilen ekstraler kalitatif olarak etken madde grupları açısından incelenmiş; alkaloid içerdikleri belirlenen toprak üstü kısımlarının ekstreleri fraksiyonlara ayrılmış ve LC/MS/MS analizleri ile bu fraksiyonlar incelenerek alkaloidlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca fraksiyonlardan kolon kromatografisi uygulanarak elde edilen bu bileşiklerin NMR spektroskopisi teknikleri ile kimyasal yapılarının tayini ve bu bileşiklerle fraksiyonların LC/MS/MS analizlerinin birlikte değerlendirilmesi ile fenantroindolizidin alkaloid profilinin saptanması hedeflenmiştir. Böylelikle çalışılan türler arasında fenantroindolizidin alkaloidleri açısından önemli olabilecek takson bulunup bulunmadığı belirlenmiş olacaktır. Ayrıca ekstrelerin insekt antifeedant ve antifungal aktivite açısından analiz edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar ilginç biyolojik aktiviteleri nedeniyle sentezleri ve modifikasyonları hedeflenen fenantroindolizidin alkaloidleri açısından çalışılan türlerin değerlendirilip değerlendirilemeyeceği hakkında bilgi verecek ve çalışılan türlerin aktivitelerinden sorumlu bileşik grubu olarak düşünülen fenantroindolizidin alkaloidleri açısından bitki ekstreleri ve bileşikleri daha ileri biyolojik aktivite çalışmaları için yol gösterici olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. *Asclepiadaceae* Familyası

Çok yıllık bitki, yarı çalı veya çalı, lateksli, gövde dik olarak yükselmiş veya sarılıcı. Yapraklar karşılıklı veya halka halinde dizilmiş, basit, tam, stipulasız. Çiçekler hermafrodit, aktinomorf, hipogin, koltuklarda veya terminal simlerde veya şemsiye şeklinde, bazen tek. Kaliks 5± bileşik sepalli, kalıcı. Korolla petalleri birleşik, tekerleksi veya kampanulat, 5 - loblu, tüp kısa; korona tek veya çift, zarımsı veya etli, 5, 10 veya daha fazla segmentten oluşmuş. Stamenler 5, korolla tüpünün tabanına veya korolla tüpüne yandan bağlanmış. Anterler halka şeklinde birleşik, genellikle stigmada birleşik, ginostemium şeklinde; nadiren stamenler serbest. Polen taneleri pollinia içinde veya dörtlü gruplar halinde, translatörlere bağlanmış halde. Ovaryum üst durumlu; plasentasyon kenarsal, ovüller çok. Karpeller 2, stigmada birleşik. Meyve bir folikül çifti içine dağılmış, veya bir tanesi daima verimsiz. Tohumlar çok sayıda yassı, tepede tüy demeti ile birlikte.

Bazı cinsleri arasındaki sınırlar hala kritiktir (ör: *Cynanchum* ve *Vincetoxicum*). Bazen bu familya iki küçük familyaya ayrılır: *Periplocaceae* (polenler dörtlü gruplar halinde) ve *Asclepiadaceae* (polenler pollinia'larda) (4).

Flora of Turkey and The East Aegean Islands'da kayıtlı *Asclepiadaceae* familyasına ait cinslerin tayin anahtarı:

1. Korona segmentleri uzamış, aristalı; polen dörtlü gruplar halinde.
2. Çiçekler mor-menekşe renkli; korona segmentleri bölünmemiş; foliküller tepede biraz bileşik.

1. *Periploca*

2. Çiçekler beyaz; korona segmentleri ikiye yarık; foliküller serbest, yatay veya akut köşelerde dizilmiş. **2. *Cyprinia***
1. Korona segmentleri kısa, aristasız; polen pollinia'da.
3. Foliküller kılsı; yapraklar linear-lanseolat. **3. *Gomphocarpus***
3. Foliküller pürüzsüz; yapraklar ovattan lanseolata doğru, taban kordat veya değil.
4. Korona çift, 10 segmentli. **4. *Cynanchum***
4. Korona tek, 5 segmentli.
5. Bitki çok yıllık; korolla-lobları ovat veya oblong; korona segmentleri birleşik. **5. *Vincetoxicum***
5. Yarı çalimsı bitkiler veya çalı; korolla lobları linear; korona segmentleri serbest **6. *Cionura***

2.1.2. *Vincetoxicum* N. M. Wolf K. BROWICZ

Çok yıllık, gövde dik olarak yükselmiş veya kısmen sarılıcı. Yapraklar karşılıklı, kısa petiolat, genellikle ovat veya ovat-lanseolat. İnfloresans koltuklarda, simoz, az çiçekli. Çiçekler beyaz, sarı, yeşilimsi, kahverengimsi, kırmızımsıdan hemen hemen siyaha doğru. Korolla tomurcukta burulmuş, tekerleksi veya kampanulat, derince bölünmüş; korona tek, etli, huni şeklinde, 5 derin veya az derin parçaya ayrılmış, dairemsi veya üçgenimsi segmentli. Pollinia sarkık. Stigma kalın, beş köşeli. Foliküller iğ şeklinde, pürüzsüz, genellikle tek ve tüysüz. (Syn. *Alexitoxicon* St. Lager; *Antitoxicum* Pobed.) (4).

Bazıları hibridize olmuş, birçoğu oldukça benzer türleri içeren zor bir gruptur. Vejetatif özellikleri aynı bitkide bile oldukça çeşitlidir ve sadece sınırlı alanda bazı türlerin teşhisi için kullanılabilir. Özellikle korona şekli ve tozlaşma mekanizması ile ilgili floral özellikler çok karmaşık ve ne yazık ki stabil değildir. En kullanışlı özellikler: çiçek rengi ve büyüklüğü, korolla loblarının kısa yumuşak tüyleri ve infloresans şeklidir (sapsız veya saplı, yoğun veya dağınık) (4).

Tür Tayin Anahtarı

1. Çiçekler beyaz, sarı veya yeşilimsi.
2. Tüm bitki gri-tomentoz; çiçekler sarı. **1. *canescens***
2. Bitki hafif tüysüz veya \pm kısa yumuşak tüylü, ama gri değil; çiçek rengi çeşitli.
3. Çiçekler beyaz veya sarı; korolla loblarının üst yüzeyi tüysüz veya tek kıvrık tüylü. **8. *hirundinaria***
3. Çiçekler yeşilimsi veya sarımsı-yeşil; korolla loblarının üst yüzeyi beyaz-yünlü. **2. *tmoleum***
1. Çiçekler kahverengimsi veya kırmızımsıdan hemen hemen siyaha doğru.
4. Gövde sarılcı, 2 m'ye kadar uzun. **4. *scandes***
4. Gövde dik olarak yükselmiş, sarılcı değil, 70 cm'ye kadar uzun
5. Tüm bitki kadifemsi tüylü. **3. *speciosum***
5. Bitki hafif tüysüz veya \pm kısa yumuşak tüylü
6. Simoz çiçek durumlarından herhangi biri glomerat veya kapitat, sıkı, belirgin şekilde saplı; yapraklar yarı sapsız. **7. *funebre***
6. Simoz çiçek durumlarından herhangi biri gevşek, sapsız veya kısa saplı; pediseller 6mm ye kadar.
7. Çiçekler 6-10 mm çapında. **5. *fuscatum***
7. Çiçekler 2-3(-4) mm çapında. **6. *parviflorum***

2.1.3. Çalışılan Türlerin Özellikleri

***V. canescens* (Willd.) Decne**

Gövde 70 cm ye kadar, \pm yatık veya dik, gri tomentoz. Yapraklar 6 (-8) cm'den X 4(-6) cm, ovat, akut, sapsız veya belirsizce petiolat, her iki yanı gri tomentoz, özellikle de gövdenin üst kısımları. Simler 5-12 çiçekli, sıkı. Çiçekler yaklaşık 8 mm çapında, hemen hemen sapsız veya 5 mm ye kadar saplı. Kaliks lobları ovat-lanseolat, dışı \pm tüylü. Korolla lobları sarı, üçgenimsi-oblong, iç kısmı beyaz yumuşak tüylü. Foliküller ovoit, 7 X 1-5 (-2)

cm, tepede akuta doğru daralır, gri kısa yumuşak tüylü. *Çiçeklenme 5-7. kireç taşı sırtları, 300-1900 m.*

1. İnfloresans sapsız

subsp. *canescens*

Yayıliş: Başlıca merkez, batı, güney, doğu Anadolu, Adalar.

2. İnfloresans ± saplı (saplar 2 cm'ye kadar)

subsp. *pedunculata* (Endemik)

Yayıliş: Güneybatı Anadolu, Adalar.

***V. fuscatum* (Hornem) Reichb. fil.**

Gövde dik olarak yükselmiş, 15-40 cm, basit, ± kısa yumuşak tüylü, özellikle üst bölümleri. Yapraklar 6-5 X 4 cm, oldukça ince, altı genellikle genişçe ovat tepede obtus veya kısaca akut, üst kısımlar ovat-lanseolattan lanseolata doğru, genellikle meyvede aşağı doğru yönelmiş, tabanda dairemsi veya subkordat, damarlar kısa yumuşak tüylü, tepede siliat; petioller 1 cm kadar. Simoz çiçek durumlarından herhangi biri 3-6- çiçekli, ± sapsız. Pediseller ince, 6 mm kadar, kısa yumuşak tüylü. Kaliks lobları lanseolat. Korolla ± koyu kahve, 0.6-1 cm çapında; loblar oblong, obtus, kaliks loblarının 2 katı kadar. Foliküller 6 cm X 8 mm, tüysüz; tepede uzamış, dar.

1. Korolla loblarının üst yüzeyi tüysüz veya sadece az, kıvrık tüylü. **subsp. *fuscatum***

Yayıliş: Başlıca Kuzey & İç Anadolu.

2. Korolla loblarının üst yüzeyi beyaz-kısa yumuşak tüylü. **subsp. *boissieri* (Endemik)**

Yayıliş: Başlıca İç Anadolu.

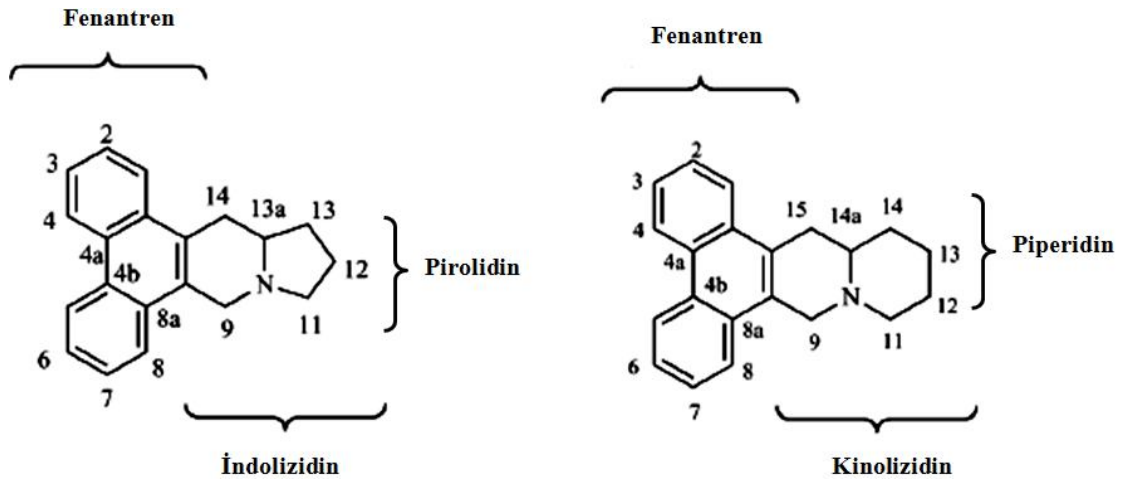
***V. parviflorum* Decne. (Endemik)**

V. fuscatum subsp. *fuscatum* dan 2-3 X daha küçük çiçeklere sahip olması ile ayrılır (2-3 (-4) mm çapında), soluk; infloresansı kısaca saplı; gövde dallanmış. *Çiçeklenme 7. Nehir yatakları, 900-1700 m.* Yayıliş: Merkez & Güney Anadolu (4).

2.2. *Vincetoxicum* Türleri Üzerinde Yapılmış Fitokimyasal Araştırmalar

2.2.1. Alkaloitler

Asclepiadaceae familyasına ait cinslerin yaygın olarak fenantroindolizidin alkaloitleri (82) ve nadiren ise fenantrokinolizidin alkaloitleri (55, 82) içerdiği bilinmektedir. Bu familyada yer alan *Vincetoxicum*, *Tylophora* ve *Cynanchum* cinslerinin fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitleri içerdiği ve bu alkaloitlerin biyogenetik olarak indol alkaloitlerinden farklı olduğu yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (83). Fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitleri yapısal olarak bağlantılı pentasiklik doğal bileşiklerdir (44, 81, 84). Doğal bileşiklerin küçük bir grubunu oluşturan bu bileşikler kuvvetli farmakolojik etkileri nedeniyle pek çok kimyasal ve biyolojik aktivite çalışmasına konu olmuştur (82, 85). Fenantroindolizidin alkaloitleri biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin ilginç bir grubu olup (58) fenantren substituentlerinin indolizidinle birleşmesi sonucu oluşmuştur (Şekil 2.1.) (68).



Şekil 2.1. Fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitlerinin genel kimyasal yapısı (68).

2.2.1.1. *Vincetoxicum* Türlerinde Bulunan Fenantroindolizidin Alkaloitleri

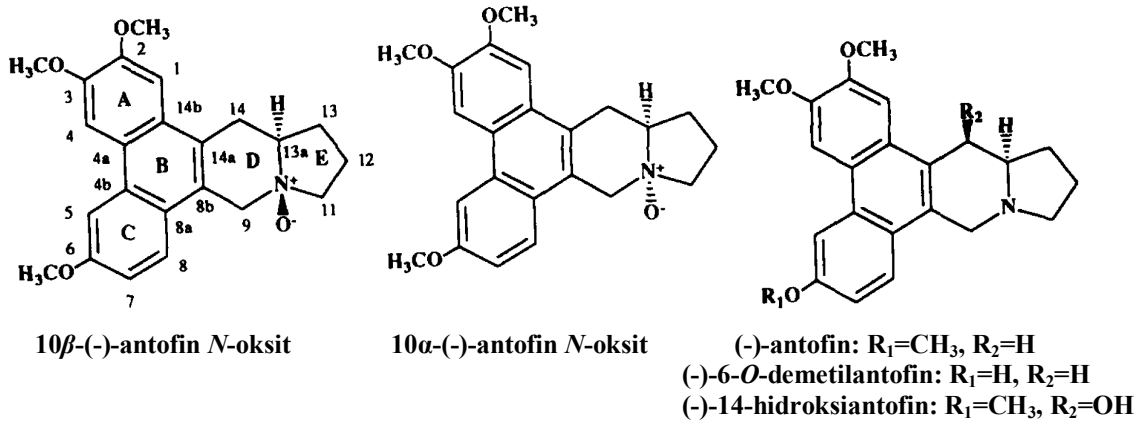
Tiloforin alkaloiti ilk kez 1935 yılında *T. indica* türünden izole edildiğinden (68) fenantroindolizidin alkaloitleri tilofora alkaloitleri veya tiloforin alkaloitleri olarak da bilinmektedir (71). 1935 yılında tiloforin'in ilk izolasyonu gerçekleştirilmiş (48, 61, 68-70, 84, 86) olmasına rağmen yapısı ve sterokimyası ancak 1960'da aydınlatılabilmıştır (68). (-)-tiloforin'in ilk izolasyonundan bu yana birçok fenantroindolizidin alkaloiti özellikle antitümör aktivite gibi çeşitli ve kuvvetli farmakolojik özellikleri nedeniyle ilgi çekici bulunmuştur (48, 70, 75, 72, 81, 86, 87). Bu nedenle bu grup bileşikler ilk günden itibaren sentezi, modifikasyonu ve yapı-aktivite bağlantıları (SAR) hedeflenen bileşikler haline gelmiş (75) ve heterosiklik yapıdaki bu doğal bileşiklerin yapısı, sterokimyası ve sentezi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (55) Yapılan literatür taramalarında tiloforin, tilokrebrin, tiloforinin (53), antofin (53, 55, 88) ve deoksipergularinin (veya deoksitiloforinin) (88) alkaloitlerinin bu grubun en iyi bilinen örnekleri olduğu görülmüştür.

Tiloforin'in 1935 yılında ilk izolasyonundan buyana bir çok araştırmacı tarafından çeşitli doğal kaynaklardan 60'dan fazla fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloiti, bunların seko analogları (61, 81, 84) ve *N*-oksitleri (63) izole edilmiştir.

Vincetoxicum cinsine ait türlerle (ör: *V. officinale*) yapılan çeşitli araştırmalarda tiloforin ve yapısı tam olarak aydınlatılamamış benzer bir alkaloitin izole edildiği bildirilmiştir. Antofin'in ise *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. officinale*, *V. hirundinaria*) ve *Antitoxicum funebre* türlerinden izole edildiği farklı çalışma grupları tarafından gösterilmiştir. Capo ve Saa tarafından 1989 yılında yapılan bir çalışmada ise *V. nigrum* türünün toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinin alkaloit fraksiyonunda yeni fenantroindolizidin alkaloitleri araştırılmış; (-)-antofin ve tanımlanamayan iki minör alkaloitin daha izole edildiği bildirilmiştir (89).

Lavault ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada *V. hirundinaria* türünün gövde ve kök kabuklarından elde edilen hekzan ve kloroform ekstraktları incelenmiş ve bitkinin köklerin hekzan ekstresinden iki yeni fenantroindolizidin *N*-oksit türevi: 10β -(-)-antofin *N*-oksit ve 10α -(-)-antofin *N*-oksit; kök ve gövde kabuklarının kloroform ekstraktlarından ise ayrı ayrı (-)-antofin, (-)-6-*O*-

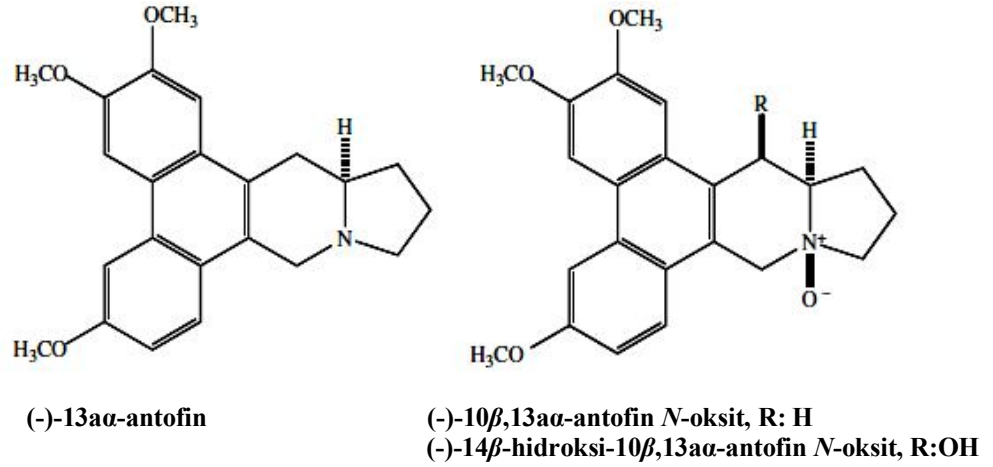
demetilantofin ve (-)-14-hidroksiantofin çeşitli miktarlarda izole edilmiştir (Şekil 2.2.). Ayrıca çalışmada D/E konfigürasyonunun 10 α -(-)-antofin *N*-oksit bileşiği için *cis* ve 10 β -(-)-antofin *N*-oksit bileşiği için ise *trans* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ilk kez aynı bitkide *cis* ve *trans* *N*-oksit türevlerinin varlığı gösterilmiş ve alışılmamış bir durum olarak literatüre geçmiştir (37).



Şekil 2.2. *V. hirsutaria* türünden elde edilen alkaloidler (37).

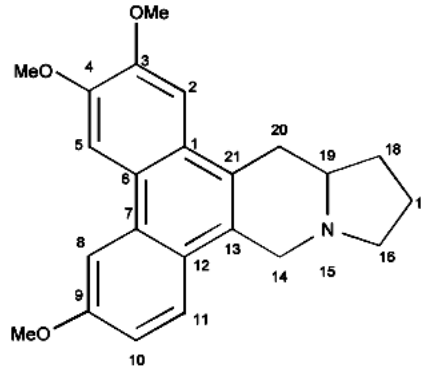
Staerk ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada Orta Asya'da yetişen ve üzerinde daha önce çalışma yapılmamış endemik bir tür olan *V. pumilum* Decne. türünün kök ve toprak üstü kısımlarının MeOH-CH₂Cl₂'li ekstralarının alkaloid fraksiyonundan izole edilen bileşiklerin; ¹H ve ¹³C NMR spektrumları literatür bilgileri ile karşılaştırılmış ve (-)-13 α -antofin, (-)-10 β ,13 α -antofin *N*-oksit ve (-)-14 β -hidroksi-10 β ,13 α -antofin *N*-oksit alkaloidleri oldukları belirlenmiştir (Şekil 2.3.). Bu çalışmada *V. pumilum* türünde fenantroindolizidin alkaloidlerinin varlığının gösterilmesi kompleks *Asclepiadaceae* familyasının filogenetik taksonomisi üzerine yapılan bir çok çalışma ile de uygunluk göstermiştir (7).

Mogg ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün taze yaprak, olgun meyve ve köklerinden hazırlanan etanollü ekstralarında biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yardımıyla (-)-antofin (Şekil 2.4.) ve (-)-antofin'den farklı fakat sınıflandırılmamış ikinci bir bileşik izole edilmiştir (24).



Şekil 2.3. *V. pumilum* türünün kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloidler (7).

V. rossicum türüne ek olarak fenantroindolizidin alkaloidlerinden özellikle (-)-antofin, antofin oksit ve birçok türevlerinin *V. hirundinaria* türünün toprak üstü kısımlarından ve köklerinden de az miktarda izole edildiği bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda *V. pumilum* türünün köklerinde, *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin ise kök, yaprak ve tohumlarında (-)-antofin'in varlığı gösterilmiştir (66).



Şekil 2.4. *V. rossicum* türünden elde edilen (-)- antofin (24).

2.2.1.2. *Vincetoxicum* cinsine yakın cinslerde bulunan alkaloidler

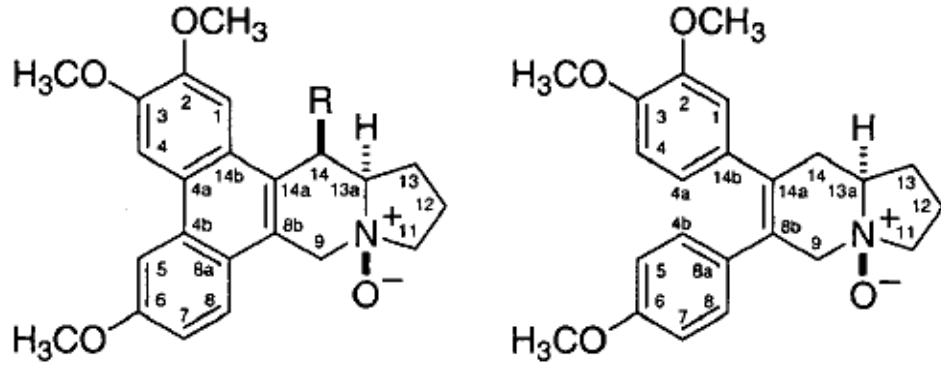
2.2.1.2.1. Fenantroindolizidin Alkaloidleri

Vincetoxicum cinsine yakın cinsler olan *Tylophora* (24) ve *Cynanchum* (78) cinslerine ait türler üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar bu cinslerin fenantroindolizidin alkaloidleri taşıdığını göstermiştir (24, 78).

Eibler ve arkadaşları tarafından 1995 yılında *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. officinale*, *V. hirundinaria*) türü üzerinde yapılan bir çalışmada YBSK analizleri yardımıyla bitkide bilinen alkaloidler A-D, bunlara ek olarak çeşitli fenantroindolizidin alkaloidleri ve naftoindolizidin türevi bileşiklerin varlığı saptanmıştır. Bu bileşiklerin yapıları UV ve parçacık ışın (PB-EI) kütle spektrumu ile kısmen tespit edilmiş olmasına rağmen tanımlanamayan bileşiklerin olduğu da bildirilmiştir (90).

Daha önce yapılan çalışmalarda *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. officinale*, *V. hirundinaria*) türünün alkaloid fraksiyonlarının İTK analizlerinden elde edilen veriler bu alkaloidlerin polar ve apolar dizilerinin olduğunu göstermiştir. Staerk ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bu çalışma polar alkaloidlerin analizi ile sınırlandırılmıştır. *C. vincetoxicum* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen MeOH:CH₂Cl₂:sulu NH₃ (50:50:1) ekstresinin EtOAc fraksiyonundan 3 fenantroindolizidin *N*-oksit izole etmiş ve bunlar bilinen (-)-10 β -antofin *N*-oksit ve (-)-10 β , 13 α -14 β -hidroksiantofin *N*-oksit ve ek olarak yeni bir alkaloid olan (-)-10 β , 13 α -sekoantofin *N*-oksit olarak tanımlanmış ve % verimleri belirlenmiştir (Şekil 2.5.) (32, 91).

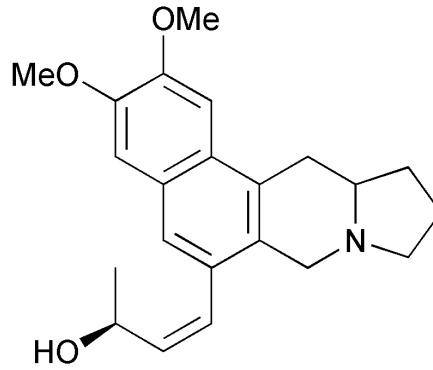
Jirovsky ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada YBSK-MS teknikleri kullanılarak *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. officinale*, *V. hirundinaria*) türünde bulunduğu bilinen, unstabil minör alkaloid Vinceten'in yan zincirinin kesin konfigürasyonu belirlenmiştir (Şekil 2.6.) (91).



(-)-10 β -antofin *N*-oksit, R: H
 (-)-10 β , 13 α -14 β -hidroksiantofin *N*-oksit, R: OH

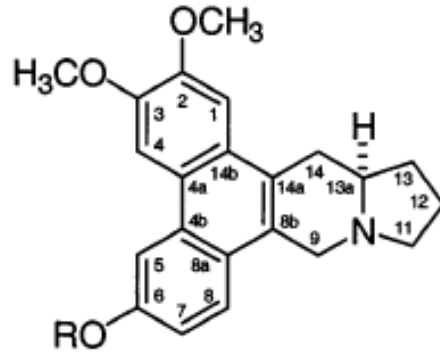
13 α -sekoantofin *N*-oksit

Şekil 2.5. *C. vincetoxicum* türünden elde edilen alkaloidler (32).

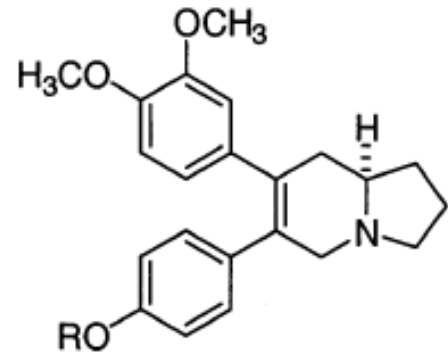


Şekil 2.6. Vinceten alkaloidi (91).

Staerk ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir diğer çalışmada *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. officinale*, *V. hirundinaria*) türünün yapraklarından hazırlanan CH₂Cl₂ ve MeOH-CH₂Cl₂'li ekstrelerin alkaloid fraksiyonlarından bilinen iki fenantroindolizidin alkaloid [(-)-(R)-13 α -antofin ve (-)-(R)-13 α -6-*O*-desmetilantofin] ve 2 yeni doğal fenantroindolizidin alkaloidi [(-)-(R)-13 α -sekoantofin ve (-)-(R)-13 α -6-*O*-desmetilsekoantofin] çeşitli verimlerde izole edilmiş (Şekil 2.7.) ve bileşiklerin yapıları COSY, NOESY, HSQC ve HMBC gibi NMR teknikleri yardımıyla aydınlatılmıştır (45).



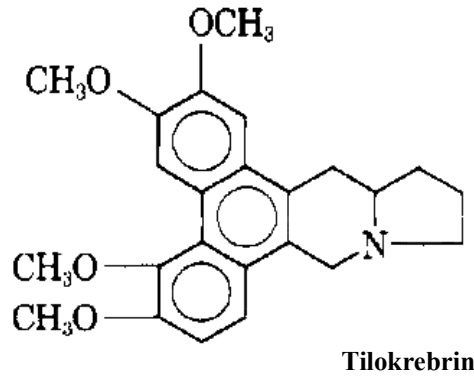
(-)-(R)-13α-antofin, R: CH₃
 (-)-(R)-13α-6-O-desmetilantofin, R: H



(-)-(R)-13α-sekoantofin, R: CH₃
 (-)-(R)-13α-6-O-desmetilsekoantofin, R: H

Şekil 2.7. *C. vincetoxicum* türünden izole edilen alkaloidler (45).

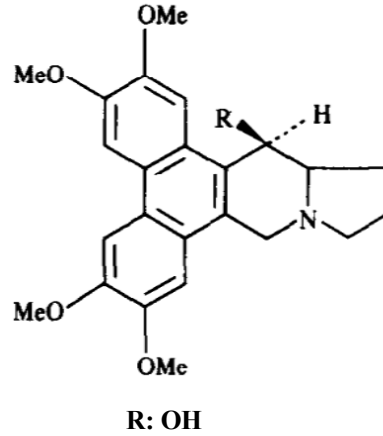
Gellert ve arkadaşları tarafından 1962 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin yapısı gösteren levojir alkaloid tilokrebrin ilk kez *Tylophora crebriflora* türünden izole edilmiş; yapısı analitik ve spektroskopik tekniklerle belirlenmiştir (Şekil 2.8.) (92, 93).



Şekil 2.8. *T. crebriflora* türünden izole edilen tilokrebrin alkaloidi (93).

Mulchandani ve Venkatachalam tarafından 1976 yılında yapılan bir çalışmada *Pergularia pallida* türünün köklerinin EtOH ve CHCl₃ ekstraktlarının alkaloid fraksiyonlarından 5 fenantroindolizidin alkaloidi karışımı (tiloforin, tiloforinidin, pergularinin, desoksipergularinin ve tanımlanamayan bir alkaloid) 0.08 % verimle izole

edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (94). Aynı çalışma grubu tarafından 1984 yılında yapılan bir başka çalışmada ise *T. asthmatica* ve *P. pallida* türlerinin köklerinden minör alkaloid tiloforininin 0.0005 % verimle izole edilmiş; yapısı 14-hidroksitiloforin olarak karakterize edilmiştir (Şekil 2.9.) (95).

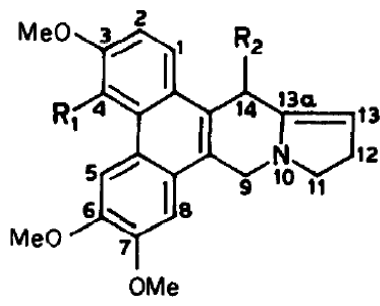


Şekil 2.9. *T. asthmatica* ve *P. pallida* türlerinin köklerinden izole edilen tiloforininin alkaloidi (95).

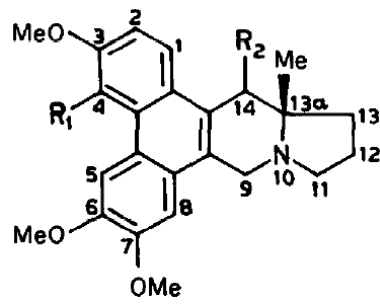
Bhutani ve arkadaşları tarafından 1984 yılında yapılan bir çalışmada *T. hirsuta* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen etilasetatlı ekstreden tilohirsutin, 13a-metiltilohirsutin, 13a-metiltilohirsutinidin, tilohirsutinidin ve 13a-hidroksiseptisin isimli 5 yeni fenantroindolizidin alkaloidi çeşitli verimlerde izole edilmiş ve 5. alkaloidin septisin'in 13a-hidroksi analogu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.10.) (96).

Bhutani ve arkadaşları tarafından 1985 yılında yapılan bir başka çalışmada *T. hirsuta* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen etilasetatlı ekstrenin alkaloid fraksiyonundan 13a-hidroksitiloforin alkaloidi izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 2.11.) (97).

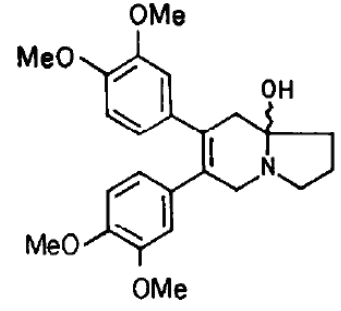
Ali ve Bhutani tarafından 1987 yılında yapılan bir çalışmada *T. hirsuta* türünün toprak üstü kısımlarından 7 minör alkaloid izole edilmiş ve bunlar bilinen alkaloidler 14-hidroksiizotilokrebrin (1), (+)-izotilokrebrin (2), (-)-tiloforin(3) ve 4-desmetilizotilokrebrin (4) ve bunlara ek olarak üç yeni alkaloid 14-desoksi-13a-metiltilohirsutinidin (5), 5-hidroksi-O-metiltiloforininidin (6) ve tilohirsutisin (7) olarak belirlenmiştir (Şekil 2.12.) (98).



Tilohirsutin, R₁: OMe R₂: H
Tilohirsutinidin R₁:R₂:OH

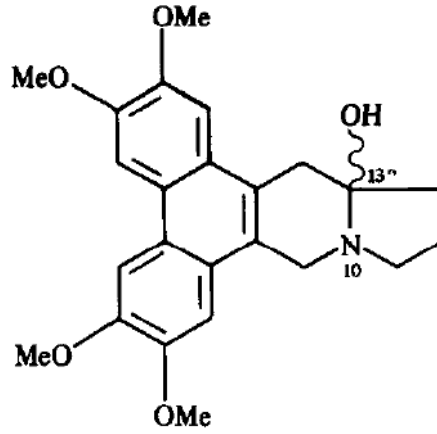


13a-metiltilohirsutin, R₁: OMe R₂: H
13a-metiltilohirsutinidin, R₁:R₂:OH

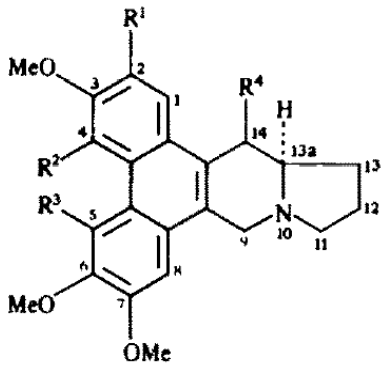


13a-hidroksiseptisin

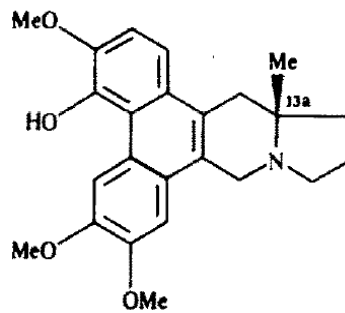
Şekil 2.10. *T. hirsuta* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloidler (96).



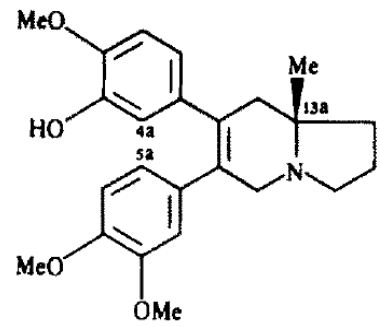
Şekil 2.11. *T. hirsuta* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen 13a-hidroksitiloforin (97).



1 R¹: R³: H; R²: OMe; R⁴: OH
2 R¹: R³: R⁴:H; R²:OMe
3 R¹: OMe; R²: R³: R⁴: H
4 R¹: R³: R⁴: H; R²: OH
6 R¹:R²:H; R³: R⁴:OH



5

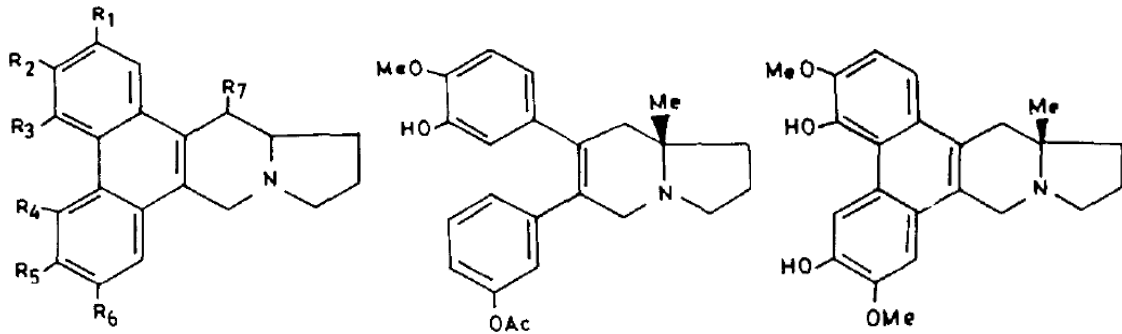


7

Şekil 2.12. *T. hirsuta* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloidler (98).

Tylophora cinsine ait türler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda E halkasında doymamışlığı bulunan veya angular (metil veya hidroksil) fonksiyonu olan veya sübstitüent sayısı, yapısı ve dağılımı farklı 14 fenantroindolizidin alkaloidi izole edilmiştir (99).

Ali ve Bhutani tarafından 1989 yılında yapılan bir çalışmada *T. indica* (Syn.: *T. asthmatica*) türünün tropik ve sub-tropiklerde yetişen iki farklı varyetesinin toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinden elde edilen alkaloid fraksiyonundan yedisi yeni ve dördü bilinen alkaloid olmak üzere toplam 11 alkaloid izole edilmiş ve % verimleri hesaplanmıştır. Yeni alkaloidler: tiloindisin A (**1**) (0.013 %), B (**6**) (0.017 %), C (**9**) (0.001 %), D (**10**) (0.005 %), E (**11**) (0.0002 %), (+)-14-hidroksiizotilokrebrin (**7**) (0.002 %) ve 4,6-desdimetilizotilokrebrin (**8**) (0.002 %) olarak isimlendirilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Çalışmada izole edilen diğer dört bilinen alkaloid ise tiloforin (**3**) (Sub-tropik varyetede: 0.05 % ve tropik varyetede: 0.03 %), 6-desmetiltiloforin (**2**) (0.003 %), tiloforinidin (**4**) (0.006 %) ve 5-hidroksi-O-metiltiloforinidin (**5**) olarak belirlenmiştir (Şekil 2.13.) (100).



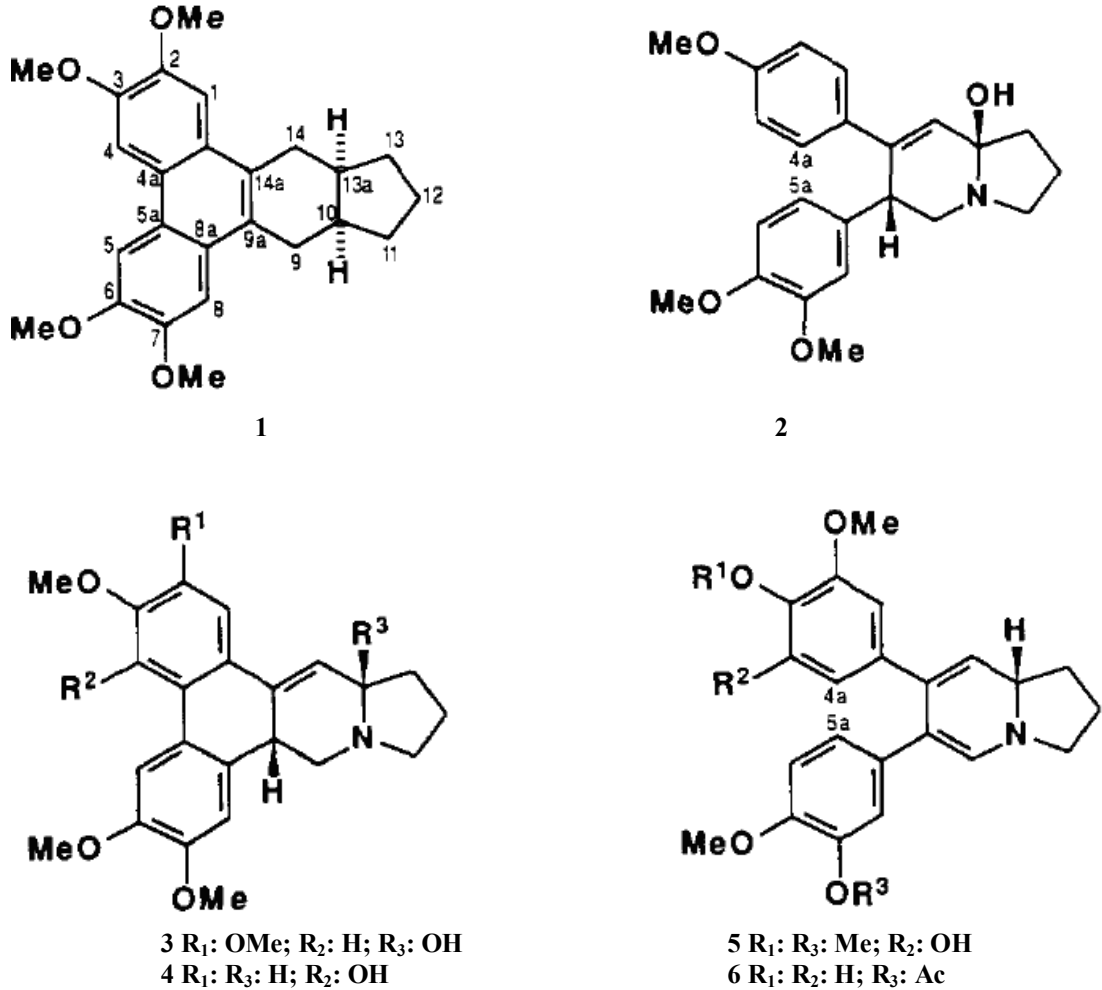
- 1 R₁: R₆: R₇: H; R₂: R₃: R₄: R₅: OMe
2 R₃: R₄: R₇: H; R₁: R₂: R₆: OMe; R₅: OH
3 R₃: R₄: R₇: H; R₁: R₂: R₅: R₆: OMe
4 R₁: R₃: R₄: H; R₂: R₆: OMe; R₅: R₇: OH
5 R₁: R₃: H; R₂: R₅: R₆: OMe; R₄: R₇: OH
7 R₁: R₄: H; R₂: R₃: R₅: R₆: OMe; R₇: OH
8 R₁: R₄: R₇: H; R₂: R₆: OMe; R₃: R₅: OH
10 R₁: R₇: H; R₂: R₃: R₅: R₆: OMe; R₄: OH
11 R₁: R₃: R₄: R₇: H; R₂: R₆: OMe; R₅: OH

6

9

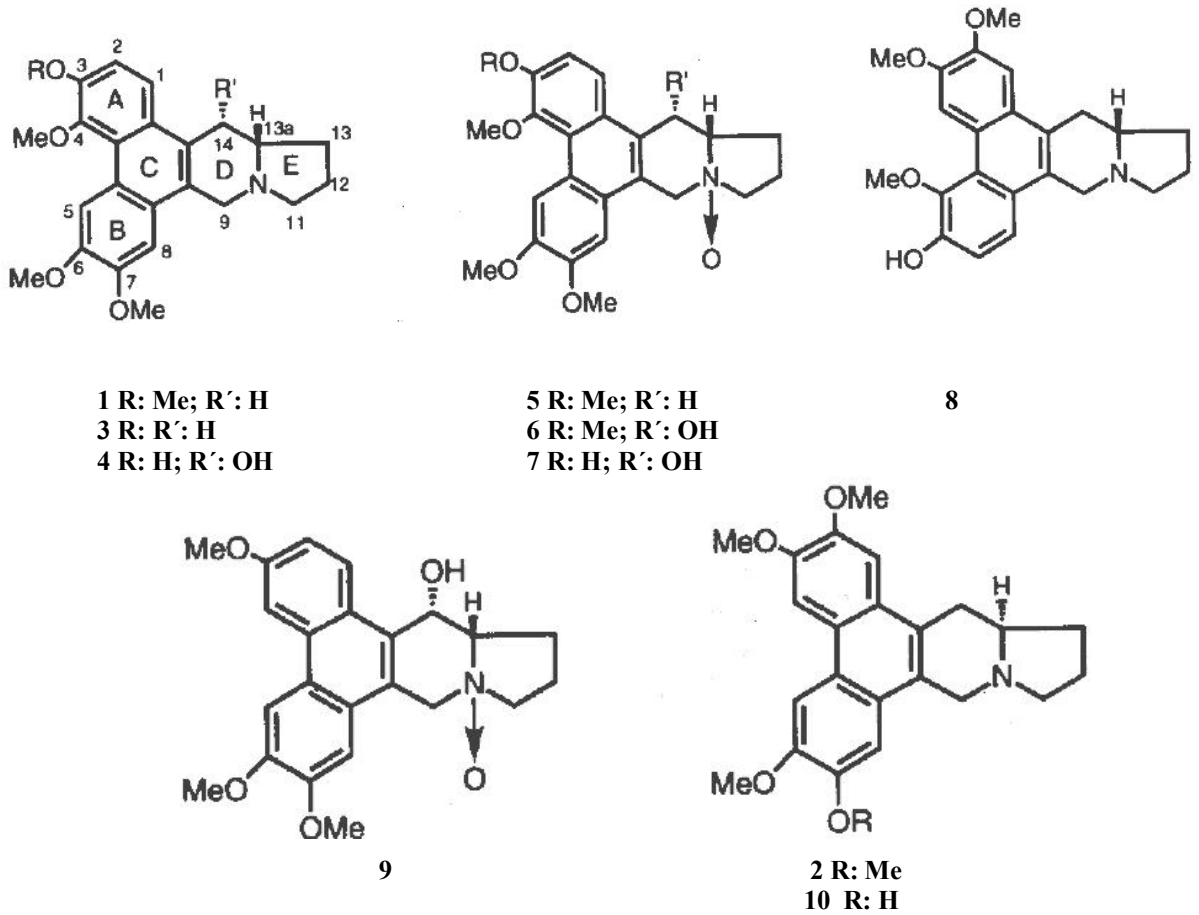
Şekil 2.13. *T. indica* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloidler (100).

Ali ve Bhutani tarafından *T. indica* türü üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda 5 yeni fenantroindolizidin alkaloidi: tiloindisin A-E izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (100, 101). Ali ve arkadaşları tarafından 1991 yılında yapılan çalışmada ise *T. indica* türünün toprak üstü kısımlarının metanollü ekstresinin etilasetat fraksiyonundan 5 yeni fenantroindolizidin alkaloidi: tiloindisin F (**2**) (0.004 %), G (**3**) (0.001 %), H (**4**) (0.0013 %), I (**5**) (0.009 %) ve J (**6**) (0.006 %) ve bunlara ek olarak benzsiklopent-sübstitüentli fenantren türevi tiloindan (**1**) ve tiloforin (0.015 %) bileşikleri izole edilmiş, % verimleri hesaplanmış ve yapıları spektral veriler ve kimyasal reaksiyonlar doğrultusunda aydınlatılmıştır (Şekil 2. 14.) (101).



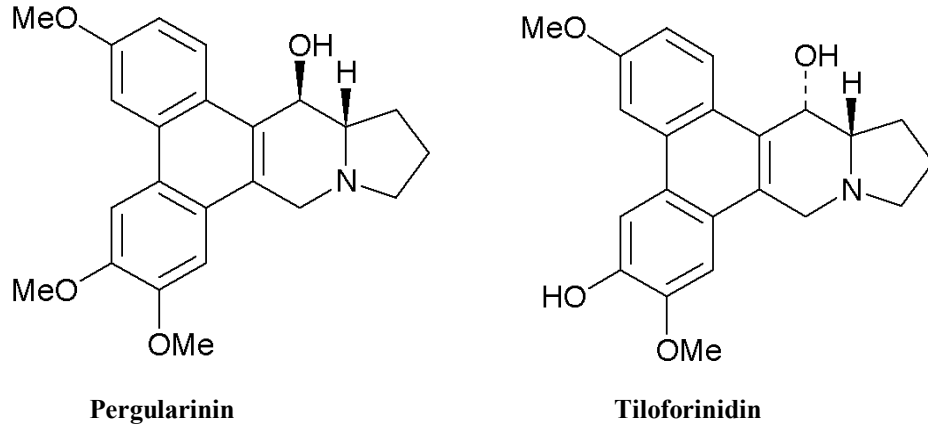
Şekil 2.14. *T. indica* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloidler (101).

Abe ve arkadaşları tarafından 1995 yılında yapılan bir çalışmada *T. tanakae* türünün taze yapraklarının metanol, kloroform ve benzen ekstraktlarından elde edilen alkaloid fraksiyonlarından on fenantroindolizidin alkaloidi izole edilmiştir (102-104). Bunlardan sekizi [3-demetilizotilokrebrin (**3**), 3-demetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin (**4**), izotilokrebrin *N*-oksit (**5**), 14- α -hidroksiizotilokrebrin *N*-oksit (**6**), 3-demetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin *N*-oksit (**7**), 6-demetiltilokrebrin (**8**), tiloforinin *N*-oksit (**9**), 7-demetiltiloforin (**10**)] ilk kez izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. İki bilinen alkaloidin ise izotilokrebrin (**1**) ve tiloforin (**2**) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.15.) (102).



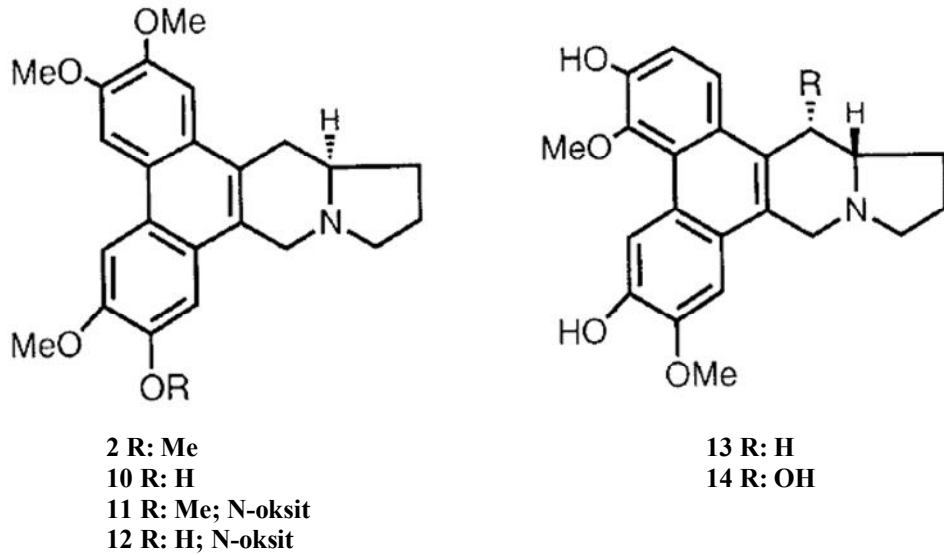
Şekil 2.15. *T. tanakae* türünün yapraklarından izole edilen fenantroindolizidin alkaloidleri (102).

Rao ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılan bir çalışmada *P. pallida* türünün köklerinden fenantroindolizidin alkaloidleri pergularinin ve tiloforinin'in izole edildiği bildirilmiştir (Şekil 2.16.) (53, 104).



Şekil 2.16. *P. pallida* türünün köklerinden elde edilen pergularinin ve tiloforinidin alkaloidleri (104).

Abe ve arkadaşları tarafından önceki yıllarda yapılan çalışmalarda *T. tanakae* türünden 10 fenantroindolizidin alkaloidinin izole edildiği bildirilmiştir (103, 104). Aynı çalışma grubu tarafından 1998 yılında yapılan bir başka çalışmada *T. tanakae* türünün yaprak ve gövdesinin metanollü ekstratlarının benzen ve kloroform fraksiyonlarının ileri araştırmalarında polar fraksiyonlarından (-)-tiloforin (**2**) ve 7-demetiltiloforin (**10**) alkaloidlerinin *N*-oksitleri **11** ve **12** numaralı alkaloidler ile **13**, **14** numaralı alkaloidler ilk kez izole edilmiş ve bu alkaloidlerin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 2.17.) (103).

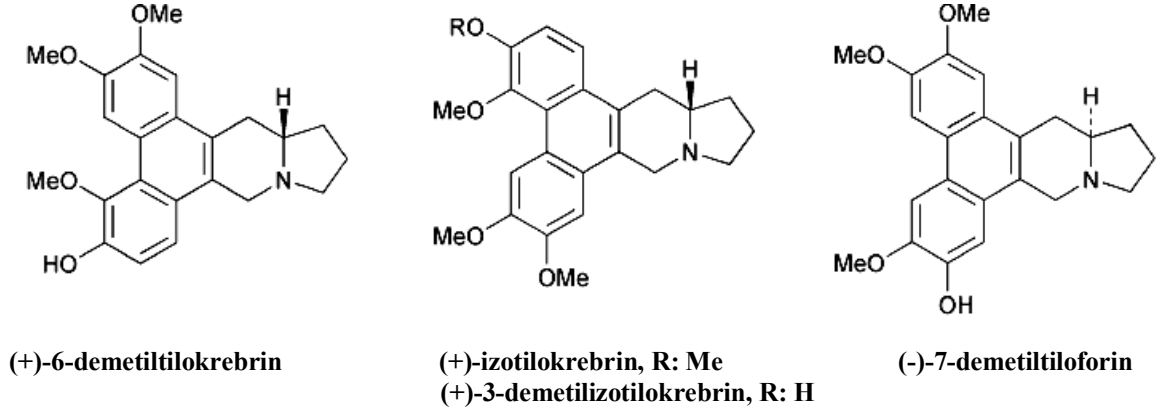


Şekil 2.17. *T. tanakae* türünden elde edilen bazı alkaloidler (103).

An ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada *C. komarovii* Al. Iijnski türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol ekstresinin fraksiyonlarından bilinen iki alkaloid: 7-demetoksiloforin ve 7-demetoksitiloforin *N*-oksit izole edilmiştir (78).

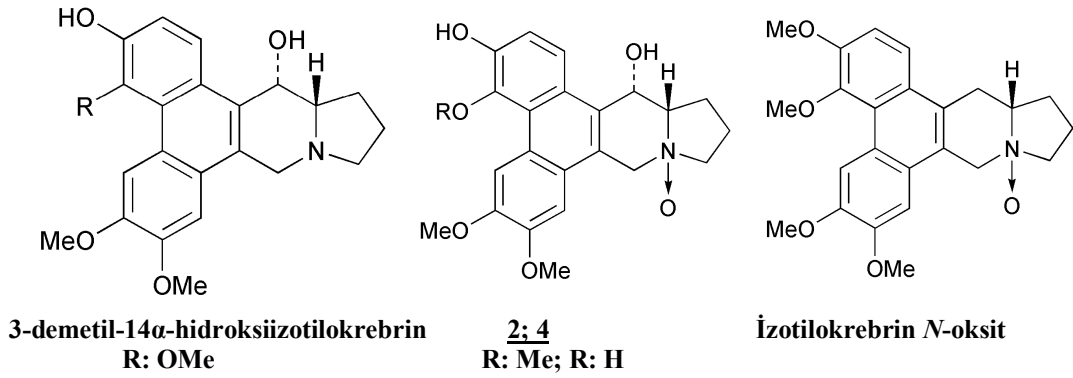
Bir çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda *T. tanakae* türünün *Ideopsis similis* türünün larvalarının besin kaynağı olduğu bildirilmiştir (103, 105). Komatsu ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada *I. similis* türünün pupalarından, insan gastrik kanser hücre dizisi-TMK-1'e karşı aktiviteleri yetişkin kelebeklerle aynı olan bazı sitotoksik bileşikler izole edilmiştir. Pupaların metanol ekstresinden hazırlanan bazı fraksiyondan YBSK analizleri ile biri yeni olmak üzere iki ana bileşik saflaştırılmıştır. Bunlardan *trans* - (+) - 3, 14 α - dihidroksi - 6, 7-dimetoksifenantroindolizidin yeni bir fenantroindolizidin alkaloidi olup bilinen diğer bir bileşik ise *trans* - (+) - 3, 14 α - dihidroksi - 4, 6, 7 - trimetoksifenantroindolizidin olarak bildirilmiştir. *T. tanakae* türünün yapraklarının çeşitli fenantroindolizidin alkaloidleri içerdiği bilindiğinden *I. similis* larvalarında bulunan sırasıyla 1. ve 2. bileşiğin büyük olasılıkla metabolik olarak bu alkaloidlerden türediği düşünülmüştür. Ayrıca 2. bileşiğin larvada etkin şekilde birikim yaptığı da saptanmıştır. 1 numaralı bileşik *I. similis* larvalarının konak bitkisi olan *T. tanakae* türünün yapraklarında tespit edilememiş fakat 2 numaralı bileşiğin miktarının larvada bulunan miktardan oldukça az olduğu görülmüştür (105). Böcek-bitki interaksiyonunun önemli ve büyüleyici yönü; fitofagus böcekler tarafından özellikle bitki sekonder metabolitlerinin seçici alımı ve depolanması olarak bildirilmiştir. Sekestrasyon olarak tanımlanan bu doğa olayı çeşitli ekolojik ve biyokimyasal prosesler süresince böcek ve fitokimyasallar arasındaki evrimsel ilişkilerin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (106). Yapılan çalışmalarda *I. similis* türünün larva evresi süresince sekesterleri ve konak bitki orjinli spesifik fenantroindolizidin alkaloidleri depoladığı gösterilmiştir (91, 106). Kelebekteki alkaloidlerin muhtemelen predatörlere karşı savunma rolünde görev aldığı ayrıca bu bileşiklerin yumurtlama stimulanı olarak da hareket ettiği bildirilmiştir. (+)-izotilokrebrin *N*-oksit, (+)-6-demetiltilokrebrin ve özellikle de (+)-izotilokrebrin, (+)-3-demetilizotilokrebrin ve (-)-7-demetiltiloforin alkaloidleri ayrı ayrı yumurtlamayı uyaran bileşikler olarak tespit edilmiş olmasına rağmen alkaloid karışımının daha etkili olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bitkide bulunan birçok

fenantroindolizidin alkaloitinin sinerjistik hareketinin kelebeğin konak seçiminde aracılık ettiğini göstermiştir (Şekil 2.18.) (91).



Şekil 2.18. (+)- 6-demethyllokrebrin, (+)-izotilokrebrin, (+)-3-demethylizotilokrebrin ve (-)-7-demethyltiloforin alkaloitleri (91).

T. tanakae türünün bileşenlerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarda tiloforin ve izotilokrebrin olmak üzere ikisi bilinen 14 fenantroindolizidin alkaloiti izole edilmiş ve bunların yapıları belirlenmiştir. Fakat izole edilen izotilokrebrin, tiloforin, tiloforinin, tilokrebrin ve septisin tipi alkaloitler arasından böceğin vücudundan sadece izotilokrebrin homologları 1-4 izole edilmiştir (106). 2001 yılında yapılan bu farklı çalışmada Abe ve arkadaşları tarafından *I. similis* türünün pupa ve imajlarının metanollü ekstresinden 3-demetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin, bunun *N*-oksidi (**2**) ve izotilokrebrin *N*-oksit isimli *T. tanakae* türünün bilinen metabolitleri ile 3,4-didemetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin(**4**) isimli yeni bir alkaloit izole edilmiştir (Şekil 2.19.) (91). Bu çalışmada ayrıca kültür bitkisinde alkaloit modeli de taranmış ve izotilokrebrin tipi alkaloitler (3,4,6,7-tetra-sübstituentli) en büyük grup olarak belirlenmiş; Japonya'nın güney-batı adalarından toplanan türlerde ise tiloforin tipi alkaloitler (2,3,6,7-tetra-sübstituentli) baskın olarak bulunmuştur. Bu durum daha önce tanımlandığı gibi bitki alkaloitlerinin paterninin bitkinin yetiştiği lokasyona veya şartlara göre değişiklik gösterdiği görüşünü desteklemiştir (106).

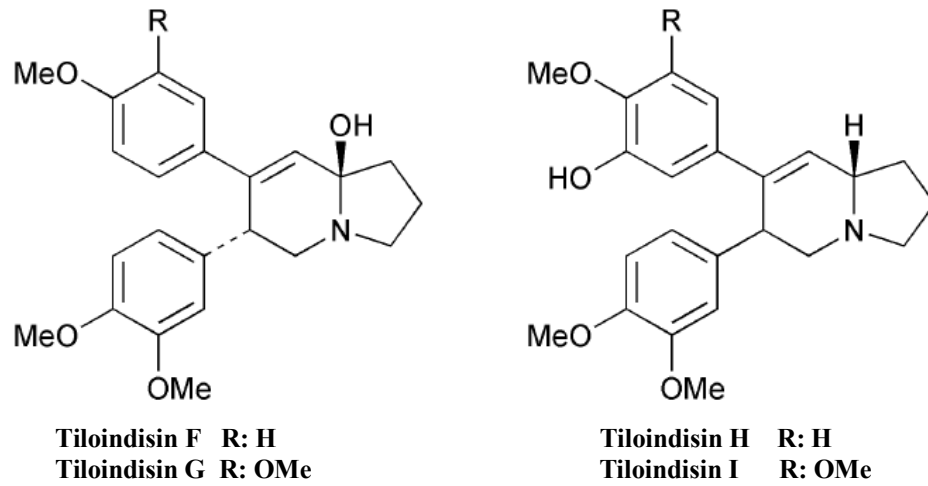


Şekil 2.19. *I. similis* türünün pupa ve imajlarının metanollü ekstresinden elde edilen alkaloidler (91).

Sugimura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda *I. similis* ve konağı *T. tanakae* türünden (+)-3-demetil-14α-hidroksiizotilokrebrin alkaloidinin N-oksidi ve (-)-7-demetiltiloforin alkaloidinin izole edildiği bildirilmiştir (91, 106).

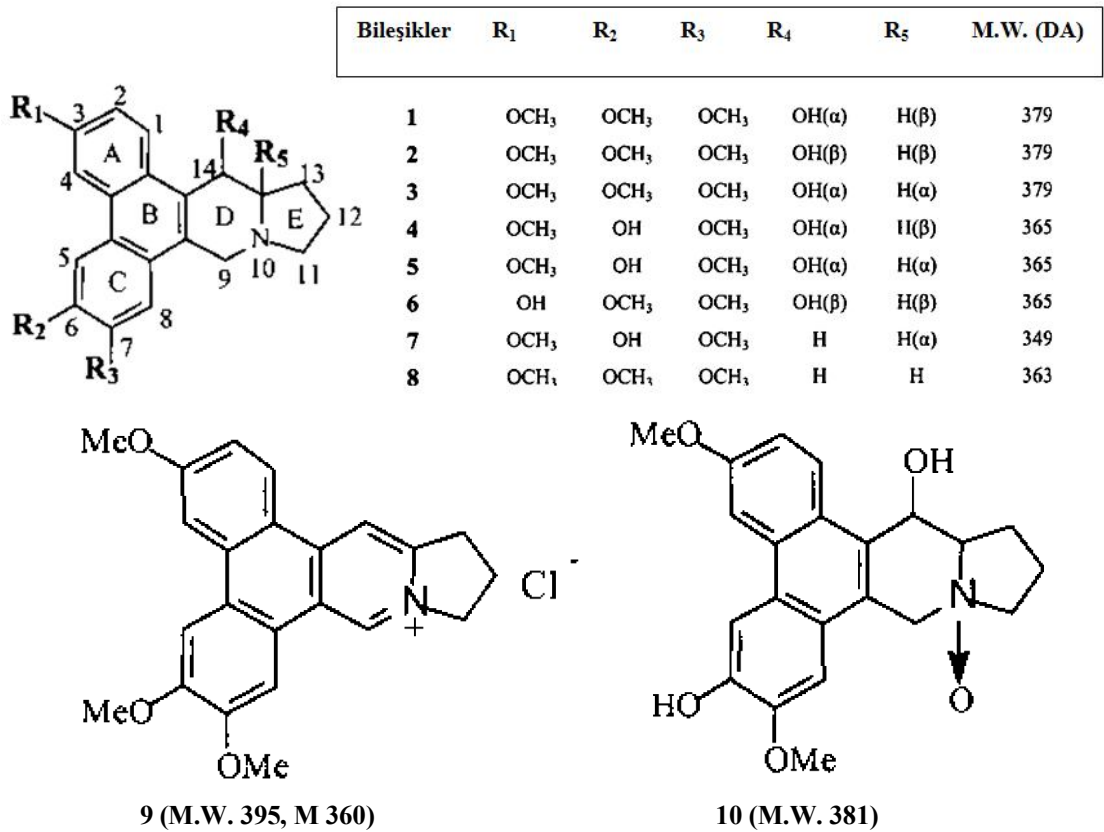
Ganguly ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *T. indica* türünün yapraklarının metanollü ekstresinin alkaloid fraksiyonundan elde edilen alkaloid karışımının karakterizasyonu yapılmış ve alkaloidlerin tiloforin, (±)-tiloforinin ve tiloforininin olduğu tespit edilmiştir (60, 107).

An ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *T. indica* türünün yapraklarından tiloindisin F-I (Tiloindisin F, Tiloindisin G, Tiloindisin H ve Tiloindisin I) isimli 4 sekofenantroindolizidin alkaloidinin izole edildiği bildirilmiştir (Şekil 2.20.) (91).



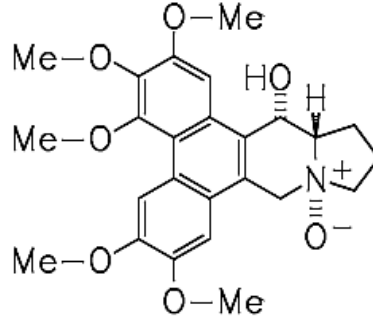
Şekil 2.20. *T. indica* türünün yapraklarından elde edilen Tiloindisin alkaloidleri (91).

Xiang ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada *T. atrofoliculata* türünün etanollü ekstresinden 10 fenantroindolizidin alkaloidi izole edilmiş ve ^1H - ve ^{13}C -NMR, FAB-MS, IR, UV ve CD spektroskopik yöntemleri kullanılarak yapıları aydınlatılmıştır. İzole edilen bu alkaloidler (13a*S*,14*S*)-3,6,7-trimetoksi - 14 - hidro - fenantroindolizidin (**1**); (13a*S*, 14*R*) - 3,6,7 - trimetoksi - 14 - hidrofenantroindolizidin (**2**); (13a*R*,14*S*) - 3,6,7 - trimetoksi-14-hidrofenantroindolizidin (**3**); (13a*S*,14*S*)-3,7-dimetoksi-6,14-dihidroksifenantroindolizidin (**4**); (13a*R*,14*S*)-3,7-dimetoksi - 6,14 - dihidroksifenantroindolizidin (**5**); (13a*S*,14*S*) - 3,14 - dihidroksi - 6,7 - dimetoksi-fenantroindolizidin (**6**); 3,7-dimetoksi-6-hidroksifenantroindolizidin (**7**); 3,6,7 - trimetoksi - fenantroindolizidin (**8**); 3, 6, 7 - trimetoksi - 9 (10), 13a (14) - dehidrofenantroindolizidinium klorit (**9**) ve 3,6,7-trimetoksi-10-oksifenantroindolizidin (**10**) olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.21.) (108).



Şekil 2.21. *T. atrofoliculata* türünden elde edilen alkaloidler (108).

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *F. septica* türünün yapraklarından fikuseptin-A, (+)-tiloforin, (+)-tilokrebrin ve (+)-izotilokrebrin isimli fenantroindolizidin alkaloidlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Şekil 2.22.) (51, 109).



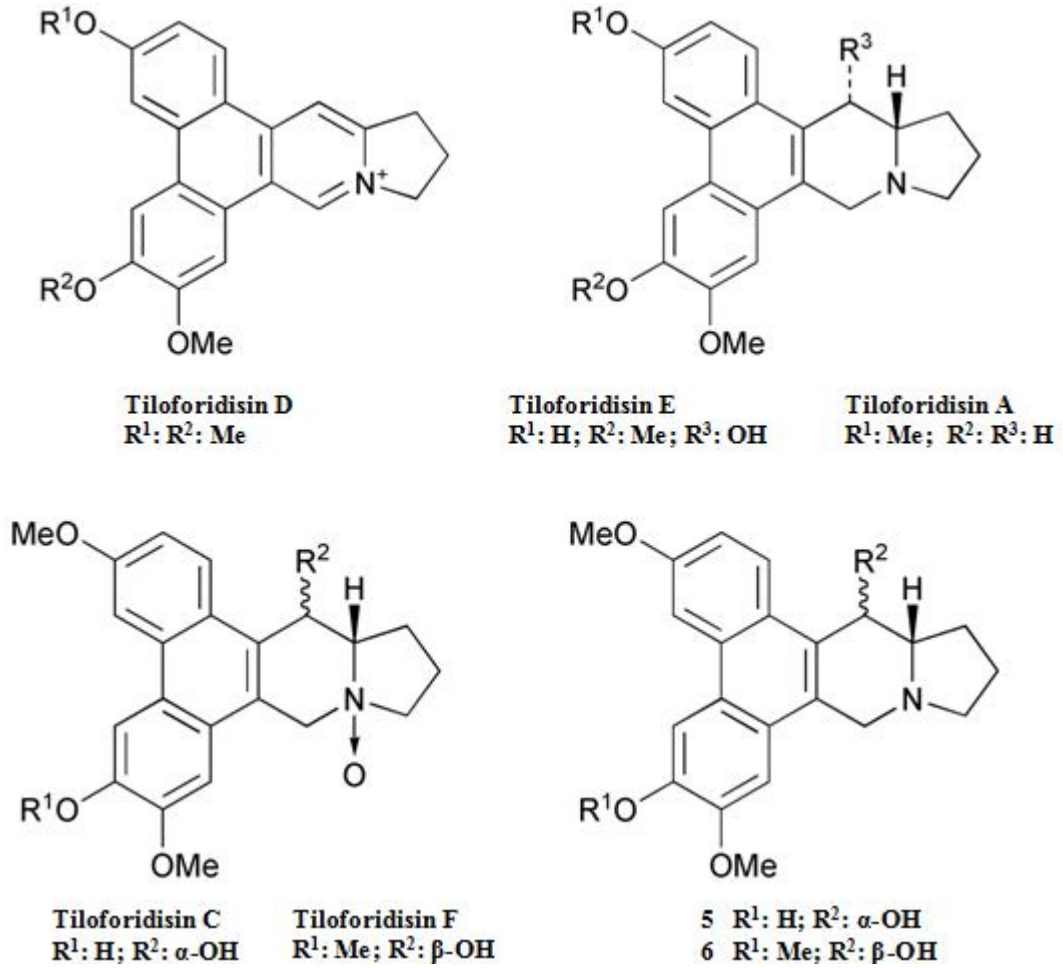
(+)-Fikuseptin A

Şekil 2.22. *F. septica* türünün yapraklarından izole edilen (+)-Fikuseptin A (109).

Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda *T. atrofoliculata* türünün köklerinden birçok yeni fenantroindolizidin alkaloidi [tiloforidisin D, tiloforidisin E (56, 110, 111), tiloforinidin (5), tiloforinin'in (6) *N*-oksitleri olan (+)-tiloforidisin C, (-)-tiloforidisin F, (R)-(+)-deoksitiloforinidin (=tiloforidisin A)] izole edilmiştir (56, 111). Bu alkaloidlerden ikisinin (tiloforidisin D ve E) kütle spektroskopisinin önceden çalışıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada alkaloidlerin ilk kez tam spektroskopik karakterizasyonu yapılmış ve bunların iyi bilinen alkaloidler tiloforinidin ve tiloforinin'in *N*-oksitleri olan (+)-tiloforidisin C ve (-)-tiloforidisin F olduğu ve izolasyon presüdürenün artefaktları olmadığı gözlenmiştir. Çünkü bu ana alkaloidler ayrıca (R)-(+)-deoksitiloforinidin (= tiloforidisin A) ile birlikte izole edilmiş ve izolasyon boyunca kullanılan benzer şartlar altında okside olmadıkları tespit edilmiştir (Şekil 2.23.) (111).

Ueda ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *F. septica* türünün yapraklarının metanollü ekstresinin *n*-hekzan, asidik EtOAc-, bazik EtOAc-, BuOH- ve H₂O-çözünebilen fraksiyonlarından içerisinde fenantroindolizidin alkaloidlerinin (tiloforin, 14 α - hidroksiizokrebrin *N*-oksit, fikuseptin A, 14-hidroksi-3,4,6,7-tetrametoksifenantroindolizidin, 14- hidroksi-2, 3, 4, 6, 7 - pentametoksifenantro

indolizidin, tilokrebrin, izotilokrebrin ve antofin) ve *seco*-fenantroindolizidin alkaloidlerinin (septisin ve sekoantofin) de bulunduğu pek çok bileşik izole edilmiştir (47).

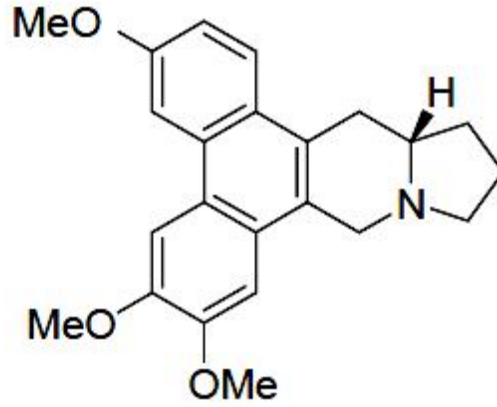


Şekil 2.23. *T. atrofoliculata* türünün köklerinden elde edilen alkaloidler (111).

Damu ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *F. septica* türünün köklerinin metanollü ekstresinin CHCl₃'lü fraksiyonundan yeni fikuseptinler E-N ve on bilinen alkaloid olmak üzere toplam 20 fenantroindolizidin alkaloidinin izole edildiği bildirilmiştir (112).

Min ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada *C. paniculatum* türünün köklerinin metanollü ekstresinden antofin alkaloidi izole edilmiştir (113).

Liu ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *T. atrofoliculata* ve *T. ovata* türlerinin köklerinden S-(+)-deoksitiloforinidin isimli yeni bir fenantroindolizidin alkaloidi izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 2.24.) (54).



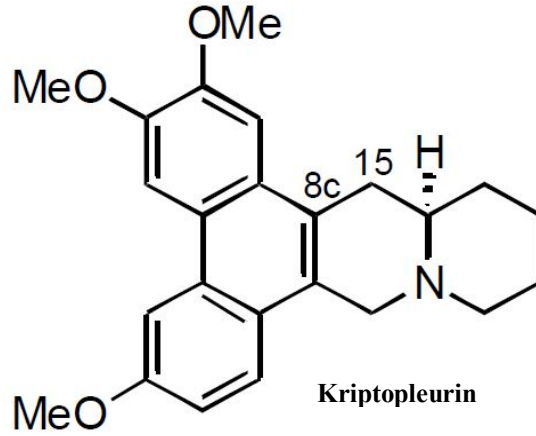
S-(+)-deoksitiloforinidin

Şekil 2.24. *T. atrofoliculata* ve *T. ovata* türlerinin köklerinden elde edilen S-(+)-deoksitiloforinidin (54).

2.2.1.2.2. Fenantrokinolizidin ve Diğer Alkaloidler

Oldukça toksik deri irritantı ve vesikant olarak bilinen kriptopleurin alkaloidi fenantrokinolizidin alkaloidlerinin en önemli temsilcisi olup ilk kez *Cryptocarya pleurosperma* türünden izole edilmiş; sonrasında ise *C. laevigata*, *Boehmeria cylindrica*, *B. platyphylla*, *B. caudate* ve *Cissus rheifolia* türlerinden izole edildiği bildirilmiştir (Şekil 2.25.) (114). Biyogenetik olarak indol alkaloidlerinden oldukça farklı olan fenantrokinolizidin alkaloidlerinin *Tylophora* ve *Cynanchum* cinsine ait türlerde de bulunduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (83).

Wiegerebe ve arkadaşları tarafından 1970 yılında yapılan bir çalışmada *Cynanchum vincetoxicum* türünden 14 - hidroksi - 2, 3, 6 - trimetoksi - 9, 11, 12, 13, 13a, 14 -hekzahidrodibenzo [f,h]-pirolo[1,2-b]-izokinolin bileşiği ve bunun *O*-asetatı izole edilmiştir (115).



Şekil 2.25. Kriptopleurin alkaloidi (114).

An ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada *C. komarovii* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen etilalkollü ekstresinin fraksiyonlarından piroloizokinolin alkaloidi 2, 3 - dimetoksi - 6 - (3 - okso - bütül) - 7, 9, 10, 11, 11a, 12 - heksahidrobenzo[*f*]pirolo[*1,2-b*]izokinolin'in izole edildiği bildirilmiştir (78).

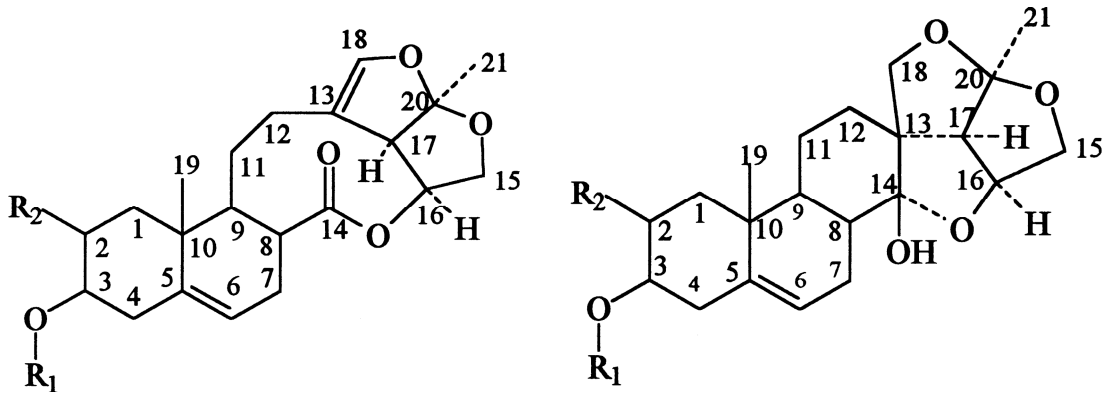
2.2.2. Glikozitler

2.2.2.1. *Vincetoxicum* Türlerinde Bulunan Glikozitler

Stöckel ve arkadaşları tarafından 1969 yılında yapılan bir çalışmada kağıt kromatografisi, İTK ve kağıt elektroforezi yardımı ile *V. hirundinaria* türünün köklerinden hazırlanan ham glikozit karışımında 7 oz varlığı tespit edilmiştir. Bunlar D-simaroz, L-diginoz, D-dijitoksoz ve az miktarda lilasinobioz olup kristal formda izole edilmiştir. Diğerleri ise D-oleandroz, boivinoz ve kanaroz'dur. Çalışmada ayrıca genin ekstresinden glikozit (F) izole edilmiş ve hirundozit-A olarak isimlendirilmiş olup bu bileşiğin anhidrohirundigenin'in oleandroziti olduğuda görülmüştür (116).

Lavault ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada *V. hirundinaria* türünün köklerinden bilinen pregnan glikozitler; sinatratozit E (1) (%)

0.0025) ve sinatratozit C (2) (% 0.0004) ve üç yeni pregnan glikoziti: hirundikozit B(3) (% 0.0003), hirundikozit C (4) (% 0.0002) ve hirundikozit D (5) (% 0.0002) izole edilmiş ve % verimleri belirlenmiştir. 2D-NMR tekniklerinden (DQF-COSY, HMQC ve HMBC) yararlanılarak elde edilen spektral datalar yardımıyla izole edilen bu bileşiklerin yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 2.26.) (18).



Glaukogenin C $R_1=H$; $R_2=H$

Glaukogenin A $R_1=H$; $R_2=OH$

1 $R_1=\beta$ -D-glu (1-4) α -D-ole (1-4) β -D-digit (1-4) β -D-ole; $R_2=H$

2 $R_1=\alpha$ -D-ole (1-4) β -D-digit (1-4) β -D-ole; $R_2=H$

3 $R_1=\beta$ -D-glu (1-4) α -D-ole (1-4) β -D-digit (1-4) β -D-ole; $R_2=OH$

4 $R_1=\alpha$ -D-ole (1-4) β -D-digit (1-4) β -D-ole; $R_2=OH$

5 $R_1=\alpha$ -D-ole (1-4) β -D-digit (1-4) β -D-ole; $R_2=H$

Hirundigenin $R_1=H$; $R_2=H$

Şekil 2.26. *V. hirundinaria* türünün köklerinden izole edilen pregnan glikozitler (18).

V. officinale (Syn.: *V. hirundinaria*, *C. vincetoxicum*) türü üzerinde yapılan çeşitli fitokimyasal çalışmalar sonucu bu türün, C_{21} -steroit glikozitleri içerdiği bildirilmiştir (26).

2.2.2.2. *Vincetoxicum* Cinsine Yakın Cinslerde Bulunan Glikozitler

Mitsuhashi ve arkadaşları tarafından 1966 yılında yapılan bir çalışmada *Cynanchum wilfordii* türünün köklerinin kloroform ekstresinden glikozit karışımı elde edilmiş; 2-deoksi şeker varlığı görülmüş ve glikozitlerin şeker kısmının D-simaroz olduğu belirlenmiştir. Bu glikozitlerin aglikon kısmında üç çeşit pregnanın (sarkostin,

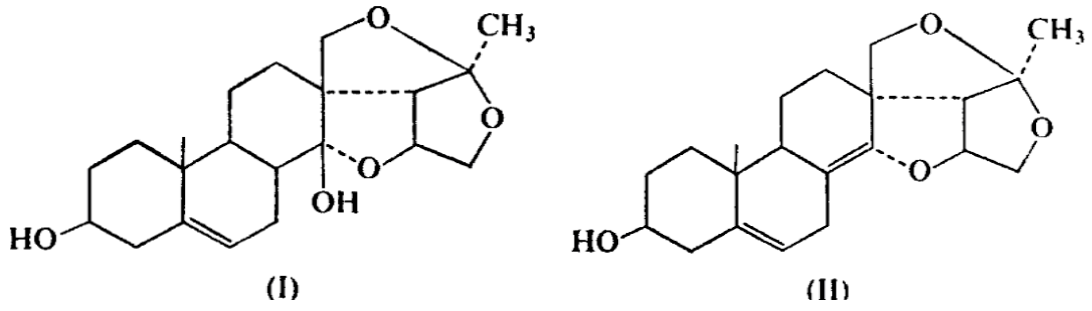
deaçilsinankogenin ve deaçilmetapleksigenin) varlığı tespit edilmiştir (117).

Nakagawa ve arkadaşları tarafından 1983 yılında yapılan bir çalışmada “Pai-ch’ien” olarak bilinen Çin tıbbi ilacı *C. glaucescens* türünün kurutulmuş kökleri araştırılmış; köklerinde bulunan glikozitlerin aglikonları incelenmiş ve glaucogenin-A, -B ve -C mono-D-tevetozit isimli üç yeni bileşik izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır (118).

Zhang ve arkadaşları tarafından 1985 yılında yapılan bir çalışmada Çin tedavi ilacı “Pai-wei” olarak bilinen *C. atratum* türünün köklerinin metanollü ekstresinden elde edilen glikozitlerin hidrolizi sonucu monotevetozit yapıda olan glaukogenin C ve oleandroz, digitoksoz, L-simaroz ve glaukobioz şekerlerini içerdiği tespit edilmiştir. Ekstreden 5 yeni oligoglikozit (sinatratozit-A, -B, -C, -D ve -E) izole edilmiş ve sinatratozit A: glaukogenin-C 3-O-β-D-oleandropiranozid; sinatratozit B: glaukogenin-C 3-O-α-L-simaropiranosil-(1→4)-β-D-digitoksopiranozil-(1→4)-β-D-oleandropiranozid; sinatratozit C: glaukogenin-C 3-O-α-D-oleandropiranosil-(1→4)-β-D-digitoksopiranosil-(1→4)-α-D-oleandropiranozid; sinatratozit D: glaukogenin-C 3-O-β-D-glukopiranosil-(1→4)-α-L-simaropiranosil-(1→4)-α-D-digitoksopiranosil-(1→4)-β-D-oleandropiranozid; sinatratozit E: glaukogenin-C 3-O-α-D-glukopiranosil-(1→4)-β-D-glukopiranosil-(1→4)-β-D-oleandropiranosil-(1→4)-β-D-digitoksopiranosil-(1→4)-α-D-oleandropiranozid olarak yapıları belirlenmiştir (119).

Cynanchum cinsine ait türlerde steroidal glikozitlerin özellikle de C₂₁ steroidal glikozitlerin oldukça yaygın bileşikler olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (120-122). Steroidal glikozitler sitotoksisite, asetilkolinesteraz inhibitör ve immünosuppressif aktivitelere sahip ana bileşikler olarak dikkat çekmiştir (123). C₂₁ steroidal glikozitler ise bir çok tıbbi bitkide bulunan ve çeşitli biyoaktiviteleri olan doğal hormon prekürsörleridir. Bu grup bileşikler pregnan iskeletine sahip olup kendi içlerinde polihidroksipregnan-tip glikozitler ve seko-pregnan-tip glikozitler olarak iki gruba ayrılmıştır. Seko-pregnan tip glikozitler ise daha ileri aşamada 14,15-seko-pregnan-tip ve 13,14:14,15-diseko-pregnan tip glikozitler olarak sınıflandırılmıştır (121).

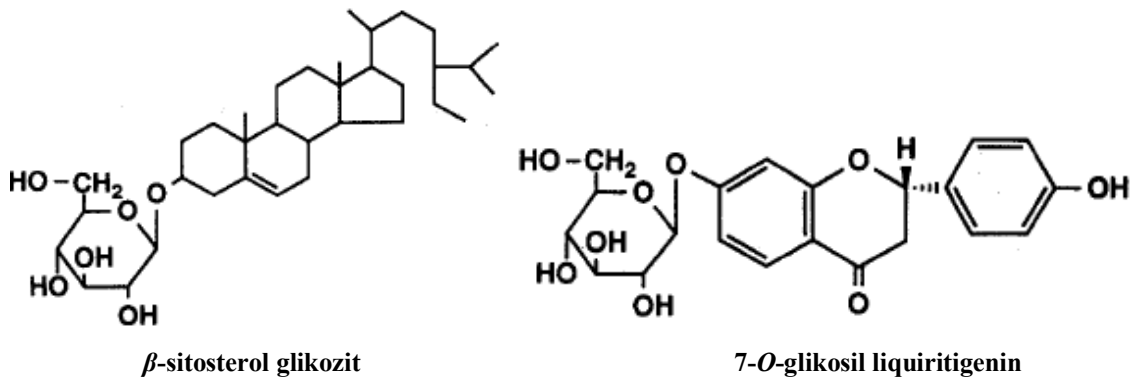
Mitsubishi ve arkadaşları tarafından 1970 yılında yapılan bir çalışmada *C. grandifolium* var. *nikoense* türünün kloroformlu ekstresinden hazırlanan glikozit karışımından hirundigenin (I) ve anhidrohirundigenin(II) aglikonları izole edilmiş ve yapıları belirlenmiştir (Şekil 2.27.) (124).



Şekil 2.27. Hirundigenin (I) ve anhidrohirundigenin (II) bileşikleri (124).

Çin tıbbi bitkisi *C. atratum* türünün kuru köklerinin glikozit bileşimi Zhang ve arkadaşları tarafından 1988 yılında yapılan bir çalışmada araştırılmış ve aglikonu 14,15-seko-pregnan tip iskelet taşıyan atratozit A-D isimli dört yeni steroidal glikozit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (125).

Li ve arkadaşları tarafından 1992 yılında yapılan bir çalışmada Çin’de “Bai-Shu-Uh” olarak bilinen *C. bungei* türünün köklerinin etanollü ekstresinden β -sitosterol glikozit ve 7-O-glikosil liquiritigenin izole edilmiştir (Şekil 2.28.) (126).



Şekil 2.28. *C. bungei* türünün köklerinden izole edilen β -sitosterol glikozit ve 7-O-glikosil liquiritigenin (126).

Lou ve arkadaşları tarafından 1993 yılında yapılan bir çalışmada *C. hancockianum* (Maxim.) Al. Ijinski türünün köklerinin etanollü ekstresinden üç yeni glikozit (neohankozit B, C ve D) izole edilmiş ve yapıları sırasıyla 9-hidroksilinalool-3-

O- β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid heptaasetat, 2-hidroksiasetofenon-2-*O*- β -D-ksilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid hekzaasetat ve 6'-*O*-sinapolisukroz oktaasetat olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada bilinen bir bileşik olan neohankozit A hekzaasetat bileşiği de bu üç yeni bileşiğe ek olarak elde edilmiştir (127).

Abe ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada *C. liukiense* türünün taze yapraklarının metanollü ekstresinden konduritol F 3-*O*- ve 4-*O*-glikozitler izole edilmiştir. Bu çalışmada taranan ve *Asclepiadaceae* familyasına ait diğer türler olan *Tylophora tanakae*, *Asclepias curassavica*, *A. fruticosa* ve özellikle *Marsdenia tomentosa* türlerinin tamamında konduritol F bileşiğinin varlığı tespit edilmiştir. Fakat konduritol F'nin glikozidik bağlanma modelinin her türde farklı olduğu görülmüştür. Örneğin *T. tanakae* ve *M. tomentosa* türlerinde 2-*O*-glikozit, *A. curassavica* türünde 3-*O*-glikozit şeklinde iken *A. fruticosa* türünde bunlardan hiçbirinin olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca *C. liukiense* türünde konduritol F glikozitlere ek olarak 11-glukosiloksi-megastigman ve monoterpen glikozit de izole edilmiştir (128).

Zhao ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan çalışmalarda *C. otophyllum* türünden dört yeni karbonhidrat izole edilmiştir. Zhao ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir başka çalışmada ise *C. otophyllum* türünün etilasetatlı ekstresinden üç yeni karbonhidrat ve *C. paniculatum* türünün etilasetatlı ekstresinden ise bir yeni karbonhidrat izole edilmiş ve yapıları sırasıyla metil 2,6 - dideoksi - 3 - *O* - metil - α - D - arabino - heksopiranosil - (1 \rightarrow 4) - 2, 6 - deoksi - 3 - *O* - metil - β - D - arabino - heksopiranosil -(1 \rightarrow 4)-2,6-dideoksi-3-*O*-metil- α -D-arabino-heksopiranozid; etil 2, 6-dideoksi-3-*O*-metil- β -D-ribo - heksopiranosil- (1 \rightarrow 4) - 2, 6 - dideoksi - 3 - *O* - metil - α - L- lyxo - heksopiranozid; metil 2,6-dideoksi-3-*O*-metil- α -L-ribo- heksopiranosil - (1 \rightarrow 4) - 2, 6-dideoksi -3-*O*-metil - β -D- lyxo-heksopiranozil - (1 \rightarrow 4) - 2,6 - dideoksi - 3 - *O* - metil- α -D-arabino-heksopiranozid ve 2,6 - dideoksi - 3 - *O* - metil - β - D - ribo - heksopiranozil-(1 \rightarrow 4)-2,6-dideoksi-3-*O*-metil- α -D-arabino-heksopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,6-dideoksi-3-*O*-metil- α -D-arabino-heksopiranoz olarak belirlenmiştir (129).

Ma ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *C. otophyllum* Scheind türünün köklerinin etanollü ekstresinde optik olarak izomerik monosakkaritler D- ve L-simaroz'un otofilozit R ve S bileşiklerinde bulunduğu gösterilmiştir (130).

Cynanchum cinsine ait türlerin biyoaktif C/D-cis-polioksipregnan glikozitleri taşıdığı bir çok çalışmada bildirilmiştir. Lin ve arkadaşları tarafından 1995 yılında

yapılan bir çalışmada Tayvan'da tümör tedavisinde kullanılan *C. taiwanianum* Yamazaki türünün köklerinin etanollü ekstresinden taiwanozit A, B, C, D ve F isimli beş yeni pregnan glikozit ve wilfozit C₁N, C₂N, M₁N ve K₁N isimli bilinen dört pregnan glikozit izole edilmiştir (131).

Abe ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada *T. tanakae* türünün köklerinin metanollü ekstresinden; 2 α -hidroksihirundigenin isimli yeni bir pregnanı da içeren 14,15-seko ve 13, 14: 14,15-diseko-tip pregnanların beş yeni glikoziti (tilofozit A-E) ve bir bilinen glikozit (sinatratozit B) izole edilmiştir (132).

2004 yılında Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel Çin tıbbında "Xu-Chang-Quin" olarak bilinen *C. paniculatum* türünün köklerinin etanollü ekstresinden panikulatumozit A ve B isimli 13,14:14,15-diseko-pregnan-tip iskelet taşıyan iki yeni C₂₁ steroidal glikozit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (133).

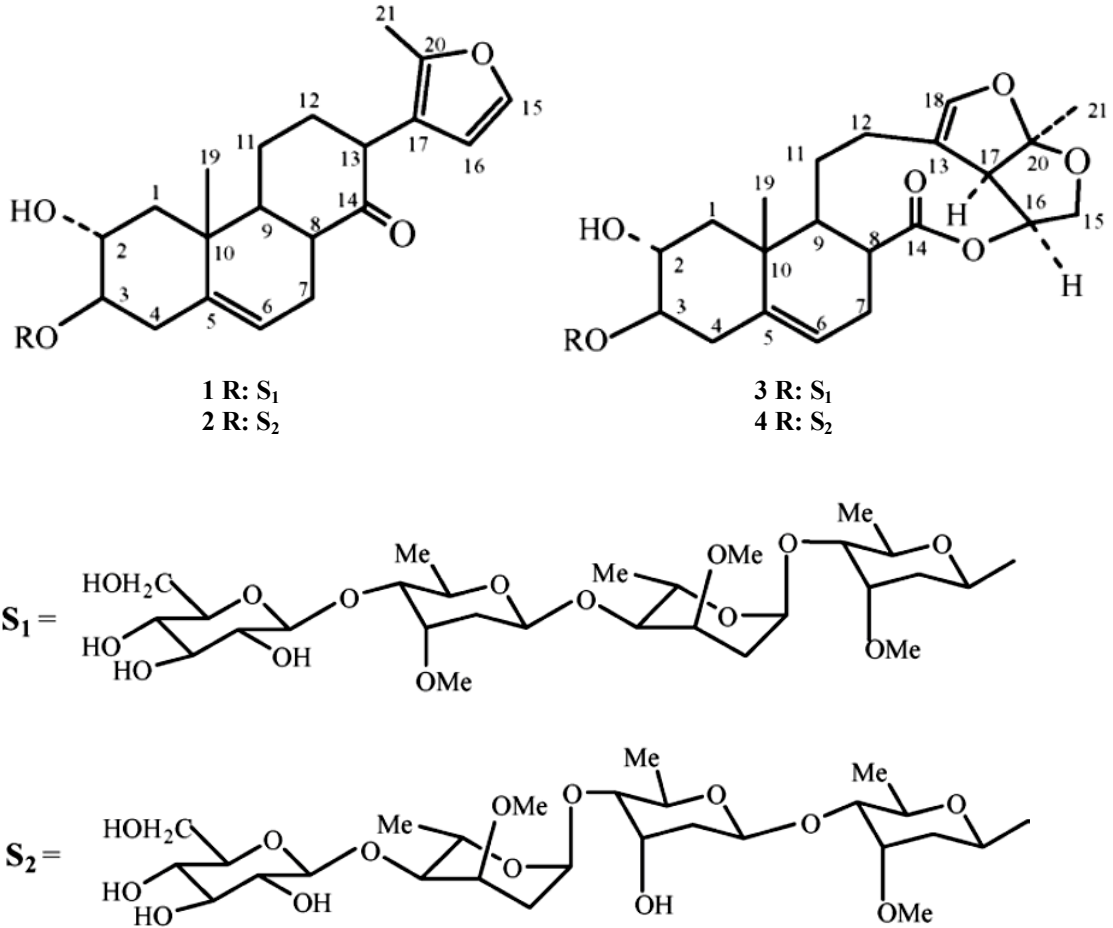
Wang ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada *C. komarovii* türünün köklerinin etanollü ekstresinden komarozit D, E, F, G ve H isimli beş yeni ve sinatratozit E ve hankozit A isimli iki bilinen C₂₁ steroidal glikozit izole edilmiştir. Bunlardan beşinin 13,14:14,15-disekopregnan-tip iskelet taşıdığı diğer ikisinin ise normal dört-halka C₂₁ steroid iskeleti taşıdığı tespit edilmiştir (134).

Bai ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada *C. atratum* türünün köklerinin metanollü ekstresinden dört yeni 13,14:14,15-diseko-18-nor-pregnan-tip steroidal glikozit; sinanozit A-D ve altı yeni 13,14:14,15-diseko-pregnan-tip steroidal glikozit; sinanozit E-J ve bilinen bir bileşik olan sinatratozit F izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (135).

Zhao ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan çalışmalarda *C. otophyllum* türünün rizomlarının etilasetatlı ekstresinden üç yeni C₂₁ steroidal saponin izole edilmiştir (129).

Li ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada *C. chekiangense* türünün köklerinin etanollü ekstresinden iki yeni C₂₁ steroidal glikozit: chekiangensozit A (**1**) ve B (**3**) ve iki bilinen steroidal glikozit (**2,4**) izole edilmiş ve yapıları belirlenmiştir. İki yeni bileşin yapısı 1D- ve 2D-NMR tekniklerinden yararlanılarak sinajapogenin A, 3 -O - β - D - glucopiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - simaropiranosil - (1 \rightarrow 4) - α - L - simaropiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - simaropiranozit ve glaucogenin A, 3 -

O - β - D - glucopiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranozit olarak aydınlatılmıştır (Şekil 2.29.) (136).



Şekil 2.29. *C. chekiangense* türünün köklerinden izole edilen C₂₁ steroidal glikozitler (136).

Liu ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada *C. forrestii* Schlechter türünün köklerinin etanollü ekstresinden 13,14:14,15-diseko-pregnan-tip iskelet taşıyan aglikona sahip sinaforrozit B, C, D, E, F ayrıca sinaforrogenin A, 14,15-sekopregnan-tip iskelet taşıyan aglikona sahip sinaforrozit G(7), H(8) ve I(9); sinaforrozit (10) ve üç bilinen C₂₁ steroidal glikozit sinatratozit A(1), hankozit (11) ve komarozit C bileşikleri tanımlanmış ve yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerden 7, 8 ve 9 numaralı bileşiklerin aglikonlarının 2-hidroksil grubu taşımadığı tespit edilmiş ve bu tür aglikona daha önce literatürlerde rastlanmadığı bildirilmiştir. 10 ve 11 numaralı

bileşiklerin ise normal C₂₁ iskelet yapısına sahip olduğu görülmüştür. Sinaforrozit B-I bileşiklerinin şeker ünitesinin glikozun iki kısmını içerdiği; sinaforrozit E-I bileşiklerinin şeker ünitesinin ise *Cynanchum* cinsindeki steroidal glikozitler için nadir olan 1→6 bağlı iki glikoz içerdiği belirlenmiştir (137).

Warashina ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada *C. sublancoletatum* (Miq) Matum türünün köklerinin metanollü ekstresinden 32 yeni 13,14-seko ve 13,14:14,15-diseko-pregnan glikozit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Bu glikozitlerin sinajapogenin A, glaukogenin-A, 13-hidroksisinajapogenin A, 2 α -hidroksianhidrohüründigenin, atratogenin A isimli beş bilinen ve biri de yeni bir pregnan: 13-*epi*-sinajapogenin A olan aglikonları içerdiği tespit edilmiştir (138).

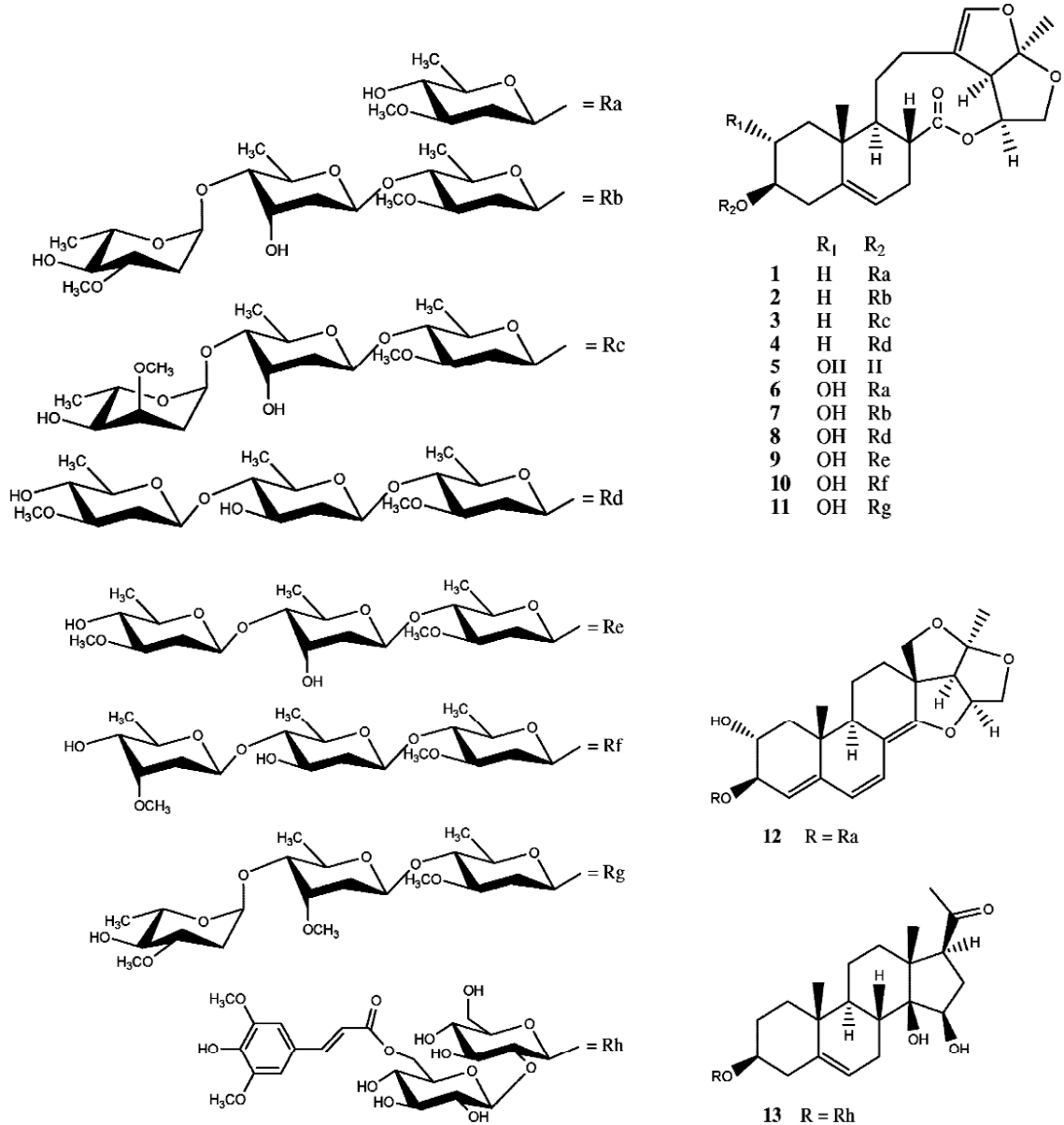
Tai ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada *C. chekiangense* türünün köklerinin etanol ekstresinden YBSK/ESI-MS/MS kullanılarak C₂₁ steroidal glikozitler sinazkirozit C, chekiangensozit A ve B, glaukozit H ve dört yeni steroidal glikozit chekiangensozit C, D, E ve chekiangensosit A izomeri izole edilmiştir. Bu çalışma YBSK/ESI-MS/MS ile *C. chekiangense* türünün köklerinde steroidal glikozitlerin belirlendiği ilk çalışma olarak literatüre geçmiştir (139).

Geleneksel Çin tıbbında *Radix cynanchi atrati* olarak bilinen *C. versicolor* Bunge türü üzerinde daha önce yapılan çalışmalar C₂₁ steroidlerin ve saponinlerin bu türün ana bileşenleri olduğunu göstermiştir. Zheng ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bu çalışmada ESI-MSⁿ ve LC/ESI-MSⁿ teknikleri kullanılarak *C. versicolor* türünün köklerinden ve rizomlarından elde edilen etanollü ekstresinin saponin fraksiyonundan dokuz C₂₁ steroidal saponin ve atratoglaukozit A'nın izomerinin kolayca ve hızlı şekilde tespit edilebildiği bildirilmiştir (140).

Wang ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada *C. inamoenum* (Maxim.) Loes türünün köklerinin metanollü ekstresinden olağan dışı 13,14:14,15-disekopregnan-tip iskelete sahip ve inamozit A-C isimli üç yeni C₂₁ steroidal glikozit ve iki bilinen C₂₁ steroidal glikozit izole edilmiştir. İnamozit A-C bileşiklerinin aglikonlarının 2 β -hidroksil grubu taşıdığı ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir (120).

Chen ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *C. amplexicaule* Sieb. Et Zucc. türünün köklerinin etanol ekstresinden 13,14: 14,15-disekopregnan-tip veya 14,15-sekopregnan-tip iskelet taşıyan aglikona sahip yedi yeni

steroidal glikozit [amleksikozit A (4), B (7), C (8), D (9), E (10), F (11) ve G (12)] ve altı bilinen bileşik [sinatratozit A (1), tilofozit A (2), sinatratozit B (3), glaukogenin A (5) ve glaukozit A (6) ve hankozit A (13)] izole edilmiş ve yapıları spektroskopik ve kimyasal delillere dayandırılarak aydınlatılmıştır. Ayrıca 12 numaralı bileşiği 14,15-sekopregnan-tip iskelete sahip bir aglikon olduğu da ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. 13 numaralı bileşiğin ise normal C₂₁ steroid iskeletine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.30.) (141).

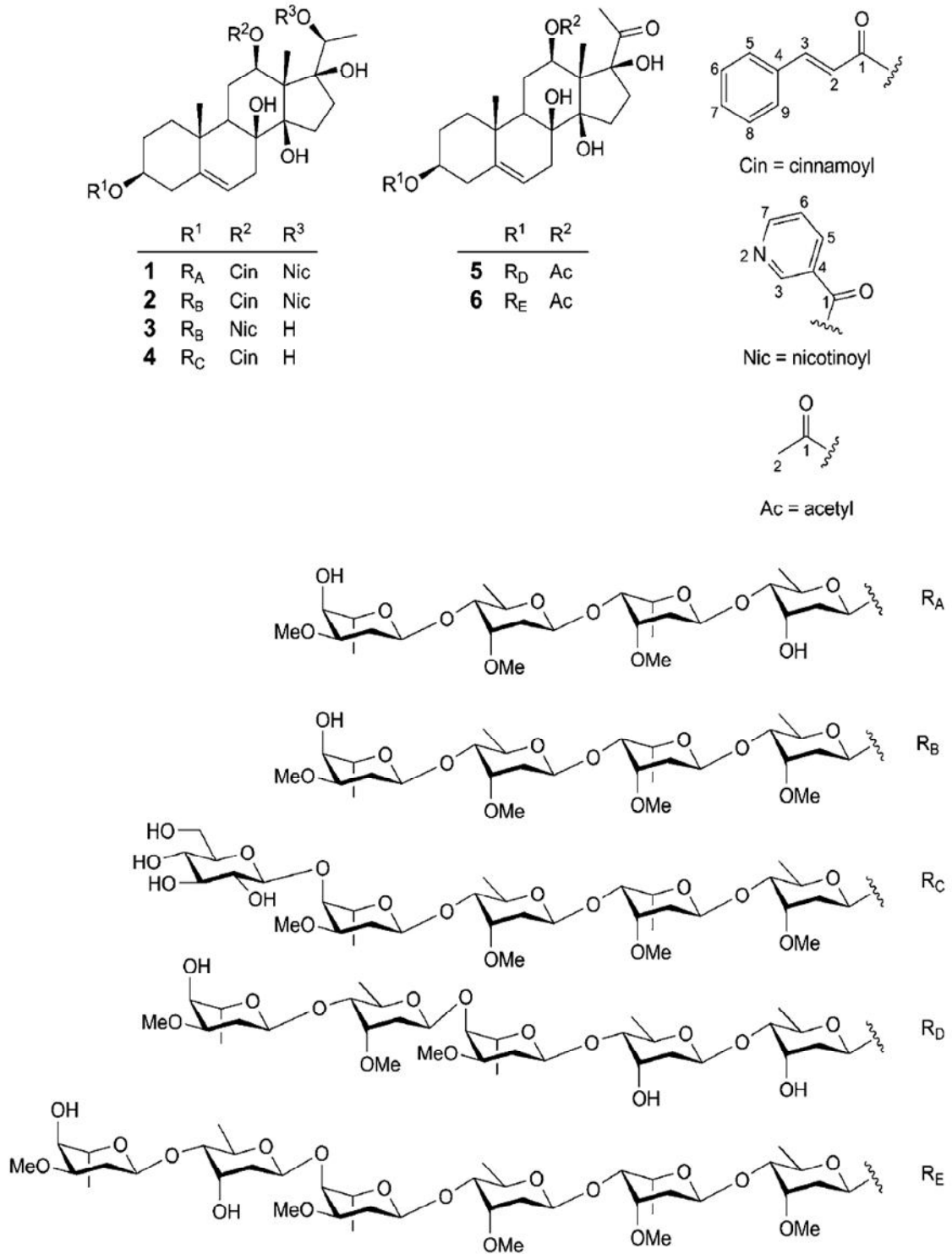


Şekil 2.30 *C. amplexicaule* türünün köklerinden elde edilen sekopregnan ve pregnan tip glikozitler (141).

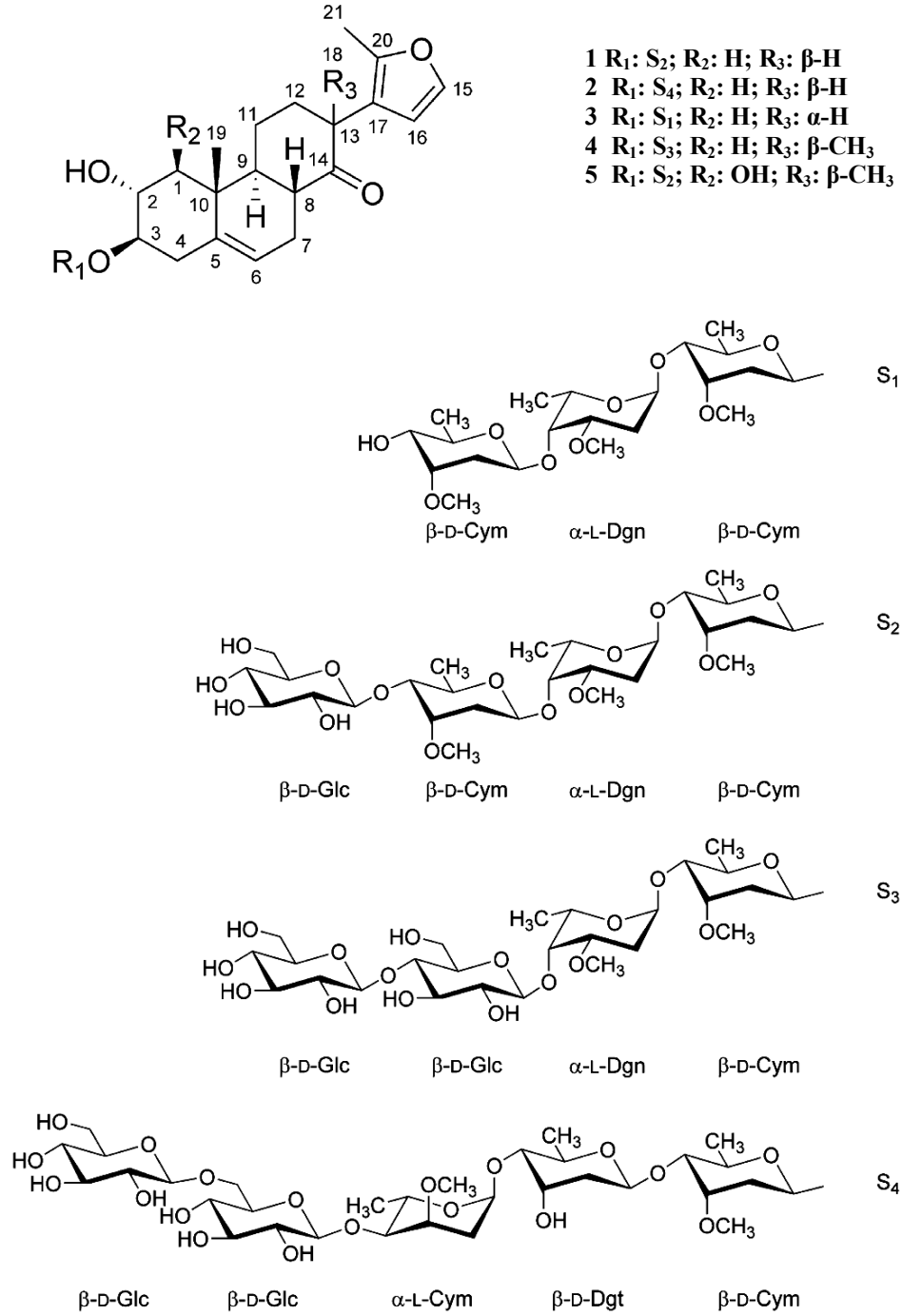
Gan ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *C. bungei* Decne türünün gövdesinin metanollü ekstresinden altı yeni C₂₁ steroidal glikozit **1-6** izole edilmiş ve bunlar **1**: Gagaminin 3-O-β-L-simaropiranozil-(1→4)-β-D-simaropiranozil - (1→4) - α - L - diginopiranosil - (1→4) - β - D - digitoksopiranozit; **2**: Gagaminin 3 - O - β - L - simaropiranozil - (1→4) - β - D - simaropiranozil - (1→4) - α - L - diginopiranozil - (1→4) - β - D - simaropiranozit; **3**: 12-O-Nikotinolsarkostin 3-O-β - L - simaropiranozil - (1→4) - β - D - simaropiranozil - (1→4) - α - L - diginopiranozil - (1→4) - β - D - simaropiranozit; **4**: Penupogenin 3-O-β-D-Gukopiranozil - (1→4)-β-L-simaropiranozil- (1→4) -β-D-simaropiranozil- (1→4) -α-L-diginopiranozil-(1→4)-β-D-simaropiranozit; **5**: 12 - O - Asetilsarkostin 3 - O - β - L - simaropiranosil - (1→4) - β - D-simaropiranozil-(1→4)-β-L-simaropiranozil-(1→4)-β-D-digitoksopiranozil-(1→4)-β-D-digitoksopiranozit; **6**: 12-O-Asetilsarkostin 3-O-β-L-simaropiranozil-(1→4)-β-D-digitoksopiranozil-(1→4)-β-L-simaropiranozil-(1→4)-β-D-simaropiranozil- (1→4) - α - L -diginopiranozil - (1→4)-β-D-simaropiranozit olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.31.) (142).

Bai ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *C. atratum* türünün köklerinden 14,15-seko-pregnan-tip iskelete sahip aglikon taşıyan beş yeni: sinanozit K-O (**1-5**) ve beş bilinen: sinazkirozit C, sublansezit E₁, atratozit A, atratozit B ve sublansezit I₁ isimli on steroidal glikozit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.32.) (143).

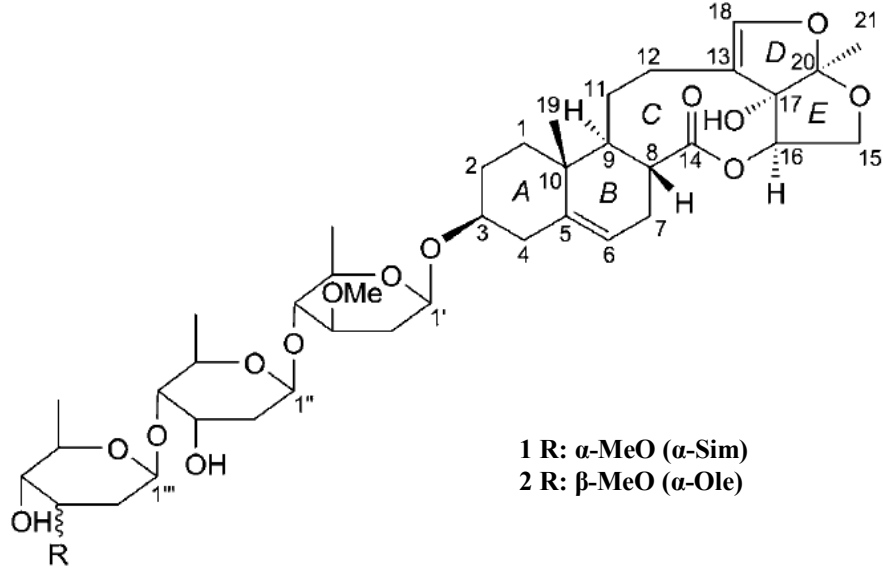
Çeşitli çalışmalarda *C. paniculatum* türünün ana bileşiklerinin faenol ve steroidal glikozitler olduğu bildirilmiştir. Özellikle steroidal glikozitlerin ise 13,14:14,15-disekopregnan-tip aglikona sahip olduğu görülmüştür. Huang ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bu çalışmaya kadar 30'dan fazla bu tip glikozitin *C. paniculatum* türünde varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise *C. paniculatum* türünün gövdesinin etanollü ekstresinden (3β,8β,9α,16α,17α)-14,16β: 15, 20α:18,20β-triepoksi-16α,17α-dihidroksi-14-okso-13,14: 14,15-disekopregna-5,13(18)-dien-3-il α-simaropiranozil-(1→4)-α-digitoksopiranozil-(1→4)-α-oleandropiranozit (**1**) ve (3β,8β,9α,16α,17α)-14,16β : 15,20α : 18,20β-triepoksi-16β : 17α-dihidroksi-14-okso-13,14:14,15-disekopregna - 5, 13(18) - dien - 3 - il α - oleandropiranozil - (1→4) - α - digitoksopiranozil-(1→4)-α-oleandropiranozit (**2**) isimli iki yeni C₂₁ steroidal glikozit izole edilmiş ve yapıları belirlenmiştir (Şekil 2.33.) (144).



Şekil 2.31. *C. bungei* türünden elde edilen C₂₁ steroidal glikozitler (142).



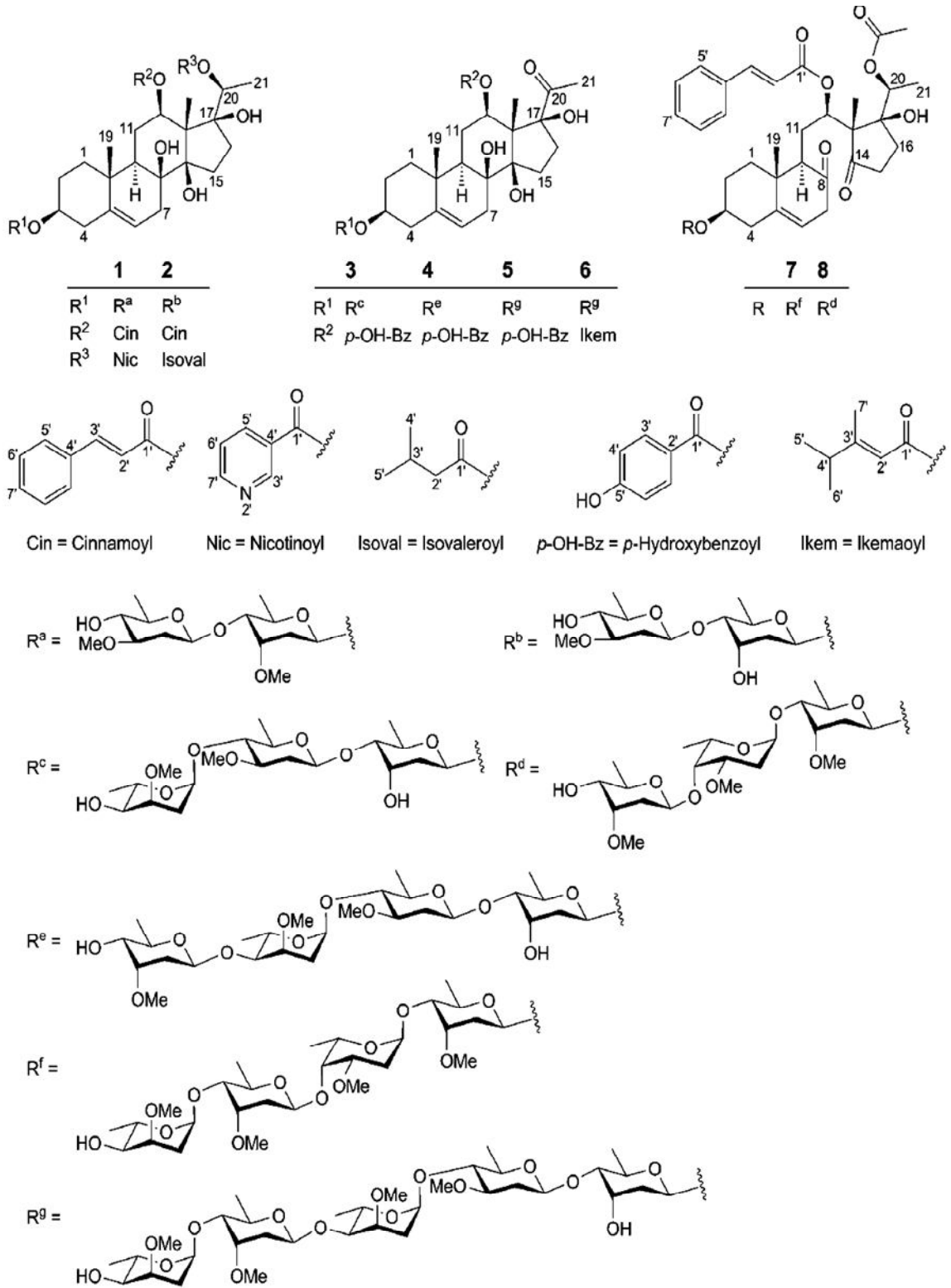
Şekil 2.32. *C. atratum* türünün köklerinden izole edilen steroidal glikozitler (143).



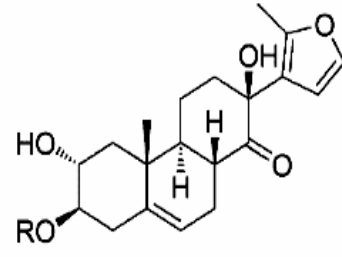
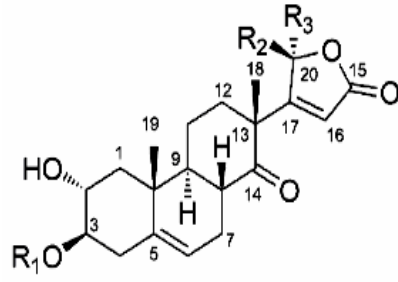
Şekil 2.33. *C. paniculatum* türünden elde edilen iki yeni C_{21} steroidal glikozit (144).

Xiang ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *C. wilfordii* türünün köklerinin etanol ekstresinden sekiz yeni C_{21} steroidal glikozit (wilfozit A-H) ve wilfozit K₁N izole edilmiş; 1D- ve 2D-NMR ve ESI-MS spektroskopik yöntemleri kullanılarak bu bileşiklerin yapıları aydınlatılmıştır. Çalışmada wilfozit G ve H bileşiklerinin 8,14-sekopregnan iskeleti taşıdığı da bildirilmiştir (Şekil 2.34.) (122).

Yapılan çeşitli çalışmalarda *C. atratum* türünün köklerinde 16 tane 14,15-seko-pregnan-tip glikozit ve 20 tane 13,14:14,15-diseko-pregnan-tip glikozit varlığı rapor edilmiştir. Bai ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bu çalışmada ise *C. atratum* türünün köklerinin metanol, etilasetat ve sulu ekstratlarından 11 yeni 14,15-seko-pregnan-tip steroidal glikozit: sinanozit P₁-P₅ (1-5), Q₁-Q₃ (6-8), R₁-R₃ (9-11); bir yeni 12,13-seko-14,18-nor-pregnan-tip steroidal glikozit: sinanozit S (12) ve dört bilinen bileşik: atratozit C, sublanseozit E3, chekiangensozit C ve sinatrotozit B izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.35.) (121).

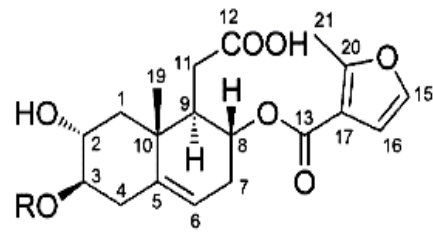
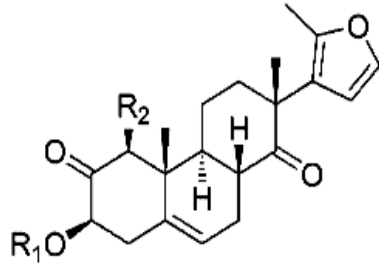


Şekil 2.34. *C. wilfordii* türünün köklerinden elde edilen C_{21} steroidal glikozitler (122).



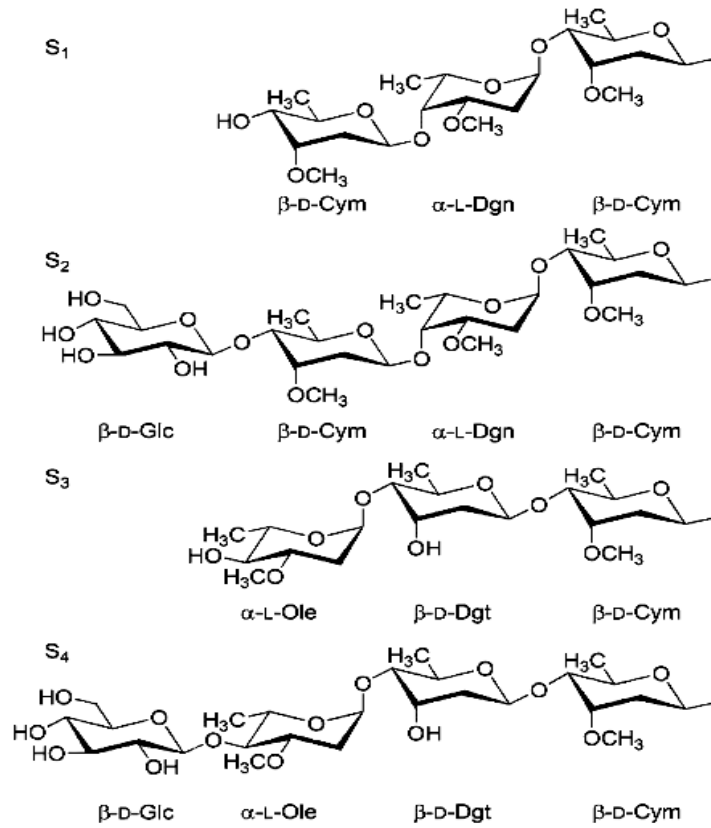
- 1 R₁: S₁, R₂:H, R₃: CH₃
 2 R₁: S₂, R₂:H, R₃: CH₃
 3 R₁: S₁, R₂:CH₃, R₃: H
 4 R₁: S₂, R₂:CH₃, R₃: H
 5 R₁: S₂, R₂:OCH₃, R₃: CH₃

- 6 R: S₂
 7 R: S₃
 8 R: S₄



- 9 R₁: S₁, R₂: H
 10 R₁: S₁, R₂: OH
 11 R₁: S₂, R₂: OH

- 12 R: S₁



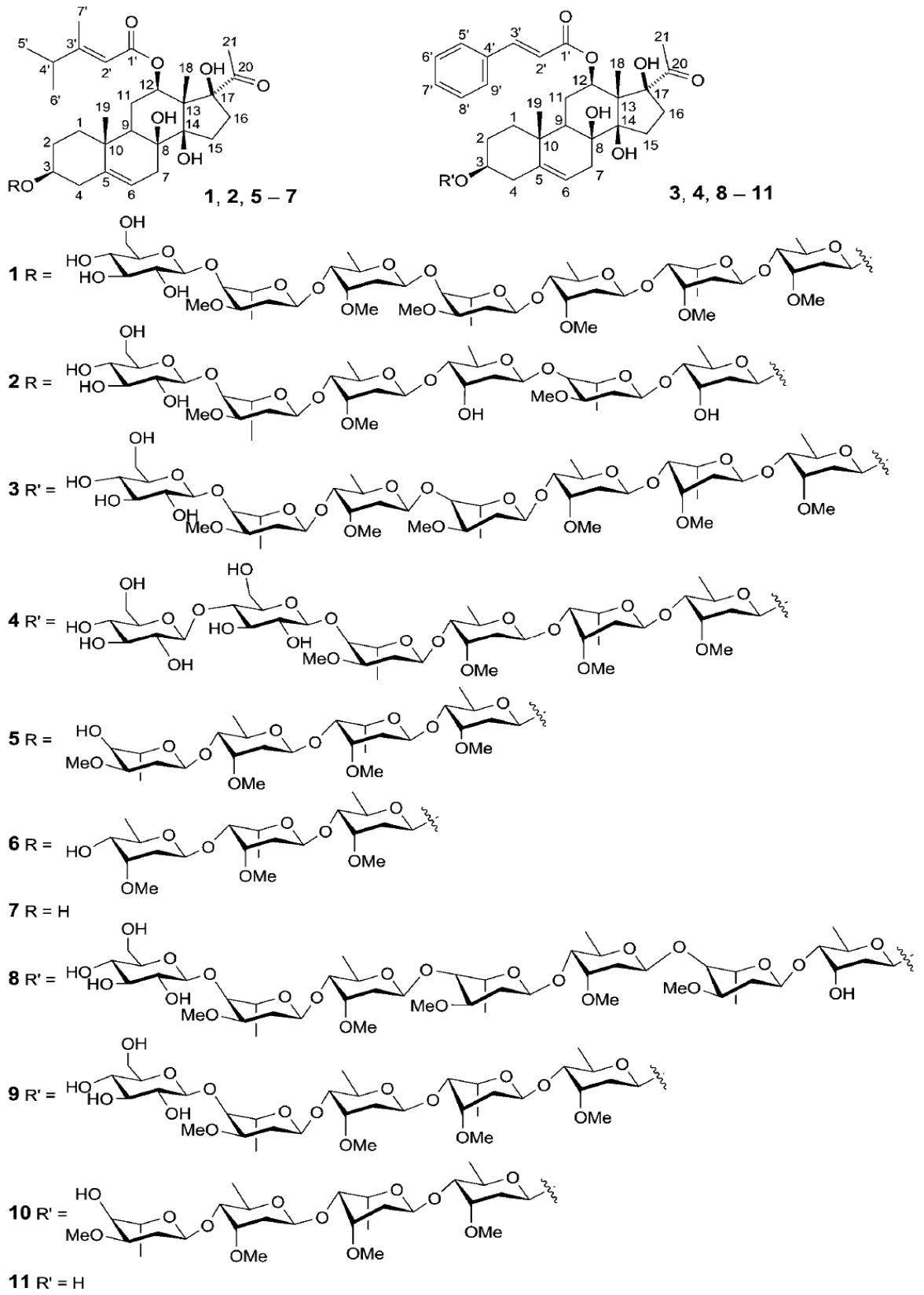
Şekil 2.35. *C. atratum* türünün köklerinden elde edilen bileşikler (121).

Gu ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada geleneksel Çin tıbbında “bai shou wu” olarak bilinen ve geriatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan *C. auriculatum* Royle ex Wight türünün köklerinin etanollü ekstresinden C(12) de açıl grubu ve C(3) de düz şeker zinciri taşıyan aurikulozid I-IV (**1-4**) isimli dört yeni C₂₁ steroidal glikozit ve yedi bilinen steroidal türevi [wilfozid C₁N (**5**), wilfozid C₃N (**6**), kaudatin (**7**), sinanaurikulozid I (**8**), sinanaurikulozid II (**9**), wilfozid K₁N (**10**) ve kidjoranin (**11**)] izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.36.) (145).

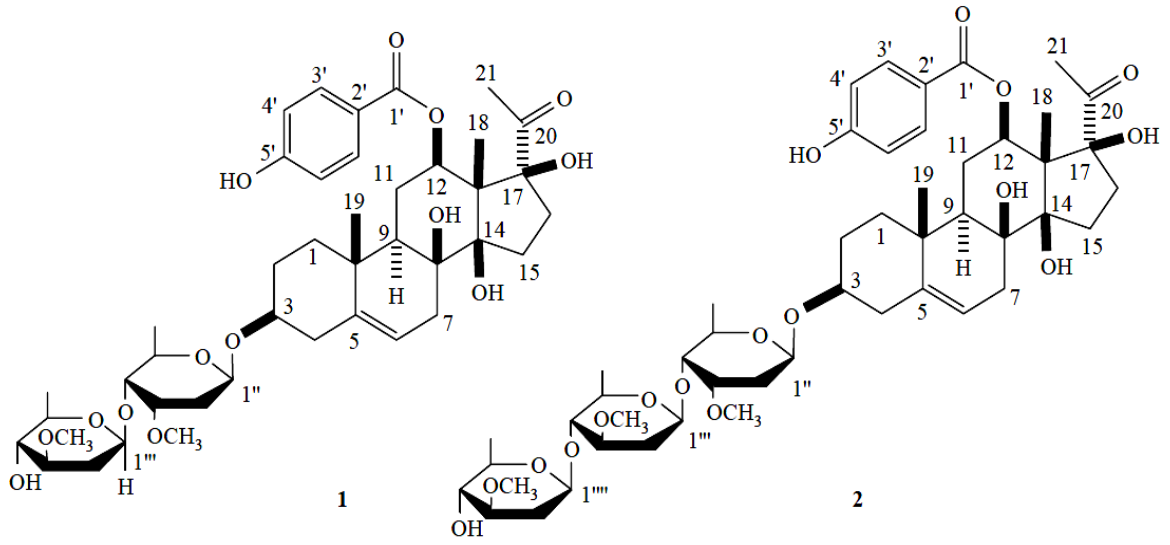
Chen ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada geleneksel Çin tıbbında “Duanjieshen” olarak bilinen ve artroflozozis ve düşük ya da kırık yaralanmalarında kullanılan “hulisan” isimli ünlü Çin preskripsiyonunun başlıca droğu olan *C. wallichii* Wight. türünün köklerinin etanol ekstresinin fraksiyonlarından 2,6-dideokspiranoz şekerlerden oluşmuş iki yeni steroidal glikozit (1: qinyangshengenin-3-*O*- β -D - oleandropyranozil - (1 \rightarrow 4) - β - D - simaropiranozid ve 2: qinyangshengenin - 3 - *O* -triglikozit) izole edilmiştir (Şekil 2.37.). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar önceki çalışmalarda bu türün ana bileşenlerinin C₂₁ steroidal glikozitler olduğunu gösteren sonuçları da desteklemiştir (146).

Chen ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir başka çalışmada *C. amplexicaule* türünün köklerinin etanollü ekstresinden ampleksikogenin B isimli yeni bir aglikona sahip iki yeni C₂₁ steroidal glikozit izole edilmiş ve yapıları ampleksikogenin B-3-*O*- β -D-simaropiranozid (**1**) ve ampleksikogenin B-3-*O*- β -D-simaropiranozil - (1 \rightarrow 4) - α - L - simaropiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - simaropiranozid (**2**) olarak belirlenmiştir (Şekil 2.38.) (147).

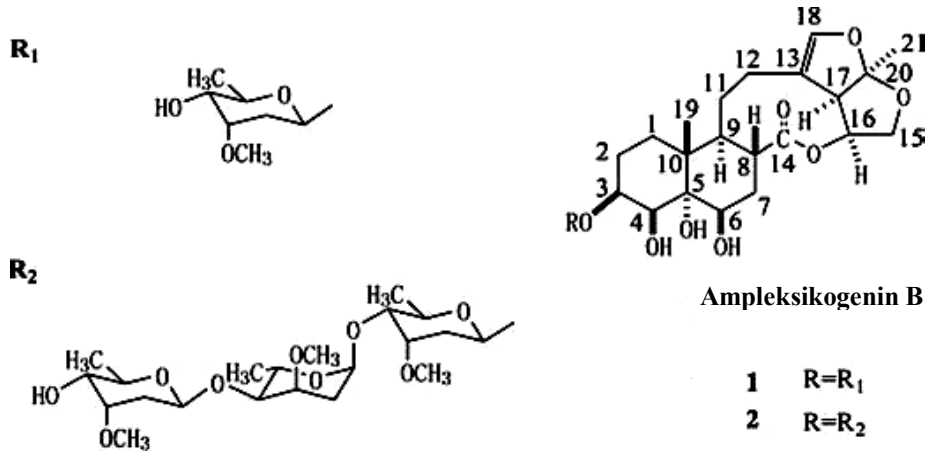
Lu ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *C. auriculatum* türünün köklerinin etanollü ekstresinden C(12) de sinnamoil grup, C (20) de 2-metilbütanoil grup ve C(3) de düz şeker zinciri taşıyan siyanoaurikulozid C-E (**1-3**) isimli üç yeni C₂₁ steroidal glikozit ve üç bilinen steroidal türevi [wilfozid K₁N (**4**), sinanaurikulozid II (**5**) ve aurikulozid IV (**6**)] izole edilmiş ve yapıları spektroskopik analizler ve kimyasal metotlara dayandırılarak aydınlatılmıştır (Şekil 2.39.) (148).



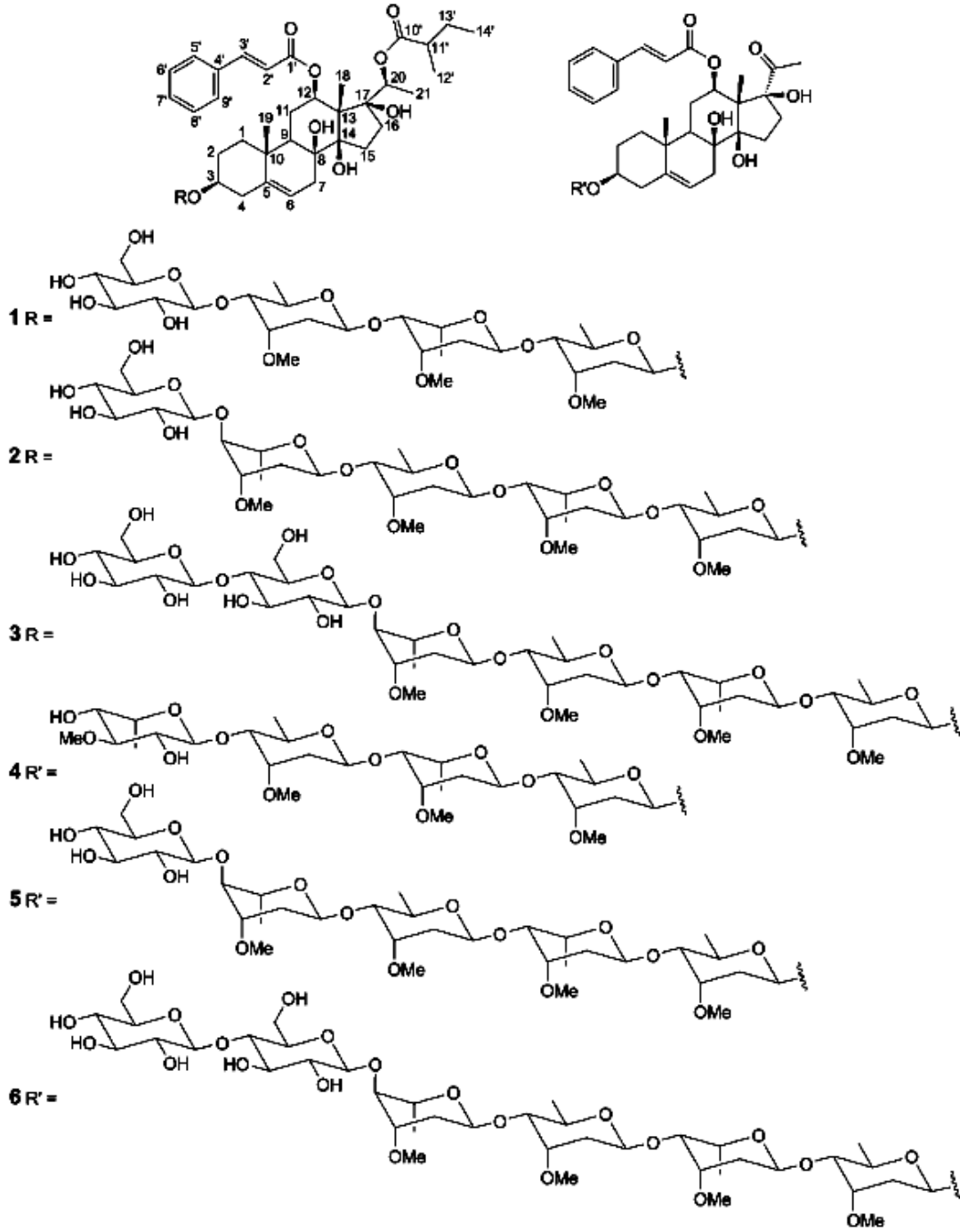
Şekil 2.36. *C. auriculatum* türünün köklerinden elde edilen bileşikler (145).



Şekil 2.37. *C. wallichii* türünün köklerinden elde edilen C₂₁ steroidal glikozitler (146).



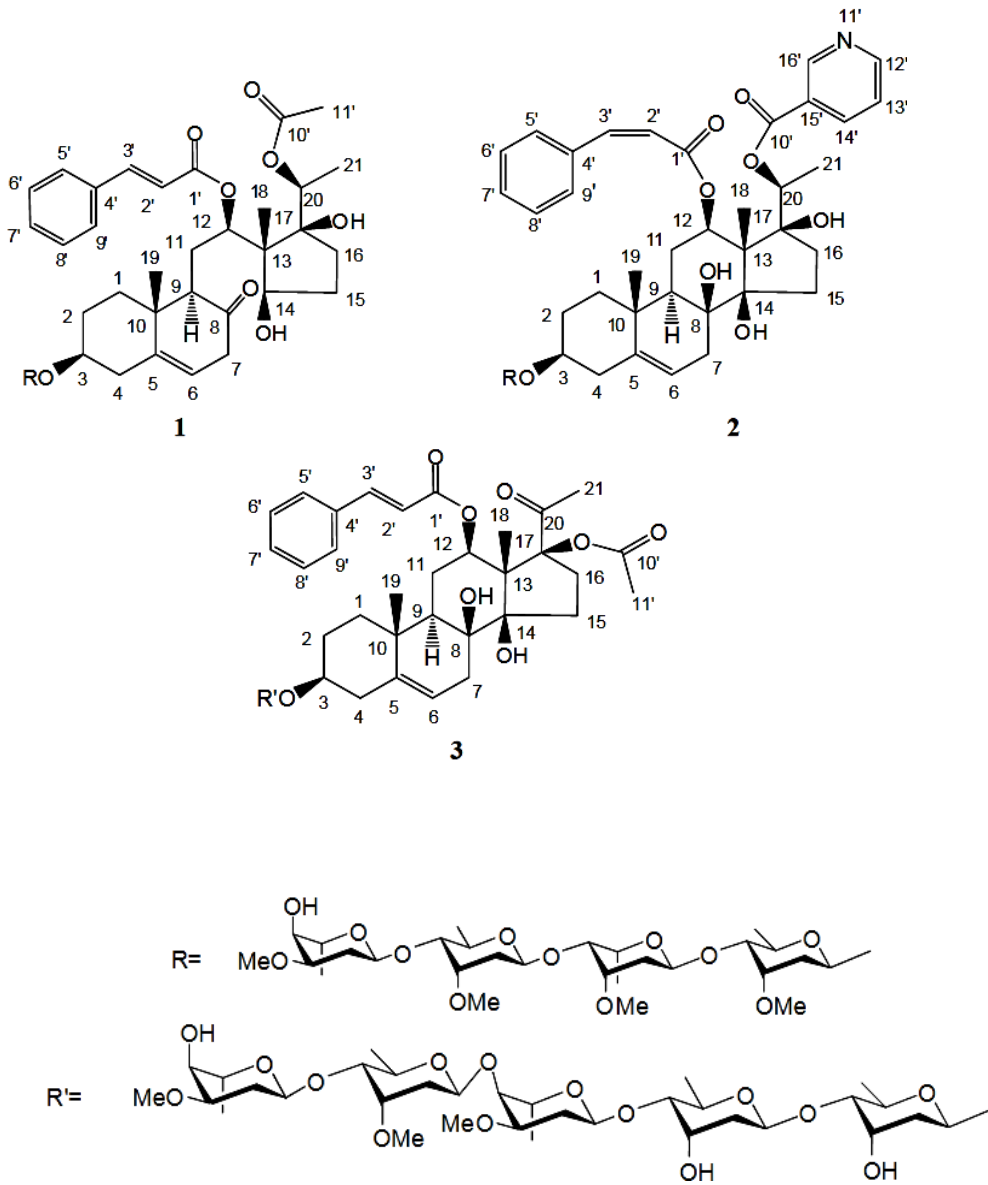
Şekil 2.38. *C. amplexicaule* türünün köklerinden elde edilen iki yeni C₂₁ steroidal glikozit (147).



Şekil 2.39. *C. auriculatum* türünden elde edilen bileşikler (148).

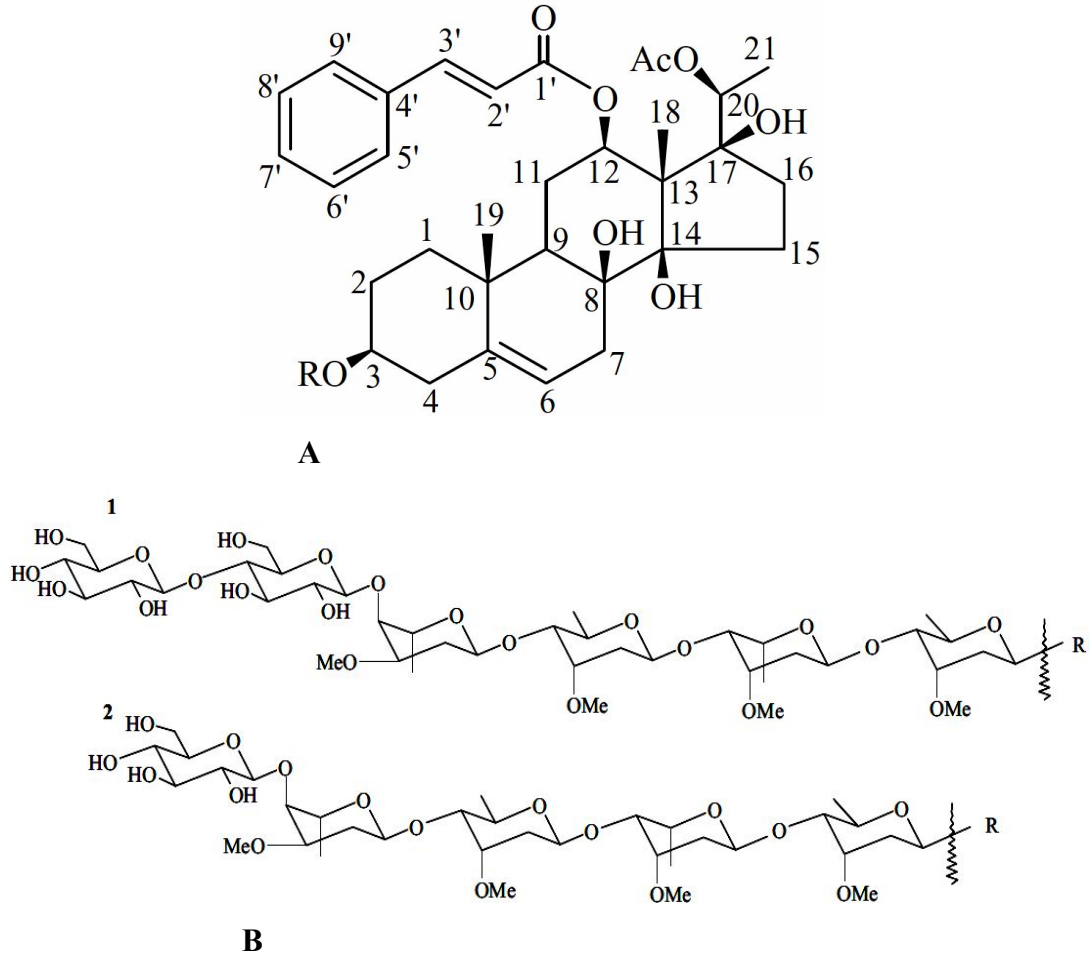
Lu ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir diğer çalışmada *C. auriculatum* türünün köklerinin etanol ekstresinden siyanoaurikulozit F [20-*O*-asetil-8,14-sekopenupogenin-8-one 3 - *O* - α - L - simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -

L-diginopiranosil - (1→4) - β - D - simaropiranosit (**1**), G [2',3'- Z - gagaminin 3 - O - α -L-simaropiranosil-(1→4)- β -D-simaropiranosil-(1→4)- α -L-diginopiranosil - (1→4)- β -D-simaropiranozit (**2**)] ve H [17-O-asetil-kidjoranin 3-O- α -L-simaropiranosil-(1→4)- β -D-simaropiranosil-(1→4)- α -L-simaropiranosil-(1→4)- β -D-digitoksopiranosil-(1→4)- β -D-digitoksopiranozit (**3**)] isimli üç yeni steroidal glikozit ve iki bilinen steroidal türevi [gagaminin 3 - O - α -L- simaropiranosil-(1→4)- β -D-simaropiranosil-(1→4)- α -L-diginopiranosil-(1→4)- β -D-simaropiranozit (**4**) ve wilfozit D₁N (**5**)] izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.40.) (149).



Şekil 2.40. *C. auriculatum* türünün köklerinden elde edilen üç yeni steroidal glikozit (149).

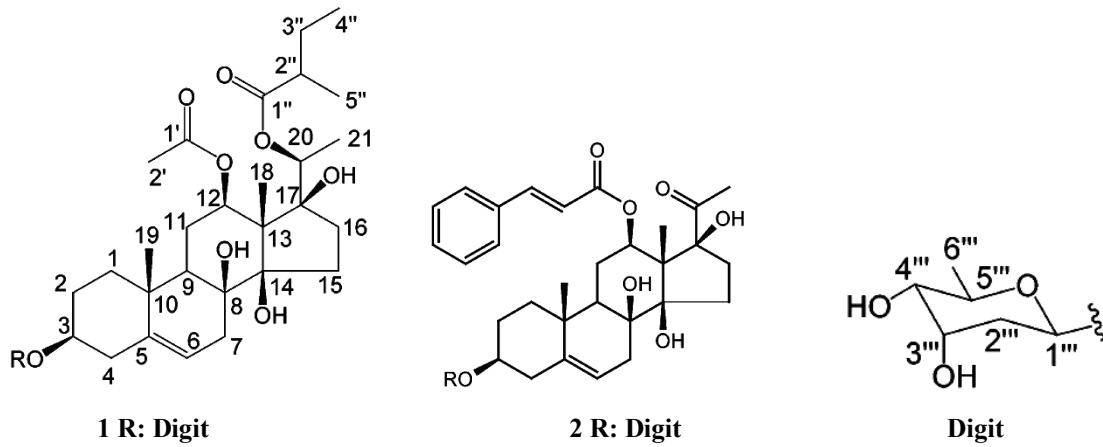
Teng ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *C. auriculatum* türünün köklerinin etanol ekstresinden iki yeni steroidal glikozit: cyanoaurikulozit A(1) ve B(2) izole edilmiş ve yapıları sırasıyla 20-*O*-asetilpenupogenin - 3 - *O* - β - D - glukopiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - glukopiranosil - (1 \rightarrow 4) - α - L-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-diginopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranozit ve 20-*O*-asetilpenupogenin-3-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-diginopiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D -simaropiranozit olarak belirlenmiştir (Şekil 2.41.) (123).



Şekil 2.41. *C. auriculatum* türünün köklerinden elde edilen steroidal glikozitler. **A:** Aglikon kısmının yapısı; **B:** Şeker kısmının yapısı (123).

Ma ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *C. otophyllum* Scheind türünün köklerinin etanol ekstresinin YBSK analizleri sonucu altı yeni glikozit: otofilozit N-P ve otofilozit Q-S ve üç bilinen glikozit: otofilozit A, otofilozit B ve kaudatin 3-O- β -D - glukopiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - oleandropiranosil - (1 \rightarrow 4) - β - D - simaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranozit olmak üzere dokuz C₂₁ steroidal glikozit izole edilmiş ve yapıları belirlenmiştir. Yapısı belirlenen bileşiklerin tümünün qingiangshengenin veya kaudatin aglikonlarını ve 1 \rightarrow 4 bağları ile bağlı 4-7 heksosil taşıyan düz şeker zincirini içerdiği tespit edilmiştir (130).

Shi ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *C. otophyllum* türünün köklerinden yeni bir C₂₁ steroid olan 12 β -O-asetil-20-O-(2-metilbütilil) - sarkostin'in 3 - O - digitoksopiranozit'i (**1**) ve bilinen kidjoranin 3 - O - β - D - digitoksopiranozit (**2**) isimli glikozitler izole edilmiş; spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle özellikle de 2D-NMR teknikleri yardımıyla yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.42.) (150).



Şekil 2.42. *C. otophyllum* türünün köklerinden izole edilen glikozitler (150).

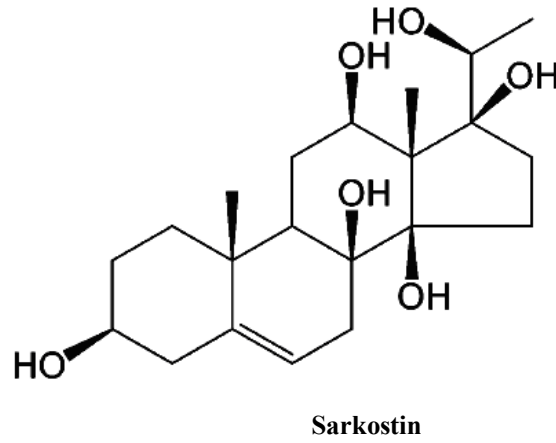
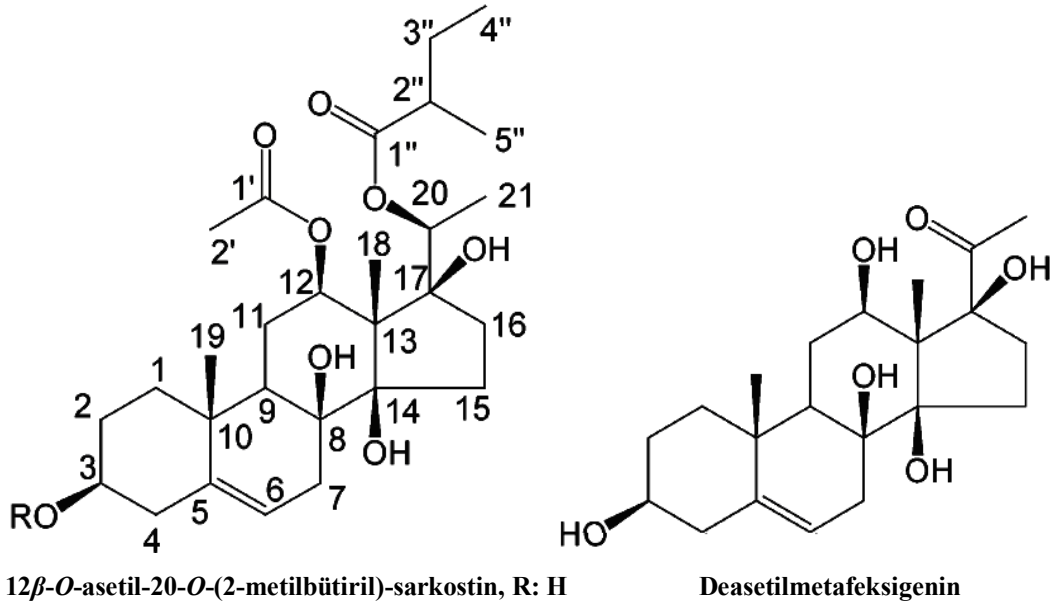
Yang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *C. auriculatum* türünün köklerinin etanol ekstresinin ve fraksiyonunun farelerde antidepressant aktivitesine bakılmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda 2011 yılında aynı çalışma grubu tarafından yapılan bu çalışmada aktif bulunan fraksiyondan Libermann-Buchard ve Keller-Kiliani reaksiyonları ile steroidal iskelet taşıdıkları belirlenen üç yeni pregnan

glikozit [siyanaurikulozit C-E (qingyangshengenin 3-*O*- β -D-oleandropiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranozit; qingyangshengenin 3 - *O* - β - D - glukopiranozil - (1 \rightarrow 4) - β - D - glukopiranozil-(1 \rightarrow 4)- α -L-simaropiranozil- (1 \rightarrow 4)- β - D - oleandropiranozil - (1 \rightarrow 4)- β -D-simaropiranozit; kaudatin 3-*O*- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 4) - β - D - simaropiranozil - (1 \rightarrow 4) - β - D - oleandropiranozil - (1 \rightarrow 4) - β - D - digitoksopiranozit] ve iki bilinen bileşik otofilozit L ve siyaurikuozit C izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır (151).

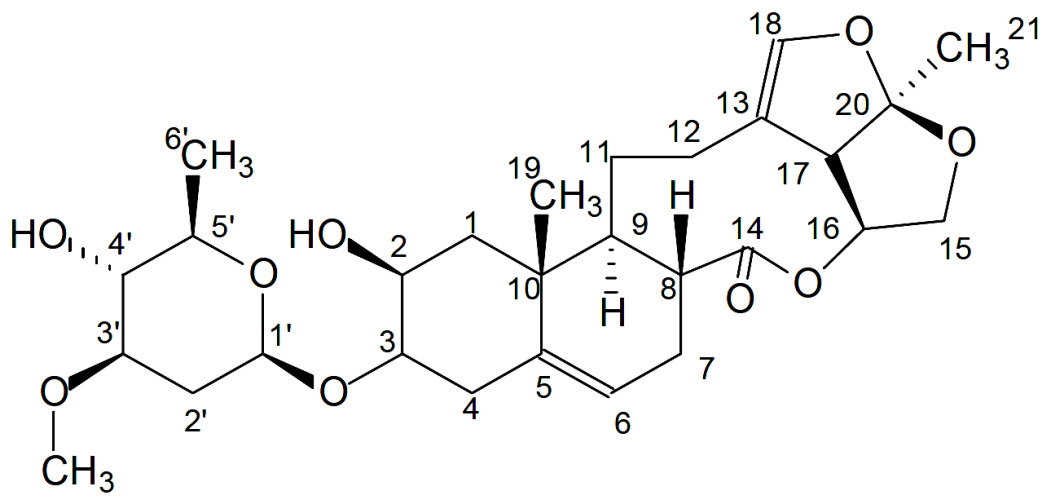
Shibano ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada *C. stauntonii* (Decne.) Schltr. Ex Levl. türünün köklerinin metanollü ekstresinden iki yeni steroidal glikozit: stauntosaponinler A ve B ve bilinen beş bileşik: anhidrohirundigenin monotevetozit, glaukogenin C mono-D-tevetozit, hirundozit A, sinatratozit A, ve glaukogenin C izole edilmiştir. Stauntosaponin A and B sırasıyla 3-*O*- β -D-oleandropiranosil-14, 16: 15, 20: 18, 20-triepoksi-14, 15-sekopregn-4, 6, 8(14)-trien ve 3-*O*- β -D-tevetopiranosil-14, 16: 15, 20: 18, 20-triepoksi-14,15-sekopregn-4, 6, 8(14)-trien olarak formüle edilmiştir (152).

Shi ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *C. otophyllum* türünün köklerinden yeni C₂₁ steroid 12 β -*O*-asetil-20-*O*-(2-metilbütiril)-sarkostin ve bilinen iki steroid [deasetilmetafeksigenin ve sarkostin] izole edilmiş; spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle özellikle de 2D-NMR teknikleriyle bu yeni steroidin yapısı aydınlatılmıştır (Şekil 2.43.) (150).

Huang ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada *T. atrofoliculata* türünün köklerinin etanol ekstresinden tiloforizit A isimli yeni bir steroid izole edilmiş ve yapısı spektroskopik yöntemler ve X-ray analizleri doğrultusunda aydınlatılmıştır (Şekil 2.44.) (153).



Şekil 2.43. *C. otophyllum* türünün köklerinden izole edilen steroidler (150).



Şekil 2.44. *T. atrofoliculata* türünün köklerinin etanol ekstresinden elde edilen tiloforizit A (153).

2.2.3. *Vincetoxicum* ve *Cynanchum* Türlerinde Bulunan Uçucu bileşikler

Lavault ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada *V. hirundinaria* türünün köklerinde uçucu yağlar olduğu bildirilmiş olup uçucu yağların (0.2 ml a/h) ana bileşenin 2-hidroksiasetofenon (% 84) olduğu önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Uçucu yağın diğer bileşenlerinin ise paeonol (% 4.3), miristin (% 0.5), apiol (% 1) ve 2,4-dekadienal (% 2.8) olduğu GC/MS analizleri ile tespit edilmiş ve yüzde oranları belirlenmiştir (18).

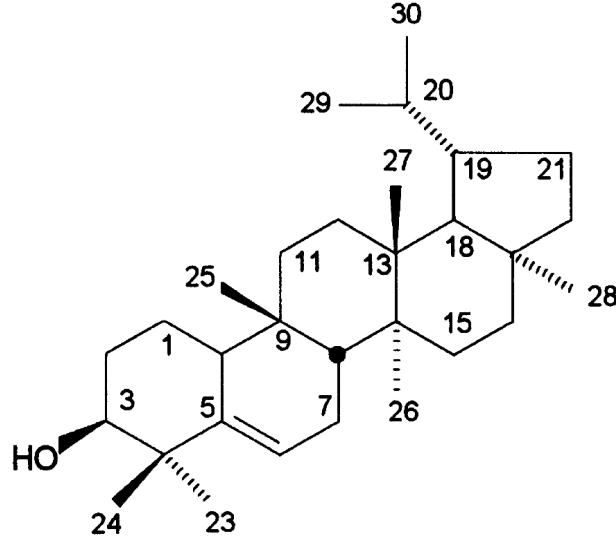
Jürgens ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada 8 cinse (*Cynanchum*, *Funastrum*, *Gonolobus*, *Metastelma*, *Oxypetalum*, *Orthosia*, *Sarcostemma* ve *Vincetoxicum*) ait 15 bitki türünün floral uçucu bileşikleri araştırılmış ve koku kimyası ve kokunun pollinatörü cezp etmede ki rolü anlaşılma çalışılmıştır. Floral uçucu bileşikler headspace adsorpsiyon tekniği ile toplanmış ve GC-MS ile analiz edilmiştir. 170 uçucu bileşik taranmış, birçoğu birçok farklı bitki türünde bulunan ve oldukça yaygın floral koku bileşikleri olan 128'i belirlenmiştir. İncelenen türler 1) monoterpenoidlerce (linalool, Z/E-acimene) baskın olan türler ve 2) benzenoidlerce (benzaldehit, fenilasetaldehit, 2-feniletıl asetat) baskın olan türler olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Çalışılan türlerden biri olan *V. hirundinaria* türünde ise yüksek miktarda benzenoidler bulunmuştur (154).

2.2.4. *Vincetoxicum* ve *Cynanchum* Türlerinde Bulunan Triterpenler ve Steroller

1969 yılında *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. hirundinaria*, *V. officinale*) türü üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda çeşitli bileşiklerle birlikte iki triterpen yapıda bileşik izole edilmiş ve isimleri friedelin ve α -amirin olarak belirlenmiştir (155, 156).

Lavault ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada ise *V. hirundinaria* türünün köklerinden hankolufenon (% 0.005) bileşiği izole edilmiş ve % verimi belirlenmiştir (18). Nowak ve Kisiel tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada çiçekli zamanında toplanan *V. officinale* türünün kurutulup toz haline getirilmiş toprak üstü kısımlarından lupan triterpenlerden biri olan hankokinol izole edilmiştir (Şekil 2.45.)(26). Pentasiklik triterpen yapıdaki hankokinol bileşiği ilk olarak

C. hancokianum türünün köklerinin etanol ekstresinden izole edildiğinden bu isim verilmiştir (26, 127, 157). Ayrıca bu bileşimin *C. rossicum* (Syn.: *V. rossicum*) türünün toprak üstü kısımlarından da izole edildiği bildirilmiştir (26, 158).



Şekil 2.45. Hankokinol (26).

Konda ve arkadaşları tarafından 1990 yılında yapılan bir çalışmada *C. hancokianum* türünün etanollü ekstresinden spektroskopik yöntemler ve X-ray analizleri kullanılarak hankolufenon ve hankolufenol isimli iki yeni pentasiklik yapılu triterpen izole edilmiştir (127, 157).

1969 yılında yapılan bir çalışmada Stöckel ve arkadaşları tarafından *V. hirundinaria* türünün köklerinden elde edilen genin ekstresinden dört kristal genin (B, D, E, G) izole edilmiştir. Bunlardan D oldukça anstabil olduğundan daha ileri araştırmalara devam edilmemiştir. B ve E bileşikleri bu çalışmaya kadar doğada buldukları bilinmeyen ve steroid yapıda olan 15-oksasteroitler olarak tespit edilmiştir. G bileşiminin ise 15-oksasteroit yapıda olduğu düşünülmüştür. Araştırmada elde edilen bu bileşiklerin alışılmış isimleri B: anhidrohirundigenin, E: hirundigenin ve G: vinsetogenin olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca hirundigenin ve anhidrohirundigenin bileşiklerinin yapısı da aydınlatılmıştır (116).

Lavault ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada *V. hirundinaria* türünün köklerinden β -sitosterol serbest (% 0.005) ve linoleik asit ile bağlı (% 0.01) olarak izole edilmiş ve % verimleri belirlenmiştir (18).

Nowak ve Kisiel tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada çiçekli zamanında toplanan *V. officinale* türünün kurutulup toz haline getirilmiş toprak üstü kısımlarından β -sitosterol, stigmasterol ve kampesterol isimli üç bilinen bitki sterolü izole edilmiştir (26). Elde edilen bu sonuçlar önceki çalışmalarda bu cinse ait türlerde β -sitosterol'ün izole edildiği bilgisini de desteklemiştir (18, 26).

1969 yılında *C. vincetoxicum* türü üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarda çeşitli bileşiklerle birlikte β -sitosterol isimli bitki sterolünde izole edildiği bildirilmiştir (156).

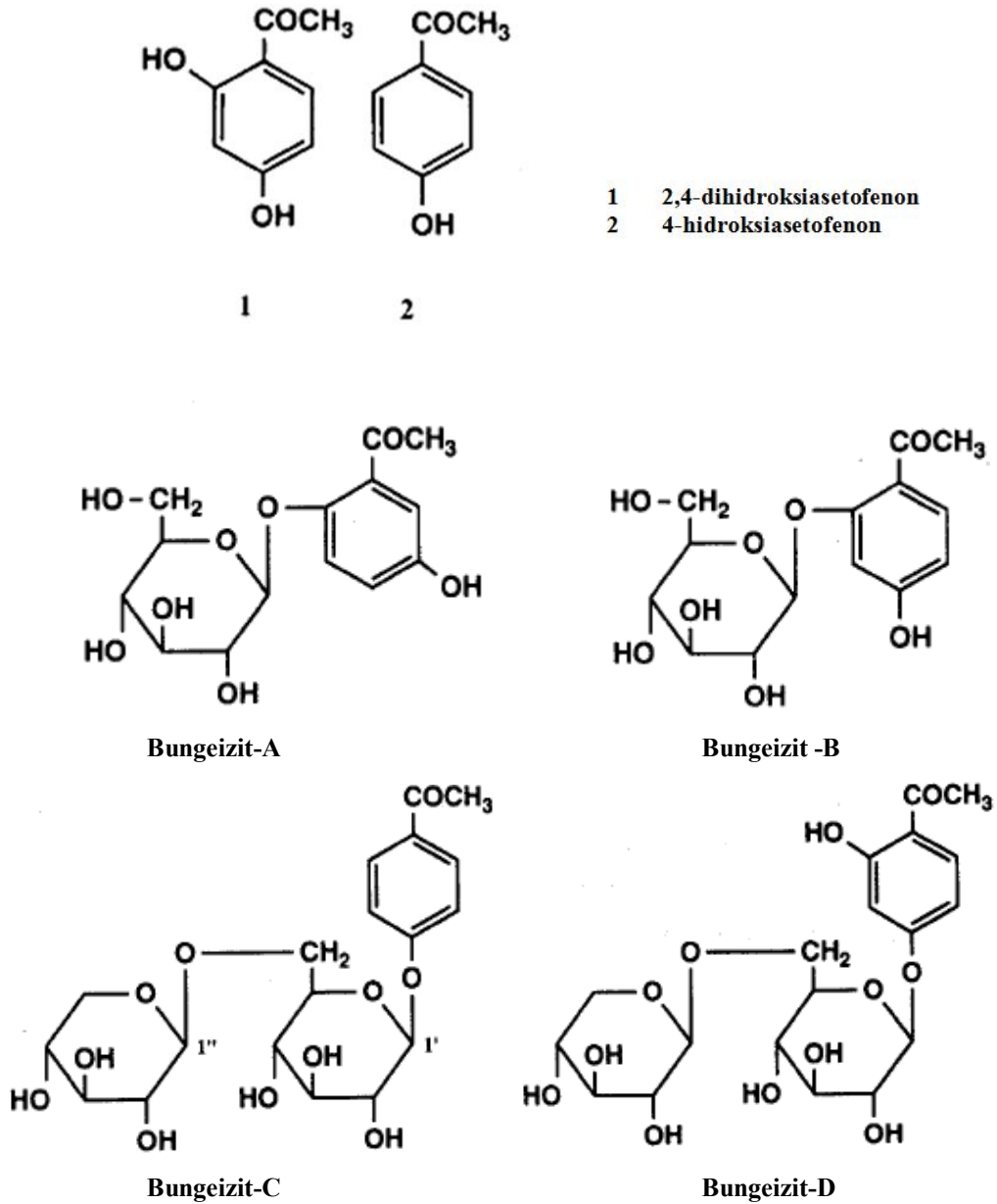
Mitsuhashi ve arkadaşları tarafından 1970 yılında yapılan bir çalışmada *C. grandifolium* var. *nikoense* türünün kloroform ekstresinden β -sitosterol bileşiği izole edilmiş ve yapısı belirlenmiştir (124).

2.2.5. *Vincetoxicum* ve *Cynanchum* Türlerinde Bulunan Asetofenonlar

Lavault ve arkadaşları tarafından 1999 yılında yapılan bir çalışmada *V. hirundinaria* türünün köklerinden 2-hidroksiasetofenon (% 0.06), paenol (% 0.01), aposinin (% 0.007), 4-hidroksiasetofenon (% 0.012), 2,4-dihidroksiasetofenon (% 0.002), siringik asit (0.002), siringik aldehit (0.0004), 1-(siringil)-1,2-dihidroksiopropan (% 0.002), 1-(4-hidroksifenil) etanol (% 0.0004) isimli asetofenonlar elde edilmiş ve yüzde verimleri tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda GS-MS ile 2-hidroksiasetofenon bileşiğinin uçucu yağlarının ana bileşeni olduğu da bildirilmiştir (18).

Asetofenonlar özellikle sinandion A ve bunun türevlerinin bitkilerde hepatoprotektif, nöroprotektif ve antitümör aktivitelerden sorumlu bileşikler olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. Bu nedenle bu biyoaktif bileşiklerin *Cynanchum* türlerinden etkili şekilde elde edilmesi ve yapılarının aydınlatılması önem kazanmıştır (159).

Li ve arkadaşları tarafından 1992 yılında yapılan bir çalışmada Çin’de “Bai-Shu-Uh” olarak bilinen *C. bungei* türünün köklerinin etanol ekstresinden 2,4-dihidroksiasetofenon, 4-hidroksiasetofenon bileşikleri izole edilmiştir. Ekstreten ayrıca bungeizit A-D isimli dört yeni asetofenon glikozit izole edilerek yapıları çeşitli teknikler yardımıyla aydınlatılmıştır (Şekil 2.46.) (126).



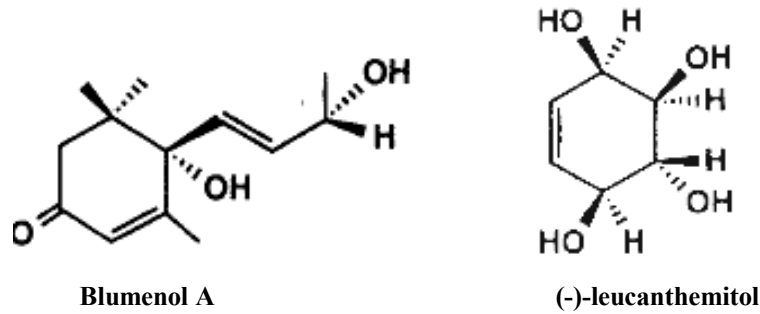
Şekil 2.46. *C. bungei* türünün köklerinden elde edilen 2,4-dihidroksiasetofenon, 4-hidroksiasetofenon ve bungeizit A-D (126).

Zhang ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *C. wilfordii* ve *C. auriculatum* türlerinin köklerinde bulunan sinandion A türevleri ileri yöntemlerle analiz edilmiş toplamda 28 sinandion A türevi belirlenmiş ve bunların 4'ünün önceden rapor edildiği 24'ünün ise yeni bileşikler olduğu tespit edilmiştir. *Cynanchum* türlerinin köklerinde bulunan asetofenonların özellikle sinandion A türevlerinin YBSK-ESI-MSⁿ teknikleri ile hızlı ve tam analizlerinin yapıldığı ilk çalışma olması nedeniyle dikkat çekici bir çalışma olarak literatüre geçmiştir (159).

2.2.6. *Vincetoxicum* ve *Cynanchum* Türlerinde Bulunan Diğer Bileşikler

Mitsubishi ve arkadaşları tarafından 1966 yılında yapılan bir çalışmada *C. wilfordii* türünün köklerinin kloroform ekstresinin asidik fraksiyonunda sinamik asit varlığı bildirilmiştir (117).

Li ve arkadaşları tarafından 1992 yılında yapılan bir çalışmada *C. bungei* türünün köklerinin etanollü ekstresinden blumenol A ve (-)-leucanthemeitol bileşikleri izole edilmiştir (Şekil 2.47.) (126).



Şekil 2.47. *C. bungei* türünün köklerinden elde edilen blumenol A ve (-)-leucanthemeitol (126).

Nowak ve Kisiel tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada çiçekli zamanında toplanan *V. officinale* türünün kurutulup toz haline getirilmiş toprak üstü kısımlarından uzun zincirli alkanoller [C24, C26, C28, C30, C32-alkan-1-oller, hakkakosan-1-ol(seril alkol) ile birlikte] izole edilmiştir (26).

2.3. *Vincetoxicum* Türleri ve Fenantroindolizidin Alkaloidleri ile İlgili Biyoaktivite Çalışmaları

2.3.1. *Vincetoxicum* Türleri Üzerinde Yapılmış İsekt-feedant ve İsekt-antifeedant Aktivite Çalışmaları

Kimyasal pestisitler tarım ürünlerinin insekt pestlerden korunmasında önemli rol oynayan ajanlardır (160, 161). Fakat kimyasal pestisitlerin yaşayan organizmalar ve çevre üzerine kronik etkisinin olması, fazla pestisit kullanımını sınırlandırmıştır. Sentetik kimyasal pestisitlerin sürekli kullanımının sağlık açısından tehlikeli olduğu, istenmeyen yan etkilere ve çevresel kirlilik gibi problemlere neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (161, 162). Ayrıca kendilerine karşı kullanılan her kimyasala böceklerin dikkate değer fiili resistans geliştirme yeteneğinde olduğu görülmüştür (28). Yıllardır sürekli ve ayırım yapmadan insektisit kullanımı sonucunda Dünya'nın farklı yerlerinde insektisitlerin farklı sınıflarına ait belirli moleküllere karşı resistans geliştiği tespit edilmiştir (76). Sentetik pestisitlerin düşüncesizce kullanılması pestlerin sekonder salgınlarına neden olmuş ve bunlar normalde doğal olarak kontrol altında iken tersine hızlı şekilde üremeye başlamıştır. Ayrıca iki veya üç uygulama sonunda pestlerin insektisitlere tolerans oluşturduğuda tespit edilmiştir (161).

Lahana yaprak güvesi *Plutella xylostella* L. türü karnıbahar, kabak, brokoli, hardal, turp ve şalgam için çok ciddi bir pest olarak bildirilmiştir. Güney Asya'da bu yaprak güvesinin istilasının ürünün % 90'dan fazlasının kaybına neden olduğu görülmüştür. Çünkü bu türün yılda çok sayıda nesil ürettiği ve bunların sayılarını çok hızlı şekilde arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca bu türün insektisitlerin aşırı kullanımı sonucu *Bacillus thuringiensis* (Bt) kristal (Cry) toksinleri içeren insektisitlerin neredeyse tüm sınıflarına karşı direnç geliştirdiğide bildirilmiştir (163). Tarımsal ürünler için tehlikeli pek çok böcek türü bulunduğu belirlenmiş olup bunlardan *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) "tütün tırtılı" önceleri sadece tütün için en önemli pest olarak bildirilirken şimdilerde ise ayrıca domates, pamuk, hintyağı ve acıkabak gibi pekçok ürün için de ciddi bir pest olarak belirlenmiştir (161). *S. littoralis* Bois. türü ise konak aralığı 40 familyayı kapsayan ve en az 87 türü ekonomik olarak önemli ürünleri içeren

oldukça etkili bir pest olarak kayıtlara geçmiştir. Bu türün saldırdığı ana ürün türleri arasında pamuk, keten, yer fıstığı, hint keneviri, yonca, mısır, pirinç, soya fasulyesi, çay, tütün ve çeşitli sebzeler (patlıcan, hardal, kırmızıbiber, su kabağı, fasulye, patates, tatlı patates, üzüm vb.) sayılmıştır. Polifagus yaşam şekli sayesinde larvalar kendilerini sayısız bitki kimyasalına adapte edebilme yeteneği geliştirmiş ve kolaylıkla sentetik insektisitlerin etkilerine karşı resistans oluşturmuştur. *Leptinotarsa decemlineata* Say. türü “Kolorado patates böceği” olarak bilinen ve sadece Solanaceae familyasına ait bitkiler üzerinde gelişebilen ve hala çok önemli patates pesti olarak değerlendirilen bir tür olarak bildirilmiştir. Bu türün tüm gelişim evreleri boyunca aşırı beslenme nedeniyle patates sebzesinde tam tahribata neden olduğu gözlenmiştir. Örneğin bir böceğin larva evresinde patates yapraklarından yaklaşık 40 cm² tükettiği; yetişkin olanların ise günde buna ek olarak 9.65 cm² kadar daha yaprak tükettiği bildirilmiştir. Kolorado patates böceği etkili beslenme miktarına ek olarak; ayrıca yüksek doğurganlığı ile de karakterize edilmiştir. Örneğin bir dişinin 300-800 yumurta bıraktığı belirlenmiştir (28). *Helicoverpa armigera* türü ise genel olarak “pamuk kurdu” veya “Amerikan pamuk kurdu” olarak bilinen ve birçok ekonomik öneme sahip üründe tahribata neden olan en ciddi pestlerden biri olarak kayıtlara geçmiştir. Bu böceğin Dünya’nın birçok farklı kısmında belirgin tahribatlara neden olduğu rapor edilmiş; örneğin Hindistan’da çiftçilerin nohut ve güvercin bezelyesi ürünlerini tarlada kaybettiği ve Hindistan rupisi ile yaklaşık 12.000 milyon (US\$ 300 milyon) zarara uğradığı belirlenmiştir. Hindistan’da çiftçilerin pestleri kontrol altına almada kısa sürede sonuç verdiğinden ağır sentetik piretroit insektisitleri yoğun şekilde kullandıkları gözlenmiştir. İlk olarak 1987 yılında Hindistan’da *H. armigera* türünün piretroit insektisitlere resistans geliştirdiği bildirilmiştir. Çiftçiler çoğunlukla karışım veya tarif edilenden çok yüksek dozlarda insektisit kullanımını tekrarladığından, insekt kontrolünde insektisit resistansı istenmeyen bir problem olarak mevcut problemlere eklenmiştir. Transgenik *Bacillus thuringiensis* (Bt) taşıyan ürünler pest resistansına sahip olup; pestlerle mücadelede kimyasal insektisitlere alternatif olarak sunulmuştur. Fakat *H. armigera* türünün Bt’deki insektisidal kristal proteine resistans geliştirme potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle transgenik ürünlere resistans geliştirme ihtimali; dirençle mücadelede çeşitli kavramsal stratejilerin geliştirilmesini teşvik etmiştir (76). Sentetik insektisitler günümüzde önde gelen sivrisinek kontrol ajanlarından biri olarak da

değerlendirilmektedir. Bu kimyasalların çevresel uygulamaları ve hedeflenmeyen organizmalar üzerine istenmeyen etkileri, sivrisineklerin insektisitlere son 50 yıl boyunca artan direnç geliştirmelerine neden olmuştur. Bu nedenle sivrisineklerin kontrolünde çevreye güvenli, geri-dönüşümlü ve hedefe özgü insektisitlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (160). Ayrıca yapılan çalışmalarda Dünya'nın bir çok bölgesinde bitkilerden türetilen ürünlerin kovucu etkileri nedeniyle veya sivrisinek ve diğer domestik böceklerin öldürülmesi için kullanıldığı tespit edilmiştir (162).

Dünya genelinde pestisitlerin aşırı kullanımı sonucu mevcut risklere yenilerinin eklenmesi (164) ile kimyasal pestisitler pestlerin kontrolünde hayal kırıklığı yaratmış (76) ve bilinçlenme ile birlikte güvenli yiyecek ve sağlıklı çevre için daha çevreci alternatif kontrol metotlarının geliştirilerek pestlerle mücadeleyi kolaylaştırması amaçlanmıştır (76, 161). Bu nedenle son zamanlarda doğal ürünlerin kullanımına dayalı biyolojik olarak parçalanabilir, çevre dostu ve çevre için daha güvenli agrokimyasallar üzerine ciddi şekilde odaklanılmıştır (165).

400 milyon yıldan fazladır bitkiler kovucu ve insektisidal etkileri gibi koruma mekanizmalarıyla ilgi çekici bulunmuştur. Aslında bitkilerin toksisite, antifeedant aktivite, böcek büyüme düzenleyicileri, yumurtlama caydırıcılığı, davet davranışlarının baskılanması ve üreme-fertilitenin azalması gibi etkili savunma sistemlerini geliştirerek evrim süresince kendilerini biyosidal bileşiklerin zengin doğal kaynağı haline getirerek birçok böceğe karşı koruduğu belirlenmiştir (160). Sentetik insektisitlerin yüksek tüketiminin azaltılmasında izlenebilecek bir diğer yol ise çevresel ve medikal olarak güvenli botanik insektisitlerin kullanılması olarak değerlendirilmiştir (28). Bu nedenle bir çok araştırmacı tarafından tarım ürünlerinin üretiminde botanik pestisitlerin kullanımı dikkat çekmiştir. Botanik pestisitlerin birçoğu non-selektif zehirli olup pestlerin geniş aralığına etkili olması hedeflenmiştir (161). Sentetik insektisitlerin aksine botanik insektisitler biyolojik olarak aktif bileşikler karışımını içerdiğinden bu bileşiklerin etkinliğinin uygun sinerjik etkileşimler yoluyla ekstra artabilir olacağıda düşünülmüştür. Günümüzde ticari olarak üretilebilen botanik insektisitlerin büyük bölümünün böceklerde akut ve kronik toksisite gösteren bitki metabolitlerinin etkilerini kullanabilme yeteneğinde olduğu görülmüştür (28). Bitkilere dayalı insektisitlerin diğer bir avantajı ise kross-resistant riskini azaltılabilen yeni hareket mekanizmalarını gerektiren hedef-spesifik moleküllerin tasarımı için yeni yaklaşımlar oluşturmasıdır

(165). Bu yüzden bir çok araştırmada bitkiler insekt büyüme kontrol ajanları olarak taranmış ve özellikle son 20-30 yılda pestisit fitokimyasalların fitofagus böceklerle karşı biyoaktivite potansiyelleri üzerine yoğunlaşmıştır (164). Birçok bitkinin özellikle sekonder metabolitleri sentetik pestisitlere etkili alternatifler olarak değerlendirilmiş ve bu metabolitlerin hareket mekanizmaları birçok araştırmacı tarafından detaylı olarak incelenmiştir (161). Son yıllarda sentetik pestisitlere ve fungusitlere alternatif olarak bitki ekstraktları ve uçucu yağlar gibi doğal ürünler üzerine araştırmaların büyük oranda artması da bu durumu desteklemiştir (164). Bitkilerden elde edilen bileşiklerin, pest insektler üzerine antifeedant, larvasidal, ovisidal, ovipozisyon caydırıcı, kovucu ve benzeri birçok hareket mekanizması farklı yollardan ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda bazı botanikaller: juvenil hormon ve ecdizon hareketleri üzerine etkili bulunmuş fakat hormonların kendisine etkili olmadığı da görülmüştür. Bunlar ayrıca antagonist juvenil hormon hareketi yoluyla insekt büyümeyi bozan maddeler olarak bildirilmiştir (161). Botanik insektisitlerin en önemli etkisi pest mortalitesi olarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarında ayrıca antifeedant aktivite, büyüme inhibisyonu ve antiovipozisyonel etkiler bazı pestlerin zararını belirgin şekilde azalttığından dikkat çekmiş; bunların antifeedant etkileri bazı araştırmacılar tarafından son yıllarda detaylı olarak araştırılmıştır. Antifeedant etki gösteren bitki maddelerinin sekonder bitki metabolitlerinin tüm bileşen gruplarında bulunduğu tespit edilmiş ve etkili insekt beslenme inhibitör etkisinin; terpenler, alkaloidler, saponinler ve polifenollerden ileri geldiği saptanmıştır. Kullanılan bu tür ürünler özellikle yıkıcı beslenmeleri nedeniyle çok zarara neden olan fitofagus böceklerin larvaları (Lepidoptera ve Coleoptera takımlarının fitofagus larvaları) üzerine etkili bulunmuştur. Antifeedant aktivitenin ayrıca böceklerle karşı larva büyüme inhibisyonu, kronik toksisite ve antiovipozisyon gibi diğer biyolojik etkiler ile de bağlantılı olduğu görülmüştür (28). Herbivorlar için bitki kalitesi bitki dokularındaki besin ve su içeriği ile ve özellikle sekonder metabolitlerin konsantrasyonu ile belirlenmektedir. Çevresel ve genetik faktörlerin her ikisinin bitki kalitesinde çeşitliliğe neden olduğu ve bu nedenle de bitki popülasyonu ile birlikte herbivorların performansının ve tercih üstünlüğünün etkilendiği görülmüştür (17).

V. hirundinaria (Syn.: *C. vincetoxicum*) türü memeli ve birçok genel böcek için oldukça zehirli olup alkaloidler gibi sekonder bileşiklerin çeşitli tiplerini içermektedir.

C. vincetoxicum türü Avrupa Asclepiad'ları arasında en sık ve geniş yayılışa sahip tür olması nedeniyle birçok böcek çalışmasına konu olmuştur (14). 1992 yılında Sheeley tarafından yapılan bir çalışmada New York dışındaki alanlarda *V. hirundinaria* türünün bulunduğu yerlerde herbivor ve patojenlerin bulunmadığı keşfedilmiştir. Bu durum Vincetoxicum türlerinde bulunan toksik bileşiklerin herbivor böcekleri uzaklaştırdığı fikrini işaret etmiştir. Fakat Christensen ise Ontario'da bulunan *V. hirundinaria* türleri ile hastalık ve herbivorluk arasında bir bağlantı bulamamıştır (12).

Vincetoxicum cinsi ile yakın akraba *Tylophora* cinsine ait türlerden biri olan *T. indica* türünün böcekler üzerine aktivitesi ile ilgili bilgiler ise oldukça az sayıda böcek ile sınırlı kalmıştır. Hindistan'da toplanıp toz edilen bu türün yaprak ve gövdesinin *Musca domestica* larvalarının kontrolünde % 10 konsantrasyon da % 78 mortalite değeri ile etkili olduğu görülmüştür. Bitkinin alkaloit ekstresinin ise % 0.01 konsantrasyonda *S. litura* larvalarının beslenmesini engellediği belirlenmiştir. Benzer başka bir çalışmada ise laboratuvar şartlarında hintyağı yaprak-disk metodu kullanılarak bitkinin yapraklarının metanol ekstresinden izole edilen alkaloitin, *Spilosoma obliqua* Walker türüne karşı güçlü antifeedant aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu türün kök, yaprak, tohum ve kabuklarından elde edilen botanik ekstralarının yüzyıllardır geleneksel insektisitler olarak kullanıldığı ve polar ekstralarının non-polar ekstralarına göre daha güçlü olduğu da çeşitli araştırmalarla bildirilmiştir. Bu türde bulunan ve önemli kimyasallar olan alkaloitler genelde polar solventlerde çözüldüğünden solvent polaritesine göre farklı düzeylerde ekstralar elde edilmiş (76) ve ayrıca yapılan çalışmalarda bu grup bileşiklerin böceklerde antifeedantlığa katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (24, 76). *Tylophora* cinsine ait türlerin ekstralarından elde edilen fenantroindolizidin alkaloitlerinin ayrıca insekt antifeedant aktivite ile ilişkili olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Sonuçlar bitkinin özelleşmiş herbivorlarının ya bu alkaloitlerden faydalandığını veya metabolizmalarına adapte ettiğini göstermiştir. *I. similis* kelebeğinin konak bitkisi olan *Tylophora* türlerinden, bitkide bulunan fenantroindolizidin alkaloitlerini aldığı ve bunları kimyasal savunma için ayırdığı varsayılmıştır (24).

Zehirli özelliklerinden dolayı herbivorlar *Vincetoxicum* cinsine ait türler üzerine oldukça özelleşmiştir (14). Avrupa'da birçok potansiyel biyolojik kontrol ajanı *V. hirundinaria* türü ile birlikte düşünülmüştür (12). Özellikle *V. hirundinaria* türü

üzerinde özelleşmekle beraber genel olarak bu böceklerle: yaprak yiyen iki krisomelit *Chrysochus asclepiadeus* Pallas ve *Chrysomela aurichalcea* ssp. *bohemic* Mann; buğday biti *Otiorhynchus pinastri* Herbst (Curculionidae); üç dipteran türü: tohumla beslenen tefrit sineği *Euphranta connexa* Fabricius (Tephritidae), iki mazi tatarcık sineği *Contarinia vincetoxici* Kieffer ve *C. asclepiadis* Schniffermiller (Noctuidae) (12, 14), noktuit güve *Abrostola asclepiadis* ve tohumla beslenen lygaeid yarım kanatlı böceği *Lygaeus equestris* (L.) (12) örnek verilmiştir. *Vincetoxicum* cinsine ait türlerle beslenen polifagus böcek türleri de keşfedilmiş olup; bunlara ise yaprak böceği *Exosoma lusitanica* L. (Chrysomelidae); tükürük böceği, *Philaenus spumarius* L. (Cercopidae) ve *Scopula umbelaria* Hübner (Geometridae); *Sparganothis pillerians* Schiff. (Tortricidae) ve *Nothris congressariella* Bruand (Gelechiidae) gibi birkaç güve örnek verilmiştir (14). Bu böceklerden buğday biti *O. pinastri* türünün *V. hirundinaria* türü üzerin de monofagus olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Rus literatürlerinde birçok krisomelit böceğin Rusya ve Orta Asya'da *Vincetoxicum* türleri üzerinden beslendiği belirtilmiştir. Fakat tüm bu bilgilere rağmen hem spesifik hem de cins ile ilgili düzeyde bitki sinonimlerinin olması Doğu Avrupa ve Rusya'da *V. nigrum* ve *V. rossicum* türlerinin böcek faunasının karışmasına neden olmaktadır (12).

V. hirundinaria türü toksisitesine rağmen monofagus folivor noktuit güve *A. asclepiadis* için konak bitki olarak bildirilmiştir (17, 34, 35). İsveç (14, 17, 36), Finlandiya ve Danimarka (17) gibi Kuzey Avrupa ülkelerinde *A. asclepiadis* türünün larvaları *V. hirundinaria* türü üzerine özelleşmiştir (14, 17, 34). Bu herbivor güvenin larvaları yiyecek kaynağı olarak tamamen *V. hirundinaria* türüne bağımlıdır ve konak bitki türüne oldukça adapte olmuştur (17). *A. asclepiadis*'in dişilerinin *V. hirundinaria* türünün yapraklarının (17, 35) alt yüzeyine en az 255 yumurta bıraktığı tespit edilmiştir (17). Yumurtlamadan sonra yumurtaların yaklaşık 10 günde çatladığı ve 5 larval instarın yaklaşık 5-6 haftada tamamlandığı görülmüştür (34-36). İsveç'de yılda bir neslin yumurtadan pupaya geçişinin yaklaşık 6 hafta sürdüğü, Avrupa'nın daha güney kesimlerinde ise birden fazla nesil oluştuğu gözlenmiştir (17). Ayrıca konakçı bitkinin geniş, büyük, açık alanlarına göre küçük, gölgeli parçalarına daha yüksek yumurta yoğunluğunun bırakıldığı, birinci ve ikinci instar larvaların gündüz ve gece beslendiği, yumurtaların bırakıldığı yerlerden çok az hareket ettiği, büyük larvaların noktural olduğu, aktif olarak yaprak aradığı ve ana olarak bitkinin tepesinde beslendiği,

larvaların gelişimini Ağustos ve Eylül aylarında tamamladıktan sonra toprakta pupa evresini geçirdiği belirlenmiştir. İskandinavya'da çoğu *A. asclepiadis* yumurtasının ölümüne genel predatörler ve parazitlerin neden olduğu bildirilmiştir. Karıncalar bu türün birincil genel predatörleri olmasına rağmen; krisofit larvaları, anthokorit böcekleri ve maytların da *A. asclepiadis* yumurtalarıyla beslendiği gözlenmiştir. Bunlara ek olarak *Trichogramma* spp. (Trichogrammatidae) ve *Telenomus* spp. (Scelionidae) türleri *A. asclepiadis* yumurtalarının parazitleri olarak tespit edilmiştir. Yumurtalarda olduğu gibi birinci ve ikinci instar larvalara aynı predatörlerin; büyük larvalara ise karınca ve yırtıcı pentatomit böceklerin saldırdığı saptanmıştır. Yumurta ve larva predasyonunun *A. asclepiadis* türünün popülasyon büyüklüğünü azaltmada önemli bir etken olduğu belirlenmiş ve konak bitki popülasyonları üzerine etkisinin az olmasının ana nedeni olarak gösterilmiştir. *A. asclepiadis* türü lokal bir tür sayılmasına ve popülasyonları nadiren yüksek yoğunluklara ulaşmasına rağmen sık konak bitki popülasyonlarının bazılarında, *A. asclepiadis* popülasyonlarının ara sıra yüksek yoğunluğa ulaşmasının konak bitkide ciddi tahribatlara yol açtığı gözlenmiştir (17). Fakat bu türün neden olduğu tahribatın düzeyinin yıllara göre değiştiği ve popülasyonlar arasında tahribata uğrayan veya tamamen yaprak dökken bitkilerde rastlandığı bildirilmiştir (35).

Tefritit sineği olarak bilinen *Euphranta connexa* türü, larvaları *C. vincetoxicum* (Syn: *V. hirundinaria*) türünün gelişmekte olan meyveleri üzerinde yaşayan ve olgunlaşmamış tohumları ile beslenen predispersal tohum predatörü olarak bildirilmiştir (14, 17, 34-36, 166). Literatürlere göre *C. vincetoxicum* türü İsveç dışında da bu türün konak bitkisi olarak kayıtlara geçmiştir (14). *E. connexa* türünün *V. hirundinaria* türü üzerinde monofagus olduğu ve sadece yılda bir nesil verdiği görülmüştür (12). Dişi sineklerin yumurtalarını gelişmekte olan podların alt tarafına bıraktığı, larvaların burada yaşadığı ve olgunlaşmış tohumlardan beslendiği belirlenmiştir (12, 34, 166). Larvaların, podların % 50-100'e saldırdığı, saldırıya uğrayan podlarda genellikle birçok tohumun tahrip olduğu ve tahrip olmayan tohumların ise fungal patojenlere daha hassas olduğu tespit edilmiştir (12). Tohum predatörü *E. connexa* türünün bazı yıllar tohumların tamamını tahrip ettiği gözlenmiştir (166). İsveç'de polifagus tırtır *Scambus brevicornis* (Gravenhorst) türü *E. connexa* türünün paraziti olarak bildirilmiş ve bu türün yoğunluğunu kontrol ettiği düşünülmüştür (12).

Herbivor tohum predatörü lygaeid yarım kanatlı böcek *Lygaeus equestris* çok

sayıda bitki türünün tohumları ile beslenen (12, 35) fakat *V. hirundinaria* türünü tercih eden bir böcek olarak kayıtlara geçmiştir (12, 14, 36, 166). *L. equestris* türünün hem yetişkinleri hem de larvalarının *V. hirundinaria* türünün tohumları ile beslendiği (12), ayrıca hem predispersal hem de postdispersal tohum predatörü olup iyi uçucu olduğu gözlenmiştir (17, 34, 35, 166, 167). Bu türün larva ve yetişkinlerinin yeşil ovüller üzerinden beslenerek geliştiği ve bu nedenle olgun tohumların germinasyon yeteneklerini kaybettiği belirlenmiştir (35). Yiyecek kaynağı ve hava şartlarının bu türün popülasyon büyüklüğünü etkilediği (12) ve tohum üretimi üzerine etkisinin oldukça minimal olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun böceğin özellikle post dispersal tohum predatörü olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (14). Bu nedenle *L. equestris* türünün bazen sayı olarak çok yüksek rakamlara ulaşmasına rağmen etkinliğinin *E. connexa* türü ile karşılaştırıldığında daha az olduğu bildirilmiştir (167).

Bu böceklere ek olarak *Tropidothorax leucopterus* Goeze (Lygaeinae) türünün de *C. vincetoxicum* türünün tohumları ile beslendiği tespit edilmiştir (14). Kuzey Amerika'da ise yarım kanatlı böcek *Lygus lineolaris* [Palisot de Beauvois] türünün *Vincetoxicum* türleri üzerinden beslendiği fakat bu türün neden olduğu tahribatın minimal seviyede olduğu bildirilmiştir (12).

Milkweed yarım kanatlı böceklerinin birçok türünün (Heteroptera: Lygaeidae: Lygaeinae) aposematik olarak renklendiği ve *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* ve *Senecionaceae* familyalarına ait toksik bitki taksonları üzerinden beslendiği belirlenmiştir. *T. leucopterus* ve *L. equestris* türleri olası düşmanlarına karşı renk gibi özel savunma mekanizmalarına sahip (aposematik) simpatrik olarak meydana gelen ve Güney Avrupanın ortalarında yaşayan iki yarım kanatlı tohum böceği olarak kayıtlara geçmiştir. Bu böceklerin genel olarak kendi savunmalarında kullandıkları maddeleri ayırmak için kendi konak bitkilerine bağımlı oldukları varsayılmıştır. Cinsteki böcekler arasında özelliklede milkweed yarım kanatlı böceklerinde sürü halinde yaşama yaygın bir özellik olarak göze çarpmaktadır. Besin bitkisinin ve birikiminin bunların defensif özellikleri üzerine etkisi Tullberg ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan bir çalışmada araştırılmış ayrıca doğal konak bitkisi *V. hirundinaria* ve *Helianthus annuus* türlerinin tohumları ile beslenen larvalar üzerine yavru kuşların neden olduğu predasyonda çalışılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda milkweed yarım kanatlı böcekleri ve *Asclepiadaceae* familyasına ait besin bitkilerinde bulunan bileşikler kardiyak

glikozitler (kardenolitler) ile ilişkilendirilmiştir. Fakat iki lygaeid yarım kanatlı böceği *L. equestris* ve *T. leucopterus* türlerinin, *Asclepiadaceae* familyasına ait konak bitkisi olan ve çeşitli toksik maddeleri içerdiği bilinen ayrıca kardenolit taşımayan *V. hirundinaria* türü üzerinde birlikte bulunduğu belirlenmiştir. Çalışılan türlerden *T. leucopterus* türünün *Vincetoxicum* üzerinde monofagus olduğu *L. equestris* türünün ise bu bitkiyi tercih etmesine rağmen toksik madde bulunmayan başka bitkilerden de beslenebildiği gözlenmiştir. Fakat bu iki tür savunmaları için konak bitkiye bağımlılık da farklılık göstermiştir. *L. equestris* türü alternatif yiyeceklere göre doğal konak bitkisi üzerinde daha az saldırı, düşük mortalite ve predatör sakınması ile daha iyi savunulmuştur. *T. leucopterus* türü için besin bitkisinin böyle bir etkisi bulunamamış ve bu durum bu türde alternatif savunma sistemlerinin olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca her iki türün larvalarının konak bitki üzerinden beslendiğinde saldırı sayısının daha az olduğu görülmüştür. Bu araştırmanın sonucunda *L. equestris* ve *T. leucopterus* türlerinde konak bitki kimyası, böcek renklenmesi ve birikim gibi aposematik sendromun önemli bileşenlerinin, diğer yaşam hikayeleri veya alternatif yaşam şekillerine kadar birlikte düşünülmesi gerektiği görülmüştür. Bu iki türün ayrıca kullandıkları bitki kısımlarının farklı olduğu; *T. leucopterus* türünün ovulları ve tohumları kullanırken ayrıca vejetatif kısımlar üzerinde de gelişebildiği; *L. equestris* türünün ise larva gelişimini tamamlamak için tohum ve ovüle bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Konak bitkilerinden toksinleri ve zararlı maddeleri ayırabilen türlerin bitkiye yüksek oranda bağımlılık gösterdiği ve bu durumun onların antipredatör savunmaları ile ilgili olduğu da bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca iki tür arasında besin alımı ve savunma ilişkisinin farklılık gösterdiği ve *L. equestris* türünde savunmanın besine bağımlı olduğu görülmüştür. Örneğin *V. hirundinaria* türü üzerinden beslenen *L. equestris* türünün *H. annuus* türü üzerinden beslenen türdeşlerine göre daha az saldırıya uğradığı ve bir hayli düşük mortaliteye sahip olduğu saptanmıştır. Bitki tarafından etkilenen larva renklenmesi düşük saldırı oranının bir diğer nedeni olarak düşünülmüştür. *V. hirundinaria* türü üzerinde bulunan larvaların daha parlak kırmızı; *H. annuus* türü ile beslenen larvaların ise daha soluk renkli olduğu görülmüştür. Predatörlerin tek olan yarım kanatlı böceklere göre küme halindeki böceklere sardırmaya daha az eğimli olduğunun belirlenmesi, böceklerde aggregasyonun saldırıdan kaçma yeteneğinde artış gibi farklı fonksiyonlarının olabileceğini

düşündürmüştür. Fakat bu araştırmada çalışılan türlerin uçuş şansının olmamasıdır. Bir önceki çalışmada yavru kuşların non-aposematik (kahverengi) lygaeid böcek gruplarına gerçekte saldırdığı ama aposematik lygaeis böcek gruplarına ise saldırmaya isteksiz olduğu görülmüş olup bu da bu çalışmada elde edilen verileri desteklemiştir. Temelde *L. equestris* ve *T. leucopterus* türlerinin *V. hirundinaria* türünü farklı yollardan sömürdüğü gözlenmiş ve *T. leucopterus* türünün bu konak üzerinde monofagus olmasına rağmen bitki kısımlarını kullanmada geniş spektrumlu olduğu belirlenmiştir. Bu türün ayrıca çok büyük yumurta yığınları yaptığı, konak bitki parçalarından uzağa uçuş eğiliminde olmadığı ve açlığa daha toleranslı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum *T. leucopterus*'nin *L. equestris*'e göre daha büyük lokal yoğunluklara ulaşmasına neden olmaktadır. *L. equestris* türünün ise tohumlar üzerine daha çok özelleştiği fakat konak bitki ve habitat ile ilgili geniş spektrumlu olduğu saptanmıştır. Bu türün daha göçücü olduğu ve hem bitki hem de toprak üzerindeki tohumlardan faydalanabildiği gözlenmiştir. Bu nedenle *L. equestris* türü aslında geniş aralıkta konak bitki kimyasallarına ve geniş aralıkta habitatlara açık bir tür olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca *L. equestris* türünün renklenmede daha çeşitli olduğu ve bu çeşitliliğin hem genetik hem de çevresel bileşenlerden kaynaklandığı belirlenmiştir (168).

Böcek-bitki interaksiyonunun en önemli ve en büyüleyici yönünün fitofagus böcekler tarafından özellikle bitki sekonder metabolitlerinin seçici alımı ve depolanması olduğu bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir. Sekestrasyon olarak tanımlanan bu doğa olayı çeşitli ekolojik ve biyokimyasal prosesler süresince böcek ve fitokimyasallar arasındaki evrimsel ilişkilerin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Japonya'nın güneybatı adalarında yetişen *Asclepias* türü *T. tanakae* üzerine özelleşmiş *I. similis* türünün fenantroindolizidin alkaloidleri içerdiği bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (106). Bu fenantroindolizidin alkaloidlerinin bir kısmının bitkide bulunduğu ve kelebekler için ovipozisyon stimulanı olarak davrandığı ayrıca çeşitli kanser hücre dizilerine karşı sitotoksik etkili olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir (91, 103, 106). Abe ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan bir çalışmada *I. similis* türünün pupa ve imajlarının metanollü ekstresinden 3-demetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin, bunun *N*-oksidi ve izotilokrebrin *N*-oksit isimli *T. tanakae* türünün bilinen üç alkaloidi ile 3,4-didemetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin isimli yeni bir alkaloid izole edilmiştir (91, 103). 3,4-didemetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin isimli dördüncü alkaloid daha önceki

çalışmalarda *Tylophora* türlerinden izole edilmemiştir. Bu çalışma *I. similis* türünün larva evresi süresince sekesterleri ve konak bitki orjinli spesifik fenantroindolizidin alkaloitleri depoladığını göstermiştir (106). Ayrıca predatörlere karşı fenantroindolizidin alkaloitlerinin savunma etkinliği de araştırılmış ve savunmada görev alan bileşikler oldukları keşfedilmiştir (91, 106). Danaid kelebeklerinde kardenolitlerin kimyasal savunmada, pirolizidin alkaloitlerinin ise hem kimyasal savunma hem de feromon üretiminde görev aldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle diğer Danaid kelebekleri gibi *I. similis* türünün yetişkin erkeklerinin de pirolizidin alkaloitlerini elde etmek ve erkek abdominal kıl fırçalarından ve kanat şeklindeki koku organlarından dihidropirolizidinleri salgılamak için pirolizidin alkaloitlerini içeren bitkiler tarafından cezp edildikleri varsayılmıştır. Bu durum kelebeğin yetişkinlerinin hem fenantroindolizidin hem de pirolizidin alkaloitleri tarafından iki yönlü olarak savunulduğunu düşündürmüştür. Abe ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışma fenantroindolizidin alkaloitlerinin sekestrasyonu ile ilgili ilk çalışma olarak literatüre geçmiştir. *T. tanakae* türünün bileşenlerinin araştırılması sürecinde çeşitli araştırmacılar tarafından tiloforin ve izotilokrebrin başta olmak üzere ikisi bilinen 14 fenantroindolizidin alkaloiti izole edilmiş ve bunların yapıları belirlenmiştir. *I. similis* türünün vücudundan izotilokrebrin, tiloforin, tiloforinin, tilokrebrin ve septisin tipi gibi alkaloitler arasından sadece izotilokrebrin homologları olan 4 alkaloit izole edilmiştir (106). Ayrıca başka çalışmalardan elde edilen (+)-izotilokrebrin *N*-oksit, (+)-6-demetiltilokrebrin ve özellikle (+)-izotilokrebrin, (+)-3-demetilizotilokrebrin ve (-)-7-demetiltiloforin isimli alkaloitlerinde ayrı ayrı yumurtlamayı uyardığı fakat bunlardan oluşan alkaloit karışımın ise daha etkili olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak kelebeğin konak seçimine bitkide bulunan birçok fenantroindolizidin alkaloitinin sinerjistik hareketinin aracılık ettiği belirlenmiştir (91).

Paleartik bölgede 150'den fazla türü, Neartik bölgede ise 60 tanımlanmış türü içeren, Cecidomyiidae ait mazı oluşturan tatarcık sineklerinden *Contarinia* cinsine ait türlerin çok benzer görünüşte olduğu ve bazı türlerinin ise morfolojik olarak ayırt edilemediği bu nedenle de tanımlamanın konakçı bitki ve mazı tipine göre yapıldığı bildirilmiştir. Mazı teşkil eden tatarcık sineklerinin konak bitki ve mazı yapısı bakımından oldukça spesifik olduğu görölmüştür. Örneğin bunların en büyük cinslerinden biri olan *C. rondani* türünün çeşitli dikotiledonların şekil bozukluğu olan

çiçek tomurcukları içerisinde, otların başaklarında, ağaçlarda, çeşitli yaprak ve çiçek durumlarında ve ayrıca mono ve dikotiledonlar üzerinde mazi geliştirdiği belirlenmiştir. Widenfalk ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada fenolik gelişmeler, morfometrik akrabalıklar ve mitokondrial DNA verileri kullanılarak *V. hirundinaria* türüne saldıran *C. vincetoxici* ve *C. asclepiadis* isimli iki izomorfik türün durumu araştırılmıştır. Bu iki tür kuzeybatıda Danimarka, güneydoğuda İsveç ve güneybatıda Finlandiya ile sınırlanmakla birlikte Avrasya'da geniş yayılım gösteren çok yıllık bir bitki olan *V. hirundinaria* türü üzerinde tanımlanmıştır. Mazıları çiçek tomurcuklarında bulunan *C. vincetoxici* türü sadece mazi karakteristiğinden ve larva morfolojisinden ayırt edilmiştir (169). Ayrıca bu çiçek mazi tatarcığının *V. hirundinaria* türü üzerinde monofagus olduğu, mazi haline gelmiş çiçeklerin şişmiş ve kırmızımsı olduğu; bu durumun ise onları dikkat çekici ve kolay bulunur hale getirdiği görülmüştür (170). Meyve duvarında mazıları olan *C. asclepiadis* türü ise mazi karakteristiği ve yetişkin morfolojisine dayalı olarak teşhis edilmiştir. Ayrıca bu iki türün çok yakın bağlantılı türler olmadığı ve *V. hirundinaria* türüne farklı nedenlerden dolayı konak olarak adapte olduğu belirlenmiştir. *V. hirundinaria* türü üzerinde barınan bu iki farklı türün larvalarının beslenme davranışlarının da farklı olduğu tespit edilmiştir. *C. vincetoxici* türünün dişilerinin en genç çiçek tomurcuklarına yumurta bıraktığı, 7-10 günün sonunda çiçek tomurcuklarının maziya dönüştüğü ve birinci instar larvaların beslenmeye başladığı gözlenmiştir. Çiçek mazıları ortalama 15 larva içermiş ama bu sıklıkla mazi başına 50'ye kadar çıkmıştır. Meyve mazıları yüzeylerindeki deformasyondan kolaylıkla tanınmıştır. Dişilerin meyve duvarına yumurtladığı ve yumurtaların beslenmenin başladığı meyvenin iç duvarında depolandığı belirlenmiştir. Yumurtlama küçük, olgunlaşmamış, nadiren de yetişkin meyvelerde yaygın olarak görülmüştür. Meyve mazısına neden olan bu türlerin yumurtlama için önceden saldırıya uğrayan meyveleri tercih ettiği, fakat tekrarlanan yumurtlamanın çiçek mazısında gözlenmediği de bildirilmiştir (169).

Bitki kalitesinin genel ve özelleşmiş herbivorları farklı şekilde etkilediği ve herbivor performansı ile tercihinin her zaman ilişkili olmadığı varsayılmıştır. Örneğin herbivorların konağı tanımlarını sağlayan bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarını içeren bitkileri daha cezbedici bulduğu gözlenmiştir. Genel herbivorların konak bitki savunmasından çoğunlukla negatif olarak etkilendiği; özelleşmiş herbivorların ise ya

etkilenmediği veya savunma bileşikleri tarafından cezp edildikleri hatta belirli kimyasalların yüksek düzeylerini tercih edebildikleri belirlenmiştir. Özelleşmiş herbivorların konak bitkilerin kimyasal kompozisyonuna adapte olduğu ve bu yüzden kimyasal çeşitlilikten daha az etkilendiği varsayılmıştır. Aslında özelleşmiş herbivorların birtakım kaynak populasyonlardaki dominant savunmaya daha çok uyum sağladığı ve bu nedenle ortalama düzeyde savunma yapan bitkileri tüketmeyi tercih ettiği görülmüştür. Özelleşmiş herbivorlar savunma bileşiklerinden etkilenmediği taktirde veya daha yüksek konsanrasyonları tercih ettiği taktirde; konak bitkide artan savunmanın alışılmadık şekilde seleksiyona neden olduğu gözlenmiştir. *A. asclepiadis* türünün larvaları birçok genel herbivor için hoş olmayan ve toksik alkaloitleri içeren *V. hirundinaria* türünün yapraklarından beslenen özelleşmiş bir herbivordur. Leimu ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada *A. asclepiadis* larvalarının besin seçimi ve performansının *V. hirundinaria* populasyonlarına göre değişimi ve konak bitki populasyonlarındaki antofin seviyesi ile bağlantılı olarak beslenme davranışındaki çeşitliliği araştırılmıştır. Besin seçimi, yaprak tüketimi, *A. asclepiadis* larvalarının büyümesi, konak bitki populasyonu içerisinde ve populasyonlar arasında değişkenlik gösterip göstermediği, özelleşmiş herbivorlar için uygun olup olmadığı incelenmiş ve ayrıca konak bitki populasyonunda tercih edilen bazı bitki genotiplerinin test edilmesi de amaçlanmıştır. Bu çalışmada yüksek antofin düzeylerine sahip konak bitki populasyonları, düşük antofin düzeylerine sahip konak bitki populasyonları ile karşılaştırılmak için seçilmiştir. Çalışmada konak bitki populasyonlarının alkaloit düzeylerinin larva büyümesini ve yaprak tüketimini etkilemediği görülmüştür. Buna ek olarak *A. asclepiadis* larvalarının konağı tanınmasına antofin'in neden olduğu belirlenmiş ama tüketim ve büyümeyi yapraktaki besin ve bileşikler gibi diğer faktörlerin etkilediği düşünülmüştür. *A. asclepiadis* larvaları antofin'in yüksek düzeyini tercih etmiş, fakat bunun konsantrasyonundan etkilenmemiştir. Bu herbivorlar *V. hirundinaria* türünde antofin'in daha yüksek düzeyleri nedeniyle alışılmadık şekilde konak bitki populasyonunda güçlü seleksiyona neden olmuştur. Bu sonuçlar özelleşmiş türlerin yüksek içerikli bitkiler tarafından daha çok cezp edilmesi nedeniyle düşük antofin düzeylerinin bitkide daha faydalı olacağını göstermiştir. Çalışmada özelleşmiş herbivor *A. asclepiadis* türünün larva performansı; tercih üstünlüğü ve yaprak tüketimi ile ölçülmüştür. Özelleşmiş herbivorları konak bitkinin savunma bileşikleri ya etkilememiş

veya bu bileşikler bu türleri cezp etmiş; bazıları ise belirli kimyasalların yüksek düzeylerini tercih etmiştir. Konak bitki populasyonları arasında yaprak tüketimi ve yiyecek seçiminde belirgin çeşitlilik olduğu ama farklı konak bitki populasyonları üzerinde larva büyümesi ve beslenme arasında fark olmadığı belirlenmiştir. *A. asclepiadis* larvaları yüksek alkaloit konsantrasyonuna sahip konak bitki populasyonlarını tercih etmiş fakat seçmeli olmayan testlerde bu populasyonlardan oluşan bitkilerde yaprak tüketiminin diğerlerinden fazla olmadığı görülmüştür. Ayrıca aynı populasyona ait konak bitkilerin bireyleri arasında larvanın besin tercihi ile ilgili bazı farklılıkların olduğu da belirlenmiş ve bu durum araştırmacılara populasyonlarda yaprak kimyasında değişkenlik olduğunu düşündürmüştür (17).

Kathuria ve Kaushik tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada; *Eucalyptus camaldulensis* ve *T. indica* türlerinden elde edilen ham yaprak ekstraları *H. armigera* larvalarına karşı seçmeli olmayan testlerle antifeedant aktiviteleri için test edilmiştir. Çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çeşitli yaprak ekstralarına (etanol, hekzan ve ham alkaloit ekstraları) lahana yaprak-diskleri batırılmış ve 24 saat süre ile *H. armigera* türünün beşinci instar larvalarının beslenmesi sağlanmıştır. Sonuçta *T. indica* türünün etanol ekstresinin % 22'den % 78'e kadar değişen oranlarda belirgin beslenme inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. *T. indica* türünün larva beslenmesinde % 50 inhibisyona neden olan EI₅₀ değerini veren etanol ekstresinin etkili konsantrasyonu % 2.8 iken hekzan ekstresinde ise bu değer % 5.2 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca larva beslenmesini azaltmada *T. indica* türünün yapraklarının etanol ekstresinden elde edilen alkaloit fraksiyonunun daha etkili olduğu görülmüştür. Alkaloit fraksiyonunun % 1 konsantrasyonda % 58 inhibisyon neden olduğu, ham yaprak ekstralarının biyolojik aktivitesinin ise aynı konsantrasyonda % 25 den az olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.1.). Bu çalışmada *T. indica* türünün alkaloitlerinin *H. armigera* türünün beslenmesini doza bağımlı olarak etkilediği görülmüş ve bu nedenle bu türün alkaloitlerinin *H. armigera* ile mücadele programında potansiyel olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (76).

Çizelge 2.1. Ham ekstrelerin *H. armigera* larvalarının beslenme inhibisyonu üzerine etkileri ve regresyon eşitlikleri (76).

Test bitkisi	Ekstre	Df(X^2)	Regresyon eşitlikleri	EL ₅₀	Fudicial limitler (% 95 CI)	Eğim±SE	R-sq	t-değeri
<i>E. camaldulensis</i>	Hekzan	3(3.21)	Y=- 1.49+1.54X	9.28	7.55-12.44	1.54±0.20	97.0	9.83*
	Etanol	3(2.83)	Y=- 1.48+1.77X	6.92	5.89-8.40	1.77±0.20	99.8	37.25*
<i>T. indica</i>	Hekzan	2(0.24)	Y=- 0.78+1.08X	5.22	3.98-7.71	1.08±0.20	95.2	6.28*
	Etanol	3(6.04)	Y=- 0.97+2.17X	2.82	2.05-3.97	2.17±0.25	99.7	29.91*

32 böceğe dayanarak elde edilmiş veriler: * % 5 de anlamlı

Yapılan pek çok araştırmaya rağmen herbivorların konak bitki populasyon dinamikleri üzerine etkileri ve özellikle farklı tip tahribatların rolünün bağlantısı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Leimu ve Lehtila tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada predispersal tohum predatörü *E. connexa* ve yaprak yiyen güve *A. asclepiadis* gibi iki özelleşmiş herbivorun ortak konak bitkisi olan *V. hirundinaria* türünün populasyon dinamikleri, uzun dönem uyum etkileri ve ilişkili rolleri 3 yıl boyunca devam eden bir çalışmada araştırılmıştır. *A. asclepiadis* türünün dişi güvesinin Haziran ve Temmuz aylarında (bitki geç dönemde tam büyüdüğü ve çiçeklendiği zaman ortaya çıkar) yapraklar üzerine yumurta bıraktığı, yumurtlamadan sonra yumurtaların yaklaşık 10 günde çatladığı ve 5 larval instarların yaklaşık 5-6 haftada gelişimini tamamladığı; tefrit sineği *E. connexa* türünün larvalarının ise ana predispersal tohum predatörü olup; larvaların gelişmekte olan tohum zarfları içerisinde yumuşak tohumlar üzerinden beslenerek yaşadığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bu çalışmada bu bilgilere ek olarak 3 yıl boyunca demografik verilerin toplanması sonucu hem tohum predasyonu hem de yaprak herbivorluğunun *V. hirundinaria* türünde populasyon büyümesini azalttığı, fakat sadece çok yüksek tahribat seviyelerinin popülasyonda büyümeyi pozitiften negatife değiştirebileceği gözlenmiştir. Ayrıca tohum predasyonunun bazen popülasyondaki tüm tohumları tahrip ettiği ve pre-dispersal tohum predasyonunun hayati derecede çeşitli etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Örneğin direk olarak açılmış tohum sayısını öncelikle azalttığı, ikincil olarak ise tohum predatörünün olgunlaşmamış tohumları yediğinde bitkinin mevcut çoğalma yeteneğinde azalma gibi dolaylı yoldan hayati derecede etkilere neden olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bitki populasyon

büyümesi üzerine tohum predasyonunun yaprak herbivorluğuna göre daha büyük etkisinin olduğu varsayılmıştır. Ayrıca yaprak herbivorluğunun etkisinin daha az olduğu ve tohum predasyonunun düzeyi arttıkça yaprak herbivorluğunun azaldığı gözlenmiştir. Herbivorluğun bitkinin büyümesini, üreme ve hayatta kalma yeteneğini etkileyebildiği ve bu etkinin boyutunun zamanlamaya, tahribatın tipine, miktarına ve tahribatın meydana geldiği bitkinin yaşam döngüsündeki evresine bağlı olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak predispersal tohum predasyonunun bitkinin çoğalma başarısını etkilediği; yaprak herbivorluğunun ise bitkinin yaşam döngüsünün tüm evrelerini etkilediği ve farklı evrelerdeki cevabında farklı olduğu tespit edilmiştir (34).

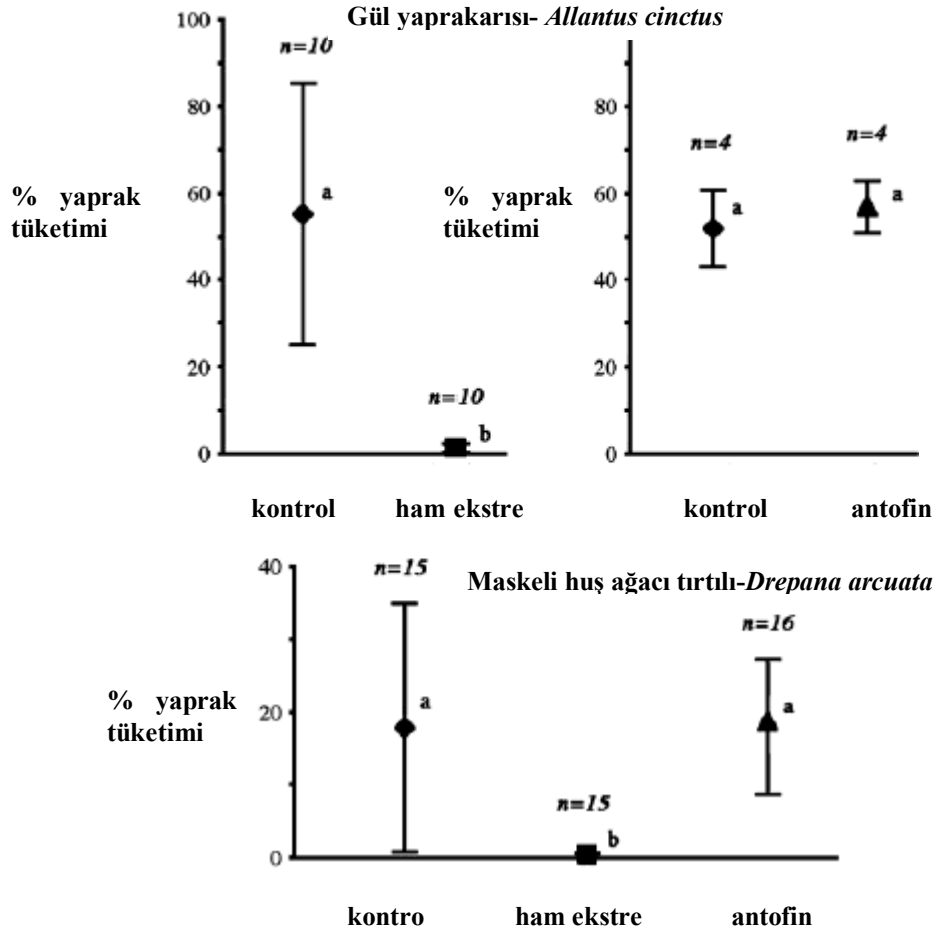
Tefrit sineği *E. connexa* larvalarının tohumların neredeyse % 100'ünü tahrip ettiği, yetişkin sineğin gelişmekte olan meyveler üzerinde yumurtladığı ve bunların güçlü uçucular olup kolaylıkla çalışma alanındaki konakçılar arasında hareket edebildiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Agren ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada 39 *V. hirundinaria* bitki popülasyonunda 3 yıl (1999-2001 yılları arasında) süre ile çiçek ve meyve oluşumunda uzaysal varyasyonları etkileyen faktörler araştırılmıştır. Bu çalışmada habitat kalitesi ve popülasyon büyüklüğü, yoğunluğu ve meyve üretiminde tüm popülasyonların değişimi ve predispersal tohum predatöründen kurtulan olgun meyve sayısı arasındaki ilişkinin önemi çalışılmıştır. *V. hirundinaria* türünün meyve üretiminin yıllara göre değiştiği ve yazın güneş görme süreleri ile negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Ana predispersal tohum predatörü *E. connexa* türünün popülasyon dinamiklerinin yıllara göre meyve bulmadaki değişimden etkilendiği gözlenmiştir. Her popülasyonda tam boyutta tüm meyvelerin total sayısı hesaplanmış ve bunların ne kadarının *E. connexa* türü tarafından saldırıya uğradığı tespit edilmiştir. Sonuçta bu türün sebep olduğu meyve predasyonunun değişken olduğu ve *V. hirundinaria* popülasyonlarında bozulmamış olgun meyve sayısı üzerine kuvvetli etkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada meyve predasyonunda popülasyon çeşitliliğinin, popülasyon büyüklüğü ve güneşe maruz kalma ile korelasyon gösterdiği ama etkinin yıllara göre farklı olduğu bildirilmiştir. Meyve predasyonu üç yılın ilk iki yılında popülasyon büyüklüğü ile pozitif olarak bağlantılı iken üçüncü yılda hemen hemen tüm meyvelerin tamamen tükendiği görülmüştür (167).

Mogg ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün kök, taze yaprak ve olgun meyvelerinden elde edilen etanollü ekstraktlarının

bakteriyal, fungal büyüme ve anti-insekt aktiviteleri araştırılmıştır. Kök ekstresinden elde edilen fraksiyonlarda (-)-antofin ve tanımlanamamış fakat (-)-antofin'den farklı ikinci bir bileşik/bileşikler belirlenmiş ve etanollü kök ekstresinin asidik, bazik, sulu fraksiyonları ve saf (-)-antofin anti-insekt aktiviteleri için gül yaprakarısı (*Allantus cinctus*), maskeli huş ağacı tırtılı (*Drepana arcuata*) ve Avrupa delici mısır kurdu (*Ostrinia nubilalis*) türlerine karşı test edilmiştir. Uygulama yapılan gül yapraklarında *A. cinctus* larvalarının mortalite göstermediği görülmüş ve bu durum yaprakarısı larvalarına karşı ham ekstrenin antifeedant etkili olduğunu düşündürmüştür. Sonrasında *V. rossicum* türünün köklerinde ana antifungal etkiden sorumlu olan (-)-antofin bileşiğinin anti-insekt aktivitesi test edilmiş ve *A. cinctus* larvalarının yaprak tüketiminde kontrol grubuna göre fark olmadığı tespit edilmiştir. *D. arcuata* türüne karşı *V. rossicum* türünün ham ekstresinin ise toksik olduğu görülmüştür. Ham ekstre uygulanan Huş ağacı yapraklarında tırtıl beslenmesinin az olması veya hiç olmaması ve tüm denemelerde tırtılların maruz kaldıktan 1 gün sonra ölmesi buna kanıt olarak gösterilmiştir (Şekil 2.48.). Kontrol gruplarında da % 17 yaprak tüketimi ile *D. arcuata* türünün mortalite göstermediği; ayrıca (-)-antofin uygulanan yapraklarda her bir tırtıl için % 19 yaprak tüketiminin olduğu ve hiçbir tırtılın mortalite göstermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmada *V. rossicum* türünün insekt antifeedant/toksik etkisinin (-)-antofin'den kaynaklanmadığı sonucuna ulaşılmış ve *V. rossicum* türünün köklerinde (-)-antofin'e ek olarak diğer biyoaktif bileşiklerin de bulunduğu düşünülmüştür. Çalışmanın devamında *D. arcuata* türü için toksik bileşik/bileşiklerin kök ekstresinin polar bileşikleri içeren asidik fraksiyonunda bulunduğu sulu ve bazik fraksiyonlarda ise bulunmadığı görülmüştür. Asidik fraksiyon uygulanan yapraklarla test edilen tüm tırtılların 12 saatte öldüğü fakat sulu ve bazik fraksiyon uygulanan yapraklarla test edilenlerin ise ölmediği gözlenmiştir. Asidik fraksiyonun ayrıca *O. nubilalis* türünün larvalarına karşıda toksik olduğuda belirlenmiştir.

Çalışmanın sonucunda bitkide bulunan ikinci bileşik/bileşiğin himenopteron larvası *A. cinctus*'a karşı antifeedant aktivite gösterdiği; *D. arcuata* ve *O. nubilalis* gibi iki lepidopteron larvasına karşı toksik olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca *V. rossicum* türünün köklerinde (-)-antofin'e ek olarak diğer biyoaktif bileşiklerinde bulunduğu gösterilmiştir. Böylelikle fenantroindolizidin alkaloitlerinin insekt

antifeedant aktivite ile ilişkili olduğu bir kez daha desteklenmiş ve *V. rossicum* türünün insektisidal/insekt anti-feedant bileşik(ler) içerdiği belirlenmiştir (24).



Şekil 2.48. Kontrol (taşıyıcı solvent-sudaki % 0.5 etanol), *V. rossicum* türünün ham kök ekstresi ve (-)-antofin uygulandıktan sonra *A. cinctus* larvalarının (üst) gül yaprağı tüketimi ve *D. arcuata* larvalarının (alt) huş ağacı yaprağı tüketimi. Her bir oluşan deneme uygulama yapılan ve yapılmayan yapraklar için tek tek ilişkilendirilmiştir. Ortalamalar aynı küçük harfler two-tailed t-testi (üst) veya Tukey-Kramer HSD post-hoc testine göre anlamlı şekilde farklı bulunmamıştır, $\alpha=0.05$ (alt). (24).

Dünya genelinde böceklerle bulaşan hastalıklar; hastalık ve ölümlerin en büyük nedeni olarak kayıtlara geçmiştir. Sadece sivrisineklerin yılda 700 milyondan fazla insana hastalık bulaştırdığı bildirilmiştir. Bu yüzden sivrisineklerin kontrolü dünya genelinde halk sağlığı ile ilgili en önemli sorunlardan biri olarak varsayılmıştır. Örneğin *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) pantropik pest olup dünyanın bazı kısımlarında plazmodium (kuş malaryası), miksomatosiz ve diğer hastalıkların nedeni

Wuchereria bancrofti'nin urban vektörü olarak gösterilmiştir (160). Pavela ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı bir çalışmada içlerinde *V. hirundinaria* türünün de bulunduğu 62 Avrupa-Asya bitki türünün toprak üstü kısımlarının metanol ekstraktları hazırlanarak laboratuvar şartlarında sivrisinek *C. quinquefasciatus* türüne karşı larvasidal aktiviteleri için test edilmiştir (160, 162). Bu çalışma Avrupa-Asya bölgesinde yabancı bitkilerin insektisit etkinliğinin taranmasını amaçlayan uluslararası bir projenin parçası olarak yürütülmüştür. Çalışmada 4. instar larvalar test edilmiş ve maksimum test dozunda (1,000 ppm) 24 saat teste bırakıldığında bitkilerden 49'unun larvasidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. İki tür için LD₅₀ değeri 51-100 ppm aralığında iken, 8 tür 101 den 500 ppm'e kadar letal doz göstermiş, 13 tür ise 101 den 1,000 ppm'e kadar letal dozlar göstermiştir. 34 türde etki görülmemiştir (LD₅₀>1,000 ppm). *C. quinquefasciatus* türünün 4. instar larvalarına karşı 24 saat maksimal dozda (1,000 ppm) uygulanan *V. hirundinaria* türünün bitki ekstresinin larvasidal aktivitesi % mortalite değeri (ortalama±SE)^a:100±0.0; LD₅₀^b(CI₉₅): 717(651-743); LD₉₀^b(CI₉₅): 957 (911-998); Ki^c:3.860 aralıklarında değerler göstermiştir. Bu bitki ekstraktlarının biyolojik aktivitesinin fenolikler, terpenler ve alkaloidler gibi bitkilerde bulunan çeşitli bileşiklerden kaynaklandığı varsayılmıştır. Bu bileşiklerin birlikte veya bağımsız olarak *C. quinquefasciatus* türüne karşı larvasidal ve yetişkin çıkma inhibisyon aktivitesi gösterdiği düşünülmüştür. Bu çalışmanın devamında mümkünse bu türlerin mosquitolar olarak kullanılabilmesi ve ticari ürünlerinin veya formülasyonlarının hazırlanabilmesi için ekstraktlarda aktif bileşiklerin belirlenmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır (160).

Pavela ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir başka çalışmada ise Avrasya'da yetişen ve içlerinde *V. hirundinaria* türünün de bulunduğu 75 bitkiden elde edilen 80 metanollü ekstrenin *S. littoralis* ve *L. decemlineata* larvalarına karşı antifeedant aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *S. littoralis* larvaları total polifagus, *L. decemlineata* larvaları ise olifagus olmaları nedeniyle seçilmiştir. Test edilen en yüksek doz olan 500 µg/cm² de sadece başlı başına ekstraktlarda değil ayrıca test edilen her iki pest türü arasında da antifeedant aktivite bakımından belirgin farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Ön taramalarda *V. hirundinaria* türünün neden olduğu % beslenme caydırıcılık indeksine bakıldığında *S. littoralis* türü için bu değer 99.2±1.5 ve *L. decemlineata* türü için ise bu değer 72.1±6.5 olarak belirlenmiştir. Ön taramalar sonucu elde edilen veriler doğrultusunda çalışma en etkili türler olan: *Angelica archangelica*,

Imperatoria ostruthium, *Psoralea bituminosa* ve *V. hirundinaria* ile devam edilmiştir. Çizelge 2.2. de kontrol ile karşılaştırıldığında *V. hirundinaria* türünün de içerisinde olduğu bitkilerin *S. littoralis* larvalarında % 50 (ED₅₀) ve % 90 (ED₉₀) beslenme caydırıcılığına neden olan etkili dozları verilmiş olup *S. littoralis* larvalarına karşı etkili olan ve seçilen 4 ekstre içerisinde *V. hirundinaria* türünden elde edilen ekstrenin ED₅₀ ve ED₉₀ (sırasıyla 11 µg/cm² ve 99 µg/cm² değerleri) değerleri ile en yüksek etkiyi gösterdiği görülmüştür (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. *S. littoralis* larvalarında kontrol ile karşılaştırıldığında % 50 (ED₅₀) ve % 90 (ED₉₀) beslenme caydırıcılığına neden olan etkili dozlar (28).

V. ref.	Türler	ED ₅₀ (CI ₉₅)	ED ₉₀ (CI ₉₅)	Chi ^a
809	<i>A. archangelica</i>	44(36-52)	173(136-237)	2.403
805	<i>I. ostruthium</i>	34(27-42)	174(154-259)	1.650
856	<i>P. bituminosa</i>	72(45-96)	198(188-256)	1.539
934	<i>V. hirundinaria</i>	11(5-18)	99(87-126)	0.920

CI₉₅: % 95 güven aralığı parantez içerisinde verilmiştir; ^a Kikare değeri, p<0.05 de anlamlıdır

Elde edilen veriler *S. littoralis* larvalarının total polifagus olması nedeniyle test edilen metanollü ekstrelerde bulunan bazı maddelere düşük hassasiyet gösterdiğini düşündürmüştür. Ayrıca çalışmada *S. littoralis* larvalarının test edilen ekstrelelere daha az duyarlı olduğu; *L. decemlineata* larvalarının ise tüm ekstrelelere çok daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada seçilen ve tıbbi bitkiler olarak sınıflandırılan bitkilerin sayısız biyolojik olarak aktif bileşikleri içerdiği bilindiğinden antifeedant aktiviteden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi zorunlu hale gelmiştir. Örneğin; *V. hirundinaria* türünün; oldukça aktif alkaloidleri, C₂₁-steroit glikozitleri, β-sitosteroller, triterpenleri, flavonoidleri ve diğer fenolik bileşikler içerdiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Buna ek olarak literatürlerde alkaloidler, kumarinler, fenoller, terpenler ve polifenollerin hem *S. littoralis* hem de *L. decemlineata* larvalarına karşı antifeedant ve büyüme inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (28).

Ünivottin yaprak böceği *Chrysolina aurichalcea asclepiadis* (Villa) (Coleoptera: Chrysomelidae: Chrysomelinae) türünün Batı Alplerde çok yıllık *V. hirundinaria* türü üzerinden beslendiği bildirilmiştir. Bu türün yumurtalarının bitkinin yakınında bulunan topraktaki yaprak çöpleri arasında kışladığı; erken ilkbaharda yumurtadan çıkarak,

yavaş yavaş bitki üzerine doğru ilerlediği ve en az erken instarlar olana kadar gelişimini yaprak tomurcuklarından beslenerek tamamladığı belirlenmiştir. Grup halinde beslenme özelliği İsviçre ve Kuzey Amerika'da *V. nigrum* ve *V. rossicum* türlerinin potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak *C. aurichalcea asclepiadis* türünün değerlendirilebileceği fikrini gündeme getirmiştir. Bu doğrultuda tasarlanan ve Weed tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada larva grup beslenmesinin konak lokasyonunu ve *C. aurichalcea asclepiadis* türünün performansını arttırdığı hipotezinin test edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler larval beslenmenin yeni doğanları cezp ettiğini göstermiş ve ilk kez bu çalışmada grup beslenmesinin kendi konak bitkisi üzerinde yumurtadan çıkan larvaların konak lokasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (171).

Son dönemde istilacı bitkileri baskılamak için biyolojik kontrol en etkili metot olarak gösterilmiştir. Tohum biyolojik kontrol ajanlarının; tahribat bölgelerinde yüksek yoğunluklara ulaşarak veya hassas bitki bölgelerinden beslenerek bitki popülasyon dinamiklerini ciddi şekilde etkileyen konak bitki popülasyonlarını azaltacak kapasitede olması gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca tohum biyolojik kontrolünün tek bir ajan ile başarılabilirliği varsayılmıştır. Fakat çeşitli toprak tipleri ve ışık şartlarında gelişmesi ve rüzgarla dağılan tohumlarla üretmesi nedeniyle, *Vincetoxicum* cinsine ait türler ile mücadele dikkat ekici derecede zor olarak nitelendirilmiştir. Çünkü bunlar mekanik kontrole dirençli, uzun dönem kontrol için tekrarlayan herbisit uygulamalarını gerektirmiştir. Geçmiş yıllarda *Hypena opulenta* (Christoph) (Lepidoptera: Noctuidae: Hypeninae) türü Ukrayna, Türkiye, İran ve Türkmenistan'da görülmüş fakat konağı tam olarak belirlenemediğinden ilk başlarda potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak dikkate alınmamıştır. Kuzey Amerika'da istilacı Avrupa'lı *Vincetoxicum* türleri *V. nigrum* ve *V. rossicum*'a karşı klasik bir biyolojik kontrol programı başlatılmıştır. Güney Ukrayna'nın ormanlarında *V. rossicum* türü üzerinden beslendiği keşfedilen noktu it güve *H. opulenta* türünün potansiyel biyolojik kontrol ajanı olarak incelendiği bildirilmiştir. Buna ek olarak bu türün *Vincetoxicum* türleri üzerine larva performansının etkisi daha ileri çalışmalar için test edilmiştir. *H. opulenta*'nın yetişkinlerinin çıktıktan 2 gün sonra yumurtlamaya başladığı ve yaklaşık 600 yumurta ürettiği, larva aracılığı ile 5 larva instar geliştiği ve pupa olarak kışı geçirdiği gözlenmiştir. Pupal diapause (biyolojik gelişimin durduğu kış uykusu benzeri durum) fakültatif olup yılda en az iki nesil ile sonuçlanmıştır. Diapause indüksiyonu; bitki kalitesi, foto-periyot ve mevsimsel

değişikliklerden etkilenmiştir. Sahadaki *H. opulenta* türlerinin *Vincetoxicum* türlerinde yaprak dökümüne neden olduğunun gözlenmesine dayanarak bu türler potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak araştırılmıştır. Tohum biyolojik kontrolünde yaprak feederlarının kullanılması yaygın olmasına rağmen bu çeşitli seviyelerde başarı ile sonuçlanmıştır. Yaprak feederlarının bitki performansı üzerine genelde negatif etkiye sahip olması bu sonuçlardan biri olup belki de bu böcekleri etkilemediği veya bitki performansını arttırdığı da varsayımlar arasında gösterilmiştir. Son zamanlarda *Vincetoxicum* türlerinin performansı üzerine yapay defoliasyon etkileri açık alanlarda ve seralarda iki farklı ışık şartı altında değerlendirilmiştir. Yapay defoliasyon potansiyel dezavantajlara rağmen biyolojik kontrol ajanı olarak yaprak yiyicilerin önemine ışık tutmada gerekli görülmüştür. Yüksek ışık şartlarında defoliasyon *Vincetoxicum* türlerinde performansı azaltacak şekilde etkili bulunmamıştır. Milbrath 2008 yılında yaptığı bir çalışmada düşük ışık altında defoliasyonun negatif etkisinin önemli olduğunu belirlemiştir. Bu nedenle *H. opulenta* gibi yaprak yiyiciler belirli koşullarda *Vincetoxicum* türleri için kayda değer potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak düşünülmüştür. Öncelikle konak özgünlüğü çalışılmış ve *H. opulenta* türünün *Vincetoxicum* türlerine özelleşmiş feederlar olduğu tespit edilmiş fakat Avrupa'dan elde edilen kanıtlar bunun ormanlık habitatlarda sınırlı olduğunu göstermiştir. *H. opulenta*'nın biyolojisi multivoltin (yıl boyunca çok sayıda döl veren) yeşil yonca kurdu *H. scabra* (F.) ve hop lüper *H. humuli* Harris ile genelde benzer bulunmuştur. Bu çalışmada karantina şartlarında *H. opulenta* türünün *V. rossicum* ve *V. nigrum* türleri üzerinde büyümesi ve üremesinin biyolojik gözlemleri rapor edilmiştir. Tek nesil larva beslenmesinin bitkiyi öldürmediği, *H. opulenta*'nın larva yoğunluğunun artmasının defoliasyon düzeyinin artmasına neden olduğu fakat defoliasyonun türler arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Bitki başına 8 larvanın (ara sıra 4) *V. rossicum* türünde yaklaşık % 100 defoliasyona neden olduğu fakat bu tahribat düzeyinin *V. nigrum* türünde oluşmadığı tespit edilmiştir. Kalıcı *H. opulenta* beslenmesi *V. rossicum* türünün performansını azaltmış fakat *V. nigrum* türünü etkilememiştir. Bu çalışmanın sonucunda Avrupa ormanlık alanlarındaki habitatlarda sınırlı olan *H. opulenta* türünün Kuzey Amerika'da yaygın hale gelmesi durumunda genellikle ormanlık alanlarda bulunan *V. rossicum* türüne karşı daha etkili mücadele sağlayabileceği düşünülmüştür. Her iki larva beslenmesi *V. rossicum* türünün toprak üstü biyokütlesinde azalmaya neden olmuş ve

bu da üreyen çıkıntılarını (ot, meyve ve tohum üretimi gibi) azaltmıştır. *V. nigrum* türünde ise çiçek üretimi larva beslenmesinden negatif olarak etkilenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları *H. opulenta* türünün *V. rossicum* türünün orman popülasyonlarına karşı umut vaat eden bir ajan olabileceğini göstermiştir (16).

Bitkilerin herbivorlara karşı iki genel savunma stratejisi bulunduğu belirlenmiştir. Bunlar: tahribatı azaltma özelliği (resistans) ve herbivor tahribatının negatif yönde etkisini azaltma özelliği (tolerans) olarak bildirilmiştir. Herbivorlara karşı resistans mekanizmasının herbivor tahribatını azaltmak için fiziksel yapı veya kimyasal mekanizmalardan kaynaklı olabileceği, tolerans mekanizmasının ise tahribatın telafisi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Resistans ve tolerans genellikle genetik özelliklerden kaynaklı olup bitki türlerinde kalıtsal genetik çeşitlilik göstermiş ve herbivorlar tarafından daima seleksiyon altında kullanılmıştır. Moola ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada özelleşmiş doğal tahribat için folivor *A. asclepiadis* ve tohum predatörlerine karşı resistans için tohum predatörü *L. equestris* türleri kullanılmış ve *V. hirundinaria* türünün herbivor resistansı ve toleransının genetik varyasyonları araştırılmıştır. Bu çalışmada yetişkin bitkiler yapay tahribatlara karşı toleransta genetik varyasyon göstermiş fakat özelleşmiş folivor *A. asclepiadis* türünün neden olduğu tahribatlara toleranslı olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde yapay tahribatlara karşı fide toleransında genetik varyasyona eğilimli bulunmuştur. Sonuçta folivor *A. asclepiadis* türü ve tohum predatörü *L. equestris* türü gibi iki farklı herbivora karşı bitki resistansında genetik varyasyon olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler bu bitki türünde artan tolerans ve resistans için herbivorluğun seçilebilir olduğunu göstermiştir (35).

Weed ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada biyolojik kontrol programı kapsamında yaprak ile beslenen noktuit güve *A. asclepiadis* ve kök ile beslenen krisomelit *Eumolpus asclepiadeus* türleri kullanılarak *V. nigrum* ve *V. rossicum* türlerinin çevreye etkisinin azaltılması amaçlanmıştır. Avrupa'da bu iki böceğin çalışılan her iki türün yakın akrabası olan *V. hirundinaria* türüne saldırdığı belirlenmiştir. Ayrıca son çalışmalar iki hedef yabancı bitkinin böcekler için uygun konaklar olduğunu göstermiştir. Bu durum Kuzey Amerika'da *Vincetoxicum* spp. türleri için bu böceklerin potansiyel biyolojik kontrol ajanları olarak kullanılabilmesi fikrini ortaya atmıştır. Bu çalışmada tarlalarda yaygın olarak bulunan *V. nigrum* ve *V. rossicum*

türleri üzerinde toprak üstü ve toprak altı herbivorlarının bireysel etkileri araştırılmıştır. Çalışmada kök herbivorlarının su ve besin absorpsiyonunu sınırlandırdığından yaprak herbivorlarına göre daha zararlı olması beklenmiştir. *Vincetoxicum spp.* türleri çok yıllık bitkiler olmaları nedeniyle bu çalışma 4 yıl boyunca sürdürülmüştür. Kök herbivorlarının *Vincetoxicum spp.* türlerinin büyümesi ve üremesi üzerine etkisi bilinmemekle birlikte kök ile beslenenlerin çok iyi biyolojik kontrol ajanları olacağı varsayılmıştır. Sonuçta *Vincetoxicum spp.* türleri üzerine etkilerine bakıldığında kök herbivoru *E. asclepiadeus* türünün yaprak herbivoru *A. asclepiadis* türüne göre daha zararlı olduğu tespit edilmiştir. Su ve besin alımının azaltılması ve bitki ağırlığının baskılanmasını içeren etki kombinasyonları ile bitkinin rekabet yeteneğinin değiştirilebileceği görülmüştür. Kök herbivorluğu her iki *Vincetoxicum* türünün bitki biyokütlesini negatif olarak etkilemiştir. Diğer otsu bitkilere göre kök herbivorlarının bu iki türü daha çok etkilediği fakat bitkiyi öldürmediği belirlenmiştir (21).

2.3.2. *Vincetoxicum* Türleri Üzerinde Yapılmış Antifungal Aktivite Çalışmaları

Çok az sayıda doğal antifungal ilacın bulunması ve bunların oldukça pahalı olması, daha ucuz ve daha etkili doğal antifungal ilaç kaynaklarının elde edilmesi için bitkilere yönelime neden olmuştur. Böylelikle fungal hastalıkların tedavisinde daha ucuz ve daha etkili ilaçların geliştirilmesinin yolu açılmıştır (31).

Capo ve Saa 1989 yılında yaptıkları bir çalışmada *V. nigrum* türünün kök ve yapraklarının alkaloit ekstresinden elde ettikleri (-)- antofin ve iki minör alkaloitin antifungal ve antibakteriyal aktivitesi olduğunu göstermiştir (89). Cappucino 2004 yılında yaptığı bir çalışmada *V. rossicum* türünün kök ekstrelerinin geniş spektrumlu antifungal aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur (13). Gibson ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada ise *V. rossicum* türünün kök ekstrelerinde bulunan antofin'in geniş spektrumlu antifungal aktivite gösterdiğini tespit etmiştir (66). *V. rossicum* türü ile yapılan önceki çalışmalarda kök ekstrelerinin antifungal özelliği bulunmuş ve antofin antimikrobiyal ajan olarak belirlenmiştir (24, 66). Fakat antifungal aktiviteden sorumlu diğer bileşik veya bileşikler saptanamamıştır (66). *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin fenantroindolizidin alkaloitlerini içerdiği bilinmekte olup; bu alkaloitlerin ilgi çekici

biyolojik özellikleri arasında *C. albicans*'a karşı belirgin sitotoksik etkisi olduğu ve bu nedenle anti-*Candida albicans* etkili yani seçici antifungal aktiviteli olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (30, 31, 61).

2005 yılında yapılan bir çalışmada Bolocistan'da (Pakistan) önemli tıbbi kullanımları olan bitkilerden; içerisinde *V. stocksii* türünün de bulunduğu dördünün 12 fungus ve 12 bakteri suşuna karşı disk diffüzyon ve agar well difüzyon testi ile biyolojik aktivitesi araştırılmış ve *V. stocksii* türünün metanollü ekstresinin *C. albicans*, *Bacillus subtilis* ve *B. cereus*'a karşı belirgin aktivite gösterdiği saptanmıştır. Çalışılan dört tür karşılaştırıldığında *C. albicans*'a karşı % 85 inhibisyon göstermesi ile *V. stocksii* türü en güçlü antifungal aktiviteye sahip tür olarak belirlenmiştir (Çizelge 2.3.). Bu çalışmada ayrıca *V. stocksii* türünün metanol ekstresinin *B. subtilis* ve *B. cereus*'a karşı belirgin etki gösterdiği, *Proteus mirabilis*, *Klebsilla pneumoniae* ve *Escherichia coli*'ye karşı ise ilımlı etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 2.4.) (31).

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan dört bitki ekstresinin antifungal aktivitesi (31).

Fungusların adı	% inhibisyon konsantrasyonu				Standart ilaçlar	Standart ilaçların MIC 200 µg/ml
	G	H	V	Z		
<i>Aspergillus flavus</i>	30±2	-	-	-	Ketokonazol	90
<i>Aspergillus niger</i>	30±2	-	-	-	Ketokonazol	100
<i>Candida albicans</i>	-	40±3	85±2	95±4	Mikonazol	100
<i>Epidermophyton floccosum</i>	-	-	-	10±2	Ketokonazol	100
<i>Fusarium solani</i>	30±2	-	-	-	Ketokonazol	100
<i>Fusarium moniliformis</i>	15	30	20	10±1	Ketokonazol	100
<i>Fusarium oxysporum</i> var. <i>lycopersici</i>	-	15	10	-	Mikonazol	70
<i>Trichophyton rubrum</i>	10	10	-	-	Ketokonazol	100
<i>Trichophyton longifusus</i>	35	15	28	30±1	Ketokonazol	100
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	-	10	20±2	Ketokonazol	100
<i>Microsporum canis</i>	-	15±1	28	-	Mikonazol	98
<i>Rhizoctoria solani</i>	-	-	10	-	Ketokonazol	100

Kısaltmalar: G: *Grewia erythraea*; H: *Hymenocrater sessilifolius*; V: *V. stocksii*; Z: *Zygothellium fabago*. Değerler anlamlı, n=5 (P<0.05); -, büyüme yok

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan dört bitki ekstresinin inhibisyon zonları (mm) (31).

	Konsantrasyon 200 µg/ml								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Grewia erythraea</i>	12±2	-	7±1	-	24±2	-	8±1	7±2	8±1
<i>Hymenocrater sessilifolius</i>	22±1	-	8±1	-	16±2	-	-	-	-
<i>Vincetoxicum stocksii</i>	25±2	18±1	12±1	15±2	6±1	13±1	-	-	15±2
<i>Zygophyllum fabago</i>	16±1	16±2	11±2	-	8±1	-	-	-	-
Tetracyclin/tobramycin	26	26	27	30	26	28	30	30	28

1. *Bacillus subtilis*, 2. *Bacillus cereus*, 3. *Escherichia coli*, 4. *Proteus mirabilis*, 5. *Pseudomonas aeruginosa*, 6. *Shigella dysenterin*, 7. *Staphylococcus aureus*, 8. *Streptococcus pyogenes*, 9. *Klebsilla pneumoniae*. *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus faecalis* aktivite göstermemiştir. Değerler anlamlı olup±S.D.; n=5; -, aktivite yok

Mogg ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün taze yaprak, olgun meyve ve köklerinden hazırlanan etanollü ekstreleri bakteriyel ve fungal büyüme inhibisyon aktiviteleri için test edilmiştir. Ekstrelerin Gram (-) ve Gram (+) bakterilerde büyümeyi inhibe ettiği; farklı filamentöz ve maya benzeri funguslara ve geniş konakçı aralığı olan bitki patojenlerine karşı belirgin antifungal aktivite gösterdiği görülmüştür (Çizelge 2.5.) (24).

Bu çalışmada *V. rossicum* türünün kök ekstrelerinden elde edilen (-)-antofin'in bakteri ve fungi inhibitörü olarak özellikle maya benzeri ve filamentöz fungusları da içerisine alan farklı taksonların büyümesini inhibe ettiği ve geniş konak aralığı olan bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2.6.) (24, 158).

Ayrıca bu çalışmada *V. rossicum* türünde görülen antimikrobiyal özelliklerin fenantroindolizidin alkaloidi (-)-antofin'den kaynaklandığı gösterilmiştir (Çizelge 2.7.) (24).

Mogg ve arkadaşları tarafından elde edilen tüm sonuçlar (-)-antofin'in bakterilere göre funguslara karşı daha etkili inhibitör aktiviteli olduğunu ve dahası (-)-antofin'in çok çeşitli bitki türlerinde patojen etkili olan ve önemli patojenler olan funguslara karşı net inhibitör aktiviteli olduğunu da göstermiştir (24, 158).

Çizelge 2.5. *V. rossicum* ekstresinin (2 mg/disk) disk difüzyon yönteminde anlamlı inhibisyon zonları (\pm SD) ve kullanılan suşlar (24).

Tür	Filum	Kaynak ^a	İnhibisyon zonu (mm) ^b						
			Kök		Yaprak		Meyve		
			+UV	-UV	+UV	-UV	+UV	-UV	
Filamentöz Funguslar									
<i>Microsporum gypseum</i> (Bodin) Guiart et Grigorakis	Ascomycota	OMH-FR2385	23.67 (2.08)	19.67 (2.52)	9.33 (0.58)	7.50 (1.32)	20.67 (1.53)	18.00 (1.00)	
<i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis et al.	Ascomycota	OMH-FR2625	22.33 (2.89)	24.00 (1.73)	7.83 (1.04)	6.83 (0.29)	19.67 (1.15)	21.67 (2.31)	
<i>Rhizopus sp.</i>	Zygomycota	OMH-FR2874	15.67 (1.53)	8.17 (1.76)	12.67 (5.51)	6.83 (0.58)	17.33 (2.08)	17.00 (1.00)	
Maya benzeri funguslar									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen	Ascomycota	OLC-S288C	12.00 (1.00)	10.33 (0.58)	8.67 (0.58)	7.00 (0.00)	9.67 (0.58)	8.33 (1.53)	
<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout	Ascomycota	OGH-308-1329	11.00 (1.00)	9.33 (1.15)	8.33 (1.53)	7.00 (0.87)	9.67 (0.58)	9.33 (0.58)	
<i>C. albicans</i> D10	Ascomycota	N.D Lees	11.33 (1.15)	9.67 (0.58)	10.00 (0.00)	7.00 (0.87)	9.00 (1.73)	8.00 (1.00)	
<i>C. albicans</i> CN1A	Ascomycota	N.D Lees	14.33 (0.58)	15.00 (1.00)	8.00 (1.00)	10.00 (2.00)	10.67 (0.58)	13.33 (1.15)	
<i>Cryptococcus neoformans</i> (Sanfelice) Vuillemin	Basidiomycota	OHM-FR2704	14.00 (1.00)	12.67 (0.58)	7.17 (0.76)	6.67 (0.29)	10.67 (1.15)	10.67 (1.53)	
<i>Wangiella dermatitidis</i> (Kano) McGinnis	Ascomycota	OHM-FR2236	8.50 (2.29)	11.33 (3.21)	n.i.	n.i.	6.67 (0.29)	10.00 (1.00)	
Gram pozitif bakteriler									
<i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn	Firmacutes	ATCC 23857	n.i.	6.67 (0.29)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	
<i>Enterococcus faecalis</i> (Andrews and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz	Firmacutes	ATCC 49452	7.33 (0.58)	n.i.	7.67 (0.58)	7.50 (0.87)	n.i.	n.i.	
<i>Listeria innocua</i> Seeliger	Firmacutes	ATCC 51742	8.67 (1.53)	8.00 (1.73)	n.i.	8.50 (0.50)	8.33 (0.58)	7.67 (0.29)	

Çizelge 2.5. Devam *V. rossicum* ekstresinin (2 mg/disk) disk difüzyon yönteminde anlamlı inhibisyon zonları (\pm SD) ve kullanılan suşlar (24).

Tür	Filum	Kaynak ^a	İnhibisyon zonu (mm) ^b					
			Kök		Yaprak		Meyve	
			+UV	-UV	+UV	-UV	+UV	-UV
Gram negatif bakteriler								
<i>Escherichia coli</i> (Migula)	Proteobacteria	ATCC 29055	7.50	6.67	7.00	7.50	6.67	6.83
Castellani and Chalmers			(0.87)	(0.58)	(1.00)	(0.50)	(0.29)	(0.29)
<i>Neisseria perflava</i>	Proteobacteria	ATCC 14799	12.33	12.00	9.67	8.33	12.33	12.67
Bergey et al.			(1.53)	(0.00)	(1.15)	(0.58)	(2.52)	(1.53)
<i>Pseudomonas putida</i> (Trevisan)	Proteobacteria	ATCC 12633	6.83	6.83	n.i.	9.67	6.83	6.83
Migula			(0.29)	(0.29)		(0.58)	(0.29)	(0.29)

^a Suş kaynakları: OHM (Ontario Ministry of Health, Toronto, ON); OGH (Ottawa General Hospital, Ottawa, ON); OCI (Ontario Cancer Institute, Toronto, ON); ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) ^b Anlamlı çap (\pm SD) 3 tekrar ve 48 saatlik inkübasyona dayanarak belirlenmiştir. n.i.= fark edilir inhibitör aktivite yok.

Çizelge 2.6. (-)-antofin'in minimum inhibitör konsantrasyonları ve disk deneyinde inhibisyon zon çapları ile birlikte seçilmiş geniş aralıkta konak bitkisi olan bitki patojeni funguslar (24).

Suşlar ve kaynakları	Örnek konak bitkiler ^a	MIC (mg/ml)	İnhibitör zon (mm) ^b		
			Ant	Asit	Aq
<i>Fusarium graminearum</i>	Buğday, Yulaf	0.006	14.33 (1.15)	n.i.	n.i.
Schwabe, NRRLK062	Mısır, Arpa				
<i>F. graminearum</i> , CBS 415.86 ^c	-	0.003	25.00 (0.00)	n.i.	n.i.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Kabak, Sarımsak	0.004	19.33 (0.58)	n.i.	n.i.
Schlechtendahl, JB1D411 ^c	Patates, Soya				
<i>Verticillium dahliae</i> Klebahn, 225753 ^c	Patlıcan, Ağaççileği	0.003	19.67 (0.58)	n.i.	n.i.
<i>Botrytis cinerea</i> Persoon, CBS 156.71 ^c	Domates, Yabanmersin	0.006	16.67 (1.53)	n.i.	n.i.
	Elma, Çilek				
<i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler, DAOM 234879 ^c	Patates, Kanola	0.006	16.33 (0.58)	n.i.	n.i.
	Buğday, Arpa				
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Libert) de Bary, Ss234 ^d	Lahana, Yonca	0.003	19.33 (1.15)	n.i.	n.i.
	Fasulye, Kanola				
<i>S. sclerotiorum</i> , 51 (G) ^d	-	0.004	15.67 (1.15)	n.i.	n.i.

^a Moral(2006) dan; ^b Anlamlı çap (\pm SD) 3 tekrar ve 48 saatlik inkübasyona dayanarak belirlenmiştir. Diskler 6×10^{-4} mg (-)-antofin (Ant), 0.26 mg asidik fraksiyon (Asit) veya 1.73 mg sulu fraksiyon (Aq); n.i. = fark edilir inhibitör aktivite yok; ^c A. Levesque, Agriculture and Agrifood Kanada, Ottawa, ON, Kanada; ^d G. Boland, U. Guelph, Guelph, ON, Kanada

Çizelge 2.7. *V. rossicum* bitkisinin kök ekstresinin ve (-)-antofin'in minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin karşılaştırması (24).

	MIC (mg/ml)	
	Ekstre	(-)-Antofin
<i>S. cerevisiae</i> S288C	0.156	0.003
<i>B. subtilis</i>	12.5-25	0.34
<i>E. faecalis</i>	0.78	0.05
<i>L. innocua</i>	12.5-25	0.23
<i>P.putida</i>	12.5-25	0.60

V. rossicum türünün sahip olduğu geniş spektrumlu antifungal aktivite bu türün fungal patojenlerden kaçmasında önemli bir etken olup bitkinin geniş alanlara yayılmasında etkili bir faktör olarak düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar (-)-antofin'in bulunan antifungal aktivitesinin, fenantroindolizidin alkaloidlerinden pergularinin ve tyloforinidin de görülen hareket yolları ile benzer olabileceği fikrini akla getirmektedir. Çünkü her iki bileşik *Lactobacillus leichmannii*'de dihidrofolat redüktaz (DHFR) ve timidilat sentetaz (TS) enzimlerini inhibe etmektedir. Bu enzimlerin her ikisi de timidin biyosentez yolağının anahtar elemanlarıdır ve bu nedenle DNA'nın de nova sentezinde önemlidir. Sonuç olarak (-)-antofin tarafından da nova timidin biyosentezinin inhibe edilmesi *V. rossicum* ekstresinin bu çalışmada kullanılan tüm funguslara karşı hassas olmasını açıklamaktadır (24).

Subramaniam ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin alkaloidlerini taşıdığı bilinen *F. fistulosa* türünün gövde kabuklarından bilinen 3 fenantroindolizidin alkaloidi ((-)-13 α -antofin, (-)-14 β -hidroksiantofin ve (-)-13 α -secoantofin) izole edilmiş ve (-)-13 α -antofin bileşimini içeren alkaloid ekstresinin *Aspergillus fumigatus* ATCC 46645 ve *C. albicans* ATCC 900280 suşlarına karşı antifungal aktivitesine bakılmış ve bu bileşimin antifungal aktivitesinin olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar 13 α -antofin bileşiminin antifungal ve antibakteriyel aktiviteli olduğunu gösteren daha önceki çalışmalarla da uygunluk göstermiştir (172).

Wang ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin alkaloid serileri ve bunların tuz türevlerinin miselial büyüme metodu ve pot deneyi ile fungisidal aktivitesine bakılmıştır. Çalışılan bileşiklerden antofin ve deoksitiloforinin'in 50 μ g/mL konsantrasyonlarda *Alternaria solani*, *Cercospora*

arachidicola, *Physalospora piricola* ve *Cladosporium cucumerinum*'a karşı % 70-% 100 inhibisyon oranı ile iyi fungisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (173).

2011 yılında yapılan bir çalışmada ise *V. rossicum* ve *V.nigrum* türlerinin kök, yaprak ve tohumlarından elde edilen fenantroindolizidin alkaloiti (-)-antofin'in *E. coli*, *B. cereus* ve *B. subtilis* bakteri suşları ve *Colletotrichum acutatum*, *F. graminearum*, *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium anisopliae* fungal suşlarına karşı disk difüzyon testi kullanılarak antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak metanol; pozitif kontrol olarak ise İturin ve Filipin; bakteriyel testlerde ise Ampisilin ve Eritromisin kullanılmıştır. Sonuç olarak (-)-antofin'in antifungal aktivitesi 10µg ve 100µg konsantrasyonlarda gözlenirken; antibakteriyel aktivitesi ise sadece en yüksek konsantrasyonda gözlenmiştir (Çizelge 2.8.) (66).

Çizelge 2.8. (-)-antofin'in antimikrobiyal aktivitesi (66).

Uygulama	Test Organizmaları			
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
	İnhibisyon zonu (mm)			
(-)-antofin				
10µg	5	3	0	1
100µg	12	6	1	5
Metanol-10µl	0	0	0	0
İturin-10µg	nt	4	nt	nt
Filipin-10µg	4	Nt	5	5
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	
(-)-antofin				
10µg	0	0	0	
100µg	2	2	0	
Metanol-10µl	0	0	0	
Ampisilin-10µg	3	2	4	
Eritromisin-15µg	8	5	11	

Nt: test edilmemiş

2.3.3. *Vincetoxicum* Türleri Üzerinde Yapılmış Antiprotozoal Aktivite Çalışmaları

Gelişmekte olan ülkelerde malarya ve layşmanyaz gibi parazitik hastalıkların neden olduğu ölüm oranları oldukça yüksektir. Her yıl; çoğu dünyanın fakir ülkelerinde yaşayan 500 milyondan fazla insan malarya riski altındadır. Tropik ve sub-tropik ülkelerde yaşayan yaklaşık 350 milyon insan bu hastalıklardan muzdariptir. Bu yüzden

bu hastalıkların tedavisinde etkili malaryal ve antilayşmanyal ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Mansoor ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada; içerisinde *V. stocksii* türünün de bulunduğu 4 bitkinin (*Gentiana olivieri*, *Carum copticum*, *Zygophyllum fabago*, *V. stocksii*) *Plasmodium falciparum*'a karşı *in vitro* antimalaryal aktivitesi ve *Leishmania donovani promastigotes*'e karşı antilayşmanyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışılan türlerde, öncelikle tüm bitkiden elde edilen etanollü ekstrelerin antiprotozoal aktiviteleri araştırılmış ve *C. copticum* türünün 60 µg/mL ve *V. stocksii* türünün ise 70 µg/mL konsantrasyonlarda IC₉₀ değerleri ile ılımlı etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca *V. stocksii* türünün 50 µg/mL konsantrasyonda IC₅₀ değeri gösterdiği de belirlenmiştir (Çizelge 2.9.) (30).

Çizelge 2.9. *Gentiana olivieri*, *Carum copticum*, *Zygophyllum fabago* ve *V. stocksii* türlerinin etanollü ekstrelerinin antiprotozoal aktiviteleri (30).

Örnek isimleri	<i>P. falciparum</i>	<i>L. donovani</i>	
	% inhibisyon	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)
<i>Gentiana olivieri</i>	28	İnaktif	İnaktif
<i>Carum copticum</i>	60	22	60
<i>Zygophyllum fabago</i>	İnaktif	İnaktif	İnaktif
<i>Vincetoxicum stocksii</i>	40	50	70
Pentamidin	Test edilmedi	1.2	6
Amfoterisin B	Test edilmedi	0.28	0.74
Klorokuin	99.2	Test edilmedi	Test edilmedi
Artemisinin	98.8	Test edilmedi	Test edilmedi

IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri, solvent kontrollerle karşılaştırıldığında layşmanyal hücrelerin sırasıyla % 50 ve % 90 ölümüne neden olan konsantrasyonlardır. Test=3, konsantrasyonlar: 100, 20, 4 µg/mL

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sonraki aşamaya sadece bu iki tür ile devam edilmiştir. *V. stocksii* türünün etanollü ekstresinin hekzan (Fraksiyon AVH), etilasetat (Fraksiyon AVE) ve bütanol (Fraksiyon AVB) fraksiyonları hazırlanarak test edilmiş ve *P. falciparum* ve *L. donovani*'ye karşı hekzan fraksiyonunun ılımlı aktivite gösterdiği fakat diğer fraksiyonların ise ya hiç aktivite göstermediği yada çok zayıf aktiviteli olduğu görülmüştür (Çizelge 2.10.) (30).

Çizelge 2.10. *V. stocksii* türünden elde edilen fraksiyonların *in vitro* antimalaryal ve antilayşmanyal aktiviteleri (30).

Örnek isimleri	<i>P. falciparum</i>	<i>L. donovani</i>	
	% inhibisyon	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)
<i>Vincetoxicum stocksii</i> AVH	52	51	90
<i>Vincetoxicum stocksii</i> AVE	21	İnaktif*	İnaktif*
<i>Vincetoxicum stocksii</i> AVB	15	İnaktif*	İnaktif*
Pentamidin	Test edilmedi	1.2	5.2
Amfoterisin B	Test edilmedi	0.45	0.9
Klorokuin	99.6	Test edilmedi	Test edilmedi
Artemisinin	99	Test edilmedi	Test edilmedi

IC₅₀ ve IC₉₀ değerleri, solvent kontrollerle karşılaştırıldığında *Leishmanial* büyüme % 50 ve % 90 oranında inhibe eden konsantrasyonlardır. * 40 µg/mL

Bu çalışmada gözlenen etkilerin muhtemelen diğer *Vincetoxicum* türlerinde bulunduğu bilinen fenantroindolizidin alkaloidlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Antilayşmanyal bitki olarak *V. stocksii* türünün yerli kabilelerde geleneksel kullanımlarının olduğu bilindiğinden bu çalışmada elde edilen sonuçlar *V. stocksii* türünün geleneksel olarak antiprotozoal kullanımları ile de paralellik göstermiştir (30).

2.3.4. *Vincetoxicum* Türleri Üzerinde Yapılmış Antidiareik ve Antispazmodik Etki Çalışmaları

Shah ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *V. stocksii* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen sulu-metanollü ekstrenin muhtemel hareket mekanizmaları ile birlikte antidiareik ve antispazmodik aktiviteleri araştırılmıştır. Farelerde hintyağı ile indüklenmiş diyare de bitkinin sulu-metanollü ekstresinin 300-1.000 mg/kg dozlarda standart antidiareik ajan Loperamit'e benzer şekilde % 12-24 koruma sağladığı saptanmıştır (Çizelge 2.11.).

Ayrıca ekstrenin tavşan jejenumundan izole edilen preparasyonlarda kendiliğinden ve yüksek K⁺ (80 mM)-indüklenmiş kontraksiyonları, doza bağımlı olarak sırasıyla 2.53 (1.65-3.90) ve 0.95 mg/mL (0.63-1.42) EC₅₀ değerleri ile inhibe ettiği görülmüştür. Bu etki kalsiyum kanal blokeri Verapamil'in neden olduğu etki ile benzerdir ve kalsiyum kanal blokaj etkisini akla getirmektedir. Çalışmada Loperamit'in kendiliğinden ve yüksek K⁺-indüklenmiş kontraksiyonların inhibisyonuna sırasıyla 8.59

(6.33-10.11) ve 9.12 μM (7.33-12.81) EC_{50} değerleri ile neden olduğu tespit edilmiştir. Kalsiyum kanal blokaj aktivitesinin ileri onaylanmasında 1-3 mg/mL konsantrasyonda ekstre dokulara ön işlem olarak uygulanmış ve Verapamil'in yaptığı etki ile aynı şekilde Ca^{++} konsantrasyonunun cevap eğrisinde sağa doğru kaymaya sebep olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar; *V. stocksii* türünün sulu-metanollü ekstresinin kalsiyum kanal blokaj bileşenlerini içerdiğini göstermiştir. Ayrıca diyare ve spazm gibi gut'un aşırı durumlarında bitkinin tıbbi kullanımlarını aydınlatmış ve bitkinin sulu-metanollü ekstresinin kalsiyum kanal blokajı yoluyla antidiyareik ve antispazmodik etkiye aracılık ettiğini düşündürmüştür (40).

Çizelge 2.11. *V. stocksii* türünün ham ekstresinin farelerde hintyağı ile indüklenmiş diyare üzerine etkisi (40).

Grup	Doz	4 saatteki total feces sayısı	4 saatteki total ıslak feces sayısı	Koruma (%)
Kontrol	10 mL/kg	12.72±0.90	0.35±0.21	99.01±0.87
Hintyağı	10 mL/kg	13.80±0.24	12.99±0.76	0.99±0.22
Hintyağı+ekstre	10 mL/kg+300 mL/kg	13.60±1.47	87.28±3.13	12.72±3.13 ^a
Hintyağı+ekstre	10 mL/kg+1.000 mL/kg	6.80±0.86	75.62±4.47	24.38±4.47 ^b
Hintyağı+Loperamid	10 mL/kg+10 mL/kg	8.80±1.18	0.40±0.34	94.82±1.39

Sonuçlar $\pm\text{SEM}$; n=5; ^a kontrolden anlamlı şekilde farklı, $p<0.05$; ^b kontrolden anlamlı şekilde farklı, $p<0.01$

2.3.5. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Amibisit Etkileri Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

Bhutani ve arkadaşları tarafından 1987 yılında yapılan bir çalışmada E halkasında doymamışlığı bulunan veya angular (metil veya hidroksil) fonksiyonu olan veya bağlı fenantreni ayrı olan; Oksijen taşıyan substituentinin sayısı, yapısı ve dağılımı farklı olan; *Tylophora* bitkilerinden daha önce izole edilmiş 14 fenantroindolizidin alkaloiti ile birlikte bunların süstitüe olmamış molekülleri ve bunun aracıları amoebisidal aktiviteleri için *in vitro* olarak test edilmiş ve çeşitli MIC değerleri ile aktif bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca tiloforin hidroklorit'in akut toksisitesi belirlenmiş ve aynı şekilde test hayvanlarında intestinal ve hepatik amoebiaziste eşit etkili olduğu gösterilmiştir (99).

2.3.6. *Vincetoxicum* Türleri ve Yakın Cinslere Ait Türlerin Fitotoksik Aktiviteleri

Fitotoksisite ile ilgili çalışmalar *C. rossicum* türünün sulu kök ekstresinin turp bitkisinin (*Raphanus sativus* L.) tohumlarının germinasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (13, 14, 158). Ayrıca *V. rossicum* türünün kök ekstresinin fitotoksik özelliği bulunmuş, fakat antofin dışında fitotoksisiteden sorumlu diğer bileşik veya bileşikler belirlenememiştir (66).

Wang ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin alkaloid serilerinin ve bunların tuz türevlerinin herbisidal aktivitesi araştırılmış ve antofin, deoksitiloforinin ve bunların türevlerinin herbisidal aktivite göstermediği belirlenmiştir (173).

Gibson ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan çimlenme çalışmalarında; *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin büyük oranda bulunduğu habitatlarda yaşayan üç akraba, doğal bitki türü: *Asclepias tuberosa*, *A. syriaca* ve *Apocynum cannabinum* türleri üzerine (-)-antofin'in etkisi araştırılmış ve μM konsantrasyonlarda kök büyümesini büyük oranda inhibe ettiği görülmüştür. *V. rossicum* ve *V. nigrum* türleri ile yapılan fitotoksisite çalışmalarında; her iki türün köklerinde, yapraklarında ve tohumlarında bulunan fenantroindolizidin alkaloidi (-)-antofin kuvvetli fitotoksin olarak tanımlanmıştır. *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin çoklu büyüme ve üreme karakteristiği göstermesi türlerin istila yeteneğinde bu durumun önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca oldukça biyoaktif fitokimyasal bir bileşik olan (-)-antofin'in köklerde ve tohum dokularında bulunması bu türlerin istila yeteneğinde potansiyel allelopatik rolünü göstermektedir. Fakat bu verilerin aksine antofin'in marula karşı ılımlı aktivite gösterdiğini; *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinde germinasyon ve kök büyümesi üzerine daha az etkili olduğunu gösteren çalışmalara da rastlanmıştır (66).

2.3.7. Fenantroindolizidin Alkaloidlerinin Antiviral Aktivitesi

Tütün mozaik virüsünün (TMV) sebep olduğu bitki hastalıkları dünya genelinde yaygındır. Bu virüsün 9 bitki familyasının üyelerini ve tütün, domates, biber, kabak ve birçok süs bitkisinin çiçeklerini içeren en az 125 türü enfekte ettiği bilinmektedir.

Enfekte olmuş birçok tarlada hasat zamanı bitkilerin % 90-100'ünde mozaik veya yaprak nekrozları görülmektedir. Bu nedenle bu bitki virüsüne bitki kanseri de denilmektedir ve kontrolü zordur (42, 174). TMV'ye karşı bitki tedavisinde kullanılan ticari antiviral ajanlardan biri olan Ningnanmisin; *Streptomyces noursei* var. *xichangensis*'den izole edilmiş bir tür pestisit olup TMV'ye karşı bitki tedavisinde diğer ticari ajanlara göre çok daha etkilidir. Fakat bu ajanın tarlalarda kullanımı fotosensitivitesi ve su yapışkanlığı nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bu nedenle daha etkili ve çevreci antiviral ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde birçok çalışma medikal formülasyonların antikanser aktivitesine odaklanmıştır. Tilofora alkaloidlerinin pestisit formülasyonunun antiviral aktivitesi ile ilgili az şey bilinmektedir (42). Polar fenantren bazlı tiloforin türevlerinin (PBTs) pestisit formülasyonlarının antiviral aktivitesi ise bilinmemektedir (174).

An ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı bir çalışmada *Vincetoxicum* cinsine akraba türlerden *C. komarovii* türünün toprak üstü kısımlarından izole edilen, bilinen iki alkaloid: 7-demetoksitiloforin ve 7-demetoksitiloforin *N*-oksit ve yeni bir bileşik olan piroloizokinolin alkaloidi 2,3 - dimetokdi - 6 - (3 - okso-bütil) - 7, 9, 10, 11, 11a, 12 - heksahidrobenzo [f] pirolo [1,2-*b*] izokinolin'in TMV'ye karşı antiviral aktivitesi araştırılmış ve ticari ajan 2,4-diokso-heksahidro-1,3,5-triazin kontrol olarak kullanılmıştır. Test edilen bileşiklerin TMV'e karşı antiviral aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. 1.0 µg/ml konsantrasyonda en aktif bileşik % 65 inhibisyon oranı ile 7-demetoksitiloforin bileşiği olarak tespit edilmiş olup; 500 µg/ml konsantrasyonda ise 7-demetoksitiloforin *N*-oksit bileşiği % 60 inhibisyon oranı ve 2,3-dimetokdi-6-(3-okso-bütil)-7,9,10,11,11a,12-heksahidrobenzo[f]pirolo[1,2-*b*]izokinolin bileşiği ise aynı konsantrasyonda % 15 inhibisyon oranı göstermiştir. Çalışmada kontrol olarak kullanılan ticari ajan ise aynı şartlarda ve 500 µg/ml konsantrasyonda % 50 inhibisyon oranı göstermiştir (78). Başka bir çalışmada ise Wang ve arkadaşları *C. komarovii* türünden izole ettikleri (-)-antofin bileşiğinin TMV'ye karşı antiviral aktivitesinin olduğunu bulmuştur (73, 87).

Önceki çalışmalarda antofin'in TMV'ye karşı belirgin inhibitör etkisi olduğu rapor edilmiştir (50). Tiloforin B (antofin)'nin TMV'ye karşı kayda değer biyolojik aktivitesinin olduğu ve 1.0×10^{-6} g/ml konsantrasyonda % 60 inhibisyon gösterdiği, aksine ticari antivirüs 2,4-dioksoheksahidro-1,3,5-triazin'nin (DHT) ise aynı şartlarda

5×10^{-4} g/ml konsantrasyonda sadece % 50 inhibisyon gösterdiği saptanmıştır (175).

Li ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada ilk kez (+)-deoksitiloforinin bileşiği sentezlenerek (+)-deoksitiloforinin ve (-)-antofin bileşiklerinin TMV'ye karşı *in vitro* antiviral aktivitesi araştırılmıştır. Karşılaştırma için ticari antiviral ajanlar DHT; 1,5-diasetil-2,4-dioksoheksahidro-1,3,5-triazin (DADHT) ve moroksidin hidroklorit bakır asetat (virüs A) aynı şartlarda test edilmiştir. Sonuç olarak (+)-deoksitiloforinin bileşiğinin TMV'ye karşı mükemmel antiviral aktivitesinin olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.12.) (176).

Çizelge 2.12. (+)-deoksitiloforinin ve (-)-antofin'in TMV'ye karşı inhibitör aktiviteleri (%) (176).

Bileşikler	100 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL
(+)-deoksitiloforinin	90	96	94	48
(-)-antofin	97	95	92	63

Wang ve arkadaşlarının antiviral ajanlar olarak fenantroindolizidin alkaloidler üzerine yaptıkları araştırmalarda geniş bir aralıkta rasemik alkaloidlerin hazırlanması için etkili yaklaşımlar geliştirmiş (87) ve 2010 yılında yaptıkları bu çalışmada rasemik fenantroindolizidin alkaloidleri; tiloforin, antofin, deoksitiloforinin ve optikçe saf alkaloidler S - (+) - tiloforin ve R- (-) - tiloforin sentezlenerek bu bileşiklerin TMV'ye karşı antiviral aktivitesine bakılmıştır. İleri tuzlama modifikasyonlarının tiloforin'in stabilitesini ve suda çözünürlüğünü artırması ve uygulamalarla antiviral aktivitenin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Test sonuçları; ticari Ningnanmisin'le karşılaştırıldığında sentezlenen bu bileşiklerin çoğunun TMV'ye karşı *in vitro* ve *in vivo* olarak daha yüksek antiviral aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle tiloforin'in tuz türevleri olan 10, 11, 13, 17 ve 22 numaralı bileşikler bitki virüslerine karşı potansiyel inhibitörler olarak belirlenmiştir (42). Wang ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir diğer çalışmada ise C9-sübstüentli fenantren bazlı tiloforin türevleri (PBTs) tasarlanıp, sentezlenerek ilk kez TMV'ye karşı antiviral aktiviteleri için test edilmiştir. Yapılan testler bu bileşiklerin bazılarının tiloforin ve ticari Ningnanmisin'e göre *in vivo* olarak TVM'ye karşı daha yüksek antiviral aktiviteli olduğunu göstermiştir. Özellikle 3, 4, 9, 13 ve 16 numaralı bileşikler bitki virüslerine karşı potansiyel inhibitörler olarak tespit edilmiştir (174). Wang ve arkadaşlarının yaptığı bu iki çalışmadan elde edilen bulgular

fenantroindolizidin alkaloidleri, bunların tuz türevleri (42) ve fenantren bazlı tiloforin türevlerinin (174) antiviral çalışmalarda yeni modeller olarak sunulabileceğini göstermiştir.

Yang ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada kuvvetli *in vivo* enteropatojenik koronavirüs transmisibl gastroenteritis virüs (TGEV) inhibitörü olan, doğal ve sentetik fenantroindolizidinleri ve fenantrokinolizidinleri içeren tiloforin bileşiklerinin teşhisi amaçlanmıştır. TGEV'in N ve S proteinlerinin ekspresyonunun imminofloresan testleri ve viral ürünlerin gerçek zaman-kantitatif PCR analizleri ile bu potansiyel bileşiklerin % 50 maksimal etkili konsantrasyon (EC₅₀) değerlerinin 8-1468 nM aralığında olduğu tespit edilmiştir. Dahası tiloforin bileşiklerinin çok güçlü anti-TGEV replikasyon aktivitesi gösterdiği ve böylece TGEV-indükleyen apoptozisi ve bunu izleyen ST hücrelerinde sitopatik etkiyi bloke ettiği belirlenmiştir. Bunlara ek olarak tiloforin bileşiklerinin insan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs (SARA CoV) ile indüklenmiş Vero 76 hücrelerinde sitopatik etkiyi kuvvetlice azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, tiloforin bileşiklerinin yeni kuvvetli anti-koronavirüs ajanları olabileceğini ve TGEV veya SARS CoV enfeksiyonlarının tedavisinde terapötik ajanlar olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Sonuç olarak tiloforin bileşiklerinin ve bu bileşiklerin elde edildiği geleneksel bitkilerin anti-koronavirüs inhibitörü olarak koronavirüs epidemilerinde ve pandemilerinde kaynak olarak kullanılabilceği düşünülmüştür (59).

2.3.8. Fenantroindolizidin Alkaloidlerinin Antiinflamatuvar Aktivitesi

Nitrik oksit'in (NO) doku homeostasisinin devamında önemli rol oynadığı bilinmektedir. NO; nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından üretilmektedir. NOS'un üç izoformu belirlenmiştir. Bunlardan endotelial izoform eNOS vasküler endotelial hücrelerden, nöral izoform nNOS ise sinir sisteminden açığa çıkmaktadır. Bunlar; vazodilasyon, platelet agregasyonunun inhibisyonu ve nöral sinyal transdüksiyonu ile homeostatik regülasyonu düzenlemek için hızlı şekilde NO'nun küçük miktarlarını üretmektedir. Üçüncüsü olan indüklenbilir izoform iNOS ise inflamasyonu da içerisine alan bir çok patolojik şartın oluşumu durumunda meydana gelir. NO; enfeksiyon patojenlerinin öldürülmesi için iNOS tarafından üretilmekte fakat fazla NO üretilmesi

ise çevredeki dokularda hücre ölümü ve doku homeostasisinin tahribi ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca iNOS ekspresyonu; astım ve romatoid artrit gibi çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklarda dokularda up-regüledir. Bu nedenle iNOS, inflamatuvar hastalıkların tedavisinde veya hafifletilmesinde iyi bir hedef olarak düşünülmektedir (41).

Fenantroindolizidin alkaloidleri ile ilgili yapılan çalışmalarda bu alkaloidlerin anti-inflamatuvar etkilerinin ve potansiyel terapötik mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalara rastlanmaktadır (51, 109). Fenantroindolizidin alkaloidi tiloforin'in; pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimini ve kollajen-indüklenmiş artrit'in ilerlemesini ve gelişimini inhibe ettiği de görülmüştür. Ayrıca tiloforin'in makrofaj hücrelerinde AP-1 aktivasyonunun inhibisyonu boyunca LPS/IFN- γ -indüklenen NO üretimini inhibe ettiği de belirlenmiştir (41).

Yang ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada RAW264.7 hücrelerinde lipopolisakkarit (LPS)/interferon- γ -(IFN γ)-indüklenen NO üretiminin baskılanması moleküler mekanizması çalışılarak, *in vitro* sistemde akut inflamasyon taklit edilmiş ve fenantroindolizidin alkaloidlerinin anti-inflamatuvar aktiviteleri araştırılmıştır. Bu çalışmada fenantroindolizidin alkaloidleri tiloforin, dehidrotiloforin ve fikuseptin A'nin anti-inflamatuvar aktivitesi araştırılmış; tiloforin ve fikuseptin A'nın NO oluşumunu kuvvetli şekilde baskıladığı ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin aksine LPS/IFN γ -ile stimule edilmiş RAW264.7 hücrelerine karşı belirgin sitotoksikite göstermediği belirlenmiştir. Tiloforin'in sorumlu mekanizmaları ile ilgili daha ileri araştırmalar yapılmış ve tümör nekrozis faktör- α 'nın, indüklenmiş nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklo-oksijenaz (COX)-II'nin indüklediği protein düzeylerini inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca mürin iNOS aktivasyonunu ve COX-II promoter aktivitesini inhibe ettiği de belirlenmiştir. Tiloforin tarafından LPS/IFN γ -ile stimüle edilen RAW264.7 hücrelerinde; iNOS ve COX-II promoterlerinin iki yaygın sorumlu elemanı olan nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve adaptör proteinden (AP)1 den sadece AP1 aktive edilmiştir (51). İleri çalışmalarla tiloforin'in, Akt'nin fosforilasyonunu arttırdığı ve bu nedenle c-Jun proteininin ekspresyonunu ve fosforilasyon düzeyini azalttığı (51, 68) ve böylelikle bunu izleyen AP1 aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (51). Akt ve c-Jun aktiviteleri hem apoptosiz hem de stressin indüklediği inflamasyon ile ilgilidir (68). Dahası tiloforin'in mitojen ile aktive edilmiş protein/ekstraselüler

sinyal-düzenleyici kinaz kinaz 1'in aktivitesini ve NF- κ B ve AP1'in sinyal aktivasyonunun yüklenmesini bloke edebildiği belirlenmiştir (51). Yani tiloforin anti-inflamatuvar etkiyi iNOS ve COX-II gibi birçok pro-inflamatuvar faktörün ekspresyonu ve bağlantılı sinyal yollarının inhibisyonu ile göstermektedir (51, 68). Ayrıca *in vitro* çalışmalar tiloforin'in 1.8 μ M konsantrasyonda IC₅₀ değeri ile mürin makrofaj hücrelerinde (RAW264) NO üretimini önlediğini göstermiştir. Ratlarda yapılan *in vivo* çalışmalarda tiloforin'in 25 mg/kg intra-peritoneal uygulamasının anlamlı şekilde anti-inflamatuvar etki oluşturduğu; CNS depresyonunun ise 100 mg/kg veya daha fazlasında gözlemlendiği görülmüştür. Önemli olan *in vivo* olarak uygulandıktan kısa bir süre sonra ilaç metabolizması hala minimumda iken etkileri gözlemlendiğinden tiloforin'in oldukça etkili olmasıdır. Sonuçta doğal kaynak olarak tiloforin inflamasyonun önlenmesinde umut verici bir bileşik olarak not edilmektedir (68).

Min ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin alkaloidlerinin anti-inflamatuvar etkilerine dayanarak antofin'in ve analoglarının RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinde LPS-indüklenmiş NO üretimi üzerine inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. Test edilen bileşikler arasında (-)-antofin en güçlü inhibitör aktiviteli bileşik olarak belirlenmiştir (IC₅₀=2.6 nM). 5. bileşik ise en az (-)-antofin kadar güçlü aktivite göstermiştir (IC₅₀=3.8 nM). 6, 8, 10, 14 ve 15 nolu bileşikler ise 30 nM konsantrasyonda IC₅₀ değeri ile etkili inhibitör aktiviteli bulunmuştur. Ayrıca bu bileşiklerin NOS inhibitörü N^G-monometil-L-arjinin (L-NMMA) ile karşılaştırıldığında 1.000-kat daha etkili olduğu da görülmüştür (Çizelge 2.13.) (41).

Çizelge 2.13. (-)-antofin ve analoglarının RAW 264.7 hücrelerinde LPS-indüklenmiş NO üretimine karşı inhibitör aktivitesi (IC₅₀) ve sitotoksik etkisi (41).

Bileşikler	NO inhibisyonu (IC ₅₀ [nM]) ^{a)}	Sitotoksosite [nM] ^{b)}
(-)-antofin	2.6	>5
2	>100	NT ^{c)}
3	>100	NT
4	>100	NT
5	3.8	>5
6	29.1	>40
7	>100	NT
8	29.1	>50
9	>100	NT
10	32.4	>80
11	>100	NT
12	>100	NT
13	>100	NT
14	26.2	>30
15	19.6	<30
L-NMMA ^{d)}	19.7 µM	-

^{a)} IC₅₀ değerinin nonlinear regresyon analizleri Tablecurve v1.0 ile yapılmıştır. Non-toksik konsantrasyonlarda sadece NO akümülyasyonları IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. ^{b)} Test edilen bileşiklerin maksimal konsantrasyonları toksisiteyi etkilememiştir. Daha yüksek konsantrasyonlar RAW 264.7 hücrelerinde sitotoksisiteyi harekete geçirebilir. ^{c)} NT: test edilmemiş. Bileşikler LPS-indüklenmiş NO üretimini inhibe etmemiştir, bu nedenle sitotoksisitesi test edilmemiştir. ^{d)} L-NMMA: N^G-monometil-L-arjinin pozitif kontrol olarak kullanılmış ve tüm test konsantrasyonlarında sitotoksisite göstermemiştir.

2.3.9. Fenantroindolizidin Alkaloidlerinin Nörotoksik Etkisi

T. atrofoliculata ve *T. ovata* türlerinin köklerinden izole edilen yeni fenantroindolizidin alkaloidi S-(+)-deoksitiloforininin (CAT) Liu ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada nörotoksitesini için test edilmiş ve vinblastin'e göre ciddi şekilde daha az nörotoksik olduğu belirlenmiştir. *In vitro* nörotoksosite çalışması için PC12 sinir hücre uzantısının aşırı büyüme testi kullanılmış ve vinkristin (VCR) uygulandıktan sonra aksonların benzer şeklini kaybettiği; düzensiz ve kısalmış yapılar ortaya çıktığı görülmüştür. Bunun aksine PC12 hücrelerinde CAT uygulanan sinir hücre uzantılarında bulunan yapısal bütünlüğün, en yüksek konsantrasyonda bile kontrol uygulanan hücreler ile aynı olduğu tespit edilmiştir. CAT'ın nörotoksitesinin vinblastinden daha az olduğu belirlenmiştir. Bu durum CAT'ın kısmen selüler mikrotübül sistem üzerinden hareket etmediğinin kanıtıdır. Ayrıca CAT uygulanan gruplardaki hayvanlarda vücut ağırlığının azaldığı gözlenmiş olup bu durum ise şiddetli toksisiteye işaret etmiştir (54).

2.3.10. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Antitümör ve Sitotoksik Aktiviteleri

Doğal ürünler; elde edilebilir anti-kanser ilaçlarının ana kaynağıdır. New Chemical Entities (NCE)'nin 1981-2002 yılları arasındaki raporlarına göre antikanser ilaçlarının yaklaşık % 74'ünü doğal ürünler, doğal ürün kaynaklı sentetik bileşikler veya onların taklitçilerinin oluşturduğu görülmüştür (46, 177). 1935 yılında (-)-tiloforin'in ilk izolasyonundan bu yana birçok fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloiti özellikle antitümör aktivite gibi çeşitli ve kuvvetli farmakolojik özellikleri nedeniyle ilgi çekici bulunmuştur (69, 72, 75, 81, 86, 87, 178). Fenantroindolizidin alkaloitlerinin bir çoğu güçlü vezikan ve sıklıkla çok toksiktir, ayrıca çeşitli normal ve abnormal memeli dokularında büyümeyi modüle etmektedir (85). Bu alkaloitler; birçok kanser hücre dizisine karşı güçlü etkisi nedeniyle son dönemde potansiyel kanser terapi ilaçları olarak kullanılan bitkisel doğal bileşiklerin küçük bir grubu olup (179); kuvvetli biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle birçok tıbbi araştırmaya konu olmuştur (180).

Fenantroindolizidin alkaloitleri küçük bir grup olmasına rağmen umut verici sitotoksik ajanlardır (177, 181). Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute-NCI) tarafından tümör hücre dizisi panellerinde yapılan çoklu testlerde bu alkaloitlerin düşük nanomolar aralıklarda kuvvetli aktivite gösterdiği belirlenmiştir (182). Ayrıca NCI tarafından yapılan antitümör aktivite taramalarında ise bu alkaloitlerin 60 hücre dizisine karşı eşsiz, kararlı ve kuvvetli büyüme inhibitör etkisi ($GI_{50}=10^{-8}M$) olduğu; melanoma ve akciğer tümörü hücre dizilerini de içine alan birçok inatçı hücre dizisine karşı kayda değer seçicilik gösterdiği bulunmuştur (42, 46, 53, 69, 111, 177). Örneğin fikuseptin-A; (+)-tiloforin; (+)-antofin ve (+)-izotilokrebrin karışımı ve *O*-metiltiloforinidin bileşikleri birçok kanser hücre dizisine karşı kuvvetli sitotoksik aktivite göstermiştir (182).

1960'ların başlarında yapılan çalışmalarda; tiloforin alkaloitlerinin antitümör aktivite mekanizmasının translasyon siklusunun uzama safhasında protein sentezini geri dönüşümsüz olarak inhibe etme şeklinde olduğu belirlenmiştir (46, 177). Gellert ve Rudzats tarafından 1964 yılında NCI'ı bünyesinde yapılan bir çalışmada tilokrebrin, 3 tümör sistemine (Sarkoma 180, Adenokarsinoma 755 ve Lemfoit lösemi L 1210) karşı test edilmiştir. Sonuçta tilokrebrin'in sarkoma 180 ve adenokarsinoma 755'e karşı

farelerde non-toksik dozlarda tümör ağırlığında kontrol gruplarına göre önemsiz azalmaya neden olduğu (93); lemfoit lösemi L 1210 da ise test hayvanlarının yaşam süresini oldukça arttırarak yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (53, 89, 93, 111, 114). Ayrıca NCI'nın datalarına göre tilokrebrin'in P388 lösemi'ye karşı ılımlı aktivitesi olduğu; bunun aksine sarkoma 180 ve adenokarsinoma 755'e ek olarak B16 melanoma, Lewis akciğer, P1534 lösemi ve Walker 256 karsinosarkoma tümör hücre dizilerine karşı etkisiz olduğu gösterilmiştir (111, 114).

Diğer bir fenantroindolizidin alkaloidi olan tiloforin bileşiğinin L 1210 lösemi'ye karşı düşük etkili olduğu; adenokarsinoma 755, P 1534 lösemi ve Walker 256 karsinosarkoma tümör hücrelerine karşı ise inaktif olduğu görülmüştür. Tiloforinin alkaloidinin sadece L 1210 lösemi'ye karşı marjinal derecede ılımlı aktiviteli olduğu belirlenmiştir (111, 114). Tiloforinin alkaloidinin ise mürin lösemi L 1210 siteminde anlamlı antitümör aktivite gösterdiği saptanmıştır (53). 1960'ların başlarında Faz 1 klinik çalışmalarında anti-kanser ajan olarak tilokrebrin başarılı bir şekilde kullanılmasına rağmen 1965-1966 yıllarında dezoryantasyon ve kaslarda koordinasyon bozukluğu gibi merkezi sinir sistemi toksisiteleri nedeniyle çok az sayıda hasta etkili şekilde tedavi edilebilmiş ve bu nedenle klinik kullanımlarda hayal kırıklığı yaratmıştır (46, 53, 63, 68, 70, 72, 178).

1970'lerde tilokrebrin ve tiloforin'in protein sentezini inhibe ettiği; ayrıca RNA ve DNA sentezinin miktarını azalttığı belirlenmiştir (68, 75, 181). *Ehrlich ascites* tümör hücreleri ile yapılan çalışmalarda 10^{-6} M tiloforin ve 10^{-7} M tilokrebrin uygulamalarında % 50 başarı sağlanmasına rağmen NCI tarafından yapılan sonraki çalışmalarda bu bileşikler genel olarak toksik bulunmuştur (68). Örneğin tiloforin bileşiği antitümör aktivitesine rağmen çok toksiktir. Yapılan çalışmalarda tiloforin'in *Paramecium caudatum*'a $\geq 5 \times 10^{-4}$ dilüsyonda toksik olduğu; kurbağalarda ise 0.4 mg/Kg dozda letal olduğu belirlenmiştir. Fakat fare ve domuzlarda ise toksisitesinin daha az olduğu bildirilmiştir (48, 183). Tiloforin'in kalp kasları üzerine paraliz etkisi ve kan damarlarının kasları üzerine stimulan etkisi olduğu da belirlenmiştir (48). Bazı fenantroindolizidin alkaloidleri çok toksik olmasına rağmen birçoğunun örneğin her iki tiloforin enantiomerinin rotentlerde az toksik olduğu da yapılan çalışmalarda görülmüştür. (R)-tiloforin ratlarda 500 mg/kg doza kadar non-toksik iken hamsterlarda ise 60 mg/kg doza kadar non-toksik bulunmuştur. Ratlarda yüksek dozda (R)-tiloforin

uygulandığında ptosis, sedasyon, motor aktivitenin azalması ve yürüyüş bozukluğu gibi bazı CNS toksisiteleri gözlenmiştir (68). Tiloforin analogları ve tiloforin enantiyomerlerinin 1960'lerde NCI tarafından yapılan değerlendirmeleri sonucu hiç biri daha ileri araştırmalar için yeterli görülmemiştir (71). Buna ek olarak klinik çalışmalardaki hayal kırıklığı bu alkaloidlerin ilaç geliştirme çalışmalarında kullanımları için ileri araştırmaların düşünülmesini engellemiştir (45, 51, 63, 80).

Fenantroindolizidin alkaloidlerine olan medikal ilgi, 1990'larda tiloforin analoglarının NCI tarafından 60 tümör hücre dizisi paneline karşı antitümör potansiyelleri için yeniden taranması ile başlamıştır (63, 68, 71, 80). Bu taramalarda 60 hücre dizi testinde birkaç bileşiğin çok güçlü (10^{-8} - 10^{-12} M) büyüme inhibitör etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca COMPARE analizlerine dayandırılarak hareket mekanizmalarının bilinen diğer antikanser bileşiklerinden farklı olduğu da belirlenmiştir (68). Bu analoglardan tiloindisin F (NSC-650393), tiloindisin G (NSC-650394), tiloindisin H (NSC-650395) ve tiloindisin I (NSC-650396) olmak üzere 4 sekofenantroindolizidin alkaloidi test edilmiş (71, 91) ve bu alkaloidlerden tiloindisin F ve tiloindisin G'nin 54 insan tümör hücre dizisine karşı $GI_{50} < 10^{-10}$ M değeri ile çok güçlü ve benzersiz aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (63, 71, 80, 91). Dahası tiloindisin F ve tiloindisin G alkaloidleri bazı melanoma ve akciğer kanserlerini içerisine alan inatçı kanser hücre dizilerine karşı gösterdiği LC_{50} değeri ile de oldukça seçici ve aktif bulunmuştur (71, 80, 91). 1990'larda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte tiloforin alkaloidlerinin; timidilat sentaz (TS) ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) gibi bir çok anahtar metabolik enzimi hedef aldığı (46, 177); bunlara karşı inhibitör etkili olduğu (184) ve ayrıca hücre apoptosisini uyardığı (46, 177) belirlenmiştir.

Tilokrebrin bileşiği ilk klinik denemelerde CNS toksisitesi nedeniyle hayal kırıklığı yaratmış olmasına rağmen özellikle multidrug resistan kanser hücre dizilerine karşı gösterdiği sitotoksitesi nedeniyle potansiyel antikanser ajanlar olarak kullanılacaklarını düşündürmüştür (80, 177). Yapılan çalışmalarda kanser hücre büyümesini oldukça kuvvetli inhibe etmesi nedeniyle (-)-antofin son dönemde dikkatleri üzerine çeken bir diğer fenantroindolizidin alkaloidi olmuş ve insan akciğer (A549) ve kolon (Col2) karsinoma hücre dizilerine karşı *in vitro* olarak kuvvetli büyüme inhibitör etkisi (IC_{50} 7.0 ve 8.6 ng ml^{-1}) olduğu belirlenmiştir (111, 114). Ayrıca yapılan çalışmalar, antofin bileşiğinin klinikte kullanılan sitotoksik ilaçlarla karşılaştırılabilecek

kadar düşük nanomolar aralıklarda IC₅₀ değerine sahip olduğunu ve drug-sensitive ve multidrug resistant kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili olduğunu da göstermiştir. (45, 52, 70, 181, 185). Örneğin (-)-antofin *in vitro* olarak düşük nanomolar aralıklarda IC₅₀ değeri ile drug-sensitive KB-3-1 ve multidrug-resistant KB-V1 kanser hücre dizilerine karşı sırasıyla 16 ve 14 nM da IC₅₀ değerleri ile klinik olarak kullanılan sitotoksik ilaçlar ile karşılaştırılabilir derecede etkili bulunmuştur (50, 52, 175, 182). Sonuç olarak bu sınıf bileşiklerin her iki drug-sensitive ve multidrug-resistant kanser hücre dizilerine karşı düşük nanomolar aralıklarda büyüme inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir (52, 68). Ayrıca son çalışmalarda etopozit (VP-16), paklitaksel, topotekan, adrimisin, sitozin arabinozit, gempitabin, hidroksiürea ve kamtotesin gibi çeşitli antikanser ilaçlarına direnç veya çapraz direnç gösteren geniş aralıktaki insan kanser hücrelerine karşı tiloforin analoglarının potansiyel sitotoksik aktiviteli olduğu belirlenmiştir (80).

Tylophora türleri ile yapılan çalışmalarda *T. tanakae* türünden 4'ü yeni olmak üzere izole edilmiş olan 14 tiloforin alkaloidi antitümör aktiviteleri için 5 farklı kanser hücre dizisine karşı test edilmiş ve bu bileşiklerden 10'unun etkili olduğu bildirilmiştir (104).

V. officinale türü ile yapılan çalışmalar bu türde bulunan bazı alkaloidlerin göğüs kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) hormondan bağımsız olarak büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir (26).

Doğal olarak antikanser aktiviteli bileşiklerin bulunmasından sonra birçok bileşik klinikte antikanser ilaç olarak kullanılmıştır. Örneğin paklitaksel *Taxus brevifolia* türünden, kamptotesin *Camptotheca acuminata* türünden ve adrimisin *Streptomyces peucetius* türünden elde edilmiştir. Böcek kaynaklı antikanser aktiviteli bileşikler ile ilgili bilgiler ise henüz oldukça sınırlıdır. Koyama ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 92 çeşit yetişkin kelebeğin metanol-kloroform ekstraktları sitotoksik aktiviteleri için *in vitro* olarak insan gastrik karsinoma TMK-1 hücrelerine karşı test etmiş ve test edilen türler arasında 5x10⁶ dilüsyonda IC₅₀ değeri ile sitotoksik etki sadece Danaidae familyasında yer alan *I. similis* türünde görülmüştür. Ayrıca sitotoksik aktivite *I. similis* türünün yiyecek kaynağı olan *T. tanakae* türünün yapraklarının kloroform-metanol ekstresinde de araştırılmış (186) ve yapraklarda sitotoksik aktivitenin olduğu belirlenmiştir (184). *I. similis* de gözlenen etkinin *T. tanakae* türünün

yapraklarında bulunan bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmüştür. *T. tanakae* türünün yapraklarında birçok fenantroindolizidin alkaloidinin bulunduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiş olup bunların bir kısmının *I. similis* de yumurtlama stimulan aktivitesinin olduğu da görülmüştür. *T. tanakae* türünün *I. similis* türünün besin kaynağı olduğunun öğrenilmesinden buyana fenantroindolizidin alkaloidlerinin ve bunların metabolitlerinin *I. similis*'in vücudunda bir miktar bulunabileceği ve bunların bazılarının TMK-1 hücrelerine karşı sitotoksikite gösterebileceği düşünülmüştür (186). Bir önceki çalışmada Danaidae familyasında yer alan *I. similis* kelebeğinin vücut sıvısının sitotoksik aktiviteli olduğunun bulunması bu etkiye neden olan fenantroindolizidin alkaloidlerinin saflaştırılması ve belirlenmesi fikrini akla getirmiştir. Ohyama ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *T. tanakae* türünün yapraklardan iki sitotoksik bileşik izole edilmiş ve bunlar: *trans*-(+)-3,14 α -dihidroksi - 4, 6, 7 - trimetoksifenantroindolizidin *N* - oksit ve (-) - 7 - hidroksi - 2, 3, 6 - trimetoksifenantroindolizidin olarak isimlendirilmiştir. Fakat bu alkaloidlerin *I. similis* kelebeğinin vücut sıvısında bulunan alkaloidlerden farklı olduğu görülmüştür. Bu alkaloidler TMK-1 hücrelerine uygulandığında *trans*-(+)-3,14 α -dihidroksi-4,6,7-trimetoksifenantroindolizidin *N*-oksid bileşiğinin 6 ng/ml dozda ve (-)-7-hidroksi-2,3,6-trimetoksifenantroindolizidin bileşiğinin ise 3 ng/ml dozda % 50 hücre büyüme inhibisyonuna (IC₅₀) neden olarak güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu etki *T. brevifolia* türünden izole edilen kanser kemoterapotik ajanı taksol'un etkisi ile hemen hemen aynıdır. *T. tanakae* türünden izole edilen fenantroindolizidin alkaloidinden bazılarının *I. similis*'in dişilerinde yumurtlama stimulanı olarak rol oynadığı ve *T. tanakae* türünün *I. similis*'in larvalarının konak bitkisi olduğu bilindiğinden fenantroindolizidin alkaloidleri ve bunların metabolitlerinin *I. similis* larvalarında birikmesi kelebeklerdeki sitotoksikiteyi açıklayabilmektedir (184). Komatsu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *I. similis* pupalarından, insan gastrik kanser hücre dizisi-TMK-1'e karşı aktiviteleri yetişkin kelebeklerle aynı olan bazı sitotoksik bileşikler izole edilmiştir. Metanol ekstresinden hazırlanan bazik fraksiyon % 83 sitotoksik aktivite gösterirken yeni bir fenantroindolizidin alkaloidi (*trans* - (+) - 3, 14 α - dihidroksi - 6, 7 - dimetoksifenantroindolizidin); ile birlikte bilinen diğer bir bileşik (*trans*-(+)-3,14 α -dihidroksi-4,6,7-trimetoksifenantroindolizidin) izole edilmiştir. Her iki bileşik servikal, akciğer, kolon karsinoması ve lösemi gibi 4 diğer kanser hücre dizisine

karşı da benzer sitotoksik potansiyel göstermiştir (105). Abe ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *I. similis* türünün pupa ve imajlarının metanollü ekstralarının dört teşhis edilebilir alkaloidi içerdiği belirlenmiştir (91, 106) Bunlardan üçü (3-demetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin, bunun *N*-oksidi ve izotilokrebrin *N*-oksit) *T. tanakae* türünün bilinen metabolitleridir. Dördüncü alkaloid; 3,4-didemetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin yeni bir alkaloidtir (91). Fenantroindolizidin alkaloidlerinden biri olan tilokrebrin'in protein sentezini inhibe ettiğinin keşfedilmesinden sonra 1998 yılında Abe ve arkadaşları tarafından 5 hücre dizisi kullanılarak bu bileşiklerin sitotoksik potansiyeli tanımlanmıştır (106).

I. similis ve onun konak bitkisi *T. tanakae* türünden elde edilen ekstraları insan gastrik karsinoma TMK-1 hücrelerine karşı sitotoksitesinin ön tarama raporlarına göre en aktif alkaloidler olan (+)-3-demetil-14 α -hidroksiizotilokrebrin'in *N*-oksidi ve (-) - (-) -7-demetiltiloferin'i daha önce Sugimura ve arkadaşları tarafından bitki ekstralarından da izole edilmiştir. İki alkaloidin TMK-1 hücre dizilerine karşı gösterdiği IC₅₀ değerleri sırasıyla 6 ng cm⁻³ ve 3 ng cm⁻³ olarak bulunmuş ve bu değerler ünlü antitümör ajan taksol'le benzer bir değer olarak görülmüştür. Bu kanıtlar her ne kadar kelebeğin vücut sıvısındaki toksisiteyi tam olarak açıklamasa da (+) - 3 - demetil - 14 α -hidroksiizotilokrebrin'e ek olarak yeni bir bileşik olan *trans*-(+)-3,14 α -dihidroksi-4,6,7-trimetoksifenantroindolizidin (3-demetiltiloferinin) izole edilerek bu bileşikler TMK-1 hücre dizilerine karşı test edilmiştir. İzole edilen yeni bileşik şimdiye kadar bitkisel kaynaklardan izole edilmemiş bilinmeyen bir bileşiktir. Pupa ekstralarındaki sitotoksitesinin % 70'inden sorumlu bu iki alkaloid TMK-1 hücre dizilerine karşı sırasıyla 0.5 ng cm⁻³ ve 0.7 ng cm⁻³ IC₅₀ değeri göstermiş ve ayrıca bunların servikal, akciğer ve kolon karsinoma ve lösemi üzerine sitotoksik olarak eşit etkili olduğu da görülmüştür. Sonuç olarak bu iki alkaloidin antitümör aktivitesini tanımlayan patent uygulamaları da kayda geçmiştir (91).

Kanser terapisinde en önemli problem ilaç direncidir. İlaç direncinin en karakterize mekanizması multidrug resistans gen (MDR) ürünü 170-kDa P-glikoprotein veya 190-kDa multidrug resistans protein MRP'in overexpressionudur. Bunların her ikisi de ATP-bağlanma kaset transport proteinler olup; ilaçları hücre dışına aktif şekilde pompalayarak ilaç direncine neden olmaktadır (71). Kemoterapotik ajanlara resistans gelişmesi kanser hastalarında büyük oranda ölüme neden olduğundan

fenantroindolizidin alkaloitlerinin terapotik öncüler olarak potansiyelleri dikkat çekmiştir. Son dönemde yapılan çalışmalar multidrug-resistant kanser hücre dizilerinin fenantroindolizidin *N*-oksitlere hassas olduğunu göstermiştir (45). Staerk ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı bir çalışmada *C. vincetoxicum* (Syn.: *V. officinale*, *V. hirundinaria*) türünün toprak üstü kısımlarından 3 fenantroindolizidin *N*-oksit izole edilmiş ve bunlardan ikisi daha önce bilinen (-)-10 β -antofin *N*-oksit (**1**) ve (-)-10 β , 13 α -14 β -hidroksiantofin *N*-oksit (**2**) bileşikleri iken, diğeri ise yeni bir bileşik olan (-)-10 β , 13 α -sekoantofin *N*-oksit (**3**) olarak tanımlanmıştır. Bu bileşikler wild tip ve multidrug resistant kanser hücre dizilerine karşı sitotoksik aktivitesi için *in vitro* olarak hem drug-sensitive KB-3-1 hem de multidrug-resistant KB-V1 kanser hücre dizileri ile test edilmiş ve rodamin 123 kontrol olarak kullanılmıştır. Antofin türevleri **1** ve **2** drug-sensitive hücre dizilerine karşı (IC₅₀ değeri yaklaşık 100 nM) belirgin sitotoksik aktivite gösterirken sekoantofin türevi **3** daha az aktif bulunmuştur (Çizelge 2.14.) (32, 91).

Çizelge 2.14. *C. vincetoxicum* türünden izole edilen fenantroindolizidin *N*-oksit alkaloitleri 1-3'ün sitotoksik aktivitesi (32).

Bileşikler	IC ₅₀ (μM)	
	KB-3-1 hücreleri	KB-V1 hücreleri
1	0.11 ± 0.04	0.16 ± 0.01
2	0.10 ± 0.04	0.16 ± 0.02
3	2.55 ± 0.35	3.30 ± 0.37
Rodamin 123	1.40 ± 0.17	>500

KB-V1 hücreleri P-170 glikoprotein akış pompasının ekspresyonunu içeren tamamen multidrug-resistans fenotip göstermektedir. KB-V1 hücrelerinin resistans indeksi KB-3-1 hücrelerine yakın olup 210 dur; bu da vinblastin ve diğer sitotoksik ilaçlar için oldukça yüksektir (32, 45). Bu çalışmada KB-V1 hücre dizilerinin çalışılan tüm alkaloitlere karşı marjinal direnç gösterdiği görülmüş olup bu da bu bileşiklerin P-glikoprotein (P-170) akış pompası için zayıf substratlar olduğunu göstermiştir (32).

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *F. septica* türünün yapraklarından izole edilen fikuseptin-A, (+)-tiloforin, (+)-tilokrebrin ve (+)-izotilokrebrin karışımının iki insan kanser hücre dizisi, NUGC ve HONE-1'e karşı güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (109).

Heterojenite, multidrug resistans fenotipler geliştirme ve son olarak rapor edilen NF- κ B'nin kurucu ekspresyonu nedeniyle kemoterapiye inatçı olan Hepatoselüler karsinomanın (HCC) etkin bir kemoterapisi bulunmamakta ve sadece cerrahi mevcut tedavi olarak gösterilmektedir. HCC hastalarının 5 yılda yaşama oranı $<5\%$ dir. Bu nedenle HCC gibi inatçı kanserlerin tedavisi için yeni hareket mekanizmalarına sahip bileşikler gereklidir. NCI'nın tümör taramaları hepatoma hücre dizilerini içermemesine rağmen Gao ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada Asya'da yaygın olan ve Amerika'da rastlanma oranı giderek artan HCC'yi de incelemiştir (71). NCI'nın devam eden çalışmalarına göre DCB-3500 [(+)-S-tiloforin (NSC-717335)] ve bunun analogu DCB-3503 (NSC-716802) bileşikler taranmış ve 60 hücre dizisine karşı yaklaşık 10^{-8} GI₅₀ değeri gösterdiği belirlenmiştir (56, 71). Gao ve arkadaşları bu verilere dayanarak bu çalışmada DCB-3500, DCB-3501, DCB-3502 ve DCB-3503 olmak üzere 4 tiloforin analogunu sentezleyerek bu bileşiklerin insan nasofaringel karsinoma hücre dizisi-KB, KB resistant hücre dizisi, insan hepatoselüler karsinoma hücre dizisi-HepG2 ve ayrıca SK-Hep 1, Huh7, PLC/PRF5, Hep3B, HA22T ve Malavu kanser hücre dizilerine karşı test etmiştir (71). Bu bileşiklerin KB ve HepG2 hücrelerinde sadece büyümeyi inhibe etmediği (DCB-3500 ve DCB-3503 için sırasıyla EC₅₀ 11-35 nM), ayrıca normalde geleneksel antitümör ilaçlarına dirençli olan KB variantlarına karşı etkili olduğu da gösterilmiştir (111). Test edilen bileşiklerden DCB-3500 ve DCB-3503'ün EC₅₀ değerlerinin yaklaşık 10^{-8} M olduğu tespit edilmiş ve bu değerlerin CPT ve gempitabin gibi kullanılan antitümör ilaçlarına yakın bir değer olduğu bildirilmiştir (71). Bu bileşiklerin, test edilen hücre dizilerinden özellikle HepG2 ve KB'ye karşı güçlü büyüme inhibitör etki gösterdiği bulunmuştur (71, 111). Bu bileşiklerin *in vivo* antitümör aktiviteleri de araştırılmıştır. Buna ek olarak HepG2 ve KB insan tümör hücre dizileri kullanılarak hücre büyümesine karşı potansiyeline bakılmış ve HepG2 hücrelerinin klonojenik yeteneklerinin azalmasında tiloforin analoglarına daha hassas olduğu görülmüştür (71). Ayrıca HepG2 hücrelerinin KB hücrelerine göre klonojenite kaybına daha hassas olduğu da tespit edilmiştir (71, 111).

Ayrıca bu çalışmada DCB-3500, DCB-3501, DCB-3502 ve DCB-3503 bileşiklerinin etoposid, hidroksiurea ve kamptotesin'e dirençli olan parental insan nasofaringel karsinoma KB hücreleri ve KB variantlarına karşı tiloforin analogları ile eşdeğer etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2.15.) (56, 71).

Çizelge 2.15. KB hücreleri ve bunun drug-resistant hücrelerinin büyüme inhibisyonu üzerine DCB-3500, DCB-3501, DCB-3502 ve DCB-3503 bileşiklerinin EC₅₀ değerleri (71).

Hücre dizileri	A. EC ₅₀ ^a			
	DCB-3500 (nM)	DCB-3501 (nM)	DCB-3502 (nM)	DCB-3503 (Nm)
KB	12±3	106±84	234±91	28±4
KB-MDR ^b	14±5	143±82	282±138	26±8
KB-7D	12±7	225±206	527±80	45±10
KB-7D-Rev	11±6	70±57	289±188	25±10
KB-Hu-R	25±7	70±42	218±167	36±6
KB-Hu-Rev	16±4	45±4	127±95	28±16
KB-100	20±10	103±33	179±63	38±1
KB-100-Rev	10±3	118±31	247±122	41±9

^a Değerler 3 denemenin ±SD, her bir data üçlü tekrarlar elde edilmiş.; ^b MDR: multidrug-resistans.

HepG2 tümör ksenografları taşıyan nude farelere intra-peritaneol enjeksiyon ile DCB-3503 bileşiği her 8 saatte bir 6mg/kg olmak üzere 3 gün boyunca uygulandığında anlamlı tümör supresyonu (P<0.0001) saptanmıştır (71, 111). Konvensiyonel tümör ilaçlarının aksine 3µM konsantrasyonda DCB-3503 bileşiği HepG2 hücrelerinde DNA kırıklarına veya apoptoze neden olmamıştır. HepG2 hücrelerinde tiloforin analoglarının; albümin ekspresyonunu indüklemesi ve α-fetoprotein ekspresyonunu azaltması, bu analogların HepG2 farklılaşmasını uyarabileceğini düşündürmüştür. Dahası bu bileşiklerin KB ve HepG2 hücrelerinde hücre siklusuna etkisinin farklı olduğu görülmüştür. Gao ve arkadaşlarının yaptığı hayvan çalışmaları DCB-3503 uygulanan hayvanlarda tümör ksenograflarının büyümesini önemli derecede baskıladığı da gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sürpriz sonuç ise hücre büyüme inhibisyonuna karşı test edilen diğer dört tiloforin analoguna göre DCB-3500 bileşiğinin *in vitro* olarak en güçlü etkili bileşik olmasına rağmen; *in vivo* olarak DCB-3500 bileşiğinin DCB-3503 bileşiğinden daha az aktif çıkmış olmasıdır (71).

T. atrofolliculata türünden izole edilen tiloforidin D ve E tiloforininin ve tiloforinin'in N-oksitleri olan (+)-tiloforidin C ve (-)- tiloforidin F isimli alkaloidler *in vitro* olarak HTC-8 ve KB hücrelerine karşı test edilmiş ve sitotoksik aktiviteli oldukları belirlenmiştir (111). Tiloforidin E bileşiği insan akciğer (A549) ve kolon (Col2) karsinoma hücre dizilerine karşı (IC₅₀<0.01 µM) antitümör ilaç adriamisinden (IC₅₀ 0.2 ve 0.4 µM) daha aktif bulunmuştur (111, 114).

Wei ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada polar fenantren bazlı tiloforin türevlerini (PBTs) tasarlayarak sentezlemiş (46) ve potansiyel antitümör ajanlar

olarak A549 insan akciğer kanser hücre dizilerine karşı sitotoksik aktiviteleri için test etmiştir (46, 69). Kullanılan antitümör ilaçlar ile karşılaştırıldığında bu bileşiklerden *N*-(2,3 – metilendioksi - 6 - metoksi-fenantr-9- ilmetil)- L -2-piperidinmetanol ve *N* - (2,3-metilendioksi-6-metoksi-fenantr-9-ilmetil)-5-aminopentanol'ün sırasıyla 0.16 ve 0.27 µM konsantrasyonlarda IC₅₀ değerleri ile en yüksek sitotoksik potansiyeli gösterdiği bulunmuştur. Çalışma ekibinin ön tarama sonuçlarına göre tiloforin'in aminoasit prekürsörü olan polar aracı bileşik 15'in insan akciğer kanser hücre dizilerine karşı 2.2 µM konsantrasyonda IC₅₀ değeri ile belirgin sitotoksik aktiviteli olduğu tespit edilmiştir (46). Wei ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir diğer çalışmada yeni C-9 substituentli fenantren bazlı tiloforin türevlerinin (PBTs) oluşturulması, sentezi amaçlanmış ve 13-36 numaralı PBT'ler sentezlenmiştir. Bunlar *in vitro* antikanser ajanlar olarak insan A549 akciğer kanser hücre dizilerine karşı test edilmiştir. Aktif çıkan 12 numaralı bileşik daha ileri araştırmalar için DU-145 (prostat), ZR-751 (göğüs), KB (nasofaringel) ve KB-Vin (multidrug resistant KB alt dizileri) insan kanser hücre dizilerine karşı test edilmiştir. Bunların iki wild tip ve eşleşmiş multidrug resistant KB hücre dizilerine karşı kuvvetli sitotoksik aktiviteli olduğu; DU-145 ve ZR-751 kanseri hücre dizilerine karşı ise kayda değer seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sınıfın hareket mekanizmasının diğer kanser kemoterapötik bileşiklerinden oldukça farklı olduğu gözlenmiş ve üç PBT analogu ayrıca murin modeli ile de test edilmiştir. Bunlardan 24b (*N*-(2,3-Metilendioksi-6-metoksifenantr-9 - ilmetil) - L - 4 - piperidinem etanol hidroklorit) isimli alkaloid güçlü *in vitro* sitotoksik aktivite gösterirken; nude farelerde A549 insan akciğer kanser hücre ksenograft modellerinde ise ılımlı *in vivo* antitümör aktivite göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen PBT tuzları suda çözünen tiloforin türevleri olarak ilk kez rapor edilmiş ve özellikle multidrug resistant kanser hücre dizilerine karşı belirgin sitotoksik aktivite göstermiştir. Buna ek olarak 24b bileşiğinin murin modelinde toksik etkili olmaması hayvanlar için de toksik olmayacağına işaret ettiğinden antikanser etkili bileşik olarak umut vaat edici bulunmuştur (80).

Seko-fenantroindolizidin alkaloidler ailesi içerisinde yer alan tiloindisin I 1991 yılında *T. indica* bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilmiş ve kanser hücre dizilerine karşı düşük nanomolar aralıkta kuvvetli ve seçici sitotoksik etki göstermesi nedeniyle bağlantılı analogları ile birlikte sentezlenerek biyolojik aktiviteleri için test

edilmiştir. Yapılan çalışmalarda özellikle 6-aril-7-(4-(metiltiyo)fenil)-2,3,8,8a-tetrahidroindolizin-5(1*H*)-ones'lar üzerinde odaklanılmıştır. Kimball ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bu çalışmada 6,7-diaril-2,3,8,8a-tetrahidroindolizin-5(1*H*)-one kütüphanesi oluşturulmuş ve ilk kez kolon kanseri hücre dizisi HCT-116'ya karşı sitotoksik aktivitesi için test edilmiştir. Bu kütüphanede bulunan ve güney aromatik halkası değişmeden duran, kuzey aromatik halkası 4-metoksi grup taşıyan ana bileşik, 0.39 µM konsantrasyonda IC₅₀ değeri ile en kuvvetli sitotoksik etkiyi göstermiştir. 7-(4-metoksifenil)-7-fenil-2,3,8,8a-tetrahidroindolizin-5(1*H*)-one isimli 12. bu bileşik NCI tarafından 60 kanser hücre dizisi panelinde taranmış ve sub-mikromolar konsantrasyonlarda kolon kanseri ve lösemi hücre dizilerine karşı seçici toksisite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca NCI'nın 60 hücre dizisi testinin karşılaştırma analizlerinde içerisinde tiloindisin I'in de bulunduğu veri tabanındaki diğer antikanser ajanları ile karşılaştırıldığında 12. bileşik farklı bir mekanizma ile etkili bulunmuştur. Bu ilgi çekici sonuçlardan sonra 12. bileşik (NSC 707904) NCI tarafından *in vivo* Mouse hollow fiber testi için seçilmiş; içerisinde kolon kanseri hücre dizisinin (COLO 205) de bulunduğu 12 insan kanser hücre dizisi standart paneline karşı test edilmiş ve bu bileşik umut vaat edici aktivite göstermiştir (187).

Wang ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitlerinin ilk kez aza-modifikasyonu tasarlanarak iki aza-analoğu sentezlenmiştir. 13a-azatiloforin (**2**) ve 14a-aza-7-metoksikriptopleurin (**3**) isimli bu hedef moleküller ve bunların pikrik tuz türevleri (**27**, **28**) BEL-7402 insan karaciğer hücre dizisi ve MOLT-4 insan lösemi hücre dizisine karşı antikanser etkileri için test edilmiştir (Çizelge 2.16.). Sonuçta 14a-aza-7-metoksikriptopleurin bileşiğinin iyi antikanser etki gösterdiği, 13a-azatiloforin bileşiğinin ise zayıf inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca bunların tuz türevleri 27 ve 28'in aktivitelerinin ise ana moleküller olan aza-fenantroindo(kino)lizidinler 2 ve 4'e göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (84).

Çizelge 2.16. Kanser hücrelerinin büyüme inhibisyon değerleri (84).

Bileşikler	10^{-4} mol.L ⁻¹ /(%)		10^{-5} mol.L ⁻¹ /(%)	
	BEL-7402 ^a	MOLT-4 ^b	BEL-7402	MOLT-4
2	9.8	0	0	3.0
4	42.0	79.1	1.7	64.2
27	66.6	57.0	24.8	72.1
28	85.2	56.7	24.4	67.9

^a BEL-7402, insan karaciğer. ^b MOLT-4, insan lösemi

Damu ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *F. septica* türünün köklerinden elde edilen metanol ekstrenin kloroform fraksiyonununun yeni fikuseptinler E-N (1-10) ve bunlara ek olarak on bilinen bileşik olmak üzere toplam 20 fenantroindolizidin alkaloidi elde edilerek sitotoksik aktiviteleri için test edilmiştir. Bu bileşiklerin bazıları ayrıca gastrik adenokarsinoma (NUGC) ve nasofaringel karsinoma (HONE) hücre dizilerine karşı test edilmiş ve dehidrotiforin dışında test edilen diğer tüm bileşiklerin belirgin hücre büyüme inhibitör etkileri ile birlikte bariz sitotoksik etkisinin de olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak başka testlerle 13aR-antofin bileşiğinin <0.1 µg/mL konsantrasyonda ED₅₀ değeri ile L-1210, P-388, A-549 ve HCT-8 hücre dizilerine karşı en yüksek etkiyi gösterdiği belirlenmiştir (112).

Ueda ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *F. septica* türünün yapraklarından izole ettikleri fenantroindolizidin alkaloidleri ve *seco*-fenantroindolizidin alkaloidlerini Human servikal karsinoma HeLa hücreleri ve human malignant pleural mezotelioma ACC-MESO-1 hücre dizilerine karşı sitotoksik aktiviteleri için test etmiş ve fenantroindolizidin alkaloidlerinin HeLa hücrelerine karşı aktif fakat ACC-MESO-1 hücrelerine karşı ise inaktif olduğunu belirlemiştir (47).

Doğal oluşan tiloforin levojir (R)-enantiomer iken; Stoye ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, bunun optik antipodu sentezlenmiş ve bunun şaşırtıcı şekilde kanser hücre büyümesinde daha kuvvetli inhibitör etkili olduğu gösterilmiştir (180).

Min ve arkadaşlarının yaptığı bir önceki çalışma antofin'in insan kolon ve akciğer kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği fikrini akla getirmiştir. Ayrıca son dönemdeki çalışmalar antofin ve birçok sentetik antofin analogunun anti-proliferatif etkisinin yapı-aktivite bağlantılarına odaklanmıştır. İlk bulguların temelinde 2010 yılında Min ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada antofin'in antiproliferatif

etkisini ve *in vitro* ve *in vivo* hareket mekanizmalarını araştırmıştır. Çalışmada kullanılan antofin bileşiği *C. paniculatum* türünün köklerinin metanollü ekstresinden izole edilmiş ve insan akciğer kanseri [A549, Paklitaksel-resistant A549 (A549-PA)] ve NCI-H358), kolon kanseri (HCT 116, %-floroaçil-resistant HCT 116 (HCT 116-FU), HT-29, HTC-15 ve SW480), mide kanseri (SNU-638), göğüs kanseri (MDA-MB-231 ve T47D), prostat kanseri (PC-3 ve LNCaP), fibrosarkoma (HT-1080) ve lösemi (HL-60, K562) hücre dizileri gibi birçok insan kanser hücre dizisine karşı test edilmiştir. Sonuçta nanomolar aralıkta IC₅₀ değerleri ile kuvvetli antiproliferatif etkili olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.17.). Antofin, HCT 116 implante edilmiş ksenograf nude fare modelinde tümör büyümesini etkili şekilde baskılamıştır. Hepsi beraber düşünüldüğünde bu bulgular doğal ürünlerden kanser terapötik ajanlarının geliştirilmesinde antofin'in önemli bir kaynak olacağını göstermiştir.

Çizelge 2.17. İnsan kanser hücrelerinde proliferasyon üzerine antofin'in inhibitör etkisi (113).

Hücre dizileri	Sınıflama	IC ₅₀ (nM)			
		Antofin	Paklitaksel	Vinblastin	Kamptotesin
HCT 116	Kolon Kanseri Hücreleri	6.3	10.6	1.4	54.0
HT-29	Kolon Kanseri Hücreleri	10.8	6.9	0.9	166.7
A549	Akciğer Kanseri Hücreleri	9.6	1.4	17.0	168.4
NCI-H358	Akciğer Kanseri Hücreleri	7.0	9.9	1.2	41.1
MDA-MB-231	Göğüs Kanseri hücreleri	12.2	>100	>1000	>500
T47D	Göğüs Kanseri hücreleri	19.7	17.5	>100	61.3
SNU-638	Mide Kanseri Hücreleri	8.9	5.7	2.2	18.7
HT-1080	Fibrosarkoma	7.1	9.9	0.8	148
HL-60	Lösemi	10.7	10.0	1.0	15.1
A549-PA	İlaç-dirençli Akciğer Kanseri Hücreleri	8.9	312.2	NT ^a	NT
HCT 116-FU	İlaç-dirençli Akciğer Kanseri Hücreleri	8.3 ^b	NT	NT	NT

^a test edilmemiş; ^b HCT 116 ve HCT 116-FU hücrelerinde 5-FU nun IC₅₀ değeri 19.4 µM ve 200 µM'in üzerindedir. (200 µM 5-FU da hayatta kalma yüzdesi % 78.3 dür)

Test edilen tüm hücre dizilerinde antofin'in 30 nM'in altında IC₅₀ değeri ile birçok insan kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Kanser terapisinin başarısında multi-drug resistans en önemli engeldir. Antofin'in drug-resistant kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkisinin parental kanser hücrelerindeki ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Antofin'in büyüme inhibe edici etkisi normal hücrelere göre kanserli hücrelere karşı daha güçlü bulunmuştur. Hücre proliferasyonunun

düzenlenmesi genel olarak hücre siklusunun ilerlemesinin kontrolü ile olacağından buda siklinler/cdks komplekslerinin ve/veya bunların bağlantılı proteinlerinin aktivitesinin inhibisyonu veya arttırılması şeklinde olmaktadır. Sonuç olarak antofin'in çeşitli insan kanser hücre dizilerine karşı kuvvetli antiproliferatif etki gösterdiği konusunda mutabakata varılmıştır. Bu inhibitör etki geleneksel antikanser ajanları ile ya benzer veya onlardan daha kuvvetlidir ve daha önce literatürlerde tanımlanan diğer fenantroindolizidin alkaloidi tiloforin ile karşılaştırıldığında antofin'in antiproliferatif etkisi daha barizdir (113).

Ikeda ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada kuvvetli sitotoksik etkili fenantroindolizidin alkaloidi olan ve son dönemde kelebekten (*I. similis*) izole edilen bir bileşiğin asimetrik total sentezi başarılı ve çeşitli insan kanser hücre dizilerine karşı dikkate değer sitotoksikite gösterdiği belirlenmiştir. Bu bileşiğin yapısal özelliği C14 pozisyonunda hidroksil grup taşımaktadır ve ayrıca dikkat çekici bir diğer yanı ise benzersiz orjini, kuvvetli sitotoksikitesi ve yapısal özelliğidir. Bileşiğin diğer bir benzersiz yönü ise klinikte kullanılan diğer antitümör ajanlara göre farklı bir antitümör mekanizmaya sahip olmasıdır. Ikeda ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada kuvvetli sitotoksik etkili bu fenantroindolizidin alkaloidinin asimetrik total sentezini başarmış; aynı yöntemi kullanarak çeşitli türevlerini sentezlenmiş ve *in vitro* sitotoksikitesi ve *in vivo* antitümör aktivitesi için test etmiştir. Çalışmanın sonucunda 19, 23 ve 27. bileşiklerin bu alkaloid ile benzer şekilde kuvvetli sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir. Seçilen bileşiklerin *in vivo* antitümör etkileri de araştırılmış ve 23 numaralı alkaloidin orta dereceli antitümör etkili olduğu belirlenmiştir (43).

Yang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada yeni heterolaktam birleşmiş antofin ve kriptopleurin analogları tasarlanarak sentezlenmiş ve beş kanser hücre dizisine karşı test edilmiştir. İki yeni S-13-okso analogunun sırasıyla 9 nM ve 20 nM konsantrasyonlarda GI₅₀ değeri ile *in vitro* olarak güçlü hücre büyüme inhibisyonu gösterdiği belirlenmiştir. İlginç olanı ise her iki bileşiğin farklı kanser hücre dizilerine karşı doğal oluşan antofin ve kriptopleurin'in aksine geliştirilmiş seçicilik göstermiş olmasıdır (188).

S-(+)-deoksitiloforininin (CAT) yeni bir fenantroindolizidin alkaloidi olup *T. atrofolliculata* ve *T. ovata* türlerinin köklerinden izole edilmiştir. Liu ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada bu bileşiğin *in vitro* ve *in vivo* olarak

antikanser aktivitesi test edilmiş ve inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) 10⁻⁷ mol/l değerinde bir çok tümör hücre dizisine (insan gastrik kanseri-BGC823; insan karaciğer kanseri-Be17402; insan kolon kanseri-HCT-8; insan ovaryum kanseri-A2780; insan akciğer kanseri-A549; insan melanoma-A375; insan nöroblastoma-SH-SY-5Y; insan glioma-BT-325; insan glioma-U251 hücre dizileri ve rat feokromositoma-PC12 hücre dizileri) karşı *in vitro* olarak güçlü antikanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2.18.).

Çizelge 2.18. Çeşitli kanser hücre dizilerinde CAT'ın *in vitro* büyüme inhibisyonu (54).

IC ₅₀ (10 ⁻⁷ mol/l)	
	A2780
	A375
	A549
	BGC823
	HCT8
	HepG2
	MCF-7
	SH-3Y-5Y
	SW1990
	U251
CAT	
	3.42± 0.58
	3.7± 0.45
	2.98±0.41
	6.18± 0.80
	1.16± 0.29
	1.45± 0.44
	9.11± 2.46
	1.84± 0.20
	5.16± 0.93
	3.34± 1.04

Not: Veriler üç bağımsız denemenin ortalamasını göstermektedir. ±SD

CAT yerine CAT'ın sitratları kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmaların farmakodinamik ölçümleri H22 mürin hepatoma ksenograflarına karşı bu bileşiğin güçlü antikanser aktiviteli olduğunu göstermiştir (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT'ın 15 mg/kg da % 75.90 ve 12.5 mg/kg'ında % 48.37) (Çizelge 2.19.) (54).

Çizelge 2.19. H22 mürin hepatoma ksenografları üzerine CAT'ın etkileri (54).

Grup	Doz (mg/kgXd)	Hayvan sayısı (başlangıç/sonda)	Vücut ağırlığı(g) (başlangıç/sonda)	Tümör ağırlığı (g,±SD)	İnhibisyon (%)
Kontrol		9/9	26.56±0.88/35.22±4.87	1.03±0.46	
CTX (i.p.)	100x1	8/8	26.13±0.64/29.00±1.60	0.07±0.04	93.47**
CAT düşük	10.0x4	9/9	26.11±0.78/25.00±5.39	0.83±0.52	19.22
CAT orta	12.5x4	9/9	26.00±0.71/20.33±2.24	0.53±0.20	48.37*
CAT yüksek	15.0x4	9/6	25.89±0.93/19.50±2.74	0.25±0.14	75.90**

Not: **p*<0.05; ***p*<0.01 kontrol grupları ile karşılaştırıldığında.

Fenantroindolizidin alkaloitlerine ilgi antitümör aktiviteleri nedeniyle başlamıştır (54, 189). Ancak bu moleküllerin özgün biyomoleküler hedefleri hala tam olarak belirlenememiştir (44, 54). Bu nedenle antitümör hücre büyümesi ve hücre döngüsünün engellenmesi arasındaki bağlantının anlaşılabilmesi için fenantroindolizidin alkaloitlerinin spesifik interaksyonları ve bağlantıları üzerine daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (179). Cesaret veren son çalışmalar tiloforin analoglarının benzersiz hareket mekanizmalarının mevcut antikanser ilaçlarından farklı olduğunu göstermiştir (64, 111, 114). Ayrıca tiloforin'in hem drug-sensitive hem de MDR kanser hücre dizilerine karşı eşsiz hareket mekanizması ile sitotoksik etkili olduğu da yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (70, 114). Timidilat sentaz, dihidrofolat redüktaz ve NF- κ B gibi rapor edilen hedeflerine ek olarak nükleik asitler: DNA ve RNA'nın da bu bileşiklerin diğer öncelikli hedefleri arasında olduğundan şüphelenilmiş ve bunlarla birlikte farklı mekanizmaları da çalışılmıştır (54). Örneğin HepG2 hücrelerinde belirgin DNA ayrılmalarına veya apoptosiz'e neden olma, protein'in up ve down-regülasyon'unun özel-ayırıcı-belirgin modelini indüklemeye ve anahtar sinyalizasyon yollarının çeşitliliğini inhibe etme bu alkaloitlerin tespit edilen mekanizmalarından bazılarıdır (111).

Bu alkaloitlerin antitümör ve antiinflamatuvar aktivitelerinin moleküler hareket mekanizmaları ile ilgili devam eden çalışmalarda; protein sentezi ve nükleik asit sentezi üzerine inhibitör etki, siklik AMP respons elementleri (CREs), aktivatör protein-1 (AP-1) ve NF- κ B bağlanma yerleri tarafından kontrol edilen RNA transkripsiyonu üzerine inhibitör etki (75, 114), apoptosiz indüksiyonu, timidilat sentaz (TS) ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) inhibisyonu, tiloforin B ile bulged DNA arasında seçici interaksyon (114) ve siklin D1, siklin B1 ve CDK4 gibi protein alt kümelerinin ekspresyonunu baskılama yetenekleri (75) gibi çeşitli mekanizmalarının olduğu görülmüştür.

2.4. *Vincetoxicum* Türü İçeren Homeopatik Preparatlar ve İlgili Araştırmalar

Amerika Homeopatik Farmakopesi'nde (HPUS) (1979) içeriği listelenmiş olan ve tamamlayıcı tıpta sıklıkla enfeksiyon hastalıklarının profilaktik tedavisinde kullanılan Engystol[®] (189), *V. hirundinaria* ve sülfürün çeşitli dilüsyonlarını içeren [*V.*

hirundinaria: 10⁻⁶(D6), 10⁻¹⁰(D10) ve 10⁻³⁰(D30) ve sülfür: 10⁻⁴(D4) ve 10⁻¹⁰(D10)] kompleks homeopatik bir preparattır (189-191) ve tablet veya enjeksiyon solüsyonları şeklinde kullanılmaktadır. *V. hirundinaria* tamamlayıcı tıpta konak savunma mekanizmalarının uyarıcısı olarak kullanılırken; sülfür ise sıklıkla akut ve kronik hastalıkların homeopatik tedavisinde kullanılan yaygın bir bileşendir (189).

Yapılan gözlem çalışmalarına göre Engystol® klinik semptomları azaltmak ve daha hızlı rahatlatmak için kullanılan güvenilir terapotik bir preparattır (190). Bu nedenle bu homeopatik preparatın muhtemel etki mekanizmalarının araştırıldığı çeşitli çalışmalara rastlanmaktadır. Engystol®'ün profilaktik yararları; grip ve soğuk algınlığı gibi solunum yolu enfeksiyonlarında bu preparatın klinik çalışmaları sonucunda elde edilmiştir (189). Yapılan çalışmalar özellikle fagositik aktiviteyi, granülosit fonksiyonunu ve gelişmiş humoral cevap üzerine immünostimulatör etkiyi göstermektedir (189, 190). Dahası son *in vitro* analizler Engystol®'ün virüs parçacıkları ile direk etkileşime girdiğini ve immün sistem üzerine muhtemel etkilerini azalttığını belirlemiştir. Bunu ise immün hücrelerinde interferon- γ üretimini artırarak oluşturduğu düşünülmektedir (189).

Doğuştan gelen immün cevap vücudu patojenlere karşı savunmada ilk nöbetçilerdir. Bu anlamda konağın antiviral cevabı interferonların (IFNs) üretimidir. İki tür IFN vardır. Bunlar Tip I veya viral IFN'ler (IFN- α , IFN- β ve IFN-III) ve Tip II IFN (IFN- γ) dir. Tip I IFN'nin sentezi IFN-indüklenmiş faktörler (IRFs) üzerinden hareketle viral enfeksiyonlarla tetiklenirken Tip II IFN ise mitojenik veya antijenik uyarılar ile indüklenmektedir. IFN üretiminin regülasyonu; virüs suşuna, enfekte konak hücre çeşidine ve IFN tipine bağlıdır (190). Örneğin interferon- γ ; herper T-hücreleri, sitotoksik T-hücreleri, doğal killer hücreler ve diğerleri gibi çeşitli hücrelerde üretilmektedir. Üretim, antijenle spesifik kontak kurulması ile veya biyolojik veya kimyasal orijinli maddelerin neden olduğu özgü olmayan stimülasyonla indüklenebilmektedir. Bu nedenle Engystol® uygulamalarının *in vitro* olarak T-lenfositlerde interferon- γ üretiminin sayısını artırdığı düşünülmüştür (189).

Enbergs'in 2006 yılında yaptığı bir çalışmada homeopatik preparat Engystol®'ün T-lenfositlerde interferon- γ üretimi üzerine etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. 30 sağlıklı-gönüllü insandan lenfositler izole edilmiş ve interferon- γ üreten hücre yüzdesi floresans ile aktif edilmiş hücre sıralamasına göre analiz edilmiştir. Hücrelere farklı

konsantrasyonlarda NaCl (kontrol) veya Engystol[®] uygulanmıştır. Engystol[®]'ün tüm konsantrasyonlarının interferon- γ üreten lenfositlerin yüzdesini belirgin şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu aşamada interferon- γ üretiminin artışı immün sistemin aktivasyonunu göstermiştir. Çalışmada test edilen konsantrasyonlarda etkinin doza bağlı olmadığı da belirlenmiştir. Ayrıca uygulama yapılmayan lenfositlerde interferon- γ üretiminin yüzdesi 20.9 ± 10.5 aralığında iken Engystol[®] uygulananlarda ise bu değer $> \% 24$ olduğu gözlenmiştir (Çizelge 2.20.). Çalışmanın sonucunda interferon- γ üreten hücrelerin yüzdesi kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (189).

Çizelge 2.20. Engystol[®]'ün farklı dilüsyonlarının ve kontrolün (NaCl solüsyonu) uygulanmasından sonra interferon- γ salınımı yapan T-lenfositlerin yüzdesi (189).

	Engystol [®]					
	Kontrol	% 100	% 60	% 20	% 10	% 2
IFN- γ salgılayan hücrelerin % si	20.9 ± 10.5	25.5 ± 10.1	25.2 ± 9.4	25.0 ± 10.2	24.5 ± 9.0	25.9 ± 9.4
Kontrol ile karşılaştırma için P	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Roeska ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada Engystol[®] (ES) ve Gripp-Heel[®] (GH) [içeriği: *Aconitum* (D4), *Byronia* (D3), *Lachesis* (D11), *Eupatorium perfoliatum* (D2) ve fosfor (D4)] medikasyonları pre-treatment (profilaktik treatment protokol) ve devam eden (terapotik treatment protokol) plak redüksiyon testleri kullanılarak antiviral aktiviteleri için test edilmiştir. Bu iki kompleks ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda *Herpes simplex* virüsü, Adenovirüs, Influenza A virüsü, RSV (insan respiratuvar sinsityal virüs), Parainfluenza virüsü, Rhinovirüs ve Cocksackievirüs gibi insan solunum yolu virüs panellerine karşı *in vitro* olarak infektiviteyi azalttığı gösterilmiştir. Engystol[®] ve Gripp-Heel[®] çeşitli solunum yolu virüslerinin replikasyonunu inhibe etmektedir. Bu çalışmada ilk kez; iki medikasyonun epitel hücre dizilerine ilaveten immün sistem hücrelerinde de (PBMCs) IFN üretimini stimüle edebileceğinin gösterilmesi amaçlanmış ve çalışmada Human rhinovirüs B serotip 14 (HRV-14), Influenza A virüsü (FluA), *Herpes simplex* virüsü 1 (HSV-1, thea strain), insan respiratuvar sinsityal virüs (RSV, long suşu), Parainfluenza tip 3 (Para 3) ve Adenovirüs tip 5 (Ad5) virüsleri kullanılmıştır. En düşük dilüsyonda (1:5) 48 saat pre-

inkübasyona tabi tutulduklarında FluA (ES: % 20.7; GH: % 15.4); HRV-14 (ES: % 25.9; GH: % 18.8) ve HSV-1 (ES: % 19.6; GH: % 15.9) değerleri ile çok düşük profilaktik virüs inhibisyonu göstermiştir. Bu aşamada doza-cevap bağlantıları gözlenmemiş ve daha kısa inkübasyon zamanlarında etki görülmemiştir. Bunun aksine test preparatlarının varlığında hücrelerin inkübasyonuna devam edildiğinde pre-inkübasyon zamanına ve virüse bağlı olarak doza-bağımlı infektivite aralığının % 20'den % 44'e kadar azaldığı gözlenmiştir. Engystol® ve Gripp-Heel®; FluA, HRV-14, HSV-1, Ad5 ve Para 3 virüslerine karşı doza-bağımlı antiviral aktivite göstermiştir. Engystol® sadece Para 3'e (1:5 dilüsyonda, % 20.7) karşı moderat etkili bulunmuştur. Bunun aksine RSV'nin viral replikasyonunun doza-bağımlı inhibisyonu Gripp-Heel®'de tespit edilirken Engystol® için böyle bir durum tespit edilememiştir. FluA da her iki preparasyon 48 saat pre-inkübasyona bırakıldığında en yüksek etkinliği (1:5 dilüsyonda ES: % 25.7 ve GH: % 44.6) göstermiştir. HSV-1; 24 saat pre-inkübasyona tabi tutulduktan sonra en iyi etkiyi (1:5 dilüsyonda, ES: % 30.4 ve GH: % 30.7) göstermiştir. Ad5'de 2 saatte en yüksek inhibisyon (1:5 dilüsyonda, ES: % 30.5; GH: % 31.3) gözlenirken HRV-14 en uzun pre-inkübasyon (24-48 saat) süresi sonunda en iyi etkiyi (1:5 dilüsyonda, ES: % 39.2 ve GH: % 28.6) göstermiştir. Sonuç olarak her iki medikasyon RSV hariç (RSV Engystol® tarafından inhibe edilememiştir) test edilen altı solunum yolu virüsüne karşı kayda değer inhibitör aktiviteli bulunmuştur. Ayrıca epitel HeLa hücrelerinde sadece HRV Tip 1 IFN üretimini inhibe etmiştir. Bu çalışmada Engystol® ve Gripp-Heel®'in, HRV ile aktive edilmiş HeLa hücrelerinde IFN salınımını arttırdığı ve replikasyon-eksik HSV ile astarlanmış başlıca immün hücrelerinde Tip 1 IFN salınımını uyardığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar ile Engystol® yapısal olarak geniş aralıkta, virüslere (DNA ve RNA) karşı daha etkili bulunmuş ve Engystol® ve Gripp-Heel®'in virüslerin (zarflı veya zarfsız) konak savunma mekanizmasını modüle ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak bu çalışmada Engystol®'ün Tip 1 IFN üretimini viral yapılara maruz kalmadan arttırıp arttırmadığı incelenmiş ve test organizmalarında spontan IFN salınımını indüklediği görülmüştür. Co-stimüle edilmiş HeLa hücrelerinde ve özellikle inaktive edilmiş PBMCs lerede Engystol® ve Gripp-Heel®'in Tip 1 IFN üretimini arttırdığı gösterilmiştir (190).

2010 yılında yapılan bir başka çalışmada ise Clausen ve arkadaşları tüm denemeleri virüs, bakteri, fungi, protozoa ve metazoa ile enfekte olmuş bitki, hayvan ve

insanlara uygulanmış, 1832 den Nisan 2009 yılına kadar kayıtlı toplam 1359 homeopati çalışmasını içeren, çok geniş bir kaynak olan HomBRex (Homeopathy Basic Research experiments) veritabanından yararlanarak Engystol®'ünde içerisinde olduğu bazı homeopatik komplekslerin *in vitro* olarak etkinliğini araştırmıştır. Bu çalışmada insan hücre dizileri üzerine araştırmalar Çizelge 2.21. de ve hayvan hücre dizilerine (fare, köpek, maymun) uygulanmış tüm denemeler ise Çizelge 2.22. de özetlenmiştir (191).

Çizelge 2.21. İnsan hücre dizilerinde enfeksiyon denemelerinin özeti (191).

Hücre dizileri	n	Patojen	Terapötik maddeler	Gözlenen parametreler	Sonuç
Hep-2	4	Human respiratory syncytial virüs (RSV)	ECS, ECSN, <i>Euph.</i> (D3), <i>Puls.</i> (D3). Engystol®, Gripp-Heel®	Plak redüksiyonu, doku kültürünün enfeksiyon dozunun belirlenmesi, viral proteinlerin transkripsiyonu	Pozitif
Hep-2		RSV	<i>Luf-op.</i> (D4)	Plak redüksiyonu	Negatif
Hep-2		Herpes simplex virüs 1	ECS, ECSN, Engystol®, Gripp-Heel®	Plak redüksiyonu, viral proteinlerin transkripsiyonu, doku kültürünün enfeksiyon dozunun belirlenmesi	Pozitif
Hep-2		Human parainfluenza virüs	Gripp-Heel	Plak redüksiyonu	Pozitif
Hep-2		Adenovirüs	Engystol®, Gripp-Heel®	Viral proteinlerin transkripsiyonu, doku kültürünün enfeksiyon dozunun belirlenmesi, sitopatojenik etkiler	Pozitif
HeLa	4	Human rhinovirüs tip 14 (HRV-14)	Engystol®, Gripp-Heel®	Plak redüksiyonu, doku kültürünün enfeksiyon dozunun belirlenmesi,	Pozitif
HeLa		HRV-14	ECSN	Plak redüksiyonu	Negatif
HeLa		Adenovirüs	Adenovirüs (nosode)	Spesifik insan proteininin transkripsiyonu	Pozitif

n: Deneme sayısı.

Bu çalışmada Engystol®'ün HSV ve Adenovirüs ile enfekte edilen insan Hep-2 hücrelerinde viral aktiviteyi % 70-80 oranında baskıladığı görülmüştür. Bu sonuçlara rağmen klinik çalışmalar ve vaka serileri viral enfeksiyonlarda Engystol®'ün etkinliğini ve solunum yolu enfeksiyonlarında kullanımı için katı esasları işaret etmektedir.

Bunun aksine Engystol®'un RSV ile enfekte insan hücre dizilerinde plak sayısını % 40 ve enfeksiyon dozunu % 20 azaltarak direk antiviral aktivite gösterdiği gibi aksi sonuçlar da rapor edilmiştir. Her ne kadar klinik çalışmalarda Engystol®'ün

sadece pozitif immunostümulan etkisinden bahsedilse de doğrudan antiviral aktivitesinin olmadığı, çünkü RSV-antijeninin eliminasyonunu arttırmadığı gözlenmiştir (191).

Çizelge 2.22. Hayvan hücre dizilerinde (Çeşitli türlerde) enfeksiyon denemelerinin özeti (191).

Konak hücre orjini	n	Patojen	Terapötik maddeler	Hücre dizileri	Gözlenen parametreler	Sonuç
Fare	1	<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> (nosode)	Makrofajlar	Amastigotların yaşaması	Negatif
Köpek	3	İnfluenza A	Çeşitli homeopatik kompleksler : Engystol [®] , ECS, ECSN,	MDCK	Plak redüksiyonu, doku kültürünün enfeksiyon dozunun belirlenmesi	Negatif
	1		Gripp-Heel [®]		Hemagglutinasyon testi	Pozitif
Maymun	1	Coxsackie virüs B4	Komplex ilaç	Maymun böbrek hücreleri	Virüs replikasyonu	Negatif
Maymun	1	Coxsackie virüs A9	Gripp-Heel [®]	Bufalo yeşil maymun böbrek hücreleri	Plak redüksiyonu	Pozitif

n:deneme sayısı

2.5. *Vincetoxicum* Cinsine Ait Bazı Türlerin Yayılma Özelliği ve Çevreye Etkileri

Olağan üstü yayılma ve çoğalma yeteneklerinden dolayı istilacı karasal otlar yerli türlerin çeşitliliğini sınırlamış ve peyzajı korumayı ve saklamayı zorlaştırmıştır. 2000 yılında yapılan bir çalışma yerli olmayan türlerin Amerika Birleşik Devletleri'ne maliyetinin yıllık 138 milyar dolardan fazla olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada çevresel ve sağlık maliyetlerine değinilmemiş, sadece ekonomik zarar ve kontrol maliyeti üzerinde durulmuştur. Her ne kadar çevresel sonuçlar tam olarak tahmin edilemiyor olsa da yerli türlerle aktif yer değiştirmeyi yerli olmayan türlerin istilası izlemiş ve bu da biyo-çeşitliliğin kaybına neden olarak maliyeti oldukça yükseltmiştir. Elton ve diğer ekologlar biyolojik istilanın son 100 yılda, normalde olduğundan çok daha hızlı olduğunu tespit etmiştir. Biyolojik istilanın bu hızla devam etmesi durumunda biyolojik sistemin kısa sürede oldukça homojenize hale geleceği ve

sonrasında bazı yerli türlerin zamanla azalarak yok olacağı da yine bu ekologlar tarafından ortaya atılmıştır (27).

Yerli bitki türlerinin kaybının biyo-çeşitliliği azaltarak geciktirdiği veya başka taraflara yönlendirerek vahşi hayattaki habitatın değerini düşürdüğü gözlenmiştir (12). Günümüzde birçok ekosistemin yüz yüze olduğu büyük potansiyel tehlikelerden bir tanesi de ekzotik bitki türlerinin istilası olarak belirlenmiştir (192). Yerli olmayan istilacı türlerin doğal habitatları bozduğu ve dünya genelinde tüm ekosistemlerde tür çeşitliliğini azalttığı tespit edilmiştir (23). Bu nedenle istilacı bitkilerin hem bitki hem de hayvan komüniteleri üzerine önemli etkilerinin olduğu bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (192).

Vincetoxicum cinsine ait türlerin deniz kenarları, otlaklar, ağaçlık alanlar, bataklıklar gibi oldukça farklı (25) ve genellikle nemli ama ıslak ve güneşli olmayan (11) habitatlarda yetiştiği görülmüştür. Bu türlerin geniş aralıkta nem ve ışığa toleranslı olduğu da gözlenmiştir (15). Birçok *Vincetoxicum* türü iç döllenme düzeyinin yüksek olması nedeniyle oldukça yayılmacıdır (10). *V. nigrum* (16), *V. hirundinaria* (11) ve *V. rossicum* türleri otsu ve çok yıllıktır (11, 13, 16, 22). Bu türlerin özellikle kıraç yerlerde, tarlalarda, yol kenarlarında, ağaçlık-açık ve bozulmuş alanlarda her yıl tepeden uca kuruyan ve yeniden yeşeren, kalabalık popülasyonlar halinde bulunduğu bildirilmiştir (11). Bu türler kuvvetli sürgünlerle desteklenmiş geniş fibrilli gelişmiş kök sistemine sahip olup (11, 20); bu kökler horizontal odunsu, sap köklü; geniş, biraz etli, liflidir (15, 27). Bir mevsimde gövdesi 1-2 metreye kadar uzayabilen *V. nigrum* türünün derin rizomlarla klonal olarak yayıldığı gözlenmiştir (12). Bu türün vejetatif rizomlarla çoğaldığı bildirilmiş olmasına rağmen benzer durum *V. rossicum* türü için tespit edilememiştir (11). Kökün tepesinde sürgünleri verecek; çok sayıda, çok yıllık tomurcuğun geliştiği ve bu sürgünlerin yıllık davranışlarını sürdürmesi için bitkiye yardımcı olduğu görülmüştür. Fakat bu durumun türün yayılması için birincil yol olmadığı da belirtilmiştir. Ayrıca eğer ana toprak üstü gövdeler tahrip edilirse tomurcukların çoklu aksiler sürgünler vermek üzere çimlenmeye hazır olduğu da tespit edilmiştir (15, 27). *Asclepiadaceae* familyasının floral yapısı oldukça özelleşmiş böcek tozlaşmasına sebep olduğundan bu avantajın dış döllenmenin gelişimini desteklediği düşünülmüştür. *Vincetoxicum* cinsine ait türler üzerinde yapılan çalışmalarda *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin self-fertil olduğu bildirilmiştir. *V. hirundinaria* türünün

ise karışık dölleme sistemine sahip olduğu (10, 35) ve böceklerle tozlaştığı gözlenmiştir (35). *Asclepiadaceae* familyasının diğer üyelerinde olduğu gibi bu türlerin tohumlarının da rüzgarla taşındığı belirlenmiştir (12). Tohumların genellikle poliembriyonik yapıda olduğu ve bir tohumdan birden fazla (6 kadar çıkabilen) genetik olarak bir birinin aynısı bitki olduğu kaydedilmiştir (27). Son dönemde *V. rossicum* türü üzerinde yapılan çalışmalarda bu türün hem tohumlarla hem de kök başlarının üzerindeki tomurcuklar yardımıyla ürettiği ve yayıldığı görülmüştür (15, 27). Bu türün ayrıca küme şeklinde tohum ürettiği (13) ve yeni alanlara bu tohumlarla taşındığı tespit edilmiştir (12). Birçok tohum ana bitkinin birkaç metre uzağına düşerken bazen de hava yardımıyla yüzlerce metre uzağına gidebildiği gözlenmiştir (13). Bu türlerde tohumların rüzgarla taşınması (13, 27) uzun mesafelere dağılmasını ve çimlenmeyi kolaylaştırmıştır (27). Ayrıca *V. rossicum* türünün, ortam şartları büyüme ve üreme için uygun olmadığında otur ve bekle veya aralıklı faz stratejisini kullandığı da saptanmıştır (15). Sonuç olarak bu türlerin geniş yaprakları; kök sistemi; yetişkin, rüzgarla taşınan tohumları ve çeşitli habitatlara çok rahat uyum sağlama yetenekleri nedeniyle doğal ekosistemleri tehdit ettiği belirlenmiştir (193).

Kuzey Amerika'daki istilacı türler arasında *V. nigrum*, *V. rossicum* ve *V. hirundinaria* türleri başta olmak üzere *Vincetoxicum*'un üç Avrupalı türünün bulunduğu saptanmıştır (12, 20, 192). Bu üç türden *V. rossicum* türünün *V. nigrum* ve *V. hirundinaria* türlerine göre daha istilacı olduğu ve daima büyük koloniler halinde bulunduğu gözlenmiştir (20). *V. nigrum* ve *V. rossicum* türlerinin kuzeydoğu Amerika ve komşusu güneydoğu Kanada'da doğal ve yarı-doğal alanlarda istilacı olduğu belirlenmiştir (192). Ayrıca bu türlerin Avrasya kıtasında ve Orta Baltık Denizi'nin ada ve sahil bölgelerinde doğal olarak yayıldığı bildirilmiştir (10). *V. rossicum* ve *V. nigrum* türleri muhtemelen süs bitkisi olarak 1800'lerin ortasında veya sonlarında Kuzey Amerika'da ortaya çıkmıştır (13, 66). *V. nigrum* türünün Kuzey Amerika'da ilk herbaryum örneği 1854 yılında Ipswich, Essex County, Massachusetts, Amerika'dan toplanmıştır (192). *V. rossicum* türü ile ise Kuzey Amerika 1800'lerin sonlarında tanışmıştır (13, 15). *V. rossicum* türünün Kanada'dan ilk kez 1889 yılında Toronto yol ayrımı, Ontario'da toplandığı kayda geçmiştir (192). 1890'larda Kuzey Amerika'nın New York Eyaleti'ndeki Nassau ve Monroe şehirlerinden bu türün toplanması ile ilk kez bu eyalette bu türe rastlandığı bildirilmiştir (27). 1897 yılında ise Kuzey-doğu

Amerika'da Rochester yakınlarından ve Long Island, New York'dan ilk kez toplandığı rapor edilmiştir (192). Kuzey Amerika'da *V. nigrum* ve *V. rossicum* türlerinin istilacı potansiyelleri 1970'lere kadar kaygı verici şekilde artmış ve son 20 yılda her iki türde hızlı bir genişleme görülmüştür. Bu istilacı türlerin New England'dan Maryland'e kadar, batıdan Nebraska ve Kansas'a kadar, son raporlarda ise Kaliforniya'ya kadar Amerika'da 21 eyalette ve Kanada da ise Ontario ve Quebec'de hızla yayıldığı bildirilmiştir (66). Kuzey Amerika'da istilacı olan bu iki türün ayrıca tarımda da artan problematik yabancı türler haline geldiği tespit edilmiştir (16, 192). 2012 yılında yapılan bir araştırmada *V. nigrum* ve *V. rossicum* türlerinin Natural Resource Conservation Service tarafından zararlı ot veya yasaklı istilacı olarak listelendiği bildirilmiştir (194).

V. hirundinaria türünün yayılma alanı Avrasya kıtası olarak belirlenmiştir (166). Bu türün Avrupa ve batı Asya'ya özgü olmasına rağmen Kuzey Amerika ve Kanada'da yetiştiği görülmüştür (11, 167). İsveç'te *V. hirundinaria* türüne geniş palaeartik bölgenin kuzey-güney saçakları boyunca rastlanmış olup; geniş Baltık adaları Öland ve Gotland'da çok yaygın olmak üzere; Baltık sahili boyunca kısmen bölük pörçük ve Malaren Gölü'nün iç kısımları boyunca doğal olarak yayıldığı gözlenmiştir (35, 36, 166, 167). Ayrıca Finlandiya'nın güneybatı karalarında ve Aland Adası'nı da içine alan güneydoğu takımadalarında görüldüğü de bildirilmiştir (166).

V. nigrum türünün Fransa, İspanya, Portekiz ve İtalya'da yerli tür olduğu ve ormanlık yamaçlardaki kalkerli topraklarda yetiştiği belirlenmiştir (16). Bu türün batı Akdeniz bölgesinin yerli türü olmasına ek olarak Kuzey Amerika'da *V. rossicum* türünden daha geniş alanlara yayıldığı da görülmüş ve güney Ontario'dan güney Pennsylvania'ya kadar; kuzeydoğu Atlantik kıyılarından Missouri'ye kadar ve Kansas'tan batıya kadar pek çok alanda bulunduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (192)

V. rossicum türü Ukrayna ve güneybatı Avrupa-Rusya'sında yerli tür olmasına rağmen (16, 192); buralarda ormanlık geçitlerle sınırlı kaldığı bildirilmiştir (16). Bu türün Atlantik kıyılarının doğusundan güney Michigan'a ve kuzey İndiana'ya; güney Ontario Kanada'dan, güneye, güney Pennsylvania'ya kadar olan doğal ve yarı doğal komünitelerde çok hızlı yayılış gösterdiği gözlenmiştir (15, 22, 27, 192). Bunlara ek olarak doğuda Maine'den batıda Iowa'ya kadar olan alanlarda görüldüğü de kayıtlara geçmiştir (192). Ayrıca son on yıl da bu istilacı türün Great Lake Havzası

ekosistemindeki doğal ve yarı doğal sistemlerde giderek artan bir problem haline geldiği görülmüştür (23, 27). Bu türün sık populasyonlar halinde büyük alanları kapladığı, diğer vejetasyonları rekabet dışı bırakarak; faunal ve floral biyo-çeşitliliği azalttığı bildirilmiştir (27) Kuzey Amerika’da bu türün bahçeleri, çimenlik alanları, fundalıkları, ağaçlık çitleri, çitlerin her iki tarafındaki ekilmeyen alanları, çalılıkları, karışık yapraklı ormanları ve otlakları istila ettiği görülmüştür (12, 27). *V. rossicum* türünün eski alanlarda ve açık alt bitki örtüsünde sık sık monokültür şeklinde bulunduğu belirlenmiştir (13). Bu türün içlerinde *Asclepias* cinsine ait türlerin de bulunduğu diğer otsu bitkilerin büyümesini baskılayarak monodominant hale geldiği, bu şekilde doğal alanlara yayıldığı ve günümüzde güney Ontario ve kuzeydoğu Amerika boyunca lkalize populasyonlar halinde bulunduğu tespit edilmiştir (193). Devam eden çalışmalarda *V. rossicum* türünün kök ekstresinin geniş spektrumlu antifungal aktivite gösterdiğinin belirlenmesiyle; dolaylı yoldan değişen rizosfer komünitelerine etkisinin vejetasyon rekabetini etkileyebildiği fikri ortaya atılmıştır (13).

V. rossicum türünün kontrolsüz olarak yayılmasının, habitatlardaki inektivor memeliler ve kuşlar için ekolojik öneme sahip olduğu belirlenmiştir (24). New York Eyaleti’nde bulunan ve dünya çapında nadir alvar habitatlarından (ör: sığ kireç taşı ve kıraç arazileri) biri olan Great Lake havzasında *V. rossicum* türünün istilasının; bitki, böcek, kuş ve toprak salyangozu gibi 54 nadir türü tehdit ettiği bildirilmiştir (192). İstila yeteneğine bağlı olarak alvar sisteminde *V. rossicum* türünün monospesifik hale geçmesinin, yerli çayır kuşlarının yuva yapma yerlerini bozduğu (16, 22-24, 195) ve yok olma tehlikesi ile karşı karşıya olan bitki türlerini tehdit ettiği saptanmıştır (23). Anektodal verilerde ise *V. rossicum* populasyonlarının yaz aylarında çayır kuşlarını yuva yapmaktan vazgeçirdiği, kış aylarında ise ölü kütüklerin altına sığınan küçük kemirgenleri raptor predasyonundan koruduğu öne sürülmüştür (14). New York Eyaleti’nin yanı sıra Kanada’da bu türün alvar komünitelerini tehdit etmeye başladığı gözlenmiştir (14, 27). *V. rossicum* türünün New York, Onadaga yakınlarında bulunan Split Rock’da federal olarak listelenmiş Geyik Dili eğreltisi, *Phyllitis scolopendrium* var. *americanum* Fernald türünü sararak varlığını tehdit ettiği (12, 14, 27); *V. nigrum* türünün ise benzer şekilde federal nesli tükenme tehlikesi ile karşı karşıya olan endemik türlerden Jessop’s milkvetch olarak bilinen *Astragalus robbinsii* (Oakes) Gray türünü tehdit ettiği belirlenmiştir (12, 14, 195). Bu verilerin aksine sadece Connecticut’da

V.rossicum türü *Asclepias viridiflora* Raf. populasyonu tarafından tehdit edilen tehlike altındaki türlerden biri olarak kayıtlara geçmiştir (12). Ontario'da (Kanada) eski tarlalarda kontrolsüz olarak yayılan arthropod çeşitliliğini, geniş yerli vejetasyonların bulunduğu alanlara göre gözle görülür şekilde azaltmıştır (16, 22, 27, 196). Bu nedenle yerli eski tarla bitkilerinin yer değiştirmesinin bu şekilde devam etmesi durumunda arthropod çeşitliliğindeki azalmanın da devam edeceği düşüncesi ağır basmıştır. Son zamanlarda merkez ve batı New York Eyaleti'ndeki birçok şehirde mısır ve soya tarlalarında bu türün görüldüğü saptanmıştır (27). Yılbaşı ağacı yetiştiricileri özellikle son on yılda *V. rossicum* türünün New York Eyaleti'ndeki plantasyon alanlarında baskısını giderek arttığını bildirmiştir (14, 27). Ayrıca restorasyon alanlarındaki küçük ağaçların bu türlerin tırmanıcı-sarılcı gövdeleri tarafından boğulduğu da gözlenmiştir (27).

Oldukça istilacı ve saldırgan olan bu türlerin zararlı etkileri sadece doğal ve yarı-doğal habitatlarda yerli bitki ve hayvan türlerini tehdit ederek yerine geçme ve rekabet üstünlüğü sağlama potansiyeli ile sınırlı kalmamıştır. Ayrıca monarch kelebeğini (*Danaus plexippus* L.) (Lepidoptera: Nymphalidae, Danainae) yumurtlaması için cezp etme potansiyeline sahip olduğu da görülmüştür (192). *V. rossicum* türü monarchlar için popülasyon bataklığı olarak ifade edilmektedir, çünkü bu türün larva gelişimine uygun olmamasına rağmen ovipozisyon için dişi monarchlara çekici ve özendirici geldiği tespit edilmiştir (12, 22, 195). Monarch kelebeğinin doğal konak bitkisi yerli *Asclepias syriaca* L. türü olup bu tür üzerine yumurta bıraktığı bildirilmiştir (15, 24). Fakat her iki türün bulunduğu eski tarla habitatlarında, *V. rossicum* türünün *A. syriaca* türü ile rekabet ederek yer değiştirdiği ve bu durumun kaygı verici boyutlara ulaştığı gözlenmiştir (22). Ayrıca Kuzey Amerika'da bu iki istilacı türün bulunduğu bölgelerde monarch kelebeklerinin popülasyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (192). Konak bitki uygunluğunu azaltarak oviposizyon yerlerini değiştirme ve larval mortalite gibi nedenlerle monarch kelebeklerinin popülasyonu üzerine bu türün negatif etkisi olduğu saptanmıştır (14, 27). Tüm bu veriler ışığında bu türlerin varlığının; larva gelişimini önleme, yumurtlamayı bozma ve yerli konaklar ile rekabeti etkileme yolu ile yerli kelebekleri tehdit ettiği sonucuna varılmıştır (23). *V. nigrum* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda da *V. rossicum* türü ile benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Monarch larvalarının *A. syriaca* türünü yiyecek kaynağı olarak tercih ettiği bilinmesine rağmen; 1998 yılında

Hanibal ve Renwick tarafından yapılan seçmeli laboratuvar testlerinde, larvaların gelişimini tamamlayamamasına rağmen dişi monarch kelebeğinin *V. nigrum* türü üzerine de yumurta bıraktığı keşfedilmiştir. Ayrıca yine bu araştırmacılar Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı lokasyonlarda *V. nigrum* türünün, bu larvaların konak bitkisi *Asclepias* cinsine ait türlerinde içerisinde bulunduğu birçok yerli bitki türüyle yer değiştirdiğini bildirmiştir (12).

Kuzey Avrupa'da *Pinus* türleri üzerinde *Cronartium* pasına (12, 197, 198) ve resin-top'a neden olan Avrupa pas fungusu *Cronartium flaccidum* (Alb. & Schwein.) G. Winter için *C. vincetoxicum* türünün alternatif konak olduğu (14, 27) gözlenmiştir. Ayrıca Avrupa'da *Cronartium asclepiadeum* (Wildenow) Fries türünün de *C. vincetoxicum* türünü sardığı belirlenmiştir (14). Bu fungus makrosiklik, bir canlıdan diğerine geçebilen, pas oluşturan beş spor evresi ve konak değişimi olan (*C. flaccidum* türünün tespit edilen konakları: *Melampyrum* sp., *Loasa* sp., *Nemesia* sp., *Paeonia* sp., *Pedicularis* sp., *Tropaeolum* sp. ve *Vincetoxicum* sp.) ve periyodik olarak Avrupa'da *Pinus* sp. türleri üzerinde ciddi epidemilere neden olan bir tür olarak kayıtlara geçmiştir (198).

Vincetoxicum türlerinin iyileşmesi ve büyümesi ile ilgili çok az veri olmasına rağmen abiyotik sabitlerin habitatların istila yeteneğinde baskın rol oynadığı ve uygun çevre şartlarında istilacıların biyotik sabitlerin üstesinden gelebilecekleri düşünülmüştür (15). Bazı çalışmalarda *V. rossicum* türünün varlığının arbuskular mikorizal fungal (AMF) komüniteleri değiştirdiği tespit edilmiştir (15, 22). Ayrıca *V. rossicum* türünün mikoriza ve benzeri mutualistlere sahip olması gibi bir takım mekanizmalarının türün rekabet yeteneğini ve yayılma hızını arttırdığı da gözlenmiştir (13). Topraktaki AMF'nin yapı ve aktivite değişikliğinin; uzun dönemde ekosistemin yapı ve fonksiyonu üzerine etkisi henüz tam olarak belirlenememiştir. Ama Greipsson ve DiTommaso tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada Merkez New York Eyaleti'nde bulunan birçok tezat habitatta *V. rossicum* türünün; izlenen kolonilerinde AMF toprak komünitelerinin aktivitesinin ve kompozisyonunun değiştiği ortaya çıkartılmıştır (192).

Yapılan bazı çalışmalarda çok zehirli olan *V. hirundinaria* türünün özelleşmiş herbivorlara sahip olduğu (10); *V. rossicum* türünün ise ürüne zararlı, çeşitli böcekler için konakçı olarak iş gördüğü bildirilmiştir (14, 27). *V. hirundinaria* türünün çok geniş miktarda nektar ürettiği ve bu durumun ziyaretçilere çekici geldiği belirlenmiştir. Bu

türlerin böcek palinasyonuna oldukça özelleşmiş oldukları, başlıca büyük sinekler ve güveler tarafından tozlaştıkları ve ayrıca sık sık arılar tarafından da ziyaret edildikleri tespit edilmiştir (166). Bu türlerin yaprak ve tohumlarından beslenen bazı böcekler olmasına rağmen Avrupa’da birçok böceğin bitkinin yapraklarında bulunan toksinler nedeniyle bu tür üzerinde nadiren beslendiği veya küçük bitki kısımları ile beslenerek bu tür üzerine özelleştiği görülmüştür. Bu böcek beslenicilerinin bazılarının polifagus olduğu tespit edilmiş ve bu nedenle bazı araştırmacılar tarafından bu türlerin belirli böcek türleri üzerinden etkili biyolojik kontrollerinin yapılabileceği fikri ortaya atılmıştır (27).

Son araştırmalara göre Ağustos 2004 de Rochester Demokrat ve Cronicle Gazeteleri Ontario şehri çevresinde bu türlerin kontrolsüz yayılışından ve arazi sahiplerinin bu tür ile mücadelede karşılaştıkları zorluklardan bahsetmiştir (27). *V. hirundinaria* ve *V. rossicum* türleri oldukça yayılcı türler olup kök sisteminin gelişmiş olması ve vejetatif köklerden filizlerin çıkması nedeniyle kesme, otlatma veya tohum oluşumunu önleyecek şekilde biçme ile bu türlerin yayılmasının önüne geçebileceği düşünülmüştür. Yapılan bazı çalışmalarda bitkinin yakılmasının etkili bir yöntem olmadığı görülmüştür. Özellikle tohum oluşmadan önce tekrar tekrar herbisit kullanımının etkili olabileceği gözlenmiştir. Ayrıca gövdeyi keserek küçük parazit enfeksiyonlar oluşturmanın da bu türlerle mücadelede tavsiye edilebileceği bildirilmiştir (11). İskandinavya’da yapılan birçok otlatma çalışmasında koyunların *C. vincetoxicum* türünü yemediği veya nadiren yediği doğrulanmıştır. Bu durum koyunların bu türü yedikten sonra öldüğü şeklindeki önceki raporları da desteklememiştir (14). Ama yinede otlaklarda inek ve koyunların bu türleri yiyerek büyümelerini kontrol edebileceği önerisi; New York ve Rhode Island’da terk edilmiş otlaklarda bu türlerin hızlı yayılmasının önüne geçememiştir (12). Bu türlerle mücadelede herbisit kullanımı da önerilmiştir. Lowlor ve Raynal tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada glifosfat ve triklopir isimli iki sistemik herbisitin etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Merkez New York’da *V. rossicum* türünün kontrol popülasyonlarında bu herbisitler yaprağa püskürtülmüş veya kesilmiş gövdelere uygulanmış ve örtme, biokütleyi azaltma ve kesik gövde uygulamasına göre yaprak-sprey uygulamasının daha etkili olduğu gözlenmiştir. Otlatma ve ayak altında çiğneme gibi yöntemlerin ise; *V. rossicum* türünde gövde yaprak ekseninden veya kök baş tomurcuklarından fişkırmayı uyardığı; glifosfat

uygulaması ile kazma ve elle çekme yöntemleri karşılaştırıldığında ise kazma işleminin bu türlerin büyümesini kontrol etmede en etkili yöntem olduğu görülmüştür. Bu türlerde kök tepesinin parçalanması bir diğer mücadele şekli olarak önerilmiş fakat kuru toprak şartlarında bile yeniden kök oluşabildiğinden yerleşik bitkilerin öldürülmesinde bu yöntemde de kesin bir başarı sağlanamamıştır. Yerleşik bitkiden tohum kapsüllerinin elle uzaklaştırılması ise daha fazla tohumun dağılmasını önleyebileceğinden etkili bir yöntem olarak ortaya atılmıştır. Ayrıca *V. rossicum* türünün kontrolünde kültürel mücadelenin sınırlı olduğu, tekrarlanan biçmenin ise bitki yüksekliğinde bir miktar azalmaya neden olsa da bu türlerin yüzeyde kapladığı alanda genel bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Sonuç olarak oldukça saldırgan ve yayılcı olan bu türlerin kontrolünde uygun yöntemi bulmanın zor olduğu ve tek bir strateji belirlemenin ise mümkün olmadığı görülmüştür (27).

Leimu ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada küçük *V. hirundinaria* popülasyonlarında polen kalitesi ve pollinia yer değiştirmesinin büyük popülasyonlarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun tersine polen miktarı büyük popülasyonlarda küçük popülasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur. Büyük popülasyonlarda kabuk initasyonu ve abortus oranlarının daha yüksek olduğu da görülmüştür. Kabuk ve tohum üretimi bitki büyüklüğü ile pozitif korelasyon göstermesine rağmen bitki büyüklüğü dişi üreme başarısını etkilememiştir. Ayrıca tohum predasyonunun infloresans büyüklüğü ile arttığı da tespit edilmiştir (166).

Vincetoxicum cinsi Avustralya ve Meksika'da yaşayan iki *Danaus* türünü içerisine alan Danainae kelebeklerinin konak bitkisi olarak bildirilmiştir. Kuzey Amerika'da ise monarch kelebeklerinin bu egzotik türü yeni bir konak olarak kullanabileceği fikri ortaya atılmış ve Mattila ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir saha çalışmasında monarch kelebekleri gözlemlenmiştir. Gözlemler sırasında dişilerin *V. rossicum* türü tarafından cezp edildiği görülmüş, fiili yumurtlama ve yapraklarda yumurta varlığı keşfedilmiştir. Fakat bu çekimin nedeni ve etkinliği tam olarak anlaşılamamıştır. Amerika'da yaz aylarının sonuna doğru monarch kelebeklerinin *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin bulunduğu alanlarda *Cynanchum* cinsine ait türlerin yapraklarını tercih ettiği gözlenmiştir. *Asclepias* ve *Vincetoxicum* cinslerine ait türler üzerinde yapılan kimyasal çalışmalarda flavonol glikozitler izole edilmiş ve monarch kelebeklerinde yumurtlama stimulanı olarak konak bitkilerin

tanınmasından sorumlu bileşikler olarak belirlenmiştir. *V. nigrum* türünün *A. syriaca* türüne göre daha düşük miktarlarda flavanol glikozit içerdiği bilinmesine rağmen *V. rossicum* türü ile ilgili benzer bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürlere uygun olup seçmeli testlerde *V. nigrum* türü üzerine monarch kelebeklerinin yumurta bıraktığı, fakat bunun az sayıda kelebek tarafından yapıldığı görülmüştür. Bu durum türlerde bulunan farklı flavonoit profilinin bir yansıması olarak düşünülmüştür. Başka bir çalışmada ise *V. nigrum* türü üzerinde bulunan yumurtalardan çıkan larvaların hayatta kalamadığı tespit edilmiştir (193).

V. rossicum ve *V. nigrum* türleri ve bunların rekabet ettiği yerli konakları, *A. syriaca* türleri üzerine yapılmış birçok karşılaştırma çalışması bulunmasına rağmen, bu iki tür ile monarch kelebeği, *D. plexippus* türünün larva beslenme tercihi ve yumurtlama seçimi ilk kez DiTommaso ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. 2003 yılında yapılan bu çalışmada bu iki istilacı türün monarch kelebek popülasyonlarını azaltma potansiyelleri; yetişkin monarch kelebeklerinde yumurtlama seçimi ve larva beslenme tercihi değerlendirilerek seçmeli testlerle *A. syriaca* ve iki *Vincetoxicum* türü karşılaştırılarak incelenmiştir. Seçmeli ve seçmeli olmayan testlerde iki *Vincetoxicum* türü üzerine yumurta bırakılmadığı; *A. syriaca* türü üzerine ise dişi başına 66'dan fazla yumurta bırakıldığı gözlenmiştir. Tüm ilk instar larvalar *A. syriaca* üzerinden beslenmelerine izin verildiğinde 48 saat hayatta kalırken; *V. rossicum* (% 44) ve *V. nigrum* (% 14) türleri üzerinde ise az sayıda larvanın hayatta kaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca *Vincetoxicum* türleri üzerinde yaşayan larvaların ağırlık ortalamasının, *A. syriaca* türü üzerinde yaşayanlara göre belirgin şekilde daha düşük olduğu saptanmıştır. İki *Vincetoxicum* türü kendi aralarında karşılaştırıldığında ise larvaların ağırlık ortalamalarının değişmediği görülmüştür. Ayrıca *Vincetoxicum* türleri üzerinde beslenenlere göre *A. syriaca* üzerinde beslenen larvaların harcadığı ortalama yaprak miktarının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular; *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin monarch kelebeklerinin geçerli konakları olmadığını ve yumurtlama bataklığı olarak bunların popülasyonlarını beklenenden daha az doğrudan tehdit ettiğini şaşırtıcı şekilde göstermiştir. Başka araştırmacıların yaptığı bir kafes çalışmasında ise *V. rossicum* (% 0.5) ve *V. nigrum* (% 21.7) türleri üzerinde yumurtlama değerleri yüksek bulunmuş olmasına rağmen; *A. syriaca* türüne yakın

alanlarda bulunan *V. nigrum* türleri üzerinde bozulmamış monarch yumurtaları da saptanmıştır (192).

Cappuccino ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bir gözlem çalışmasında olgun *V. rossicum* türlerinin sonbaharda 0.5 ila 2.0 m yüksekliğe kadar erişebildiği, köklerden çok sayıda gövdenin oluştuğu, bu türün rizomlarla yayılmadığı, birçok *Asclepias* türü ile karşılaştırıldığında meyve ve tohum oluşumunun yüksek olduğu, yaz sonunda ve sonbaharda küme şeklindeki tohumların foliküllerden dağıldığı, bu türün polenlerinin birçok *Asclepias* türünde olduğu gibi pollinia adı verilen ayrılmış paketler içerisine konuşlandığı, her çiçekte on pollinia'nın çift halinde bağlanarak el merceği ile görülebilen beş pollinaria'yı oluşturduğu belirlenmiştir. Çiçeklerde kayıp pollinaria'lar gözlenmiş olup; bu durum türün potansiyel pollinatörler tarafından ziyaret edildiğini göstermiştir (13).

Son zamanlarda New York Eyaletinde tarım faaliyetlerinde, yol kenarları ve doğal alanların düzenlenmesinde zorluk çıkartan ve kontrolleri için yıllık milyonlarca dolar harcanan birçok istilacı egzotik tür saptanmıştır. Weston ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada özellikle son yıllarda problem haline gelen ve içlerinde *V. rossicum* türünün de bulunduğu çok yıllık üç tür (*Polygonum cuspidatum*, *Artemisia vulgaris* and *V. rossicum*) detaylı olarak incelenmiştir. *V. rossicum* türünün tipik olarak kalkerli toprakları tercih ettiği görülmüş olup; Ontario ve batı Kanada'da öncelikle kireç taşı, dik kaya, ağaçlı yüksek arazilerin derin killi kısımları ve boğazların kayalık veya sığ topraklı kısımları üzerinde yetiştikleri bildirilmiştir. Merkez New York Eyaletinde ise bu türün habitatının kuru, güneşli, nemli ve gölgeliye kadar değişen aralıklarda olduğu görülmüştür. Popülasyonlar; ağaçlı boğazların geçit yatağındaki sığ topraklara, derin yumuşak veya iyi geçirgen alüvyon topraklara, kalkerli kayalar ve sert eğimli yerlere, alüvyal ağaçlık, çayır ve otlaklara yayılmıştır. Kuzey Amerika'da *V. rossicum* türünün tahrip edilmiş çorak alanlarda yetiştiği; isteyerek güneşli açık alanları, çalılık habitatları ve çitleri istila ettiği tespit edilmiştir. İlk saptamalara göre daha az tahrip olmuş habitatların yakınına doğru isteyerek hareket ettikleri de gözlenmiştir. Bitki yoğunluğunun; orman saçakları altındaki gölgelik habitatlarda, güneşli lokasyonlara göre daha düşük olduğu ve ormanlık alanlarda diğer bitkilerin üretken olmadığı alanlarda uzun yıllar üretken olmak için uygun ışık şartlarında ısrar edebildikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada *V. rossicum* türünün tohum üretimi ile alınan

ışık miktarının bağlantılı olduğu da saptanmıştır. New York'da gölgede yetişen sürgünlerin güneşte ve açık alanlarda yetişenlere göre daha az yaşayabilir tohum ürettiği, ayrıca Kuzey Amerika'da bulunan bazı *Vincetoxicum* türlerinin tohumlarının az geliştiği ve tabakalanmadan çimlendiği gözlenmiştir. Oysa tohumların tabakalanmasına izin verilirse büyük çimlenme yüzdelere ulaşıldığı da bildirilmiştir. Merkez New York bölgesinde *V. rossicum* türünün Ağustos ayı sonlarına doğru toplanan tohumlarına göre Kasım ayı gibi olgunlaştıktan sonra toplanan tohumlarının uyuduğu ve tabakalandıktan sonra büyük oranlarda çimlenme gösterdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada Merkez New York eyaletinde eski tarlalarda ve ormanlık alanlarda *V. rossicum* türünün yerleşik AMF popülasyonları ile simbiyotik birliktelik kurduğu da gözlenmiştir. *V. rossicum* türü tarafından kolonize edilen alanlardaki toprakların, bitişik non-kolonize alanlardaki topraklardan daha büyük mikorizal inokulum potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum toprağın mikrobiyal komünitesinin çeşitliliği ve kompozisyonu üzerine etkisi yoluyla ile bu türün yerleşik vejetasyonların yer değiştirmesine katkıda bulunabileceği düşüncesini desteklemiştir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda son dönemde yapılan araştırmalar bu saldırgan türün farklı habitatlarda yayılmasına aracılık eden AMF'nin oynadığı rolü belirlemeye odaklanmıştır (27).

V. hirundinaria çiçeklerinin büyük bölümünün nektar hırsızları çok sayıda böcek tarafından ziyaret edildiği bir çok çalışmada belirtilmiştir (167). Buna rağmen *Vincetoxicum* cinsinin polinatörleri üzerine sınırlı bilgiler kaydedilmiştir. Son moleküler filogenetik çalışmalar *Vincetoxicum* cinsinin *Tylophora* cinsi ile yakın akraba olduğunu göstermiş ve bu cinsle ilgili monofiletik gruplar oluşturulmuştur. Yamashiro ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada önceki moleküler filogenetik çalışmalar ışığında 18 *Vincetoxicum* türünün ve 7 *Tylophora* türünün pollinasyon sisteminin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada incelenen 18 *Vincetoxicum* türü iki monofiletik gruba ayrılmış ve gruplardan biri 3 *Vincetoxicum* türünü ve 7 *Tylophora* (I. Grup) türünü içermiş; diğer grup ise geriye kalan 15 *Vincetoxicum* türünü içermiştir (II. Grup). I. Gruptaki türlerin çoğu ince, nektarsız çiçekli iken II. gruptakiler ise büyük, nektar salgılayan çiçekli türler olarak sınıflandırılmış ve bu nedenle I. ve II. gruptaki türlerin pollinatörlerinin farklı olması beklenmiştir. Çalışma sonucunda 14 *Vincetoxicum* türünün Coleoptera, Diptera, Hymenoptera ve Lepidoptera olmak üzere 4 sınıfa ait böcekler tarafından ziyaret edilmekle birlikte; bu cinste Diptera ve Lepidoptera

pollinasyonunun baskın olduğu görülmüştür. Sciaridae türlerinin *V. japonicum*, *V. katoi* ve *V. sublaceolatum* var. *sublaceolatum* türlerinin polenlerini taşıdığı gözlenirken; güve pollinasyonu 4 *Vincetoxicum* türünde (*V. ambiguum*, *V. amplexicaule*, *V. austrokiusinaum* ve *V. yonakuniense*) gözlenmiştir. Çayır sineği (Tipulidae) ve güvelerin *V. pycnostelma* türünün polenlerini taşıdığı da belirlenmiştir. *V. atratum* ve *V. sublaceolatum* var. *macranthum* türleri gün boyunca başlıca Anthomyiidae, Calliphoridae, Ephydriidae ve Muscidae'a ait sinek türleri tarafından ziyaret edilmiştir. *V. magnificum* türünün çiçekleri ise çayır sinekleri tarafından gece ziyaret edilmiş, fakat bunların ziyaret sıklıklarının az olduğu bildirilmiştir. *V. nipponicum* türü güveler ve sivrisinekler tarafından gün boyunca ziyaret edilmekle birlikte, ayrıca gecede ziyaret edilmiştir. Birçok güvenin *V. nipponicum* türünün çiçeklerini ziyaret ettiği gözlenmesine rağmen bunların hortumlarına yapışmış polen taneleri gözlenmemiştir. Fakat sadece bir çayır sineğinin *V. nipponicum* türünün polenlerini taşıdığı tespit edilmiştir. Ayrıca *Vincetoxicum* cinsine ait 16 türden en büyük çiçeklere sahip olan *V. acuminatum* türü Coleoptera, Diptera, Hymenoptera ve Lepidoptera sınıflarına ait ziyaretçiler tarafından gün boyunca ziyaret edilmiştir. Bu türde ayrıca teke böcekleri ve süprüntü sinekleri tarafından ziyarette sıklıkla gözlenmiştir. *V. calcareum* türünün çiçekleri üzerinde anthomyiid sineği ve emfit sineği gibi birçok dipteran böceği gözlenmesine rağmen çalışma ekibi tarafından polen taşıyan böcek yakalanamamıştır. *V. macrophyllum* ve *V. yamanakae* türlerinde gözlem süresince çiçek ziyaretçilerine rastlanmamıştır. Bir başka çalışmada ise Ollerton ve arkadaşları tarafından *V. hirundinaria*, *V. nigrum* ve *V. rossicum* türleri sinek polinasyonu için gözlenmiş ve bu cinsten sinek polinasyonunun baskın olduğu bildirilmiştir (25). Bu cinsin ana polinatörlerinden biri olan en büyük emfit sineği *Empis tessellata* türü çok uzun uçuş periyoduna sahip, iyi bir uçucu olup çok uzak mesafelere kadar uçabildiği belirlenmiştir (167).

Jürgens ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada 8 cins (*Cynanchum*, *Funastrum*, *Gonolobus*, *Metastelma*, *Oxypetalum*, *Orthosia*, *Sarcostemma* ve *Vincetoxicum*) ait 15 bitki türünün floral uçucu bileşikleri araştırılmış ve koku kimyası ve kokunun polinatörü cezp etmedeki rolü araştırılmıştır. Çalışmada 170 uçucu bileşik taranmış, birçoğu çok farklı bitki türünde bulunan ve oldukça yaygın floral koku bileşikler olan 128'i belirlenmiştir. İncelenen türler 1) monoterpenlerce (linalool, Z/E-

asimen) baskın olan türler ve 2) benzenoitlerce (benzaldehit, fenilasetaldehit, 2-feniletıl asetat) baskın olan türler olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Her iki kemotipdeki türlerin başlıca Hymenoptera ve Lepidoptera ile tozlaştığı ve muhtemelen bu böceklerin hem monoterpenler hem de benzenoitler tarafından etkin olarak cezp edildiği varsayılmıştır. Başka bir seçenekte ise benzenoitce baskın olan bitki türlerinin belki de farklı pollinatör alt kümelerini monoterpence baskın olan türlere göre daha çok cezp ettiği düşünülmüştür. Çalışılan türlerden biri olan *V. hirundinaria* türünde yüksek miktarda benzenoitler bulunmuştur. *V. hirundinaria* türünün farklı Diptera, bazı Hymenoptera ve Lepidoptera (Nymphalidae ve Noctuidae) ile genel olarak tozlaştığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bütün bu böceklerin belki de *V. hirundinaria* türü tarafından yayılan ve özellikle benzenoit bileşiklerinden kaynaklanan güçlü koku nedeniyle cezp edildikleri varsayılmıştır. Çiçeklerinin güçlü kokusundan sorumlu fenilasetaldehit bileşiğinin Lepidoptera ve sivrisinekleri cezp etmekten sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca önceki çalışmalardan nokturnal güve *A. asclepiadis* türünün düzenli olarak *V. hirundinaria* türünü nektar için ziyaret ettiği görülmüştür. *V. hirundinaria* türünün kokulu bileşiklerini hem gece hem de gündüz yaydığı da bu çalışmada belirlenmiş ve ayrıca yüksek düzeyde benzilasetat ve fenilasetaldehit saldığı tespit edilmiştir ki bunlar bir çok araştırmacı tarafından güve türleri için güçlü cezp ediciler olarak bildirilmiştir (154).

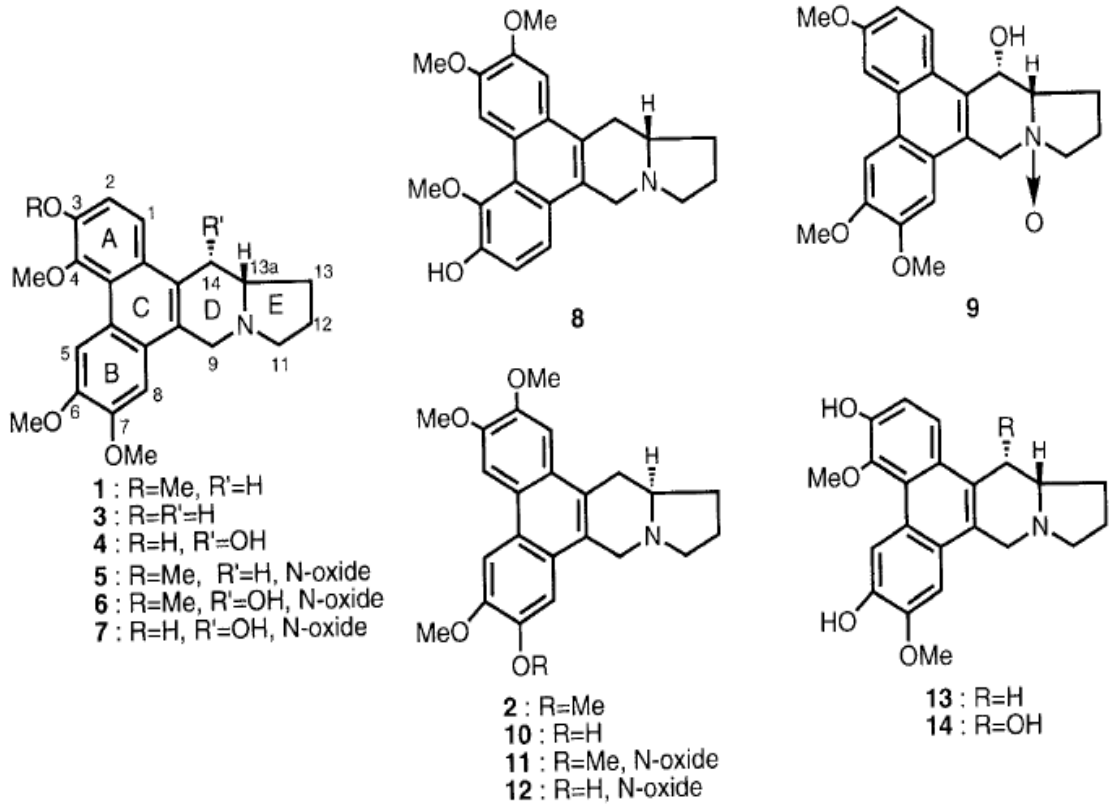
V. rossicum türünün allelopatik özelliklerini araştıran yayınlanmış bir çalışmaya rastlanmamış olmasına rağmen (27), bu özelliğinin ağaçlık vejetasyon desteği bulunmayan açık alanlarda bu türün müthiş başarısını açıklamaya yardımcı olacağı düşünülmüştür (13, 27). Bir çok araştırmacı tarafından rekabetin nedeninin aydınlatılması için bu durumun daha ileri şekilde araştırılmasının gerekli olduğu ve bu araştırmaların ise özellikle *Vincetoxicum* türlerinin kompleks sekonder metabolitleri üzerine yoğunlaşması gerektiği belirtilmiştir (27). *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin çoklu büyüme, üreme karakteristiği göstermesi ve türlerin istila yeteneğinde bu metabolitlerin önemli rol oynadığı düşünülmüş ve Gibson ve arkadaşları tarafından 2011 yılında bu türler üzerinde yapılan fitotoksisite çalışmalarında; her iki türün köklerinde, yapraklarında ve tohumlarında bulunan fenantroindolizidin alkaloiti (-)-antofin'in μM konsantrasyonlarda kök büyümesini büyük oranda inhibe ettiği görülmüştür. Oldukça biyoaktif fitokimyasal bir bileşik olan (-)-antofin'in köklerde ve

tohum dokularında bulunmasının bu türlerin istila yeteneğinde potansiyel allelopatik rolünü gösterdiği belirtilmiştir (66).

2.6. Fenantroindolizidin Alkaloitleri ile İlgili Yapı-Aktivite Çalışmaları

1935 yılında ilk izole edildiklerinden bu yana fenantroindolizidin alkaloitleri çeşitli ve güçlü farmakolojik etkileri nedeniyle sentezi, modifikasyonu ve yapı-aktivite bağlantıları (SAR) hedeflenen bileşiklerdir (75). Bu grup bileşikler; kan-beyin bariyeri boyunca ilaç transferini önlediğinden, daha çok moleküler farmakolojik çalışmalara odaklanılmış, polarite ve hidrofilitesi gibi fiziksel özellikleri geliştirilmeye çalışılmıştır (179). Fakat bu alkaloitlerin protein ve nükleik asit sentezini inhibe etmeye dayalı sitotoksitelerine rağmen yapı aktivite bağlantıları tam olarak çalışılmamıştır (45). Bazı araştırmalarda fenantroindolizidin alkaloitlerinin ve bazı sentetik ara ürünlerinin yapı-aktivite korelasyonları doğrulanmıştır (65). Yapılan yapı-aktivite çalışmalarına rağmen fenantroindolizidin alkaloitlerinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak netleşmemiştir. Dahası bu alkaloitlerin yapı-aktivite bağlantıları ve biyolojik fonksiyonları ile ilgili analizler ve bilgiler hala çok azdır (51). Son dönemde yapılan çalışmalar multidrug-rezistant kanser hücre dizilerinin fenantroindolizidin *N*-oksitlere hassas olduğunu göstermiştir. Kemoterapotik ajanlara rezistansın gelişmesi kanser hastalarında büyük oranda ölüme neden olduğundan bu bulgular fenantroindolizidin alkaloitlerinin terapötik öncüler olarak potansiyellerinin ve yapı-aktivite bağlantılarının önemine bir kez daha vurgu yapmıştır (45).

Abe ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yapılan bir çalışmada *T. tanakae* türünün yapraklarının ve gövdelerinin metanollü ekstresinin benzen ve kloroform fraksiyonlarından iki alkaloit *N*-oksit [(-)-tiloforin (**2**) ve 7-demetiltioforin (**10**) alkaloitlerinin *N*-oksitleri sırasıyla 11 ve 12 nolu bileşikler] ve ileri araştırmalarda ise polar fraksiyonlardan iki yeni alkaloit (**13**, **14**) izole edilmiştir (Şekil 2.49.). *T. tanakae* türünden 4'ü yeni olmak üzere izole edilmiş olan 14 tilofora alkaloitinin 10'u ile birlikte *N*-oksitlerinin sitotoksik aktiviteleri için 5 farklı kanser hücre dizisine karşı test edilmiş ve *N*-oksitlerin aktiviteyi önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 2.23.).



Şekil 2.49. *T. tanakae* türünün metanollü ekstresinden izole edilen alkaloidler (103).

Çalışmada fenantren yapıda (ör: 14 α -hidroksi-3-demetilizotilokrebrin) bir serbest hidroksil grup taşıyan alkaloidler, iki hidroksil grup taşıyan veya hiç taşımayanlara (ör: (+)-14 α -hidroksi-3,6-didemetilizotilokrebrin veya (+)-izokrebrin) göre daha kuvvetli etkili bulunurken ve 14 α -hidroksi-3-demetilizotilokrebrin de olduğu gibi 14 α -hidroksi grup'un varlığının etkinliği arttırdığı da tespit edilmiştir. (S) serisi alkaloidlerin (13 β -H), (R) serisi [13 α -H, tipik örnek: (-)-tiloforin] alkaloidler ile karşılaştırıldığında daha yüksek aktivite göstermesi de ileri çalışmaların yapılması gerektiğini bir kez daha ortaya koymuştur (103, 104).

Çizelge 2.23. Kanser hücre kültürlerine ^a (GI₅₀: ng/ml) alkaloidlerin sitotoksik aktiviteleri (103).

Bileşikler	PC-6	MCF-7	SW620	NUGC-3	P388
4	0.0416	0.0625	0.0848	0.126	<0.038
3	0.0767	0.297	0.24	0.337	<0.038
8	0.068	0.181	0.245	0.337	<0.038
13	0.273	1.03	0.778	0.869	0.17
11	23.2	38.3	74.5	44.7	5.76
5-FU	298	1170	2930	2200	62
CDDP	256	2760	1380	83.4	12.9
10	0.41	0.517	0.581	0.701	<0.191
7	4.22	5.77	7.18	8.02	1.56
1	6.83	10.1	13.0	19.4	3.42
2	43.5	55.9	158	104	13.5
12	166	170	341	351	53.9
5-FU	447	515	1790	1240	56.2
CDDP	315	1430	786	63.5	16.2

^a PC-6, insan akciğer; MCF-7, göğüs; SW-620, kolon; NUGC-3, gastrik; P388, mürin lösemi hücre dizileri. 5-FU: 5-floroaçil, CDDP: Cisplatin

Staerk ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada *C. vincetoxicum* türünün toprak üstü kısımlarından bilinen iki fenantroindolizidin alkaloidi [(-)-(R)-13α-antofin (**1**) ve (-)-(R)-13α-6-O-desmetilantofin (**2**)] ve 2 yeni doğal fenantroindolizidin alkaloidi [(-)-(R)-13α-sekoantofin (**3**) ve (-)-(R)-13α-6-O-desmetilsekoantofin (**4**)] izole edilmiş bunlarla birlikte daha önce *T. tanakae* türünden izole edilmiş olan 3 fenantroindolizidin alkaloidi [(-)-(R)-13α-tiloforin (**5**), (-)-(R)-13α-7-O-desmetiltiloforin (**6**) ve (+)-(S)-13αβ-izotilokrebrin (**7**)] *in vitro* olarak wild-tip ve multidrug-rezistant insan karsinoma hücre dizileri olan drug-sensitive KB-3-1 ve multi-drug rezistant KB-V1 kanser hücre dizilerine karşı sitotoksik etkileri için test edilmiş ve bu çalışmada rodamin 123 kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca fenantroindolizidin alkaloid serisi (tersiyer aminler) yapı-aktivite bağlantıları için değerlendirilmiştir. KB-V1 hücreleri P-170 glikoprotein akış pompasının ekspresyonunu içeren tamamen multidrug-rezistans fenotip göstermektedir. Alkaloidler **1-7** ile test edilen multidrug-rezistant KB-V1 hücrelerinin anlamlı rezistans gösterdiği saptanmıştır. Rodamine 123'le test edildiğinde KB-V1 hücrelerinin rezistans indeksi KB-3-1 hücrelerinininkine yakın bir değer olup; 225'den yüksektir. Oysa vinblastin için rapor edilen rezistans indeksi 210 olup bu değer diğer sitotoksik ilaçlardan bile daha yüksek bir değerdir. Bu yüzden daha önce test edilmiş fenantroindolizidin N-oksid alkaloidler gibi bu çalışmada test edilen alkaloidler **1-7**'de glikoprotein akış pompası için zayıf

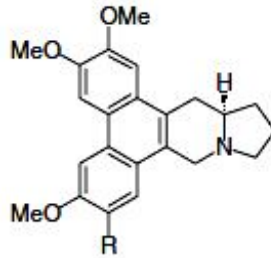
substratlar olarak belirlenmiştir. Alkaloit 1, 2 ve 6; 7-17 nM da IC₅₀ değerleri ile bariz sitotoksik etki gösterirken; seko analoglar 3 ve 4'ün sitotoksitesinin dikkat çekici şekilde azaldığı gözlenmiştir. Daha önce *N*-oksit alkaloitlerde olduğu gibi burada da serbest bazların yüksek sitotoksitesi için değişmez fenantren yapının öncelikle gerekliliği gösterilmiştir. Ayrıca 3. bileşiğe göre 4. bileşikte 7 kat artan toksisite tespit edilmiş olup; buda 6. pozisyondaki hidroksil grubunun önemini vurgulamıştır. Bu durum 6-metil analogu olan 1. bileşikten 2 kat daha toksik olan 2. bileşikte de gözlenmiştir. Benzer şekilde 5. bileşik, 7-desmetil analogu olan 6. bileşikten 14-kat daha fazla toksik bulunmuştur. Bu bulgulara dayanarak 13aR serisine sahip bileşiklerin; C-6 ve C-7 de serbest fenolik fonksiyolar içermesi KB kanser hücre dizilerine karşı özellikle yüksek sitotoksitenin nedeni olarak bildirilmiştir. C-13a da *S* konfigürasyonuna sahip izotilokrebrin (7) bileşiği her iki hücre dizisi için 50 nM civarında IC₅₀ değeri göstermiştir (Çizelge 2.24.). Sonuç olarak bu çalışmada kullanılan alkaloitlerin drug-sensitif ve multidrug-rezistant kanser hücre dizilerine karşı eşdeğer sitotoksositeye sahip olduğu belirlenmiştir. Oysaki *Catharanthus* alkaloitleri (taksol) gibi front-line antineoplastik ilaçların bazıları ve tetrasiklin antibiyotikleri; KB-V1 hücrelerinde ilaç transporter glikoproteinini (MDR1) expresse etmeye dayalı multidrug-rezistans gibi çok yaygın rezistans mekanizmalarına oldukça yatkın bileşiklerdir (45).

Çizelge 2.24. Fenantroindolizidin alkaloitlerinin sitotoksik aktivitesi (45).

Bileşikler	IC ₅₀ (nM)	
	KB-3-1 hücreleri	KB-V1 hücreleri
Antofin (1)	16 ± 5	14 ± 2
6- <i>O</i> -desmetilantofin (2)	7 ± 3	10 ± 4
Sekoantofin (3)	2630 ± 490	2440 ± 330
6- <i>O</i> -desmetilsekoantofin (4)	403 ± 83	425 ± 82
Tiloforin (5)	214 ± 60	173 ± 45
7-desmetiltiloforin (6)	15 ± 3	17 ± 2
İzotilokrebrin (7)	43 ± 3	54 ± 16
Rodamin 123	2200 ± 420	>500000

Fu ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada sitotoksosite açısından önemli olan molekülün özelliklerinin belirlenmesi için fenantren halka üzerinde farklı substituentleri taşıyan antofin analogları serisi sentezlenmiş ve etkileri

araştırılmıştır. Bu bileşiklerden biri olan (-)-antofin'in, drug-sensitif KB-3-1 ve multidrug-rezistant KB-V1 kanser hücre dizilerine karşı klinik olarak kullanılan sitotoksik ilaçlarla karşılaştırıldığında düşük nanomolar konsantrasyonlarda IC₅₀ değerine sahip olduğu gösterilirken; (-)-tiloforin'in ise KB kanser hücre dizilerine karşı azalan sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir. Fakat tiloforin'in 7-desmetil analogu olan 3. bileşik ilginç olarak antofinle aynı sitotoksik etkiyi göstermiştir (Şekil 2.50). Buna ek olarak doğal ürünün optik antipodu olan (+)-tiloforin ((+)-2) alkaloidinin KB variantlarının ve HepG2 hücrelerinin büyümesini düşük nanomolar konsantrasyonlarda dikkate değer ölçüde EC₅₀ değeri ile inhibe ettiği belirlenmiştir (64).



R: OMe (-)-tiloforin
R: OH (-)-7-desmetiltiloforin

Şekil 2.50. Sentetik bazı Antofin analogları (64).

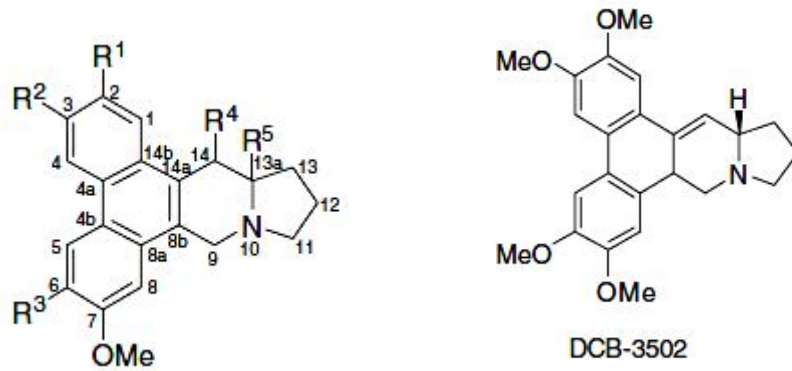
Yapı-aktivite bağlantıları ile ilgili Fu ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada çeşitli doğal fenantroindolizidin alkaloidlerinin sitotoksik aktiviteleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak: **1)** sabit fenantren yapının yüksek sitotoksik aktivite için birincil olarak gerekli olduğu; **2)** azottaki paylaşılmayan elektron çiftinin yüksek aktivite için önemli olduğu ve **3)** sitotoksik etkinin şiddetinin, fenantren halka üzerindeki substitüsyonun tipi ve modeline oldukça duyarlı olduğu görülmüştür. Böylece sistematik yapı-aktivite bağlantı çalışmalarında fenantren halkada bulunması gereken fonksiyonel grubunun gerekliliği aydınlatılmıştır. Bu da fenantroindolizidin alkaloidlerinin geliştirilmesinde temel olarak ele alınacak bir bulgu olmuştur (64).

Fenantren bazlı tiloforin türevlerinin (PBTs) biyolojik hedefleri bilinmediğinden birçok yapı aktivite bağlantı (SAR) çalışması yapılmış (177) ve devam eden bu

çalışmalarda yeni tasarlanan polar fenantren bazlı tiloforin türevleri için uygun modifikasyonlar belirlenmiştir (46). Buna göre: **1)** planar fenantren sistemin gerekliliği görülmüş, fakat sitotoksik aktivite için yeterli bulunmamıştır. **2)** C-9 pozisyonunda *N*-hidrofilik substituent sitotoksik aktiviteyi kuvvetlendirmede gerekli görülmüş ve karbonil grubuna bağlı olmasından ise metilen'e bağlı olması tercih edilmiştir. **3)** Bu C-9 pozisyonundaki *N*-hidrofilik substituent polar kısmın tanınması için ideal olarak görülmüştür. Ayrıca terminal karboksilik asit veya hidroksimetil grupları içeren analoglar metil ester taşıyanlara göre daha uygun bulunmuştur. **4)** C-6 pozisyonunda fenantren iskelet üzerindeki metoksi substituenti hem sterik ve hem de elektronik gereklilik için en uygun durum olarak belirlenmiş ve benziloksil ve hidroksil grupları üzerinde tercih edilmiştir. **5)** Planar fenantren sistemin 2,3 pozisyonlarına metilendioksi halkasının eklenmesi sitotoksik aktiviteyi ciddi şekilde arttırmış ve en kuvvetli türevlerin elde edilmesini sağlamıştır (46, 177).

Yapı-aktivite ilişkileri ile ilgili Yang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmalarda farklı biyolojik aktiviteler göstermesinde fenantroindolizidin alkaloidlerinin düzlemsel veya düzlemsel olmayan yapılarının hayati rol oynadığı tespit edilmiştir (62).

Daha önce yapılan çalışmalarda *T. atrofoliculata* türünden yedi fenantroindolizidin alkaloidi; tiloforidisin D (PA-1), tiloforidisin E (PA-2), tiloforidisin C (PA-3), tiloforidisin F (PA-4), *R*-(+)-deoksitiloforinidin (PA-5), tiloforinin (PA-6) ve tiloforinidin (PA-7) izole edilmiş ve hücre kültürlerinde farklı derecelerde büyüme inhibitör aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir. Gao ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir çalışmada beş fenantroindolizidin alkaloidi; DCB-3500, DCB 3501, DCB-3502, DCB-3503 ve DCB-3506 sentezlemiş ve *T. atrofoliculata* türünden izole edilen diğer yedi fenantroindolizidin alkaloidi ile birlikte insan hepatoselüler karsinoma hücre dizileri-HepG2 ve insan pankreatik duktal karsinoma hücre dizilerine (PANC-1) karşı *in vitro* ve *in vivo* sitotoksik etkileri için test edilmiş ve antitümör aktiviteleri taranmıştır (Şekil 2.51.) (56).



Bileşikler	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	N ¹⁰
DCB-3500	OMe	OMe	OMe	H	H (S)	-
DCB-3501	OMe	OMe	OMe	OH (R)	H (S)	-
DCB-3503	OMe	OMe	OMe	OH (S)	H (S)	-
DCB-3506	OMe	OH	OMe	OH (S)	H (S)	-
PA-2 (Tiloforidisin E)	H	OH	OMe	OH (S)	H (S)	-
PA-3 (Tiloforidisin C)	H	OMe	OH	OH (S)	H (S)	N ⁺ -O ⁻
PA-4 (Tiloforidisin F)	H	OMe	OMe	OH (S)	H (S)	N ⁺ -O ⁻
PA-5 [(R)-(+)-Deoksitiloforinidin]	H	OMe	OH	H	H (R)	-
PA-6 (Tiloforinin)	H	OMe	OMe	OH (R)	H (S)	-
PA-7 (Tiloforinidin)	H	OMe	OH	OH (S)	H (S)	-

Şekil 2.51. *T. atrofoliculata* türünden izole edilen alkaloidler ve sentetik bazı fenantroindolizidin alkaloidleri (56).

Bunlara ek olarak NF- κ B, cAMP respons elementi (CRE) ve aktivatör protein-1'in (AP-1) aracılık ettiği transkripsiyona karşı inhibitör etkileri; bunların anahtar hücre siklusunun kontrol proteini siklin D1 üzerine down-regulatör etkileri ve yapı-aktivite bağlantıları karşılaştırmalı olarak taranmıştır (56).

R² pozisyonunda OH taşıması ile yapısal olarak diğer PA analoglarından farklı olan PA-2 ve DCB-3506 bileşikleri en düşük aktiviteli bileşikler olarak tespit edilmiştir. DCB-3503 ve tiloforinidin (PA-7) bileşikleri ise hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak tümör büyümesine karşı en aktif bileşikler olarak belirlenmiştir. Hepatoselüler karsinoma (HepG2) hücre dizilerinde R² pozisyonunda OMe taşıyan DCB-3503 ve R³ pozisyonunda OH taşıyan PA-7 bileşiklerinin GI₅₀ değerlerinin sırasıyla 35±5 nM ve 11±5 nM olduğu gösterilmiş, ayrıca DCB-3503 ve PA-7 bileşiklerinin nude farelerde HepG2 hücre dizilerinde tümör büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Çizelge 2.25.) (56).

Çizelge 2.25. HepG2 ve PANC-1 hücrelerinde PA analoglarının sitotoksitesisi (56).

Bileşik	HepG2 GI ₅₀ ^a (nM)	PANC-1 GI ₅₀ ^a (nM)
DCB-3500	11 ± 4 ^b	nd
DCB-3501	110 ± 45 ^b	nd
DCB-3502	264 ± 115 ^b	nd
DCB-3503	35 ± 5 ^b	51 ± 3 ^b
DCB-3506	>600	nd
PA-2	>5000	>5000
PA-3	98 ± 38	67 ± 9
PA-4	71 ± 9	63 ± 7
PA-5	13 ± 3	11 ± 3
PA-6	20 ± 6	11 ± 4
PA-7	11 ± 5	7 ± 0

^a değerleri üç denemenin ±SD değeridir, her data 3 kez tekrarlanmıştır. (nd, belirlenemedi);
^b yayımlanmış.

Sonuçlar fenantroindolizidin alkaloitlerinin bilinen güçlü antitümör aktivitesi, NF-κB inhibitör etkisi ve siklin D1 down-regulatör etkisinin kendi aralarında korelasyon gösterdiğini belirlemiştir (Çizelge 2.26.) (56).

Çizelge 2.26. HepG2 hücrelerinde NF-κB, CRE ve AP-1'in aracılık ettiği transkripsiyon üzerine PA analoglarının inhibitör etkisinin IC değerleri (56).

Bileşikler	NF-κB IC ₅₀ ^a (nM)	CRE IC ₅₀ ^a (nM)	AP-1 IC ₅₀ ^a (nM)
DCB-3500	41 ± 20 ^c	>300 ^{b,c}	>300 ^{b,c}
DCB-3501	315 ± 64	>300	>300 ^b
DCB-3502	>300	>300	>300 ^b
DCB-3503	87 ± 6 ^c	1067 ± 231	1067 ± 116
DCB-3506	322 ± 19	>300	>1000
PA-2	>1000	>1000	>3000
PA-3	600 ± 173	>1000	>3000
PA-4	367 ± 116	>1000	>3000
PA-5	11 ± 6	135 ± 21	68 ± 46
PA-6	12 ± 9	80 ± 28	110 ± 14
PA-7	10 ± 4	95 ± 92	65 ± 35

^a değerleri üç denemenin ±SD değeridir, her data 3 kez tekrarlanmıştır. ^b kısa süreli transfeksiyondan veriler oluşturulmuştur.; ^c Grafik versiyonu yayımlanmıştır.

Gao ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı diğer yapı-aktivite çalışmasında PBTs # 28, # 31-34, tilofora alkaloitleri rac-kriptopleurin, (-)-antofin, (-)-tiloforin, (-)-fikuseptin C, prekürsör #1 ve prekürsör #2, (+)-S-tiloforin (DCB-3500) bileşikleri son modüler total sentez yaklaşımı ile sentezlenmiş ve bu sentetik PBT alkaloitlerinin tilofora alkaloitlerinin fonksiyonel analogları olup olmadıkları doğrulanmaya

çalışılmıştır. Ayrıca ilk kez HepG2, PANC-1 ve CEM hücrelerine karşı sitotoksik etkileri için test edilmiş ve buna ek olarak NF- κ B, AP-1, CRE ve glukokortikoid cevap elementi (GRE) ve protein-DNA-RNA sentezi üzerine etkileri de karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada PBT alkaloidlerinin fonksiyonel olarak tilofora alkaloidlerinin analogları olması durumunda D-halkasının açılmasının potansiyeli etkileyebileceği ve bunların farklı intraselüler yollar üzerine karşılaştırılabilir etkilerinin olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (75).

Tilofora alkaloidlerinin yapı-aktivite bağlantılarının araştırıldığı bu çalışmada (+)-*S*-tiloforin ve (-)-*R*-tiloforin bileşiklerinin sadece 13a pozisyonundaki kiral merkezlerinin mutlak konfigürasyonunun farklı olduğu görülmüş ve (R)-konfigürasyonundaki bileşiğin sitotoksisiteyi yaklaşık 3-4 kat düşürdüğü belirlenmiştir. (-)-antofin ve (-)-*R*-tiloforin bileşiklerinin yapılarının R³ pozisyonunda farklı olduğu ve R³ pozisyonunda OMe substituentinin varlığının HepG2 hücrelerinde sitotoksisiteyi 6 kat; PANC-1 ve CEM hücrelerinde ise 10 kattan fazla arttırdığı belirlenmiştir. Bunların aksine prekürsör 1 ve 2 ise en az aktif bileşikler olarak bulunmuştur (Çizelge 2.27.) (75).

Çizelge 2.27. Tilofora alkaloidleri ve PBT'lerin HepG2, PANC-1 ve CEM hücrelerinde büyüme inhibisyonlarının GI₅₀ değerleri (75).

	HepG2 GI ₅₀ ^a (nM)	PANC-1 GI ₅₀ ^a (nM)	CEM GI ₅₀ ^a (nM)
(+)- <i>S</i> -tiloforin	11±4 ^b	12±2	15±3
(-)- <i>R</i> -tiloforin	33±2	29±6	67±6
(-)-antofin	4.9±0.4	2.2±0.3	5.2±0.5
Rac-kriptopleurin	1.5±0.2	0.5±0.1	2±0.5
Prekürsör #1	1723±417	904±297	567±58
Prekürsör #2	>10,000	>10,000	>2000
(-)-fikuseptin C	371±27	156±26	323±13
	HepG2 GI ₅₀ ^a (μM)	PANC-1 GI ₅₀ ^a (μM)	CEM GI ₅₀ ^a (μM)
PBT #28	2.3±0.3	2.2±0.3	2.0±0.3
PBT #31	8.6±3.6	7.4±0.3	6.2±0.2
PBT #32	5.4±1.4	6.2±0.7	2.7±0.1
PBT #33	3±0.7	2.3±0.2	1.7±0.3
PBT #34	3.1±1.0	2.3±0.2	1.6±0.5

^a üç deneme ve her denemenin üçlü tekrarlarının ±SD değerleri.; ^b yayımlanmış.

Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen veriler; DCB-3503 ve analoglarının NF- κ B, CRE ve AP-1'in aracılık ettiği transkripsiyonu inhibe ettiğini göstermiş olup bu

araştırmaya konu olan dört sinyalizasyon yolağı arasından NF-κB sinyalizasyon yolağına karşı bu bileşiklerin daha seçici olduğu belirlenmiştir. DCB-3503 bileşiğinin NF-κB'nin aracılık ettiği transkripsiyon üzerine kuvvetli inhibitör etkili olduğunun belirlenmesi bu etkinin antitümör aktivite mekanizmalarından bir diğeri olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmada ise tilofora alkaloidlerinin NF-κB, CRE, AP-1 ve GRE'nin aracılık ettiği transkripsiyon'a karşı etkisi karşılaştırılmış ve hareket mekanizması çalışmaları süresince tiloforin analogu DCB-3503'ün aminoasit ve timidin'i inhibe ettiği ama zaman-bağımlı ve doz-bağımlı hareket şeklinde uridin bileşmesini inhibe etmediği tespit edilmiştir (Çizelge 2.27, Çizelge 2.28.) (75).

Çalışmanın sonucunda fenantren bazlı alkaloidlerin bariz yapı-aktivite bağlantısı gösterdiği, R¹ ve R²'nin her ikisinde metilendioksi köprüsü yoluyla OMe eterlerin yer değiştirmesi ve indolizidin halkanın açılması sonucu sitotoksik potansiyelin ciddi şekilde azaldığı gözlenmiştir. Oysaki R³'de OMe grubunun kaybı ve beş-üyel E-halkanın, altı-üyel E-halka ile yer değiştirmesinin gözlenen sitotoksisiteyi anlamlı şekilde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu bileşikler yakın yapısal analoglar olmasına rağmen; sitotoksite potansiyelleri NF-κB sinyalizasyon yolağına karşı seçici olmuş ve protein, DNA ve RNA sentezine karşı etkileri aynı sınıf bileşikler gibi düşünülemez derecede farklı bulunmuştur.

Çizelge 2.28. Tilofora alkaloidleri ve PBTs'lerin HepG2 hücrelerinde stimüle edilmiş NF-κB, CRE, AP-1 ve GRE yolaklarına karşı inhibitör etkisinin IC₅₀ değerleri (75).

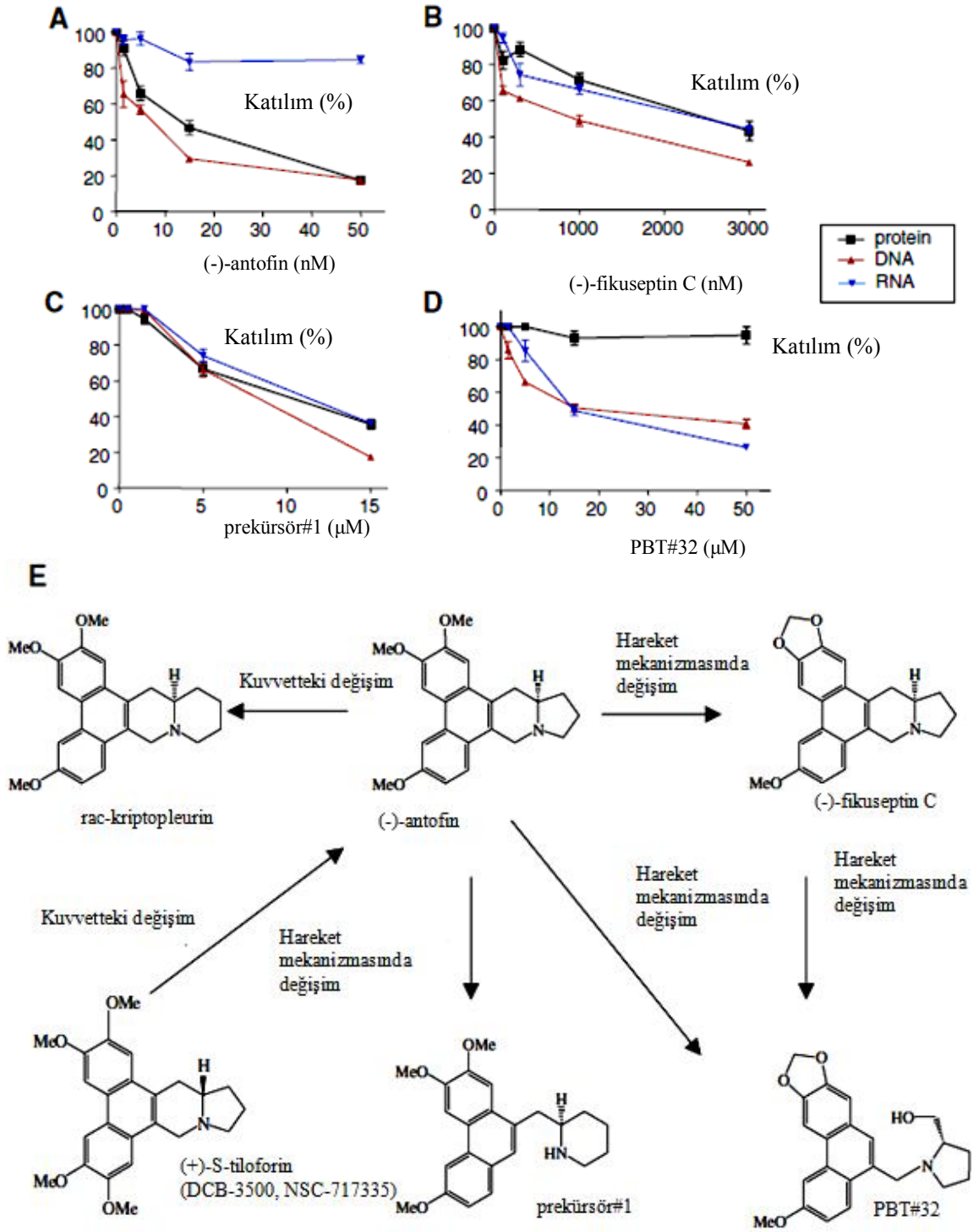
	NF-κB (nM)	IC ₅₀ ^a	CRE IC ₅₀ ^a (nM)	AP-1 IC ₅₀ ^a (nM)	GRE IC ₅₀ ^a (nM)
(+)- <i>S</i> -tiloforin	41±20 ^b		>300 ^b	>300 ^b	229±33
(-)- <i>R</i> -tiloforin	317±51		7910±344	2257±123	534±113
(-)-antofin	7.3±1.9		167±42	135±16	24±0.5
Rac-kriptopleurin	1.4±0.6		25±0.5	18.6±0.8	10±0.2
Prekürsör #1	2171±351		12.025±830	9776±625	4500±312
Prekürsör #2	>10,000		>15,000	>15,000	>15,000
(-)-fikuseptin C	1244±93		2566±352	3383±158	2440±651
	NF-κB IC ₅₀ ^a (μM)		CRE IC ₅₀ ^a (μM)	AP-1 IC ₅₀ ^a (μM)	GRE IC ₅₀ ^a (μM)
PBT #28	7.9±1.1		8.6±0.6	8.7±2.1	9.2±1
PBT #31	23.5±2.2		25.0±6	27±4.4	>30
PBT #32	21±0.5		24±0.8	>30	19±4.2
PBT #33	7±0.2		12.1±0.4	6.2±0.3	7.2±1.9
PBT #34	10.2±1.1		18.5±2.1	10±1.8	20.7±2.8

^a üç deneme ve her denemenin üçlü tekrarlarının ±SD değerleri; ^b yayımlanmış.

Şekil 2.52.: A ve B’de (-)-antofin ve (-)-fikuseptin C’nin DNA ve protein sentezini doza bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür. Bunun aksine (-)-antofin’in RNA sentezini sadece kısmen inhibe ettiği; (-)-fikuseptin C’nin ise ayrıca RNA sentezini doza bağımlı olarak inhibe ettiği belirlenmiştir. Şekil 2.52.: C ve D’de ise hem prekürsör #1 hem de PBT#32 doza bağımlı olarak DNA ve RNA sentezini inhibe etmiştir. Bunun aksine PBT#32 bileşiği sadece kısmen protein sentezini inhibe ederken; prekürsör #1 ayrıca protein sentezini doza bağımlı olarak da inhibe etmiştir. Bu çalışmada birçok tiloforin analogunun yapısal analoglar olmasına rağmen; fonksiyonel analoglar olmayabileceği de gösterilmiştir. Sonuç olarak Gao ve arkadaşları bu araştırmaya konu olan bileşiklerin yapısal analoglar olduğunu, bunların sitotoksik kuvvetlerinin, NF- κ B sinyalizasyon yollarına karşı selektivitelerinin ve protein ve nükleik asit sentezi üzerine inhibitör etkilerinin farklı olduğunu belirlemiştir (Şekil 2.52.) (75).

Su ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada uygun fenantren-9-karboksaldehitlerden başlayarak (\pm)-antofin, (\pm)-deoksipergularinin ve diğer dehidro türdeşleri (dehidroiminium kloritleri ve bromitleri) sentezlenmiş ve bunlar *in vitro* sitotoksik etkileri için test edilmiştir. (\pm)-antofin ve (\pm)-deoksipergularinin bileşikleri drug-rezistant variant’ı içeren çeşitli insan tümör hücre dizilerine [A549 (akciğer), MCF-7 (göğüs), KB (nasofarenks) ve KB-VIN (multidrug-rezistant KB alt dizisi)] karşı 0.16-16 ng/mL aralıklarında gösterdiği EC₅₀ değeri ile belirgin etkili bulunmuştur. Bu alkaloidlerin ve bazı sentetik ara ürünlerinin yapı-aktivite korelasyonları ayrıca doğrulanmıştır. İki büyük parça olan; fenantren ve indolizidin arasındaki non-planar yapının fenantroindolizidinlerin sitotoksik aktivitesinde elzem rol oynadığı görülmüştür. İndolizidin parçalarının düzlemselliğinin ve rijiditesinin artmasının gücünü belirgin şekilde azalttığı ve ikinci pozisyondaki (antofin) metoksi grubun sitotoksik aktivite için hidrojen atomundan daha avantajlı olduğu belirlenmiştir (65).

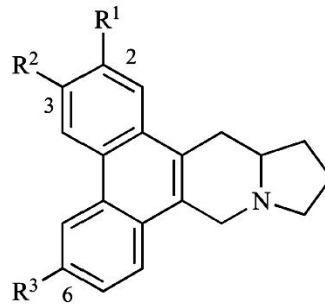
Liao ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada yeni fenantren bazlı tiloforin türev serilerinin antitümör aktiviteleri ile birlikte kantitatif yapı-aktivite bağlantıları (QSAR) Density Functional Theory (DFT), Moleküler Mekanizmalar (MM2) ve istatistiksel metotlarla çalışılmıştır. Bu QSAR denklemi ile yüksek antikanser aktiviteli on yeni bileşik teorik olarak tasarlanmış ve deneysel ispatları tahmin edilmiştir (69).



Şekil 2.52. L-[³⁵S]-metionin, [¹⁴C]-timidin ve [¹⁴C]-üridin katımı üzerinden tilofora alkaloitleri ve fenantren-bazlı tiloforin türevlerinin etkisi. HepG2 hücreleri 5 dakika için ilaçların seri dilüsyonları ile ön muamele edilmiş ve L-[³⁵S]-metionin, [¹⁴C]-timidin veya [¹⁴C]-üridin ile sırasıyla işaretlenmiştir. Bunların katım yüzdeleri (kontrol ile karşılaştırıldığında) gösterilmiştir. (A) HepG2 hücreleri (-)-antofin ile sırasıyla 1.5 nM, 5 nM, 15 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda önceden işlenmiştir. (B) HepG2 hücreleri (-)-fikuseptin C ile sırasıyla 100 nM, 300 nM, 1 µM ve 3 µM konsantrasyonlarda önceden işlenmiştir. (C) HepG2 hücreleri prekürsör#1 ile sırasıyla 0.5 µM, 1.5 µM, 5 µM ve 15 µM konsantrasyonlarda önceden işlenmiştir. (D) HepG2 hücreleri PBT#32 ile sırasıyla 1.5 µM, 5 µM, 15 µM ve 50 µM konsantrasyonlarda önceden işlenmiştir. (E) Tilofora alkaloitlerinin ve PBT'lerin SAR etkisinin şematik gösterimi (75).

Fenantroindolizidinler fenantren substituentlerinin indolizidinle birleşmesi sonucu olduğundan araştırmacılar daha çok fenantren substitüsyon paterninin etkilerini incelemiş ve indolizidin halka füzyonunun olup olmaması, C14-hidroksillenmiş grubun indolizidin halkada bulunup bulunmaması ve amin'in oksidasyon durumu araştırılmıştır. Fakat pirolidin sunstitüsüyonu hakkında çok az veri bulunmaktadır (68).

Erken bulgular fenantren ünitesi üzerinde bulunan hidroksil ve alkoksi substituentlerinin biyolojik aktivite için zorunlu olduğunu göstermiştir. Süstitüe olmamış fenantro[9,10-b]kinolizidin *in vitro* protein sentezi çalışmalarında ve *in vivo* antitümör çalışmalarında inaktif bulunurken; süstitüe olmamış fenantroindolizidin *in vitro* antiamebik testlerde inaktif bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda fenantren substitüsyon paterninin fenantroindolizidinlerin *in vitro* antikanser aktivitelerini önemli derecede etkilediği tespit edilmiştir. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan SAR çalışmalarında antofin'in C2 substituentinde bulunan MeO'nun HO, *i*-PrO veya OCH₂O ile (C3 ile paylaşarak) yer değiştirmesinin bileşiğin sitotoksitesisi üzerine belirgin şekilde zararlı etkisinin olduğu görülmüştür. Bu nedenle C2 substituentinin küçük olması gerektiği saptanmıştır. Burada H-bağının donör değil alıcı olması gerektiği görüşmüştür. C3 ve C6'nın bu tür değişiklikleri tolere edebildiği; ancak C6 da HO'in değişmesinin aktivitenin ana antofin'e yaklaşarak artmasına sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.53., Çizelge 2.29.) (68).



Şekil 2.53. Antofin Analogları (68).

Çizelge 2.29. Fenantren substituentli antofin analogları: HCT 116^a (68).

Bileşikler	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ (nM)
1, (R)-antofin	OMe	OMe	OMe	9.9
2(±)-antofin	OMe	OMe	OMe	29.4
3	O-i-Pr	OMe	OMe	783.2
4	OMe	O-i-Pr	OMe	24.7
5	OMe	OMe	O-i-Pr	19.2
6	OH	OMe	OMe	68.3
7	OMe	OH	OMe	21.4
8	OMe	OMe	OH	1.1
9	OMe	OMe	H	49.3
10	-OCH ₂ O-	-	OMe	364.1

^a İnsan kolorektal karsinoması

Antofin'in seko analogu, sekoantofin, 6-*O*-desmetilsekoantofin ve sekoantofin *N*-oksit *in vitro* olarak diğer test edilen bileşiklerden daha az aktif bulunmuştur (IC₅₀ 400-3000 nM). İndolizidin halkasında doymamışlık içeren tiloindisin I bileşiği ise NCI'nın 60 hücre dizi testinde 10⁻⁹ M da GI₅₀ değeri ile çok güçlü etkili olup bu yapı ailesindeki en güçlü bileşiktir. Ayrıca aril halkaların büyük rotasyonel esnekliğinin ve enamin nitrojenin azalan bazikliğinin bu bileşiklerin aktivitesinde önemli rol oynayacağı belirtilmiştir (Çizelge 2.30.) (68).

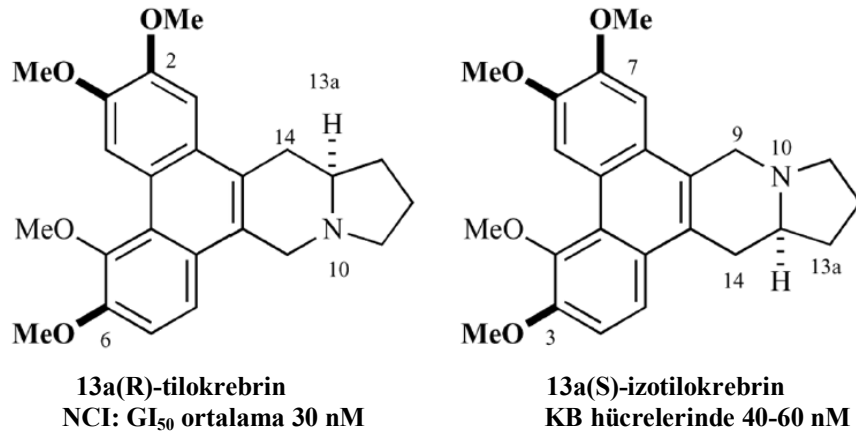
İndolizidin amin'in oksidasyon düzeyinin bu bileşiklerin *in vitro* hücre büyüme inhibitör aktivitesini etkilediği bilinmektedir. Tiloforin analoglarının bazı *N*-oksitlerinin doğal olarak [örneğin: tiloforidisin C, tiloforidisin F ve antofin *N*-oksit (Şekil 2.53.)] bulunduğu bildirilmiştir. KB, HepG2 ve PANC-I hücre dizilerinde bu *N*-oksitler serbest amin eşlerinden *in vitro* olarak 5-10 kat daha az aktif bulunmuştur (60-160 nM). İlginç olanı ise; *N*-oksidasyon potansiyeli azalırken antofin'in ve tiloforidisin'in *N*-oksitlerinin hala aktif bileşikler olduğunun tespit edilmiş olmasıdır (Çizelge 2.30.). Çeşitli fenantroindolizidinlerin ve fenantrokinolizidinlerin amid yapıları olan C9-keto analogları, kanser hücre büyüme testlerinde en düşük etkili bileşikler olarak belirlenmiştir. Fakat bir başka çalışmada hücre büyüme medyumlarının pH'sının fenantroindolizidinlerin ve fenantrokinolizidinlerin aktivitesi üzerine güçlü etkisi olduğu saptanmıştır. Örneğin tiloforin ve kriptopleurin mayalarda 5.8 pH da, 7.0 pH'ya göre daha az sitostatik bulunmuştur (68).

Çizelge 2.30. Çeşitli kanser hücre dizilerinde bazı fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidinlerin GI₅₀ değerleri (68).

Giriş	Bileşik	Hücre tipi ^a	GI ₅₀ (M)
1	(R)-tiloforin	KB	17x10 ⁻⁸
2	(S)-tiloforin	NCI panel ^b	1.9x10 ⁻⁸
3	Tilokrebrin	NCI panel	2.95x10 ⁻⁸
4	(R)-kriptopleurin	NCI panel	1x10 ⁻¹²
5	(R)-antofin	KB	1.5x10 ⁻⁸
6	(+)-tiloforinidin	HepG2 ve PANC-1	1x10 ⁻⁸
7	7-desmetiltiloforin	KB	1.5x10 ⁻⁸
8	(S)-izotilokrebrin	KB	4.5x10 ⁻⁸
9	Sekoantofin	KB	2.5x10 ⁻⁶
10	6-O-desmetilsekoantofin	KB	4.0x10 ⁻⁷
11	Tiloindisin G	NCI panel	1x10 ⁻¹⁰
12	Tiloindisin F	NCI panel	1x10 ⁻¹⁰
13	(S)-tiloindisin I	NCI panel	4.4x10 ⁻⁹
14	13(R)-14(R)-hidroksiantofin	KB	1.4x10 ⁻⁷
15	13(R)-antofin-N-oksit	KB	1.4x10 ⁻⁷
16	Tiloforidisin C	HepG2 ve PANC	8x10 ⁻⁸
17	Tiloforidisin F	HepG2 ve PANC	7x10 ⁻⁸

^a Hücre tipi: insan nasofarenks karsinoma (bir veya daha fazla hücre dizisinin ortalaması), HepG2= insan hepatosit karsinoma, PANC-1: insan pankreatik karsinoma; ^b NCI 60 hücre dizisi paneli için GI₅₀ ortalaması; ^c NCI hücre dizi panelleri için Ave GI₅₀ değerlendirme <http://dtp.nci.nih.gov/dtpstandard/dwindex/index.jsp>.

Bazı fenantroindolizidinlerin C13a(R)-sterokimyasına, diğerlerinin ise C13a (S)-sterokimyasına sahip olduğu belirlenmiştir. İnsan kolorektal (HCT 116) ve akciğer (A 549) karsinoma hücrelerinde antofin'in doğal (R)-enantiomeri (rasematın IC₅₀ değeri 9.9 ve 10.4 nM sırasıyla), doğal olmayan (S)-enantiomerinden (rasematın IC₅₀ değeri 29.4 ve 25.1 nM sırasıyla) daha sitostatik bulunmuştur. Tersine insan nasofarenks karsinoma (KB) hücrelerinde tiloforin'in doğal (R)-enantiomerinin (IC₅₀:173 nm) doğal olmayan (S)-enantiomerinden (IC₅₀:12 nM) daha az sitostatik olduğu belirlenmiştir. Tilokrebrin'in ise C(13a) sterokimyası (S) dir. Fakat tilokrebrin ve isotilokrebrin'in C(13a) da enantiomerik olmasına rağmen biyolojik aktiviteleri benzer bulunmuştur ve piroolidin azotunun yer değişmesine izin verilirse fenantren sırasının da aynı olacağı bildirilmiştir (Şekil 2.54.). Ayrıca R-serilerinde C-2 metoksilasyonunun, S-serilerinde ise C-7 metoksilasyonunun aktivite için çok önemli olduğu görülmüştür (68).



Şekil 2.54. Enantiyomerlerin yapısal benzerlikleri (68).

Tiloforin'in C(14) hidroksillenmiş analoglarının *in vitro* antiproliferatif testler de (kanser hücreleri) benzer veya belirsiz aktivite kaybı gösterdiği belirlenmiştir. (Şekil 7) Gao ve arkadaşları orijinal olarak Rapoport ve arkadaşları tarafından sentezlenmiş olan (S)-tiloforin'in C(14) hidroksillenmiş analogları 10 ve 11'i test etmiştir. C(14) S, C(13a) S tiloforin analogu 11'in KB ve HepG2 hücre dizilerinde sırasıyla 24-40 nM da GI₅₀ değerine sahip olduğu; C(14) R, C(13a) S tiloforin analogu 10'un ise bu hücre dizilerinde yaklaşık 100 nM civarında GI₅₀ değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Karşılaştırıldığında (S)-tiloforin bileşiğinin her iki hücre dizisinde sırasıyla 9-15 nM da GI₅₀ değerine sahip olduğu görülmüştür. Doğal olarak oluşan C(14) S, C(13a) S stereokimyasına ve az farklı fenantren substitüsyon paternine sahip tiloforinidin bileşiğinin *in vitro* olarak (HepG2 hücre dizilerinde GI₅₀:11 nM) (S)-tiloforin bileşiği kadar aktif olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle C(14) S, C(13a) S stereokimyasının bu bileşikler için optimal olabileceği düşünülmüştür (68).

Fenantren bazlı tiloforin türevlerinde (PBT's) fenantroindolizidin halka füzyonunun yokluğunda birleşme (merkez halka birleşmiş) araştırılmış ve birleşmiş indolizidin halkanın sentezinin bu molekülün sınırlandırıcı sentetik faktörü olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle C-C bağlarından birinin yer değiştirmesi ile indolizidin halka oluşturulmuş ve sentezin zorluğunun büyük ölçüde azaldığı gösterilmiş ve böylece fenantren bazlı tiloforin türevlerinin yüksek miktarlarda sentezlenebileceği gösterilmiştir (68).

Genel olarak bu bileşiklerin mikromolar ve sub-mikromolar konsantrasyonlarda

in vivo sitotoksitesinin ve tümör büyüme inhibisyonunun ılımlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fenantren bazlı tiloforin türevleri ve (S)-tiloforin'in hareket mekanizmaları karşılaştırılmış ve (S)-tiloforinde olduğu gibi fenantren bazlı tiloforin türevlerinde de aynı biyolojik mekanizmanın işlemediği tespit edilmiştir. Benzer analoglar farklı araştırmacılar tarafından da sentezlenmiş ve tiloforin ve kriptopleurin analoglarının indolizidin ve kinolizidin halka yokluğunda kanser hücre büyüme testlerinde daha az aktif olduğu doğrulanmıştır. İlginç olanı ise yapılarının, güçlü anti-mitotik ve antianjiyogenik ajan olan poli-substituentli cis-stilben combretastin A4 ile benzer olması nedeniyle bunlar antianjiyogenesis testleri ile taranmış ve oldukça umut vaat eden öncü bileşikler olarak belirlenmiştir (68).

Bu bileşiklerin; indolizidin sınıfında pirolidin substitüsyonunun sentezinin zor olması nedeniyle SAR verileri bulunmamaktadır. Fenantroindolizidinlerin enantio-selektif sentezi pirolin veya diğer doğal oluşan bileşiklerden başlamış ve bunların sentezlerinin kolay olmadığı görülmüştür. Son günlerde rapor edilen sentez yöntemlerinde ise kiral yardımcı ve kiral katalizator metotları ile pirolidin halka yerleştirilerek pirolidin substituentli analoglara bağlanmasına izin vermiştir (68).

2.6.1. *In vivo* Aktivite ve Farmakokinetik

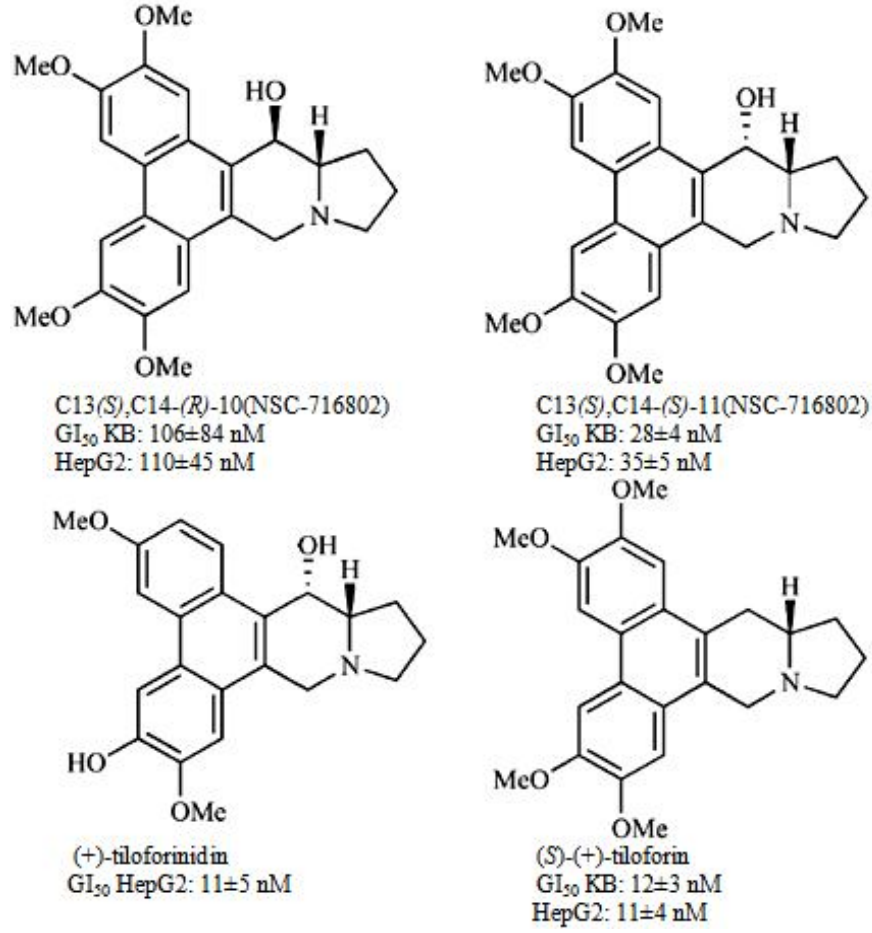
1968 yılında Donaldson ve arkadaşları *Ehrlich ascites*-tümör hücreleri ile infekte edilmiş farelere (göğüs kanseri olarak bilinmektedir) kriptopleurin'i 3 µM/kg üzerinde günde iki kez 10 gün boyunca uygulandığında % 50 tümör büyüme inhibisyonu gösterdiğini belirlemiştir. Gao ve arkadaşları son dönemde C14 hidroksillenmiş analoglarının *in vivo* tümör büyümesini azaltmada daha etkili olduğunu bulmuştur (Şekil 2.55.). (S)-tiloforin bileşiğinin *in vitro* olarak (HepG2 hücre dizilerine karşı) tiloforinidin ile eş güçte olduğu, *in vivo* (fare) olarak ise daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde (S)-tiloforin bileşiği sentetik 11 numaralı bileşikten *in vitro* olarak daha aktif bulunmuştur (Şekil 2.55.) fakat *in vivo* olarak ise daha az kuvvetli olduğu görülmüştür. Tiloforinidin ve 11 numaralı bileşiğin her ikisinin de kendilerine uygun *in vivo* farmakokinetikleri verebilen indolizidin'in aynı C(14) hidroksilasyonunu paylaştığı belirlenmiştir. Antofin'in ise güçlü *in vitro* etkisine rağmen, metabolik olarak

unsabil olduğu ve bunun sonucu olarak zayıf *in vivo* farmakokinetik profil gösterdiği, ayrıca C(14) hidroksil grubu taşımadığı tespit edilmiştir (68).

C-14 de OH grup taşıyan birkaç polar antofin analogu sentezlenmiş olmasına rağmen, daha önce E-halka substituentli analogları (C11- C14 de) sentezlenmemiştir. Yang ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada doğal ürünler *R*-antofin ve *R*-kriptopleurin'in yeni E-halkası taşıyan analogları 13c(E7), 12-okso-*S*-antofin(17) ve 12*N*-metil-12-aza-*S*-antofin(18) ilk kez sentezlenmiştir. Bu çalışma doğal alkaloidlerin E-halkası taşıyan varyasyonlarının ileri SAR çalışmaları içinde kaynak oluşturmuştur. Sentezlenen E7 bileşiği *R*-antofin ve *R*-kriptopleurin bileşiği ile karşılaştırılarak *in vitro* olarak A549 (akciğer), KB (nasofarenks), DU-145 (prostat) ve HCT-8 (kolon) kanserlerini içeren insan tümör hücre dizi panellerine karşı test edilmiştir (Çizelge 2.31.). Bu çalışmada E7 bileşiğinin belirgin sitotoksik aktiviteli olduğu ve A549 hücre büyümesine karşı *R*-antofin kadar kuvvetli etki gösterdiği belirlenmiş fakat KB ve DU-145 tümör hücre dizilerine karşı geliştirilmiş seçici etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar E-halka boyutunun, molekül ve hedefteki bağlanma bölgeleri arasındaki interaksiyonu etkilediğini ve belki de antikanser seçicilikte rol oynadığını düşündürmüştür. Ayrıca 17 ve 18 nolu bileşiklerin sitotoksitesinde belirgin redüksiyon gözlenmiş; keton üzerinde ve imidazolidin nitrojen üzerinde ileri modifikasyonlarla potansiyel antitümör aktivitenin geliştirilebileceğini akla getirmiştir (199).

Wang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloid serileri ve bunların 14-amino türevleri (1-44) sentezlenerek, yapı aktivite bağlantıları araştırılmış ve bu bileşiklerin A549 ve HL60 hücre dizilerine karşı antitümör aktiviteleri araştırılmıştır. Test sonuçları bu bileşiklerin çoğunluğunun iyi derecede antitümör aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle 15, 22, 28, 33-36, 40 ve 42 numaralı bileşiklerin düşük nanomolar veya subnanomolar aralıklarda antitümör aktiviteli olduğu bildirilmiştir. Çalışmada sentezlenen fenantrokinolizidin alkaloidlerinin çoğunun fenantroindolizidin alkaloidlerinden daha etkili olduğu da tespit edilmiştir. Ayrıca (13a*S*,14*S*)-14-hidroksifenantroindolizidin ve (14a *R*, 15 *R*) - 15- hidroksifenantrokinolizidin konfigürasyonları optimal etkili bulunmuştur. 14-amino fenantroindolizidinlerden özellikle 26 ve 28 numaralı bileşiklerin artan polarite ile iyi antitümör aktivite

gösterdiği tespit edilmiştir (200).



Şekil 2.55. C14-Hidroksillenmiş analogların tiloforin'le karşılaştırılması (199).

Çizelge 2.31. *R*-antofin, *R*-kriptopleurin, E7, 17 ve 18 bileşiklerinin antikanser aktiviteleri (GI₅₀) (199).

Bileşikler	A549 (nM)	DU-145 (nM)	KB (nM)	HCT-8 (nM)
<i>R</i> -antofin	22	25	36	ND
<i>R</i> -kriptopleurin	1.38	1.59	1.51	1.09
E7	25	179	102	10
17	290	710	480	420
18	660	2030	1720	1000

Lv ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada önceki çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* antitümör aktivite gösterdiği belirlenen; kan beyin bariyerinden beyin dokularına iyi yayıldığı tespit edilen ve *T. atrofoliculata* ve *T. ovata*

türlerinden izole edilen (+)-13a-(S)-Deoksitiloforinin alkaloitinin 34 türevi tasarlanmış, sentezlenmiş ve yedi insan tümör hücre dizisine (HCT8 (insan kolon kanseri hücre dizisi), U251 (insan glioblastoma kanser hücre dizisi), HepG2 (insan hepatoselüler kanseri hücre dizisi), A549 (insan akciğer adenokarsinoma hücre dizisi), A2780 (insan ovaryum kanseri hücre dizisi), BGC823 (insan gastrik kanseri hücre dizisi), Capan 2 (insan pankreatik kanseri hücre dizisi)) karşı *in vitro* olarak sitotoksik aktiviteleri için test edilmiştir. Sentezlenen ve yapı-aktivite bağlantıları araştırılan bu bileşiklerden 9, 32, 33 numaralı türevlerin tümüne göre en güçlü etkili oldukları bulunurken; 12, 16 ve 35 numaralı türevler ise en az etkili bileşikler olarak tespit edilmiştir. 1, 9, 32 ve 33 numaralı bu dört türev ile test edildiğinde siklin A, siklin D1 ve CDK2 proteinlerin ekspresyonunun dramatik şekilde azaldığı gösterilmiştir. Daha ileri araştırmalarda sitometrik analizlerle bu dört bileşiğin A549 hücrelerinde S-fazı arttırdığı belirlenmiştir. elde edilen tüm sonuçlar doğrultusunda bu seri bileşiklerin antitümör aktivitesini P13K ve MAPK sinyalizasyon transdüksiyon yollarının ve hücre döngüsünün ilerlemesini bloke ederek gösterdiği saptanmıştır (44).

2.7. Fenantroindolizidin Alkaloitlerinin Sentezi ile İlgili Araştırmalar

Fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitleri *Asclepiadaceae* familyasının çeşitli bitkilerinde bulunan (65, 200), pentasiklik yapıda doğal bileşiklerdir (64, 65, 180, 181, 200). Fenantroindolizidin alkaloitleri ile ilgili sayısız farmakolojik ve biyolojik aktivite arasında antitümör aktivite en kayda değeridir (70, 84, 201). Örneğin fenantroindolizidin alkaloitlerinden biri olan antofin özellikle ilgi çekici bir bileşiktir, çünkü multidrug-rezistant kanser hücre dizilerine karşı düşük nanomolar aralıkta IC₅₀ değeri ile oldukça etkilidir (57). Fakat antofin'in biyokimyasal ve farmasötik etkilerinin araştırılması için büyük miktarlarda sentezlenmesi gerekmektedir. Çünkü bu bileşiklerin doğada kaynakları çok azdır (181). Ayrıca bu bileşiklerin potansiyel terapötik kullanımlarına rağmen ciddi merkezi sinir sistemi (CNS) yan etkileri, düşük su çözünürlüğü ve zayıf metabolik stabiliteleri bulunmaktadır (52, 84). CNS yan etkilerine ek olarak; artan polariteleri ve kan-beyin bariyerini geçmeleri bu bileşiklerin sentezini sınırlandırmaktadır (75). Bu nedenle mevcut problemlerin giderilmesi ve modifikasyonları için bu alkaloitler ile ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmuştur (84, 199). Sonuç olarak nadir biyolojik aktiviteleri ve eşsiz pentasiklik yapıları ile birlikte, oldukça düşük doğal kaynaklarının olması fenantroindolizidin alkaloitleri, türevleri ve fenantrokinolizidin alkaloitleri üzerinde sentez çalışmalarının yapılmasına neden olmuş (52, 65, 73, 82, 199) ve sayısız sentez metodu rapor edilmiştir (57, 84, 184). Özellikle son 10 yılda literatürlerde bu alkaloitlerin sentezi ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmaktadır (61, 63, 199). En yaygın olarak ise oldukça kondanse bileşikler olan (±)-antofin, (±)-kriptopleurin ve (±)-deoksipergularinin ile ilgili sentetik çalışmalar bulunmaktadır (55). Ayrıca antofin ve diğer fenantroindolizidin alkaloitlerinin hem rasemik hem de optik olarak aktif formlarının çeşitli sentezleri de rapor edilmiştir (65, 181).

İndolizidin motifi sayısız alkaloitin önemli yapısal ünitesidir ve glikozidaz inhibitörlerinin büyük bir sınıfını oluşturmaktadır. Buna ek olarak birçok indolizidin antibakteriyal, antiviral, antitümör ve antidiyabetik özellikleri içeren biyolojik profili ilgi çekici bileşiklerdir. Ayrıca aril-substitüentli indolizidinler; biyoaktif doğal ürünler veya peptidomimetikler olarak da kayda değerdir (202). Fenantren halka; pek çok doğal üründe ve fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitler gibi alkaloitlerde büyük

ölçüde bulunmaktadır (55, 201). Polimetoksi substitüentli fenantren ünitenin sentezi bu alkaloitlerin hazırlanmasında anahtar basamaktır (73, 201). Bu nedenle polimetoksi substitüentli fenantrenlerin etkili bağlanma protokolünün geliştirilmesi daha da önem kazanmıştır (201). Pschorr; 1896'da intramoleküler eşleşme etkisi yoluyla arendiazonium tuzu kullanarak fenantren çekirdeğin ilk kez sentezini başarmış ve Pschorr reaksiyonu olarak adlandırılan bu yöntem fenantren halkanın sentezinde klasik bir metot olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Ama uzun basamaklar ve düşük miktarda ürün verimi bu metodun pratik olarak uygulanmasını sınırlamıştır (73, 201). Bu nedenle fenantren halkanın sentezinde sayısız alternatif metot geliştirilmiştir (55, 201). Fenantroindolizidin alkaloitlerinin ilk sentetik yolları iki yöne odaklanmıştır: 1) fenantren halkayı kapatarak indolizidin üniteyi bitirmek, 2) ilk olarak fenantrenin siklizasyonu, sonra indolizidin halka sisteminin sentezidir. Son dönemdeki stratejilerde ise tipik yöntem amino (amido) asit üzerinden indolizidin çekirdeğin inşa edilmesidir. Burada prolin veya onun analogları yapı taşı olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. 1961'de Govindachari ve arkadaşları çeşitli şartlarda *N*-(2,3,6,7-tetrametoksi-fenantrilmetil) prolinol'ün fenantren halkaya bağlanmada başarısız olduğunu görmüştür (72). 1969 da Chauncy ve arkadaşları Friedel-Crafts alkilasyon reaksiyonu ile (-)-*N*-fenantr-9-ilmetil-L-prolil bromit'in halka kapanma ürünü vermede başarısız olduğunu; ama (-)-*N*-fenantr-9-ilmetil-L-prolin'in hidrokloridinin polifosforik asitle katalize edilmiş alkilasyonunun başarılı olduğunu belirlemiştir (72, 203). Fakat stabil olmayan keton ara ürünü ve düşük ürün verimi bu uygulamayı sınırlamıştır (72). Fenantroindolizidin alkaloitlerinin biomimetik ilk sentezi ise 1978 yılında Herbert ve arkadaşları tarafından başarılmıştır (114).

Mangla ve arkadaşları 1980 yılında yaptıkları bir çalışmada 6,7-di(3-hidroksi-4-metoksifenil)-6,7-dehidroindolizidin 10'un ferrisiyanit oksidasyonu ile daha önce *T. asthmatica* türünden izole edilen fenantroindolizidin alkaloiti tiloforin 12'nin biyogenetik tipini sentezlemiştir (204).

Buckley ve Rapoport tarafından 1983 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitlerinin önemli temsilcilerinin kiral spesifik total sentezi (S)- α -aminoasit'den tanımlanmıştır. Bu çalışmada anahtar adım tiloforin ve kriptopleurin halka sistemlerinin optik olarak tüm sentezinde intramoleküler Friedel-Crafts açılasyon yönteminin kullanılmasıdır. Bu siklizasyonlar amido ketonlar

ile sonuçlanmış ve az bulunan bu alkaloidlerin çok miktarda sentezi sağlanmıştır (85). Rapoport ve arkadaşları tarafından tanımlanmış bu ilk stratejide kiral merkez kaynağı olarak prolin, glutamik asit, aminoasit ve piroglutamat gibi yapı taşları kullanılmıştır (199). Fakat bu çalışmada intramoleküler Friedel-Crafts alkilasyonunun katalizlenmesi aşamasında Lewis asit ile prolin'in keton vermede başarısız olduğu görülmüştür (72).

Fenantroindolizidin alkaloidleri biyogenetik olarak β -amino keton araçları üzerinden şekillenmektedir ve bu araçlar aslında filloston ve pleurospermin ile birbirine tutunmuş olarak aynı bitkide antofin ve kriptopleurin ile birlikte bulunmaktadır. Bu durum Iida ve arkadaşlarına pentasiklik indolizidin ve kinolizidin alkaloidlerinin kullanışlı yaygın yapı taşları olarak β -amino ketonlardan faydalanılarak sentezlenmelerinin yeni bir yaklaşım olabileceğini düşündürmüştür. Bu sentetik yaklaşımda anahtar özellik sonraki basamaklarda (intramoleküler fotosiklizasyon gibi) fenantren çekirdeği içeren alkaloidleri oluşturan β -amino alkoller'in sentezi için 1,3-dipolar sikloaddisyon reaksiyonunun gerekliliğidir. Bu yeni yaklaşımla Iida ve arkadaşları tarafından bu çalışmada tiloforin, kriptopleurin, septisin ve julandin'in rasemik formlarının sentezi tanımlanmıştır (74). Tiloforin ve kriptopleurin'in seko türdeşleri septisin ve julandin aynı bitki familyasında bulunan diğer bileşikler olup; fenantroindolizidinlerin kabul edilen prekürsörleridir (82). Septisin'in *F. septica* ve *T. crebriiflora* türlerinden izole edildiği ve negatif dönüşüm olduğu belirtilirken; (+)-septisin'in ise *T. asthmatica* ekstresinden elde edildiği rapor edilmiştir. Septisin bir indolizidin alkaloidi olup fenantroindolizidin alkaloidi tiloforin'in biyogenetik prekürsörüdür. Septisin'in enantioselektif sentezi ilk olarak 1969 yılında Russel ve Hunziker tarafından rapor edilmiştir. Bunların sentezinde L-prolinol yapıtaşı olarak kullanılmış ve (-)-septisin ($[\alpha]_D^{22}$ -16.2) elde edilmiştir. Tiloforin ve septisin'in rasemik sentezi gibi çeşitli sentezleri de rapor edilmiştir (205).

Birçok doğal kaynaklı tiloforin alkaloidi (ör: tiloforin ve tilokrebrin) sentezlenerek; bunların erken yolları belirlenmiş ve 1985 yılının başlarında Suffness tarafından bir reviewde özetlenmiştir (114). Suffness bu bileşiklerin daha polar türevlerinin CNS penetrasyonunu azaltabileceği ve daha kullanışlı neoplastik aktivite gösterebileceği fikrini ortaya atarken (178); Steark ve arkadaşları ise CNS yan etkilerinin kan-beyin bariyerini geçemeyecek daha polar analogların kullanılması ile minimize edilebileceğini düşünmüştür (45, 46, 69). Bu bilgiler doğrultusunda son

dönemde bu bileşiklerin daha polar analogları ile sitotoksitesinin ve CNS toksitesinin üstesinden gelinebileceği, kan beyin bariyerinden geçişin azaltılabileceği ve dahası doku spesifik ilaç dağıtım tekniklerinin geliştirilebileceği düşünülerek sentez çalışmalarına yönelim artmıştır (70).

1989 yılında Venkatachalam ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; flor içeren seko fenantroindolizidin alkaloidlerinin sentezi amaçlanmış ve biyolojik olarak aktif bu bileşiklerin içerisinde flor'un bulunmasının bunların aktivitesini daha da arttırabileceği veya biyolojik profilini değiştiren türevleri ile sonuçlanabileceği düşünülmüştür. Bu çalışma potansiyel olarak biyoaktif moleküller olan flor analoglarının hazırlanması ile ilgili yapılan ilk çalışma olup; yapıtaşları olarak homoveratrik asit ve p-florobenzildehit kullanılarak flor-substitüentli seko fenantroindolizidin bileşiğinin sentezi başarılmıştır (58).

1991 yılında Comins ve Morgan rasemik tiloforin ve bunun seko analogu septisin'in dihidropiridon aracılığı üzerinden sentezlendiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada *N*-açıldihidropiridon'dan (±)-septisin ve (±)-tiloforin bileşikleri sırasıyla beş ve altı adımda sentezlenmiştir (104, 205, 206).

Pearson ve arkadaşları 1994 yılında yaptığı bir çalışmada (±)-tiloforin bileşiğini azit ve ω-kloroalken'in intramoleküler sikloaddisyonu ve termal duble-siklizasyonla sentezlemiştir (48).

Ciufolini ve arkadaşları 1996 yılında yaptıkları bir çalışmada fenantroizidin alkaloidlerinin temsilcileri olan tiloforin, antofin ve bunların seko türdeşleri septisin ve julandin'in total sentezini Knoevenagel-Stobbe sentezi yoluyla sterik olarak kalabalık 3,4-diarilpiridin'den hazırlayarak yapmıştır (82). Comins ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı bir çalışmada ise 2 - alkil - 2, 3 - dihidro - 4 - piridonlar'ın enantioselektif preparasyonu ile rasemik sentezin modifikasyonu başarılmıştır. Böylece (-)-septisin ve (-)-tiloforin'in asimetric modelleri elde edilmiştir (205).

Lebrun ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptığı bir çalışmada 2-arilmetilpiperidin'in Pictet-Spengler siklizasyonu ile (±)-kriptopleurin, (±)-antofin ve (±)-deoksipergularinin alkaloidleri sentezlenmiş ve ana enekarbamatlar 7, 8, 9'un ardışık *N*-deproteksiyon-redüksiyon ile pirolidinler 4, 5, 6 elde edilmiştir. Son olarak da fosforlanmış karbamatlar 12, 13 ile birlikte uygun aldehitler 10 ve 11 Horner reaksiyonu ile hazırlanmıştır (55).

Kim ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada ilk kez potansiyel anti-tümör etkili fenantroindolizidin alkaloiti (-)-antofin'in asimetrik total sentezini yapmıştır (181, 184). Bu sentezin önemli özelliği enantioselektif katalitik faz transfer alkilasyonu ve doğal olmayan α -aminoasit türevinin beraber kullanılarak sterogenik merkezin oluşturulmasıdır (181). 2004 yılında Kim ve arkadaşları yaptıkları bir başka çalışmada (-)-antofin ve (-)-kriptopleurin bileşiklerinin asimetrik total sentezini (*R*)-(*E*)-4-(tributilstannil)but-3-en-2-ol kullanarak başarmıştır (184).

Szemes ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada; (*S*)-glutamik asitten furo[f]indolizinlerin enantiyospesifik sentezi ile birkaç adımda doymamışlık dereceleri farklı fenantro[f]indolizidin analogları sentezlenmiştir (207).

2004 de Banwell ve Sydnes fenantroindolizidin alkaloitlerinin seko-klorlanmış türevlerinin hedef halka kapanma ürünü ile sonuçlanmadığını belirlemiştir. Sonuç olarak kullanılan metotların hiç birinin reaksiyonların detayı ve sonuç ürünleri hakkında bilgi vermediği görülmüştür (72).

Gao ve arkadaşları 2004 yılında yaptığı bir çalışmada 4 tiloforin analogunu (DCB-3500, DCB 3501, DCB-3502 ve DCB-3503) sentezlemiştir (71). Devam eden çalışmalar sonucunda Gao ve arkadaşları bu dört tiloforin analoguna ek olarak DCB-3506 bileşiğini sentezlemiştir (56).

Antofin; drug-sensitif ve multidrug-rezistant kanser hücre dizilerine karşı düşük nanomolar aralıklarda IC₅₀ değerine sahip olması (184) ve antibiyotik, antifungal, antiviral aktivite ve başka medikal özellikleri nedeniyle sayısız sentetik araştırmaya konu olmuştur. Antofin ile ilgili ilk sentez çalışmalarında daha çok fenantren'nin ara aromatik halkasının kapanması için gerekli substratlarının hazırlanma üzerine çalışmalar yapılmıştır (88). Prolidin halka sisteminin eklenmesi için çeşitli stratejiler denenmiştir. Bunlar: pirol alkilasyonu, prolin alkilasyonu, pirol-substitüentli Wittig-like belirteçlerin kullanımı ve orto metilasyonu içermektedir. Diğer stratejiler ise piridin-bazlı stratejiler ve sikloheksadienon fotorearrangement yaklaşımları içermektedir. Enantiyoselektif yaklaşımlar alken metatezine dayalıdır ve son dönemde rapor edilmektedir (65, 88). Kim ve arkadaşlarının daha önce yaptığı çalışmada (-)-antofin için iki farklı asimetrik sentetik yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar yeterli miktarda fenantroindolizidin ve fenantrokolinolizidin alkaloitlerinin sentezi için uygun ise de rasemik formda analoglarının daha hızlı şekilde hazırlanması için yeni yaklaşımlara

gereksinim duyulmuştur (52). Kim ve arkadaşları ayrıca fenantroindolizidin alkaloitlerinin asimetrik total sentezinde en etkili sentetik anahtar aracı olan 12 numaralı bileşiğin enantiyomerik olarak saf form olduğunu belirlemiş ve kiral yapılı blok (*R*)-9 ve kiralitenin total transferi ile Overman rearrangementı yoluyla bu bileşiğin sentezini başarmıştır. Böylelikle (-)-antofin için yeni enantioselektif sentetik bir yol tanımlanmıştır (184). Böylece doğal olarak meydana gelen fenantroindolizidin alkaloit antofin'in (-)-enantiomeri yine ilk kez Kim ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (111). Daha önceki çalışmalarda rasemik antofin'in % 23 verimle kısa yoldan 7 basamakta sentezi rapor edilmiştir. Camacho ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada antofin'in içerdiği tüm karbonlar γ,δ -doymamış karben kompleksleri ile 2-alkinilfenil keton türevinin eşleşmesi ile tek bir basamakta elde edilmiştir. Antofin'in sentezlenmesi için sonraki dönüşümler üç basamakta tamamlanmıştır (88). Devam eden çalışmalarda yeni bir sentetik yolla Kim ve arkadaşları fenantren halka üzerinde farklı substituentleri taşıyan antofin analoglarının serilerini sentezlemiş ve sitotoksisite için gerekli özellikleri değerlendirmiştir (41, 52). Bir diğer çalışmada ise Kim ve arkadaşları fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloitlerinin en bilinen örnekleri olan antofin ve kriptopleurin'in total sentezini daha pratik ve daha hızlı bir yolla tanımlanmıştır. Burada her bir alkaloitin pirolidin ve piperidin halkaları azit onto an alkene'in intramoleküler 1,3-dipolar sikloaddisyonu ve sonrasında imin ve aziridin ile sonuçlanan sonraki redüksiyonu kullanılarak başarılmıştır (52).

Li ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada (+)-deoksitiloforinin bileşiğinin ilk kez total sentezi başarılmış ve 6 lineer adımda % 39.6 verimle ürün elde edilmiştir (176).

Fürstner ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada fenantrokinolizidin alkaloit kriptopleurin ve fenantroindolizidin alkaloitleri (-)-antofin, (-)-tiloforin ve (-)-fikuseptin C bileşiklerinin total sentezi yapılmıştır (70).

Wei ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada polar fenantren bazlı tiloforin türevlerini (PBTs) tasarlamış ve etkili miktarlarda sentezlemiştir. Bu bileşikler fenantren çekirdek yapısı içermiştir (46). Steark ve arkadaşlarının ortaya attığı CNS yan etkilerinin kan-beyin bariyerini geçemeyecek daha polar analogların kullanılması ile minimize edilebileceği düşüncesi (45, 46, 69) yeni fenantren bazlı tiloforin türevlerinin araştırılmasında hem yol gösterici hem de sentez çalışmalarında sınırlandırıcı olmuştur.

N-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimit hidroklorit (EDC)'in elde edilisinde Pschorr siklizasyonu ve eşleşme reaksiyonu başarılı şekilde uygulanmıştır. Böylece kısa yoldan, daha etkili ve daha polar fenantren bazlı tiloforin türevlerinin sentezinde %50'nin üzerinde ürün verimi elde edilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada Steark'ın yöntemi kullanılarak indolizidin halkanın açılması ile polar kimyasal kısım kolaylıkla fenantren iskeletin içine sokulabilmiştir (46). Wei ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı bir başka çalışmada yeni C-9 substitüentli fenantren bazlı tiloforin türevlerinin oluşturulması ve sentezi amaçlanmış ve C-9 substitüentli fenantren bazlı tiloforin türevleri (13-36) sentezlenmiştir (80).

Takeuchi ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada radikal kaskat siklizasyonu kullanılarak angular pozisyonda metil substituenti taşıyan fenantroindolizidin iskeleti sentezlenmiştir. *N*-akriloil-*N*-(1-metiletenil)-9-bromo-fenantren-10-ylmetilaminler'den, elde edilen ve bir radikal kaskat olan aril radikallerinin 6-*endo* siklizasyonu ile oluşan α -amidoyl radikallerinin sonrasında 5-*endo*-trig siklizasyonu ile angular C13a pozisyonunda metil substituenti taşıyan fenantroindolizidin alkaloidleri sentezlenmiştir (208).

Son zamanlarda A549 insan akciğer kanser hücre dizilerine karşı $EC_{50} \approx 10^{-7}$ M değerine sahip, yeni, polar, suda çözünebilen fenantren bazlı tiloforin türevlerinin serisi geliştirilmiştir (177). Sitotoksitesite için önemli olan bir molekülün özelliklerinin belirlenebilmesi için Fu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise fenantren halka üzerinde farklı substituentleri taşıyan antofin analogları serisi sentezlenmiştir (64).

Tiloindisin I kanser hücrelerine karşı nanomolar miktarlarda kuvvetli ve seçici sitotoksitesitesi nedeniyle ilgi çekici bir bileşiktir, bu nedenle Tiloindisin I ve bağlantılı analogları sentezlenerek biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Kimball ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bu çalışmada 6 - aril - 7 - (4- (metiltiyo) fenil) - 2, 3, 8, 8 *a* - tetrahidroindolizin - 5 (1*H*) - ones lar üzerinde odaklanmış ve 6,7-diaryl-2, 3, 8, 8*a*-tetrahidroindolizin-5(1*H*)-one kütüphanesini oluşturmuştur (186).

Rapor edilen sayısız sentez metodundan bir olan ve çok yaygın olarak kullanılan bir metodolojiye göre: çok büyük ölçüde yoğunlaştırılmış doğal alkaloid (\pm)-antofin ve onun geometrik izomeri (\pm)-deoksipergularinin sentezinde uygun heterosikl ile birlikte aromatik kalıntının birleşmesinden sonra, son aşamada fenantren halka sisteminin biaril

bağ içerdiği gösterilmiştir. Su ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada uygun fenantren - 9 - karboksaldehitlerden başlanarak (\pm) - antofin, (\pm) - deoksipergularinin ve diğer dehidro türdeşleri (dehidroiminium kloritleri ve bromitleri) sentezlenmiş ve ayrıca bu alkaloidlerin ve bazı sentetik ara ürünlerinin yapı-aktivite korelasyonları doğrulanmıştır (65).

Bir çok araştırmada fenantren halkanın sentezinde sayısız alternatif metot geliştirilmiş olmasına rağmen tallium (III) trifloroasetat (TTFA), kurşun (IV) tetraasetat [$\text{Pb}(\text{OAc})_4$], feniliodin (III) bis (trifloroasetat) (PIFA) ve vanadyum oksitri florit (VOF_3) gibi oksidatif eşleşme ajanlarının kullanılması daha çok ilgi ve dikkat çekmiştir. Fakat yüksek toksisite, sıkı şartlar ve düşük miktarda ürün verimi bu ajanların kapsamlı uygulamalarını sınırlandırmıştır. Lü ve arkadaşları daha önce substitüentli metil (*Z*) ve (*E*)- α -fenilsinamat'ın oksidatif eşleşmesi ile polimetoksi substitüentli fenantren türevlerinin sentezi için vanadyum oksitriklorit (VOCl_3)'in kullanımını rapor etmiştir. Burada oksidant yüklemesi azaltılmış ve ürün verimi arttırılmıştır. Buna rağmen sıkı şartlar ve yan reaksiyonlar sentezin geniş faaliyet alanını sınırlandırmıştır. Oksidatif aril-aril eşleşme reaksiyonları için demir (III) kompleksi ve bazı demir (III) solvantların kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır. Fakat bu komplekslerin hazırlanması genellikle sıkıntılı ve ürün verimi orta dereceli olduğundan fenantren sentezi için yeni alternatif metotlara gereksinim duyulmuştur. Demir (III) klorit son yıllarda organik sentezde ucuz, çevre dostu ve güçlü oksitleyici ajan olması nedeniyle polimerizasyon, oksidasyon ve oksidatif eşleşmeler gibi yararlı reaksiyonlarda geniş şekilde kullanılmaktadır. Özellikle oksidatif eşleşme polimerizasyonlarında FeCl_3 kullanımı belirgin önem kazanmıştır. Binaftoller ve polisiklik arenler FeCl_3 'ün aracılık ettiği oksidatif eşleşmeler süresince sentezlenmiştir. Bu çalışmada ise Lü ve arkadaşları yeni bir yöntemle pratik şekilde oda sıcaklığında FeCl_3 kullanarak metil 2,3-difenilakrilat'ın intramoleküler oksidatif eşleşmesi yolu ile bol miktarda polimetoksi substitüentli fenantren halkanın sentezini amaçlamıştır. Demir (III) klorit, polimetoksi substitüentli fenantren türevlerinin (*E* veya *Z*)-2,3-di(substitüentli fenil)akrilat'ın intramoleküler oksidatif eşleşmesi yoluyla sentezlenmesinde kullanılmıştır. Sonuç olarak ılımlı reaksiyon şartlarında, ucuz ve nontoksik FeCl_3 'ün kullanılması yeni pratik ve geniş alanda kullanımı olan önemli fenantren halkaların sentezi için gerekli görülmüştür (201).

Bitkilerin biyolojik olarak aktif doğal ürünlerinin alternatif, geleneksel ve sentetik agrokimyasallar olarak taranmasını amaçlayan ve Wang ve arkadaşları tarafından yürütülen araştırma programının bir kısmında fenantroindolizidin alkaloidlerinin sentezi ve geliştirilmesine odaklanılmış ve üç farklı fenantroindolizidin alkaloidi (+)-tiloforin, (+)-deoksitiloforinin ve 2,3,6,7-tetrametoksifenantro[9,10,3',4']-indolizidin için sentetik yaklaşım geliştirilmiştir. Bu çalışmada oda sıcaklığında bol miktarda ürün elde etmek ve oksidatif eşleşme yolu ile polimetoksi- substitüentli fenantren-karboksilik asidi hazırlamak için FeCl₃ kullanılmıştır. Mild reaksiyon şartlarında ve çevre dostu FeCl₃'ün kullanılması şartıyla önemli fenantren halka sentezinde yeni ve pratik bir yol geliştirilmiştir. Bu protokolün daha ileri uygulamalarında anahtar basamak olarak pirol'den başlanarak tiloforin, deoksitiloforinin ve antofin'in sırasıyla % 48, % 44 ve % 46 gibi gerçek elde edilebilir oranlarda başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmüştür (73). Wang ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloidlerinin ilk kez aza-modifikasyonları tasarlanarak iki aza-analoğu üretilmiştir. Hidrazin monohidrattan başlanarak 13*a*-azatiloforin ve 14*a*-aza-7-metoksikriptopleurin yüksek miktarlarda sentezlenmiştir (84).

Paladyum-katalizli karboaminasyon metodu kullanılarak rasemik doğal ürün tiloforin'in [(±)-1] total sentezi önceki çalışmalarda Wolfe ve arkadaşları tarafından gösterilmiş olup Rossiter ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada elektronca zengin aril bromit 4 adımda hazırlanarak; bu olefinik karbomat ile birlikte paladyum katalizli olarak Wolfe karboaminasyon şartlarında reaksiyona sokulmuş ve rasemik 2-(arilmetil)pirolidin yeterli miktarda ve ayrıntılı olarak sentezlenmiştir (86).

Yamashita ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada fenantro[9,10-*b*]indolizidin-one, fenantro[9, 10-*b*]-kinolizidin-9-one ve ilgili benzolaktamlar, benzolaktam halka formülasyonu ile direk aromatik karbonilasyon yöntemi kullanılarak Pd(OAc)₂ katalizli ortamda sentezlenmiştir. Ayrıca tiloforin, kriptopleurin ve antofin bileşiklerinin de Pd(OAc)₂-katalizli ortamda direk aromatik karbonilasyon yöntemi kullanılarak benzolaktam halka formülasyonu ile sentezi de rapor edilmiştir (61).

Safar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tilofori(ni)n'in enantiopure ve heteroaromatik analoglarının geniş aralıkta ve birkaç basamakta hazırlanmasına olanak

sağlayan enantiopure (*S*)-glutamik asit ve (hetero)aren-karboksaldehit oldukça yararlı yapı taşları olarak gösterilmiştir (209).

Son yaklaşımlar Pt(II)-katalizlenmiş sikloizomerizasyon, [5+5]-sikloaddition, intramoleküler alkan karboaminasyon, 1,3-dipolar sikloaddisyon ve benzeri diğer anahtar basamakları içermektedir. Ambrosini ve arkadaşları multikatalitik oksidatif aminoklorokarbonilasyon/Friedel-Crafts reaksiyonunu anahtar basamak olarak kullanarak tilofora alkaloidleri: tiloforin ve 13 α -sekoantofin'i hızlı ve sentetik bir yaklaşımla elde etmiştir. Ayrıca kolayca uzaklaştırılabilen nosil (Ns) grubunun daha önce rapor edilen tosil grubunun yerine başarılı bir şekilde kullanılabilceği de bu araştırmada gösterilmiştir (57).

Fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloidlerinin kiral merkezinin azot atomuna α bağlanması nedeniyle; asimetrik sentezlerinde α -aminoasitler ve bunların prolin, glutamik asit, aminoadipat, piroglutamat ve *D*-serin metil ester hidroklorit gibi türevleri kiral merkez kaynağı olarak geniş kullanıma sahip olmuştur (63). Ayrıca bu alkaloidlerin asimetrik sentezinde; kiral yardımcı yaklaşım, kiral allilik alkol, intramoleküler alken karboaminasyonu için enantioselektif kataliz ve enantioselektif faz-transfer alkilasyonu yaklaşımları var olup bunların bazılarının seko yapıların sentezi içinde kullanıldığını gösteren farklı stratejilerin bulunduğu da belirlenmiştir (63, 199). Cui ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada (*R*)-antofin ve (*R*)-kriptopleurin; prolin-katalizlenmiş ardışık α -aminoksilasyon ve aldehit ile Horner-Wadsworth-Emmons olefinasyonu üzerinden yüksek optik saflıkta sentezlenmiştir (63).

C-14 ve OH grup taşıyan birkaç polar antofin analogu sentezlenmiş olmasına rağmen E-halka substituentli analoglar (C11- C14 de) bu güne kadar sentezlenmemiştir. Ayrıca enantiyomerik olarak doğal ve saf fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloidlerinin sentezi için yeni, çok amaçlı bir metot tanımlanmıştır. Yang ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bu çalışmada Rapoport'un laktam ünitesinin aksine yenilik olarak oksazolidinon ünitesi kullanılmış ve doğal ürünler *R*-antofin ve *R*-kriptopleurin'in yeni E-halkası taşıyan analogları 13c(E7), 12-okso-*S*-antofin(17) ve 12*N*-metil-12-aza-*S*-antofin(18) ilk kez bu yeni metotla sentezlenmiştir. Bu çalışmanın doğal alkaloidlerin E-halkası taşıyan varyasyonlarının ileri SAR çalışmalarına kaynak olacağı düşünülmüştür (199).

Wang ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada rasemik

fenantroindolizidin alkaloidleri tiloforin, antofin, deoksitiloforinin ve optikçe saf alkaloidler S-(+)-tiloforin ve R-(-)-tiloforin sentezlenmiştir. Burada ileri tuzlama modifikasyonları ile tiloforin'in stabilitesinin ve suda çözünürlüğünün artırılması ve uygulamalarda antiviral aktivitenin geliştirilmesi amaçlanmıştır (42). Wang ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir diğer çalışmada ise C9-sübstitüentli fenantrenbazlı tiloforin türevleri (PBTs) tasarlanıp, sentezlenmiştir (174). Wang ve arkadaşlarının antiviral ajanlar olarak fenantroindolizidin alkaloidleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda geniş bir aralıkta rasemik alkaloidlerin hazırlanması için etkili yaklaşımlar geliştirmiştir. Bu çalışmada daha ileri araştırmalarla antiviral aktivite üzerine α -C kiralitenin etkisi araştırılmış ve testler için enantiopure fenantroindolizidin alkaloidlerine gereksinim duyulmuştur. Sonuç olarak altı enantiopure fenantroindolizidin alkaloidi (1a-c) Parham-tip sikloaçilasyon anahtar basamağı ile kısa, basit ve etkili yolla başarılı şekilde sentezlenmiştir (87).

Stoye ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada L-prolinden, duble brominasyonu ve N-aziridinilimin serbest-radikal siklizasyonunu anahtar basamak olarak içeren dokuz basamakta, veratraldehit ve homoveratrik asit kullanılarak (S)-(+)-tiloforin'in kısa rasemizasyonu ve protecting-group free sentezi yapılmıştır (180).

Fenantroindolizidin alkaloid analoglarının alternatif polaritelerinin CNS toksisitesi ve antitümör aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılmasının amaçlandığı bir çalışmada Lewis asit'in katalizlediği N-(3-hidroksi-2,6,7-trimetoksi-fenantren-9-ilmetil)-2-klorometilpirolidin'den başlayan intramoleküler Friedel-Crafts reaksiyonu ile 3-demetiltiloforin'in sentezi sürecinde iki klorlanmış fenantren türevi N-(4,10-dikloro-3-hidroksi - 2,6,7- trimetoksifenantren - 9 - ilmetil)- 2 - klorometilpirolidin ve N - (4 - kloro -3-hidroksi-2,6,7-trimetoksifenantren-9-ilmetil)-2-klorometilpirolidin elde edilmiştir. Li ve arkadaşları bu çalışmada 3-demetiltiloforin ve fenantren halka üzerinde fonksiyonel 3-hidroksil gruba dayalı türev serilerinin sentezini başarmıştır (72).

Güçlü antitümör ve antiviral aktivite gösteren ve enantiomeri olan fenantroindolizidin alkaloidi (+)-antofin Pansare ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada tanımlanmış ve enantiyomerik olarak zenginleştirilmiş γ -nitroketondan fonksiyonelize indolizidinlerin etkili elde edilme yolu gösterilmiştir (202).

Yang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada yeni heterolaktam birleşmiş antofin ve kriptopleurin analogları tasarlanarak sentezlenmiştir (199).

Wu ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada ilk kez *C. vincetoxicum* türünden izole edilmiş olan (-)-6-*O*-desmetilantofin bileşiği ve bunun doğal olmayan enantiyomeri (+)-6-*O*-desmetilantofin bileşiğinin etkili ve kolay yoldan sentezi başarılmıştır (210).

Ikeda ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada kuvvetli sitotoksik etkili fenantroindolizidin alkaloidi olan ve son dönemde kelebekten (*I. similis*) izole edilen bir bileşiğin asimetrik total sentezi amaçlanmış ve başarılmıştır. Ayrıca aynı yöntem kullanılarak çeşitli türevleri de sentezlenmiştir. Bu bileşiğin yapısal özelliği C14 pozisyonunda hidroksil grup taşımasıdır. Bu zamana kadar çeşitli araştırmacılar tarafından fenantroindolizidin alkaloidlerinin total sentezi ile ilgili pek çok çalışma yapılmış fakat stereoseçicilik ile düzenlenmiş 14-hidroksil grubun nadir çalışıldığı görülmüştür (43).

Wang ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin ve fenantrokinolizidin alkaloid serileri ve bunların 14-amino türevleri sentezlenmiştir (200).

Lv ve arkadaşları tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada önceki çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* antitümör aktivite gösterdiği belirlenen; kan beyin bariyerinden beyin dokularına iyi yayıldığı tespit edilen ve *T. atrofoliculata* ve *T. ovata* türlerinden izole edilen (+)-13a-(S)-deoksitiloforinin alkaloidinin 34 türevi tasarlanmış ve sentezlenmiştir (44).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

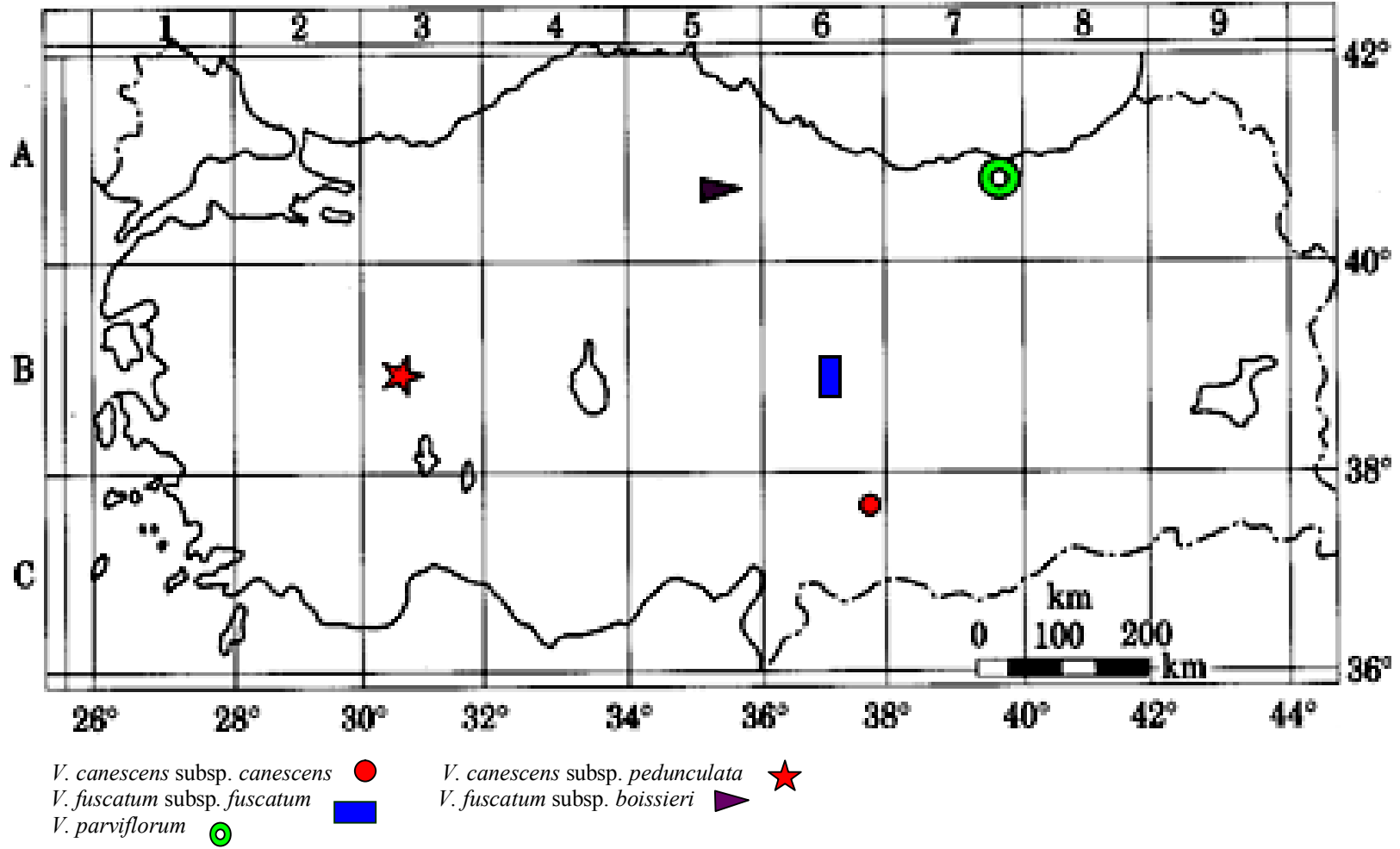
3.1. Gereç

3.1.1. Bitkisel Materyal

Çalışma materyali olarak *V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata* (endemik), *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* (endemik) ve *V. parviflorum* (endemik) türlerini içeren *Vincetoxicum* cinsine ait beş takson seçildi. Türlerin toplandığı lokaliteler; “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” Vol: 6 ve herbaryum kayıtları (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu (ANK), Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu (GAZI) ve Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu (HUB)) incelenerek belirlendi, örnekler doğal habitatında fotoğraflandı, çiçekli oldukları aylarda toplandı ve gölgede kurutularak çalışma materyalleri hazırlandı (Çizelge 3.1.) (Şekil 3.1-6.). Kurutulan bitkisel materyallerin teşhisi Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet İLÇİM tarafından yapıldı ve bitkisel materyallere ait herbaryum örnekleri Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Herbaryumuna bırakıldı.

Çizelge 3.1. Çalışılan türlerin toplandığı lokaliteler, toplama zamanları ve herbaryum numaraları.

Türler	Lokaliteler	Toplama zamanları	Herbaryum numaraları
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	C6 Kahramanmaraş: Engizek Dağı, Küçükcerit Köyü çevresi, Tarla açıklığı, yaklaşık 1000 m	25.06.2009	A. İLÇİM 1283 MKUH
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i>	B3 Afyon: Dinar; Kumalar Dağı, Haydarlı, Yeniköy mah. 750 m güneybatısı, Delikli taş sırtı mevki, Uzunmusakırı tepesi, kayalık, 1375-1500 m.	06.05.2009	A. İLÇİM 1284 MKUH
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	B6 Kayseri: Pınarbaşı; Kavak Köyü üzeri, Hınzır Dağı, 1800 m.	10.07.2009	A. İLÇİM 1315 MKUH
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i>	A5 Amasya: Ferhat Dağı yamaçları, Memidede Mezarlığı civarı, 460 m.	12.06.2009	A. İLÇİM 1316 MKUH
<i>V. parviflorum</i>	A7 Trabzon: Meryemana, c. 1200 m.	05.07.2009	A. İLÇİM 1334 MKUH



Şekil 3.1. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinin toplandığı lokaliteler.



1



2



3

Şekil 3.2. *V. canescens* subsp. *canescens* türünün 1: genel görünüşü, 2-3: çiçekli-meyveli görünüşü.



1



2



3

Şekil 3.3. *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün 1: genel-çiçekli görünüşü, 2-3: meyveli görünüşü.



1



2



3



4

Şekil 3.4. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün 1-3: genel görünüşü, 4: çiçekli- meyveli görünüşü.



1



2



3

Şekil 3.5. *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün 1: genel görünüşü, 2: çiçekli, 3: meyveli görünüşü.



1



2



3

Şekil 3.6. *V. parviflorum* türünün 1-3 genel ve çiçekli görünüşü.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Reaktifler

3.1.2.1. Kimyasal Malzemeler

Adı	Markası	Adı	Markası
Diklorometan	Carlo Erba	Formaldehit	Merck
Metanol	Merck	Pikrik asit	Fluka
Etanol	Merck	Brom	Merck
HCl	Merck	FeCl ₃	Aklar kimya
Amonyak	Climax	α -Naftol	Merck
Petrol eteri	Merck	NaOH	Climax
Dietileter	Sigma-Aldrich	Na ₂ HPO ₄	Kimetsan
Kloroform	Merck	Sodyum asetat	Aklar kimya
Benzen	Merck	Ksilen	Carlo Erba
Aseton	Akkimya	Formik asit	Merck
Etil asetat	Merck	Amilalkol	Lachema
Sülfirik asit	Merck	Kurşun asetat	Sigma-Aldrich
Asetik asit	Climax	Kurşun sub-asetat	Sigma-Aldrich
Glasiyal asetik asit	Climax	Na ₂ CO ₃	Aklar kimya
Toluen	Merck	CDCl ₃	Merck
Hekzan	Merck	Amonyum asetat	Merck

3.1.2.2. Kullanılan Reaktifler

Dragendorff Reaktifi	Mayer Reaktifi
Seriksülfat Reaktifi	Molisch Reaktifi
Fehling A/B Reaktifi	Seliwanoff Reaktifi
Baljet A/B Reaktifi	Stiasny Reaktifi

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Markası
Rotary Evaporatör	Heidolph-Rotar TLR 1000
Su Banyosu	Elektro-mag
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex
Elektrikli Terazı	Denver Instrument
Karıştırıcı	Stirrer DLS-Velf Scientifica
Değirmen	Retsch SK 100
pH metre	1. Metler Toledo-Seven Easy 2. Thermo
Etüv	Memmert RS 232
Saf Su Cihazı	Millipore
Spektrofotometre	Spectroline-Model CM-10
Mikroskop	OlympusCX21
Sıvı Kromatografisi/Kütle/Kütle	Agilent 1200 Series: Agilent Technologies 6460
Spektrometresi (LC/MS/MS)	Triple Quad LC/MS/MS
Nükleer Magnetik Rezonans	Bruker Ultrashield Plus Biospin GmbH 400 MHz
Spektrometresi (NMR) Cihazı	Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi
Kolon	YMC Pro C18 (150x3mm, 5 µm, YMC, Japan)

3.2. Yöntem

3.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

3.2.1.1. Teşhis Reaksiyonları

Türlerin içerdiği genel etken madde gruplarının saptanması için genel teşhis reaksiyonları uygulandı.

3.2.1.1.1. Alkaloit Teşhisi

1. Aşama

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyaller, ekstre A, ekstre B ve ekstre C serilerinden 2'şer g tartılarak 20 mL % 6'lık H₂SO₄ içeren % 70'lik etanolle 1 dakika kaynatıldı, soğutuldu, çökmeye bırakıldı ve süzüldü. Her bir ekstreden 2'şer tüpe bir miktar aktararak Dragendorff ve Mayer Reaktifleri damlatıldı, tüplerde kirli beyaz ve turuncu çökelek oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bu kontrolden sonra deneye devam edildi.

2. Aşama

Süzüntülere % 25'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edilerek alkalilendirildi ve ayırma hunisine aktarıldı. Üzerine 15 mL CH₂Cl₂ eklendi ve hafifçe çalkalanarak tüketildi. Fazlar ayrılınca alttaki CH₂Cl₂'li faz ayrı bir kaba aktararak üzerine 15 mL % 10'luk asetik asit çözeltisi eklendi ve kuvvetli çalkalanarak tüketildi. Altteki CH₂Cl₂'li tabaka atıldı, üstteki tabaka iki tüpe aktararak tüplerden birine Dragendorff diğerine ise Mayer Reaktifleri damlatıldı ve tüplerde çökelek oluşup oluşmadığı gözlemlendi (211).

3.2.1.1.2. Kardiyoaktif Heterozit Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 2'şer g tartılarak 10 mL % 70'lik etanolle su banyosunda 2 dakika kaynatıldı ve süzüldü. Süzüntü 2 misli suyla seyreltildi, üzerine 1 mL derişik kurşun subasetat çözeltisi ilave edildi, süzüldü. Süzüntü 10 mL kloroformla ayırma hunisinde ekstre edildi. Kloroform tabakası ayrılarak 3 kapsüle alındı. Aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı.

- a) Keller Klani Reaksiyonu: Kapsüldeki süzüntü kuruluğa kadar uçuruldu. Üzerine 3 mL % 3,5'lik glasiyel asetik asitli FeCl₃ çözeltisi ilave edildi, bir dakika bekletildi. Deney tüpüne aktararak üzerine tüpün kenarından tabaka yapacak şekilde 2 mL derişik H₂SO₄ dikkatlice aktarıldı, meydana gelen renk gözlemlendi.

- b) Baljet Reaksiyonu: Kapsüldeki çözelti uçuruldu, artık 1 mL etanolde çözüldükten sonra üzerine Baljet reaktifi (Baljet A-B) damlatıldı ve renk değişimi meydana gelip gelmediği gözlemlendi (211).
- c) Lieberman-Burchard Reaksiyonu: Kapsüldeki çözelti kuruluğa kadar uçuruldu. Artık üzerine 1 mL asetik asit anhidrit ve derişik H₂SO₄ karışımından (5:1) eklendi. 5 dakika bekletilerek renk değişimi gözlemlendi (212).

3.2.1.1.3. Saponozit Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartıldı, 100 mL su ilave edilerek bir balonda pH kontrolü yapılarak 30 dakika kaynatıldı (212). Kaynama sırasında sıvının asit reaksiyonu gösterip-göstermediği turnusol kağıdı ile zaman zaman kontrol edildi. Eğer asit reaksiyonu var ise % 1'lik Na₂CO₃ çözeltisi ile nötrleştirildi (211). Soğutularak süzöldü, hacmi balon jøjede 100 mL'ye tamamlandı. Bir cam tüpe 10 mL kadar alındı, tüpün ağzı başparmak ile kapatılarak yatay olarak 15 sn. çalkalandı. 15 dakika bekletildi, süre sonunda kalıcı köpük oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Köpük gözlenirse 1-2 damla 2 N HCl damlatılınca kaybolup kaybolmadığı kontrol edildi (212).

3.2.1.1.4. Flavonoit Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından 5'er gram toz edilmiş materyal tartılarak üzerine 100 mL su ilave edildi ve % 5'lik dekoksijenler hazırlandı, soğutuldu, balon jøjeye süzölerek 100 mL'ye tamamlandı. Süzöntüler 3 tüpe aktarıldı ve aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı.

- a) 1. tüpteki süzöntü üzerine 1-2 damla % 10'luk NH₃ çözeltisi ilave edildi ve renk değişimi gözlemlendi.
- b) 2. tüpteki süzöntü üzerine 1-2 damla kurşun asetat çözeltisi ilave edildi ve renk değişimi gözlemlendi.

- c) 3. tüpteki süzüntü üzerine % 5'lik FeCl_3 çözeltisi ilave edildi. Renk değişimi gözlemlendi.

Siyanidin Reaksiyonu: Toz materyallerden 1'er g tartılarak % 50'lik etanolle su banyosunda yarım saat tüketilerek süzüldü. Derişik HCl ve bir spatül ucu Mg tozu ilave edildi Hidrojen gazı çıkışı ile birlikte çözeltinin rengi gözlemlendi (211).

3.2.1.1.5. Antosiyanozit Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartılarak % 50'lik etanolle hafif alevde ekstre edildi, süzüldü. Süzüntü 5 kısma ayrılarak aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı.

- a) Dilüe H_2SO_4 ilavesi ile oluşan renk gözlemlendi.
- b) NaOH çözeltisi ilave edilip sonra dilüe HCl ilave edildiğinde meydana gelen renk gözlemlendi.
- c) Kurşun asetat çözeltisi ilave edildiğinde meydana gelen çökelek gözlemlendi.
- d) Ayırma hunisine alınan süzüntü bir miktar amilalkol ile çalkalandı ve tabakalarda meydana gelen renk gözlemlendi (211).

3.2.1.1.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartılarak bir erlende su ile ısıtıldı. Pikrik asit kağıtlardan bir parça sodyum karbonat çözeltisi ile ıslatıldı ve bir mantarla erlenin boynuna sıkıştırılarak ıslatılmış materyalin yakınına kadar sarkıtıldı. Ağzı çok sıkı olmayacak şekilde kapatılmış olan erlen hafif bek alevinde ısıtıldı. Kağıtta meydana gelen renk gözlemlendi (211).

3.2.1.1.7. Tanen Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından 5'er gram toz edilmiş materyal tartılarak üzerine 100 mL su ilave edildi ve % 5'lik dekoksijenasyonu hazırlandı,

soğutuldu, balon jöjeye süzülerək 100 mL'ye tamamlandı. Süzüntüler 4 tüpe ayrılarak aşığıdaki reaksiyonlar uygulandı.

- a) 1. tüpteki süzöntü üzerine % 5'lik FeCl_3 çözeltilisi ilave edildi. Renk değişimi gözlendi.
- b) 2. tüpteki süzöntüler üzerine % 1'lik tuzlu jelatin çözeltilisi ilave edildi. Çökelek oluşup oluşmadığı gözlendi.
- c) 3. tüpteki süzöntü Stiasny reaktifı ile ısıtılıp soğutulduğunda çökelek oluşup oluşmadığı gözlendi (212).

Kontrolden sonra çökelekli süzöntü süzüldü. Bir tüpe 3 mL alınarak sodyum asetat ile doyuruldu, doymuş çözeltiliye 3 damla seyreltik FeCl_3 çözeltilisi damlatıldı ve çökelek oluşup oluşmadığı veya renk değişimi olup olmadığı gözlendi (213).

- d) 4. tüpteki 5 mL süzöntü üzerine 1 mL bromlu su ilave edildi. Çökelek oluşup oluşmadığı gözlendi (212).

3.2.1.1.8. Antrasenozit Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartıldı, 20 mL dilüe H_2SO_4 ile 2 dakika kaynatıldı. Hidroliz ürünü sıcakken süzüldü, soğutuldu ve süzöntü biraz benzen ile ekstre edildi. Üstteki benzen tabakası alındı ve % 10'luk amonyak ile çalkalandı. Altteki amonyak tabakasının rengi gözlendi (Borntrager reaksiyonu) (211).

3.2.1.1.9. Kumarin Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartılarak % 50'lik etanolle su banyosunda tüketildi, süzüldü. Kapsüle alınan süzöntü kuruluğa kadar yoğunlaştırıldıktan sonra 1 N NaOH çözeltilisinden damla damla ilave edildi ve UV de verdiği floresans gözlendi (214).

3.2.1.1.10. Nişasta Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartıldı, 5 mL su ile ısıtıldı. 45 mL sıcak su ilave edildi ve iyot çözeltisinden 1-2 damla ilave edildiğinde oluşan renk gözlemlendi (214).

3.2.1.1.11. Oz Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 5'er g tartıldı, bir havanda 10 mL su ile iyice ezildi. Sulu kısımlar süzülerek alındı, kalan kısım iki defa daha 10 mL su ile aynı şekilde ezilerek ekstratlar süzüldü ve birleştirildi. Bu süzüntüler bek üzerinde yaklaşık 10 mL kalana kadar yoğunlaştırıldı. Yoğun ekstre üzerine kurşun asetatın sudaki % 10'luk çözeltisinden 5 mL ilave edildi. Çökeltiler süzülerek alındı, süzüntülere NaHPO₄'ün doymuş çözeltisinden damla damla ilave edildi ve kurşunun fazlası çöktürüldü. Süzüldü, süzüntüler balon jöjede 25 mL'ye tamamlandı. Süzüntülere aşağıdaki reaksiyonlar uygulandı.

- a) **Fehling Reaksiyonu**: Süzüntüden 1 mL deney tüpüne alındı üzerine 2 mL Fehling A ve 2 mL Fehling B çözeltileri ilave edildi. Bek alevinde dikkatli olarak ısıtıldı ve tüpte çökelek oluşup oluşmadığı gözlemlendi.
- b) **Molisch Reaksiyonu**: Süzüntüler üzerine α -naftalün % 15'lik çözeltisinden 1-2 damla ilave edildi. Bu karışımın üstüne 1 mL kadar derişik H₂SO₄ tabaka teşkil edecek şekilde dikkatlice ilave edildi ve renk oluşup oluşmadığı gözlemlendi.
- c) **Seliwanoff Reaksiyonu**: Süzüntüler üzerine 1 mL Seliwanoff reaktifi eklenerek oluşan renk değerlendirildi (211).

3.2.1.1.12. Uçucu Yağ Teşhisi

Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarında uçucu yağ olup olmadığı organoleptik ve mikroskopik olarak incelendi (213, 215).

Organoleptik inceleme

Türlerin toprak üstü kısımları avuç içerisinde ovuşturulup koklandığında herhangi bir koku olup olmadığına bakıldı.

Mikroskopik inceleme

Türlerin toz edilmiş toprak üstü kısımları mikroskopta incelenerek salgı organı taşıyıp taşımadıkları değerlendirildi.

3.2.1.1.13. Sabit Yağ Teşhisi

Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen toz materyallerden 1'er g tartılarak 10 mL toluen ile sık sık çalkalanarak ekstre edildi, süzüldü. Süzüntüden 5 mL bir kapsüle alındı, su banyosunda 1-2 damla kalıncaya kadar yoğunlaştırıldı. Yoğun ekstre süzgeç kağıdına küçük lekeler halinde uygulandı. Süzgeç kağıdı 100 °C'lik etüvde 10-15 dakika tutuldu kağıtlarda yağsı bir iz olup olmadığı kontrol edildi (211).

3.2.1.2. Ekstraksiyon Çalışmaları

3.2.1.2.1. Ekstrelerin Hazırlanması

Diklorometan, Metanol-Diklorometan ve Metanol Ekstrelerinin Hazırlanması

Gölgede kurutulup toz haline getirilen ve miktarları aşağıda belirtilen, toprak üstü ve kök kısımlarından meydana gelen bitkisel materyaller oda sıcaklığında öncelikle CH₂Cl₂ ile (3 X 3 L) masere edildi, süzüldü ve süzüntüler birleştirildi. Kurutulan materyaller sonrasında sırasıyla MeOH-CH₂Cl₂ (1:1) ve MeOH ile (3 X 3 L) masere edildi süzüldü ve süzüntüler ayrı ayrı birleştirildi. Elde edilen diklorometanlı, metanol-diklorometanlı ve metanollü süzüntüler rotaevaporatörde düşük sıcaklık ve yüksek basınç altında darası alınmış armut balonlarda yoğunlaştırılarak üç farklı polaritede ekstre (toprak üstü ve köklerden elde edilen ekstre A, ekstre B, ekstre C serileri) elde

edildi ve ekstreler kullanılabildi kadar +4 °C de karanlıkta muhafaza edildi (Şekil 3.7.) (45).

Kullanılan toz edilmiş örnek miktarı:

	<u>Ekstre A ve B için miktarlar</u>	<u>Ekstre C için miktarlar</u>
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i> :	T.Ü: 1100 g; Kök: 330 g	T.Ü: 750 g; Kök: 500 g
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> :	T.Ü: 1250 g; Kök: 500 g	T.Ü: 750 g; Kök: 500 g
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i> :	T.Ü: 1000 g; Kök: 500 g	T.Ü: 500 g; Kök: 250 g
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> :	T.Ü: 410 g; Kök: 100 g	T.Ü: 280 g; Kök: 200 g
<i>V. parviflorum</i> :	T.Ü: 400 g; Kök: 150 g	T.Ü: 100 g; Kök: 15 g

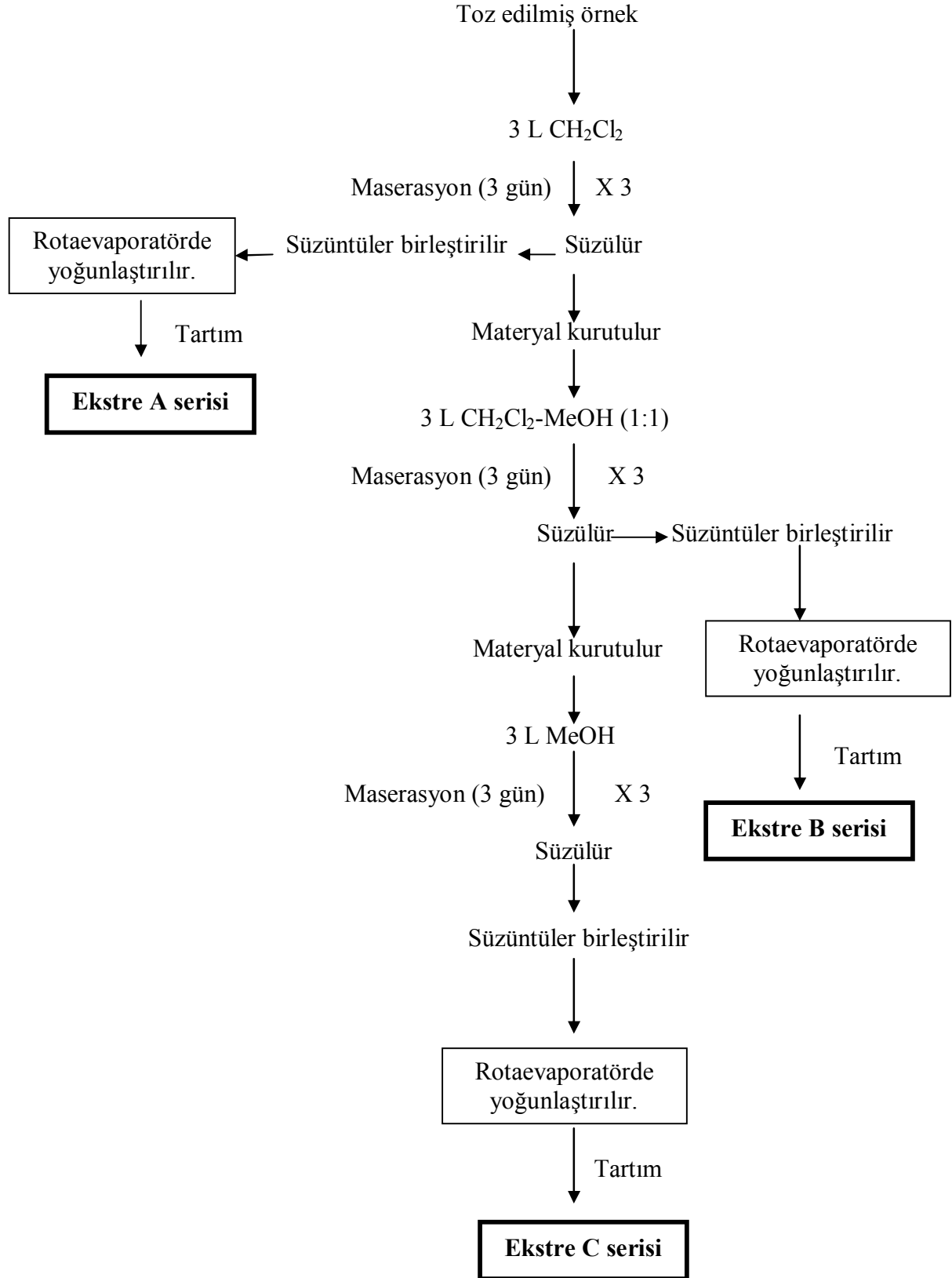
(T.Ü: Toprak Üstü)

Etanol Ekstrelerinin Hazırlanması

Biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere türlerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan A, B ve C ekstre serilerine ek olarak toprak üstü kısımlarının etanollü ekstreleri hazırlandı. Çalışılan türlerin gölgede kurutulup toz haline getirilen ve miktarları aşağıda belirtilen toprak üstü kısımlarından meydana gelen bitkisel materyaller, % 96'lık etanolle 30 dakika ultrasonik karıştırıcıda karıştırıldı ve 1 gece oda sıcaklığında karıştırılarak bekletildi. Süspansiyonlar süzüldü, süzüntüler rotaevaporatörde düşük sıcaklıkta yoğunlaştırıldı, elde edilen ekstreler kullanılabildi kadar +4 °C de karanlıkta saklandı (24).

Kullanılan toz edilmiş örnek miktarı:

- V. canescens* subsp. *canescens*: Toprak üstü: 100 g
V. canescens subsp. *pedunculata*: Toprak üstü: 100 g
V. fuscatum subsp. *fuscatum*: Toprak üstü: 100 g
V. fuscatum subsp. *boissieri*: Toprak üstü: 50 g
V. parviflorum: Toprak üstü: 50 g



Şekil 3.7. Ekstre A, ekstre B ve ekstre C serilerinin elde edilişi.

3.2.1.2.2. Alkaloit Fraksiyonlarının Hazırlanması

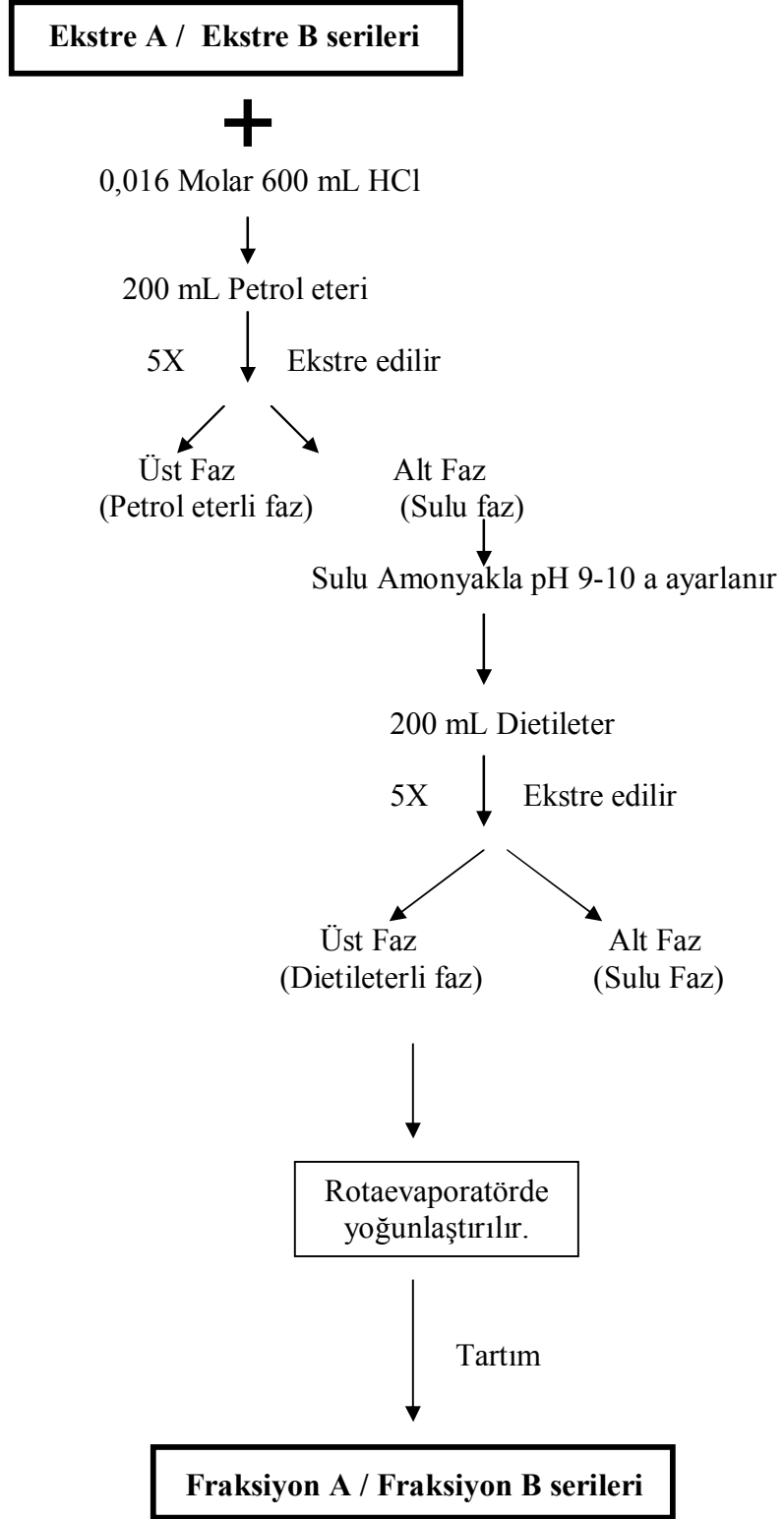
Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ham ekstreler (ekstre A ve ekstre B) 600 mL, 0.016 M HCl'de çözülerek çözeltiler ayırma hunisinde petrol eteri ile (5 x 200 mL) ekstre edildi. Sulu fazlar bir balonda toplandı ve % 10'luk NH₃ ile alkalilendirilerek, pH'sı 9-10'aralığına ayarlandı. Alkalilendirilen sulu fazlar ayırma hunisinde dietileter (4 x 200 mL) ile ekstre edildi ve alkaloit içeren dietileterli fazlar bir balonda toplanarak rotaevaporatörde düşük sıcaklıkta yoğunlaştırıldı Böylece alkaloit fraksiyonu A ve alkaloit fraksiyonu B elde edildi ve fraksiyonlar kullanılabildi kadar +4 °C de karanlıkta muhafaza edildi (Şekil 3.8.) (45).

3.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce Tabaka Kromatografisinden değişik aşamalarda faydalanıldı. İlk olarak toprak üstü kısımlarından ve köklerden elde edilen ekstrelerin ve fraksiyonların içerdiği maddelerin tespiti için kullanıldı. Öncelikle tüm türlerin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden elde edilen ekstre A, ekstre B ve ekstre C serileri ile toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloit fraksiyonu A ve alkaloit fraksiyonu B serileri, silikagel 60 F₂₅₄ İTK plaklarına uygulandı ve çeşitli çözücü sistemleri yardımıyla incelendi (Çizelge 3.2.). Plakların üzerine alkaloit varlığında turuncu renk veren Dragendorff reaktifi püskürtülerek 254 ve 365 nm dalga boylarında UV ışığı altında görüntüleri incelendi (45).

Çizelge 3.2. İTK için kullanılan çözücü sistemleri.

Ekstreler	Çözücü sistemi (h/h)
Ekstre A -T. üstü; Ekstre B-T. üstü	Benzen: Aseton (5:1)
Ekstre A -T. üstü	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ : Aseton (9:1) CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)
Ekstre B-T. üstü	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)
Ekstre C-T. üstü	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (8:2)
Ekstre A-Kök	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9.5:0.5)
Ekstre B-Kök	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)
Alkaloit fraksiyon A; Alkaloit fraksiyon B	Benzen: Aseton (5:1) X 2



Şekil 3.8. Alkaloid fraksiyonu A ve alkaloid fraksiyonu B serilerinin elde edilişi.

3.2.1.4. Alkaloit Fraksiyonlarının LC/MS/MS Analizleri

Ekstre A ve Ekstre B serilerinden elde edilen alkaloit fraksiyonlarının uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla fraksiyonlar metanolde çözüldü ve bunların farklı konsantrasyonları ile çeşitli denemeler yapıldı. Sonuç olarak fraksiyonlar için uygun konsantrasyonlar belirlendi ve çalışılan 5 türün toprak üstü kısımlarının iki farklı alkaloit fraksiyonu (Diklorometan, Diklorometan:Metanol (1:1)) olmak üzere toplamda 10 fraksiyona ait numuneler hazırlanarak LC/MS/MS analizleri yapıldı (216).

Cihaz özellikleri

Cihaz: Sıvı Kromatografisi/Kütle/Kütle Spektrometresi (LC/MS/MS)

Teknik Özellikler

Marka : Agilent 1200 series: Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS/MS

Model : 6460

Cihaz İkili (binary) pompa, Autosampler, QQQ (MS/MS) kütle dedektörüne sahiptir.

Kolon: YMC Pro C18 ((150x3mm) particle size 5 µm, YMC, Japan)

Mobil faz: CH₃OH/H₂O (0.02 M CH₃COONH₄), (52:48)

Akış hızı: 0.3 mL/dak.

LC/MS/MS analiz sonuçlarının incelenmesi neticesinde kolon kromatografisi ve preparatif İTK yardımı ile fraksiyonlardan birinin alkaloitlerinin saflaştırılmasına karar verilmiştir.

3.2.1.5. Kolon Kromatografisi

Alkaloit fraksiyonlarının İTK ile yapılan deneyleri sonucunda benzer alkaloitleri taşıdıkları saptandığından miktarı fazla olan fraksiyonlardan *V. parviflorum* türünün diklorometanlı ekstresinin alkaloit fraksiyonu kolon kromatografisi ile maddelerin izolasyonu için seçildi. 0.439 g fraksiyon 5 g silikajel 60 (0.40-0.063 mm) (Merck) ile karıştırılarak kolon uygulamak üzere hazırlandı. 150 g silikajel 5.5 cm genişlik ve 52 cm boyda kolon hazırlamak için tartıldı, kolon kuru yöntemle dolduruldu ve üzerine

adsorbanla karıştırılan fraksiyon uygulandı. Çizelge 3.3. de belirtilen çözücü sistemleri geçirilerek ve İTK kontrolleri yapılarak fraksiyonlara ayrıldı (103).

İTK kontrollerinde Fr-10 ve Fr-11 de (Kloroform) alkaloid olduğu belirlendi ve bir miktar ayrılarak LC/MS/MS de incelendi.

Çizelge 3.3. Kolon Kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri ve elde edilen fraksiyonlar.

Çözücü sistemi	Miktarı (mL)	Fraksiyon numaraları
Petrol Eteri	200	Fr-1
Petrol Eteri:Kloroform (80:20)	500	Fr-2-Fr-3
Petrol Eteri:Kloroform (60:40)	500	Fr-4-Fr-5
Petrol Eteri:Kloroform (40:60)	500	Fr-6; Fr-7
Petrol Eteri:Kloroform (20:80)	500	Fr-8; Fr-9
Kloroform	500	Fr-10; Fr-11
Kloroform:Etilasetat (80:20)	500	Fr-12; Fr-13
Kloroform:Etilasetat (70:30)	1100	Fr-14; Fr-15; Fr-16
Kloroform:Etilasetat (60:40)	600	Fr-17; Fr-18; Fr-19
Kloroform:Etilasetat (50:50)	1100	Fr-20; Fr-21; Fr-22; Fr-23; Fr-24
Kloroform:Etilasetat (30:70)	500	Fr-25; Fr-26
Etilasetat	500	Fr-27; Fr-28
Etilasetat: Metanol (90:10)	500	Fr-29; Fr-30

3.2.1.6. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

V. canescens subsp. *pedunculata* türünün diklorometanlı ekstresinin alkaloid fraksiyonununun 0.15 g'ı metanolde çözdürülerek 17 adet İTK plağına (silikajel 60 F₂₅₄ TLC (Merck)) bant şeklinde uygulandı ve plaklar CHCl₃:MeOH (9:1) çözücü sisteminde iki kez yürütüldü. Plaklar UV₂₅₄ ve UV₃₆₅ dalga boylarında incelendi, işaretlendi ve bir plağın kenarına Dragendorff reaktifi püskürtülerek alkaloidlere ait bantlar belirlendi. Alkaloid bantları ayrı ayrı kesilerek alındı, ufak parçalara bölündü ve CHCl₃: MeOH (9:1) karışımında 3 saat çözülmeye bırakıldı. Çözünen plaklar vakum altında G-3 cam filtreden süzüldü, elde edilen süzüntüler rotaevaporatörde darası alınmış armut balonlarda yoğunlaştırıldı ve LC/MS/MS de incelendi (89, 183).

3.2.2. Biyoaktivite Çalışmaları

3.2.2.1. İnsekt Antifeedant Aktivite

3.2.2.1.1. Antifeedant Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Böcekler

Spodoptera littoralis Bois.: Test için kullanılan böcekler yapay böcek besini (Stonefly Industries, Bryan, TX, USA) ile beslenen *S. littoralis* popülasyonundan elde edildi. Koloniler 25 ± 1 °C’de ve 16:8 saat (ışık: karanlık) fotoperiyodunda büyütüldü. Bu deney yakın zamanda deri değiştiren *S. littoralis* L2-larvalarının ön ölçümü ile başladı.

Leptinotarsa decemlineata Say.: Yeni deri değiştiren *L. decemlineata* türünün 2. instar larvaları patates, *Solanum tuberosum*, üzerinde, 25 ± 2 °C de ve 16:8 saat (ışık: karanlık) fotoperiyodundaki çevresel şartlarda büyütülen koloniden elde edildi. Bu koloni yabancı yetişkinler ile beraber patates tarlalarından toplanıp yıllık olarak yenilenmektedir (28).

3.2.2.1.2. Antifeedant Aktivite Testi

Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin tamamı insekt antifeedant aktivite için test edildi. *S. littoralis* ve *L. decemlineata* larvaları çalışma başlamadan önce 3 saat süre ile aç bırakıldı. Çalışma petri kaplarında (9.0 cm çapında) yapıldı. Damp filtre kağıtları petrilerin ortasına serildi ve mantar delici yardımıyla *L. decemlineata* için patates ve *S. littoralis* için domates yapraklarından 1.5 cm çapında 4 disk hazırlandı. Bunlar filtre kağıdı üzerine yerleştirildi. Ekstrelerden yeterli miktarlarda tartılarak metanol: su (80:20) karışımında çözüldü ve % 5’lik (a/a) solüsyon hazırlandı. Otomatik olarak kullanılan bir doz aparatı yardımı ile her diske eşit miktarda, yaklaşık $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ doza denk gelecek şekilde, 20 μm ekstre solüsyonu uygulandı. Kontrol olarak sadece solvent uygulanan diskler kullanıldı. Uygulamadan sonra yaprak diskleri

solventin buharlaşması için yaklaşık 10 dakika bekletildi. Daha sonra çok aç olan *S. littoralis* ve *L. decemlineata* 2 larvaları petrilerin merkezine yerleştirildi. Larvalar başlangıçtan 5 gün sonra tartıldı ve larva büyümesinde % 50 inhibisyona neden olan letal dozlar kontrol ile karşılaştırılıp probit analizleri yapılarak belirlendi. Ayrıca ekstreler çeşitli dozlarda tekrar besinlere karıştırılarak paralel deneylerle larval mortalite de araştırıldı. 5. günün sonunda elde edilen tüm verilerin probit analizleri yapılarak LD₅₀ değerleri ve % 95 güven aralığı sınırları (CI₉₅) belirlendi (28).

3.2.2.2. Antifungal Aktivite

Antifungal aktivite çalışması için kontamine edilmiş ve saklanmış mısırdan izole edilen *Aspergillus fumigatus* fungal suşu kullanıldı. Suşlar yatık agar (patates-havuç agar) üzerine 4 °C de yerleştirildi ve alt-kültürler petri kapları üzerine ekilmiş halde çalışmaya hazır hale getirildi.

Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin tamamı antifungal aktiviteleri için *A. fumigatus*'a karşı agar dilüsyon metodu ile test edildi. Uygun çözücüde çözünen ekstreler patates dekstroz agar (PDA) üzerine 1 mg/mL konsantrasyonda uygulandı. Solventin PDA'daki son konsantrasyonu % 0.75 (h/h) olarak değerlendirildi. Kontrol olarak ekstre içermeyen eşit miktarda uygun çözücü kullanıldı. Hazırlanmış petrilerdeki (9.0 cm çapında) 7-günlük fungus kültürünün periferinden kesilen deney diskleri (0.4 cm) ile uygulama yapılan petriler aseptik olarak inoküle edildi. Bu petriler 21 °C'de 7 gün karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 7. günün sonunda hedef fungusların radyal büyüme inhibisyon yüzdeleri bir formül yardımı ile hesaplanarak antifungal aktivite değerlendirildi (217).

Formül;

$$\text{Yüzde inhibisyon} = \frac{(DC-DT)}{DC} \times 100$$

DT= uygulama yapılan koloni çapı
DC= kontrol grubunun koloni çapı

3.2.2.3. İstatistiksel Analizler

Antifeedant ve antifungal aktivite çalışmaları sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinin yapılması için EPA Probit Analiz Programı (Versiyon 1.5) kullanıldı (28) (217).

4. BULGULAR

4.1. Fitokimyasal Çalışmalar

4.1.1. Teşhis Reaksiyonları

4.1.1.1. Alkaloit Teşhisi

Çizelge 4.1. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde alkaloit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Dragendorff Reaktifi	Mayer Reaktifi
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök-Toz materyal	-	-
	Toprak üstü- Toz materyal	+	+
	Toprak üstü -CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH:CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH'lı ekstre	-	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök-Toz materyal	-	-
	Toprak üstü- Toz materyal	+	+
	Toprak üstü -CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH:CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH'lı ekstre	-	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök-Toz materyal	-	-
	Toprak üstü- Toz materyal	+	+
	Toprak üstü -CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH:CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH'lı ekstre	-	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök-Toz materyal	-	-
	Toprak üstü- Toz materyal	+	+
	Toprak üstü -CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH:CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH'lı ekstre	-	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök-Toz materyal	-	-
	Toprak üstü- Toz materyal	+	+
	Toprak üstü -CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH:CH ₂ Cl ₂ 'li ekstre	+	+
	Toprak üstü -MeOH'lı ekstre	-	-

* Endemik türler.

4.1.1.2. Kardiyoaktif Heterozit Teşhisi

Çizelge 4.2. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde kardiyoaktif heterozit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Keller-Kliani Reaksiyonu	Baljet Reaksiyonu	Lieberman-Burchard Reaksiyonu
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	+	+	+
	Toprak üstü	+	+	+
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	+	+	-
	Toprak üstü	+	+	+
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	+	+	-
	Toprak üstü	+	+	+
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	+	+	-
	Toprak üstü	+	+	+
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	+	+	-
	Toprak üstü	+	+	+

* Endemik türler

4.1.1.3. Saponozit Teşhisi

Çizelge 4.3. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde saponozit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Saponozit
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	+
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.1.4. Flavonoit Teşhisi

Çizelge 4.4. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde flavonoit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	% 10'luk NH ₃	Kurşun asetat	% 5'lik FeCl ₃	Siyanidin Reaksiyonu
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	+	+	-	-
	Toprak üstü	+	+	+	+ ^a
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	+	+	-	-
	Toprak üstü	+	+	+	+ ^a
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	+	+	-	-
	Toprak üstü	+	+	+	+ ^a
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	+	+	-	-
	Toprak üstü	+	+	+	+ ^a
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	+	+	-	-
	Toprak üstü	+	+	+	+ ^a

*: Endemik türler; ^a: Flavonon

4.1.1.5. Antosiyanozit Teşhisi

Çizelge 4.5. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde antosiyanozit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Dilüe H ₂ SO ₄	NaOH-HCl	Kurşun asetat	Amilalkol	Dilüe H ₂ SO ₄ Amilalkol
1	Kök	-	-	-	-	-
	Toprak üstü	-	-	-	-	-
2	Kök	-	-	-	-	-
	Toprak üstü	-	-	-	-	-
3	Kök	-	-	-	-	-
	Toprak üstü	-	-	-	-	-
4	Kök	-	-	-	-	-
	Toprak üstü	-	-	-	-	-
5	Kök	-	-	-	-	-
	Toprak üstü	-	-	-	-	-

1: *V. canescens* subsp. *pedunculata**; 2: *V. canescens* subsp. *canescens*; 3: *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*
4: *V. fuscatum* subsp. *boissieri* *; 5: *V. parviflorum* *; *: Endemik türler.

4.1.1.6. Siyanogenetik Heterozit Teşhisi

Çizelge 4.6. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde siyanogenetik heterozit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Siyanogenetik Heterozit
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.1.7. Tanen Teşhisi

Çizelge 4.7. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde tanen teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	% 5 FeCl ₃	Tuzlu Jelatin	Stiasny Reaktifi	Bromlu su
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-	-	-	-
	Toprak üstü	+	-	-	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-	-	-	-
	Toprak üstü	+	-	-	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-	-	-	-
	Toprak üstü	+	-	+ ^a	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-	-	-	-
	Toprak üstü	+	-	+ ^a	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-	-	-	-
	T. üstü	+	-	+ ^a	-

* Endemik türler; ^a: Katesik tanen

4.1.1.8. Antrasenozit Teşhisi

Çizelge 4.8. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde antrasenozit teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Antrasenozit
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.1.9. Kumarin Teşhisi

Çizelge 4.9. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde kumarin teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Kumarin
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.1.10. Nişasta Teşhisi

Çizelge 4.10. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde nişasta teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Nişasta
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	+
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	+
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	+
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	+
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	+
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.1.11. Oz Teşhisi

Çizelge 4.11. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde oz teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Fehling Reaksiyonu	Molisch Reaksiyonu	Seliwanoff Reaksiyonu
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	+	+	+ ^a
	Toprak üstü	+	+	+ ^b
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	+	+	+ ^b
	Toprak üstü	+	+	+ ^b
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	+	+	+ ^a
	Toprak üstü	+	+	+ ^a
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	+	+	+ ^a
	Toprak üstü	+	+	+ ^b
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	+	+	+ ^a
	Toprak üstü	+	+	+ ^b

* Endemik türler; ^a: Ketoz; ^b: Aldoz

4.1.1.12. Uçucu Yağ Teşhisi

Çizelge 4.12. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde uçucu yağ teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Uçucu Yağ
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.1.13. Sabit Yağ Teşhisi

Çizelge 4.13. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde sabit yağ teşhis reaksiyonları sonuçları.

Tür	Kullanılan kısım	Sabit Yağ
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-
	Toprak üstü	-

*: Endemik türler

4.1.2. Ekstraksiyon Çalışmaları

4.1.2.1. Ekstre Miktarları ve Verimleri

Çalışılan türlerin diklorometan, metanol-diklorometan (1:1), metanol ve etanol ile ekstraksiyonu sonucu toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin (CH₂Cl₂'li

ekstreler: ekstre A serisi; MeOH-CH₂Cl₂(1:1) ekstreler: ekstre B serisi; MeOH'lı ekstreler: ekstre C serisi ve Etanollü ekstre serisi) kuru ağırlıkları belirlendi ve % verimleri hesaplandı (Çizelge 4.14.).

Çizelge 4.14. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinin toprak üstü kısımlarından elde ekstre % verimleri.

Tür	Ekstre A (%)	Ekstre B (%)	Ekstre C (%)	Etanollü ekstre (%)
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	4.03	10.30	8.79	13.783
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	2.29	9.61	13.72	11.473
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	4.34	12.28	9.9	15.510
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	3.47	11.64	8.93	13.560
<i>V. parviflorum</i> *	3.32	12.91	8.43	11.286

*Endemik türler;

4.1.2.2. Alkaloit Fraksiyonları

Ekstre C ve kök ekstrelerinde alkaloit bulunmadığından fraksiyonlama çalışmaları sadece ekstre A ve ekstre B'nin toprak üst kısımları ile sınırlandırıldı. Ekstre A ve ekstre B'nin fraksiyonlanması sonucunda elde edilen alkaloit fraksiyonu A ve B'nin kuru ağırlıkları saptandı ve kullanılabildiği kadar +4 °C'de karanlıkta muhafaza edildi. (Çizelge 4.15.).

Çizelge 4.15. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloit fraksiyonu A ve alkaloit fraksiyonu B serilerinin miktarları.

Tür Adı	Alkaloit Fraksiyonu A (g)	Alkaloit Fraksiyonu B (g)
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	0.24	0.48
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	0.30	0.59
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	0.24	0.88
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	0.34	0.55
<i>V. parviflorum</i> *	0.54	0.23

* Endemik türler

4.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Çalışılan türlerden elde edilen tüm ham ekstreler ve toprak üstü kısımlarından elde edilen alkaloit fraksiyonu A ve alkaloit fraksiyonu B İTK plaklarına uygulanarak çeşitli çözücü sistemleri yardımıyla ayrıldı. Plaklar önce UV 254 ve UV 365 nm de incelendi sonrasında alkaloit varlığında turuncu renk veren Dragendorff reaktifi püskürtülerek lekeler tekrar incelendi.

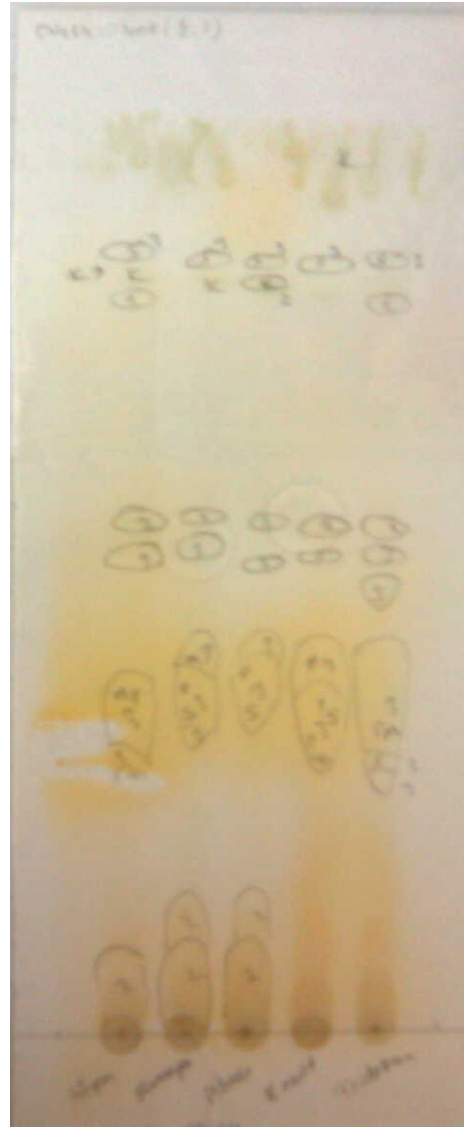
Plaklara Dragendorff reaktifinin püskürtülmesi sonucu kök ekstrelerinde ve ekstre C-toprak üstü serisinde alkaloit bulunmadığı, toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstre A ve ekstre B serilerinde ise alkaloit bulunduğu saptandı (Çizelge 4.16.) (Şekil 4.1.). Bu bulgular ana etken madde gruplarının taranması sırasında elde edilen bulguları desteklediğinden ve tezin amacının çalışılan türlerin alkaloitlerinin araştırılması olduğundan alkaloitler dışındaki diğer etken madde gruplarının içeriği daha ileri araştırmalarla irdelenmemiştir. Bu nedenle türlerin ileri fitokimyasal araştırmalarına alkaloit varlığı tespit edilen toprak üstü kısımlarının ekstrelerinin (ekstre A ve ekstre B) alkaloit fraksiyonlarının hazırlanması ile devam edilmesi uygun görülmüş ve aktivite çalışmaları da toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstreler (ekstre A, B, C ve etanollü ekstre serileri) ile sınırlandırılmıştır. Alkaloit fraksiyonu A ve B'nin uygulandığı plaklara Dragendorff reaktifi püskürtüldüğünde plaklar üzerinde turuncu lekeler gözleendiğinden bu fraksiyonlarda alkaloit varlığı saptandı (Şekil 4.2.-4.3.). Elde edilen bu bulgular ana etken madde gruplarının taranması sonucu elde edilen bulguları desteklemiştir. Fraksiyonlarda alkaloit aranması çalışmalarında ekstre C-toprak üstü serilerinde alkaloit bulunmadığı ana etken madde gruplarının taranması sırasında belirlenmesine rağmen kontrol amacıyla *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünden elde edilen ekstre C-toprak üstü fraksiyonlanarak İTK plaklarına uygulanmış ve alkaloit içermediği doğrulanmıştır.

Çizelge 4.16. İTK plaklarında kullanılan çözücü sistemleri ve İTK sonuçları.

Ekstreler	Çözücü sistemi (h/h)	Kullanılan Reaktif	Sonuç
Ekstre A-T. üstü Ekstre B-T. üstü Ekstre A -T. üstü	Benzen: Aseton (5:1) CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ -Aseton (9:1) CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9.5:0.5)	Dragendorff Reaktifi	Kök ekstreleri ve Ekstre C: Turuncu renk değişimi gözlenmedi. Ekstre A ve Ekstre B-toprak üstü: Alkaloid varlığında görülen turuncu lekeler gözlemlendi
Ekstre B-T. üstü Ekstre C-T. üstü	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1) CH ₂ Cl ₂ -MeOH (8:2)		
Fraksiyon A Fraksiyon B	Benzen: Aseton (5:1) X 2	Dragendorff Reaktifi	Fraksiyon A-B: Alkaloid varlığında görülen turuncu lekeler gözlemlendi.

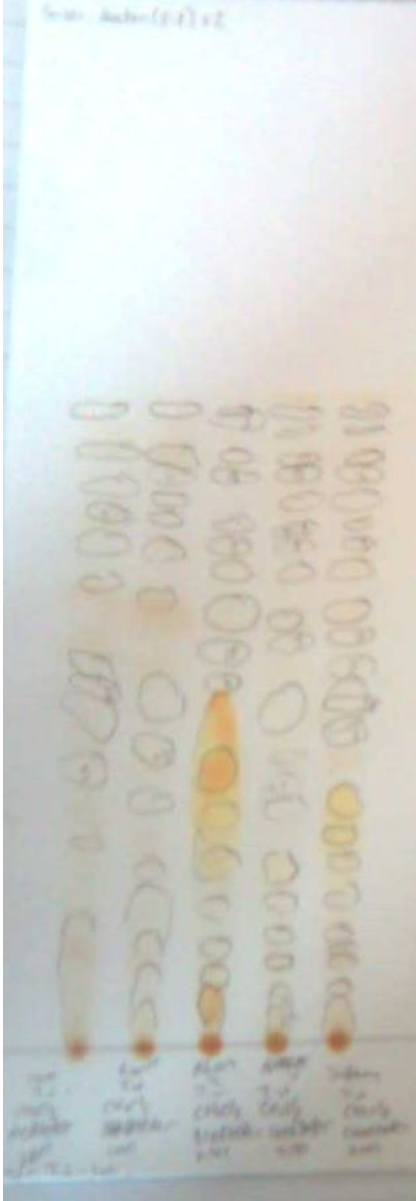


A

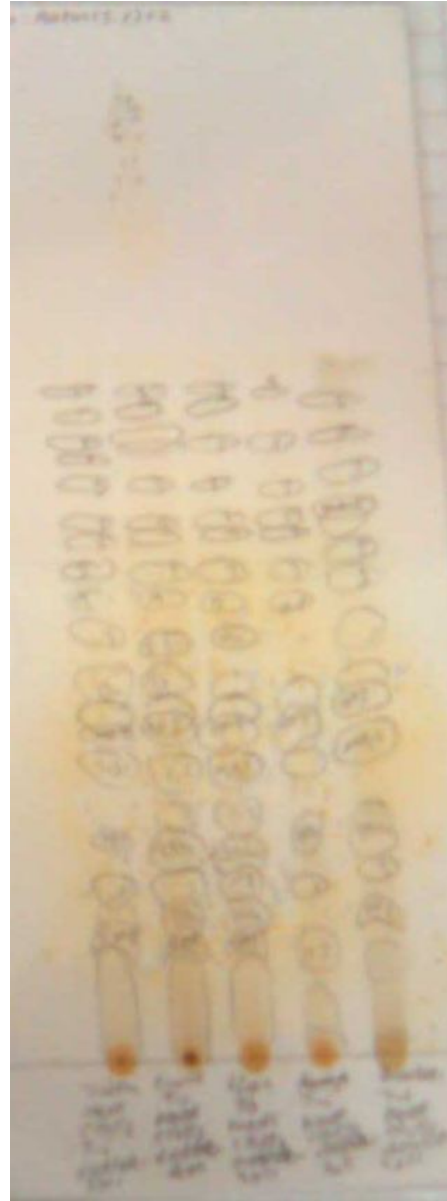


B

Şekil 4.1. Toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstre A (A) ve Ekstre B (B) serilerinin İTK sonuçları. Çözücü sistemi: CH₂Cl₂: MeOH (9:1); Dragendorff Reaktifi püskürtüldü. Turuncu lekeler gözlemlendi.

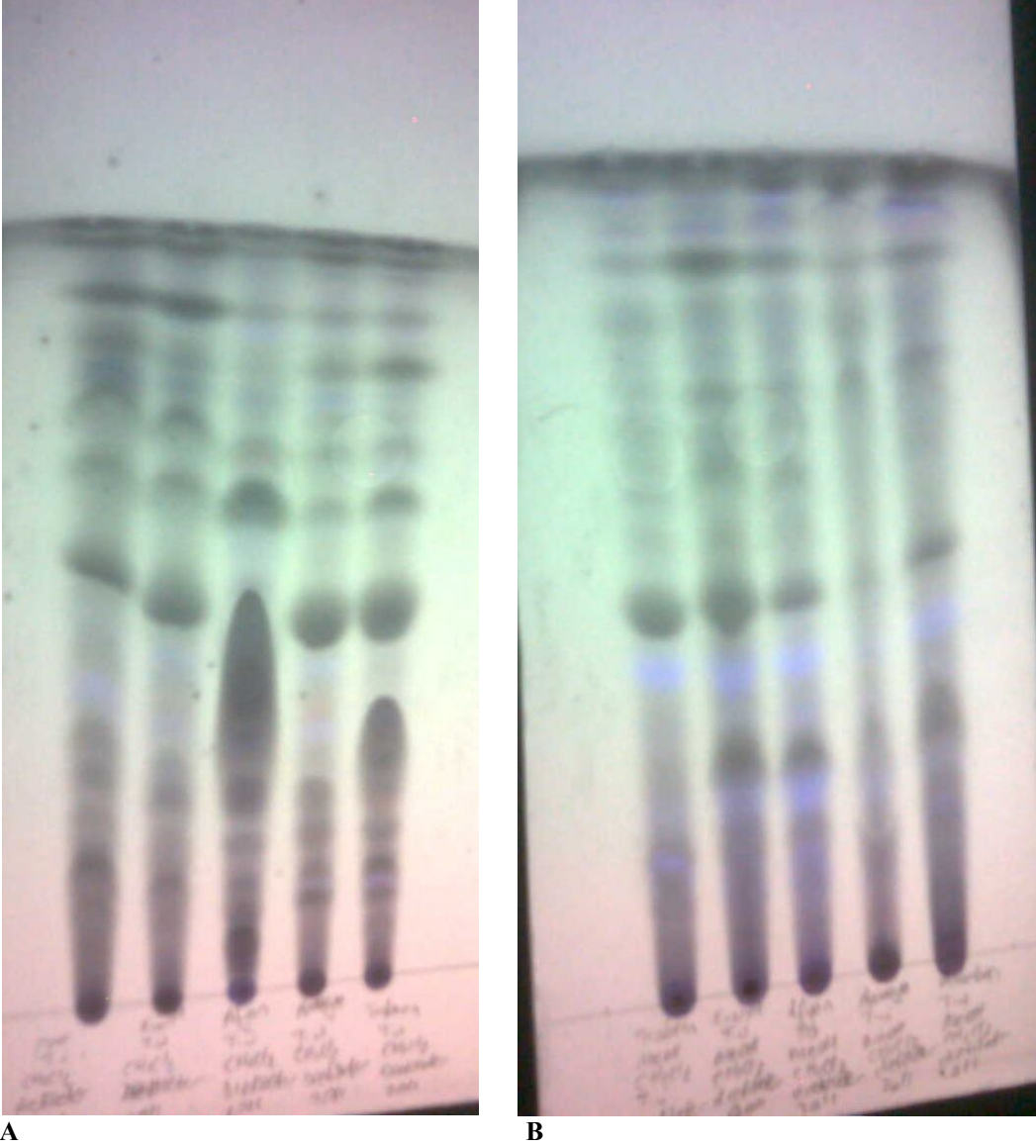


A



B

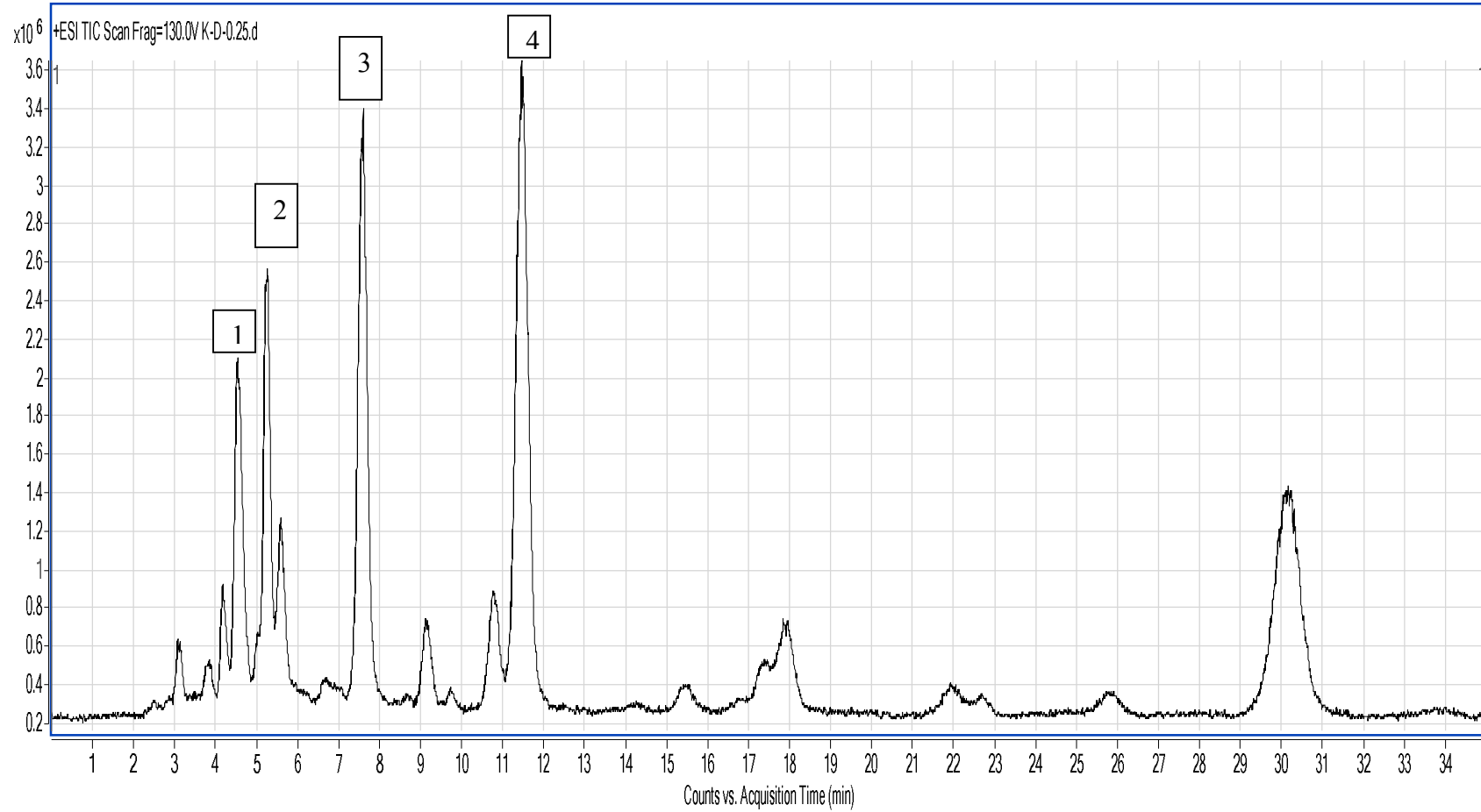
Şekil 4.2. Fraksiyon A (A) ve fraksiyon B (B) serilerinin İTK sonuçları. Çözücü sistemi: Benzen:Aseton (5:1)X2. Dragendorff Reaktifi püskürtüldü. Turuncu lekeler gözlemlendi.



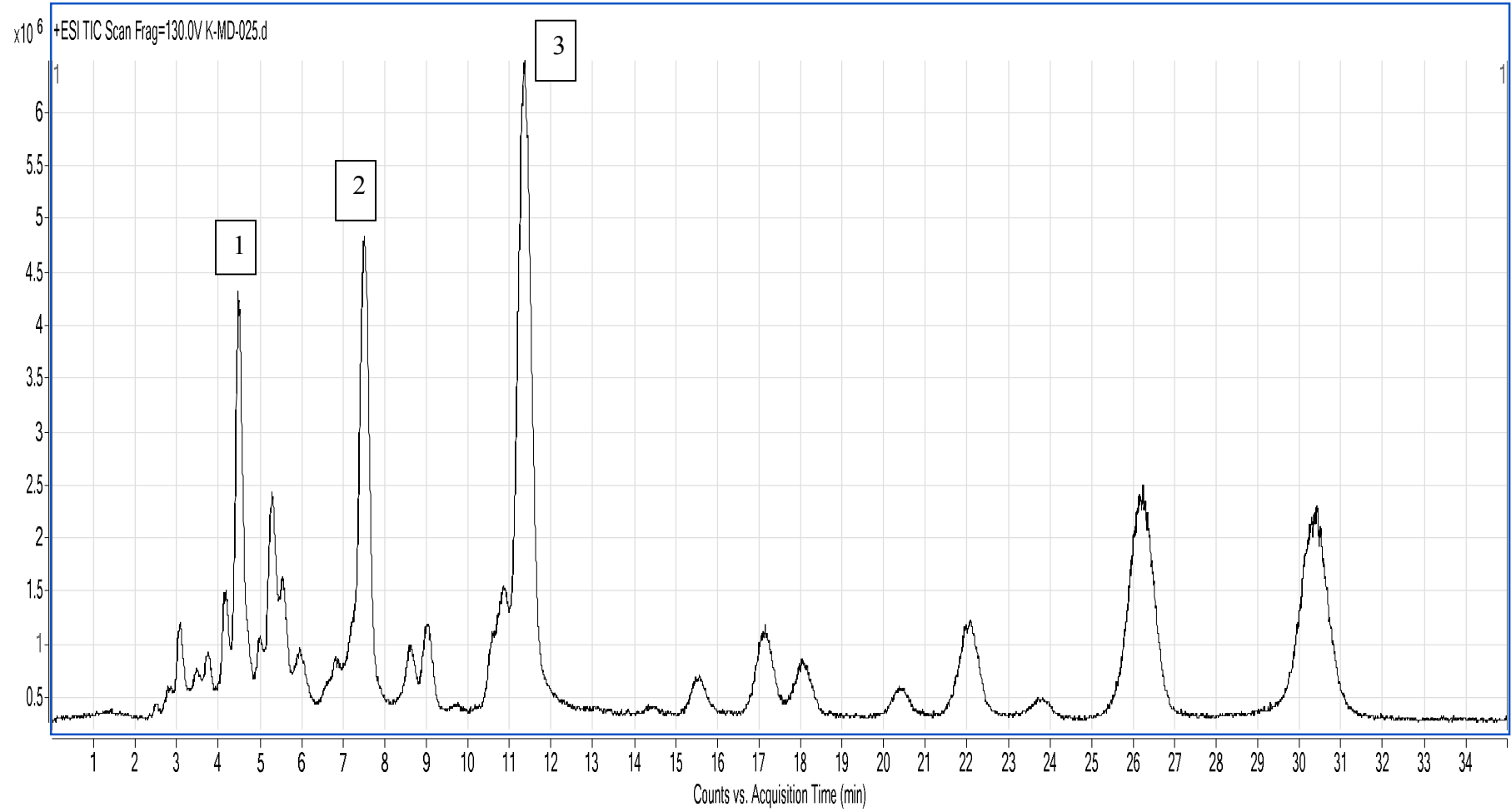
Şekil 4.3. **A:** Fraksiyon A ve **B:** Fraksiyon B serilerinin 254 nm de İTK sonuçları. Çözücü sistemi: Benzen:Aseton (5:1)X2.

4.1.4. Alkaloit Fraksiyonlarının LC/MS/MS Analizleri

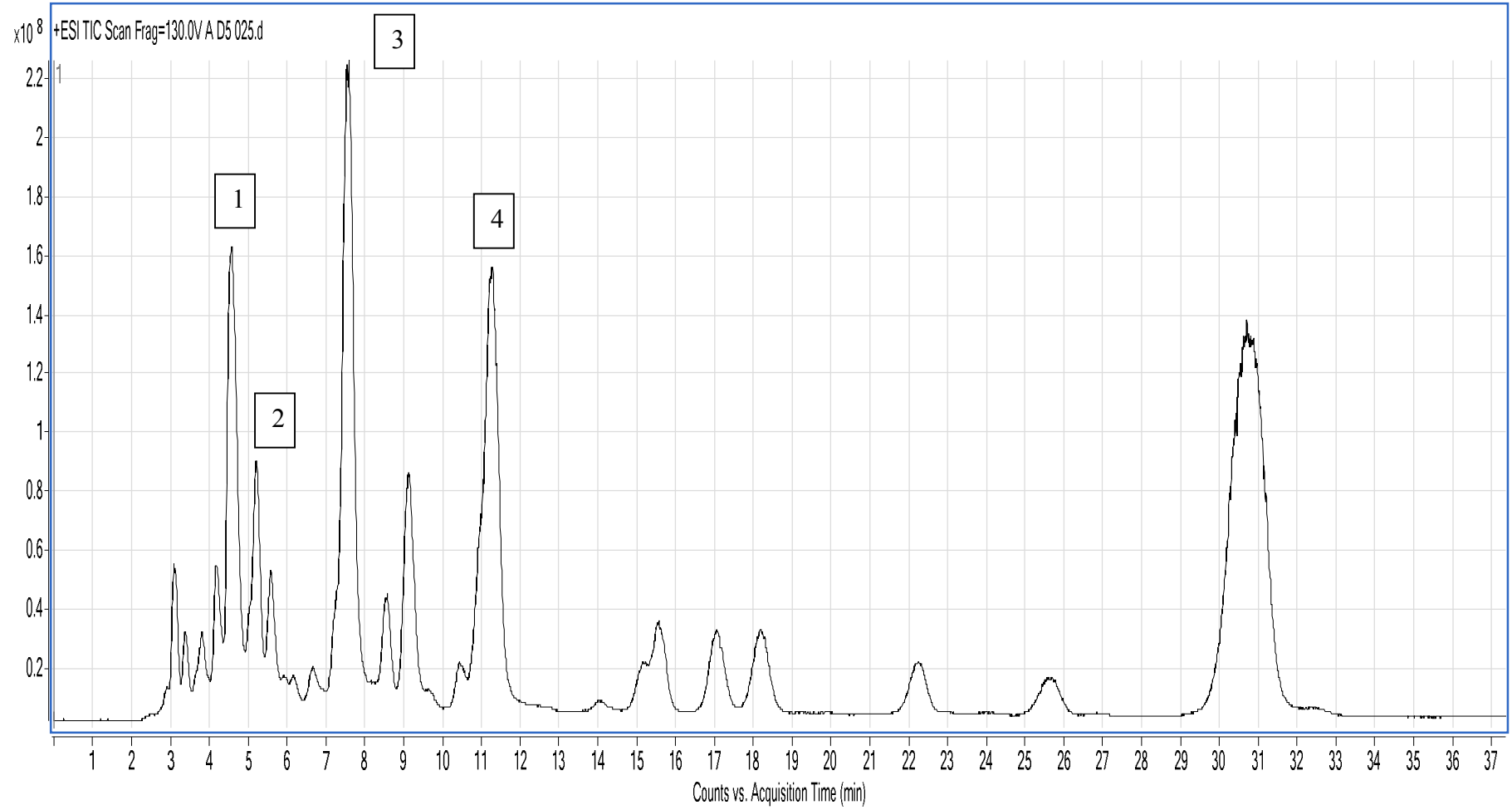
Çalışılan türlerin alkaloit fraksiyonlarının LC/MS/MS analizleri sonucunda elde edilen kromatogramlar Kromatogram 4.1-10 da verilmiştir.



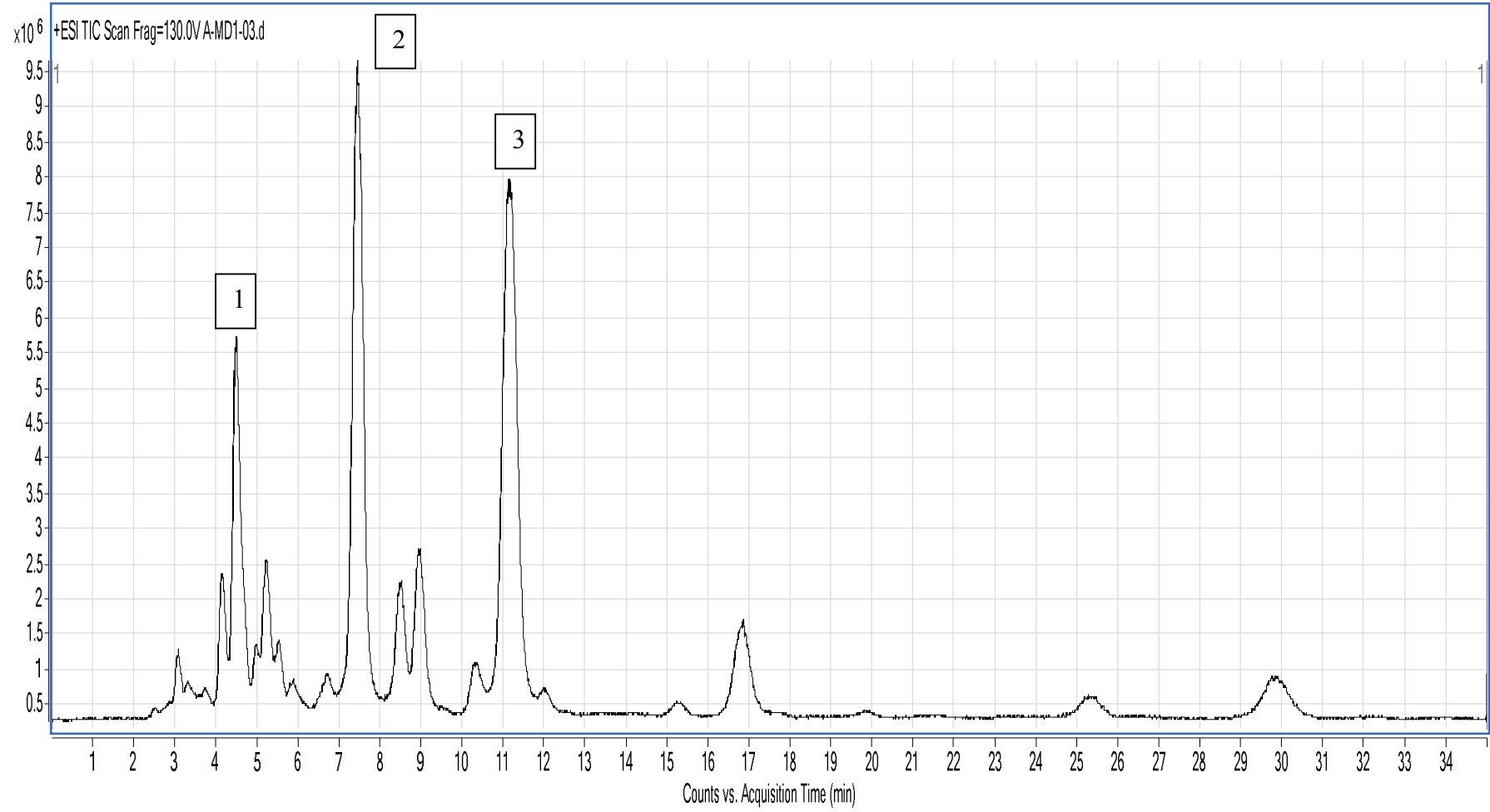
Kromatogram 4.1. *V. canescens* subsp. *canescens* türünün diklorometan ekstresinin alkaloid fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Sekoantofin; 2: Bilinmeyen alkaloid; 3: Sekoantofin *N*-oksid; 4: Antofin *N*-oksid)



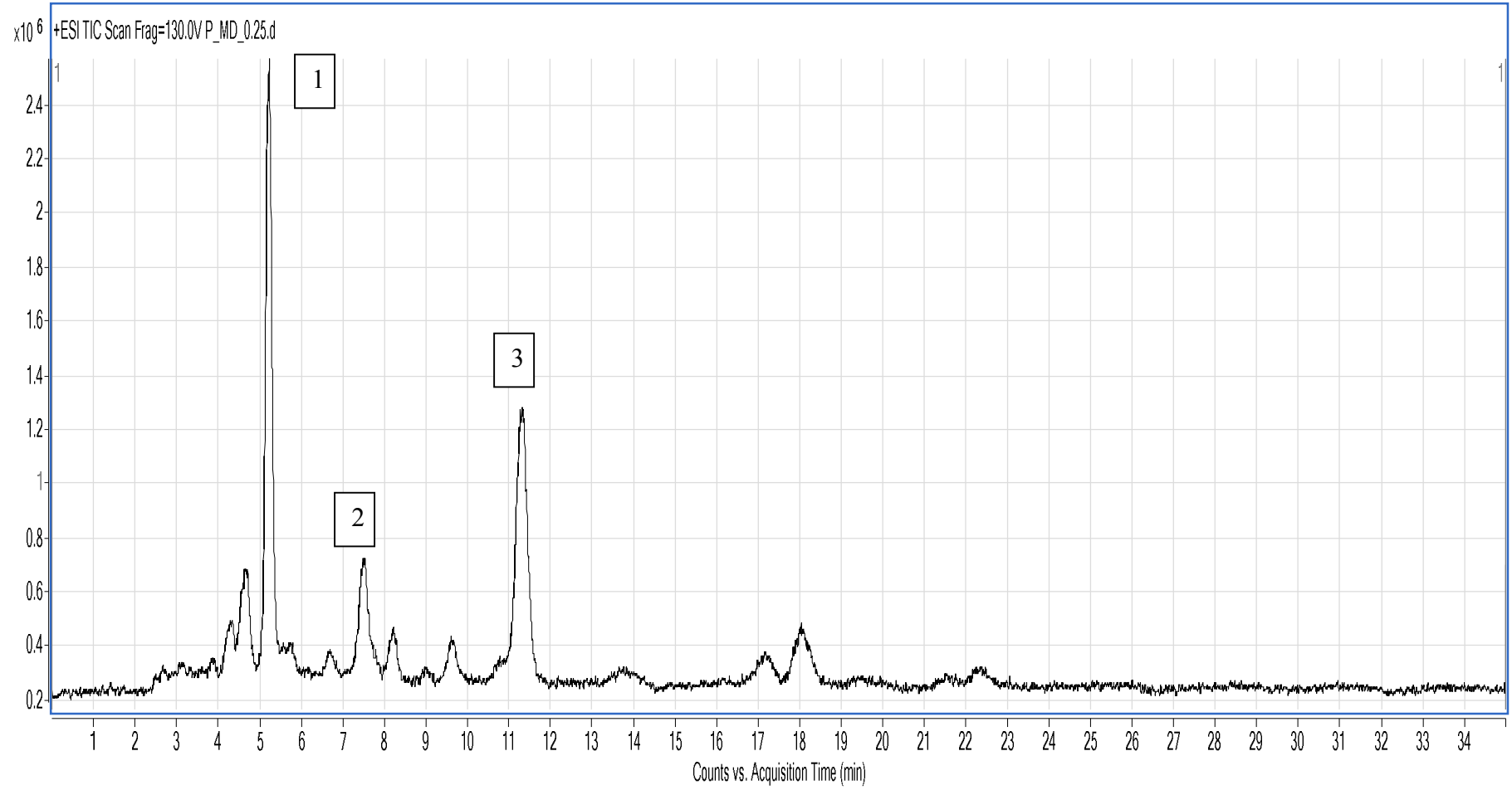
Kromatogram 4.2. *V. canescens* subsp. *canescens* türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloid fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Sekoantofin; 2: Sekoantofin *N*-oksid; 3: Antofin *N*-oksid)



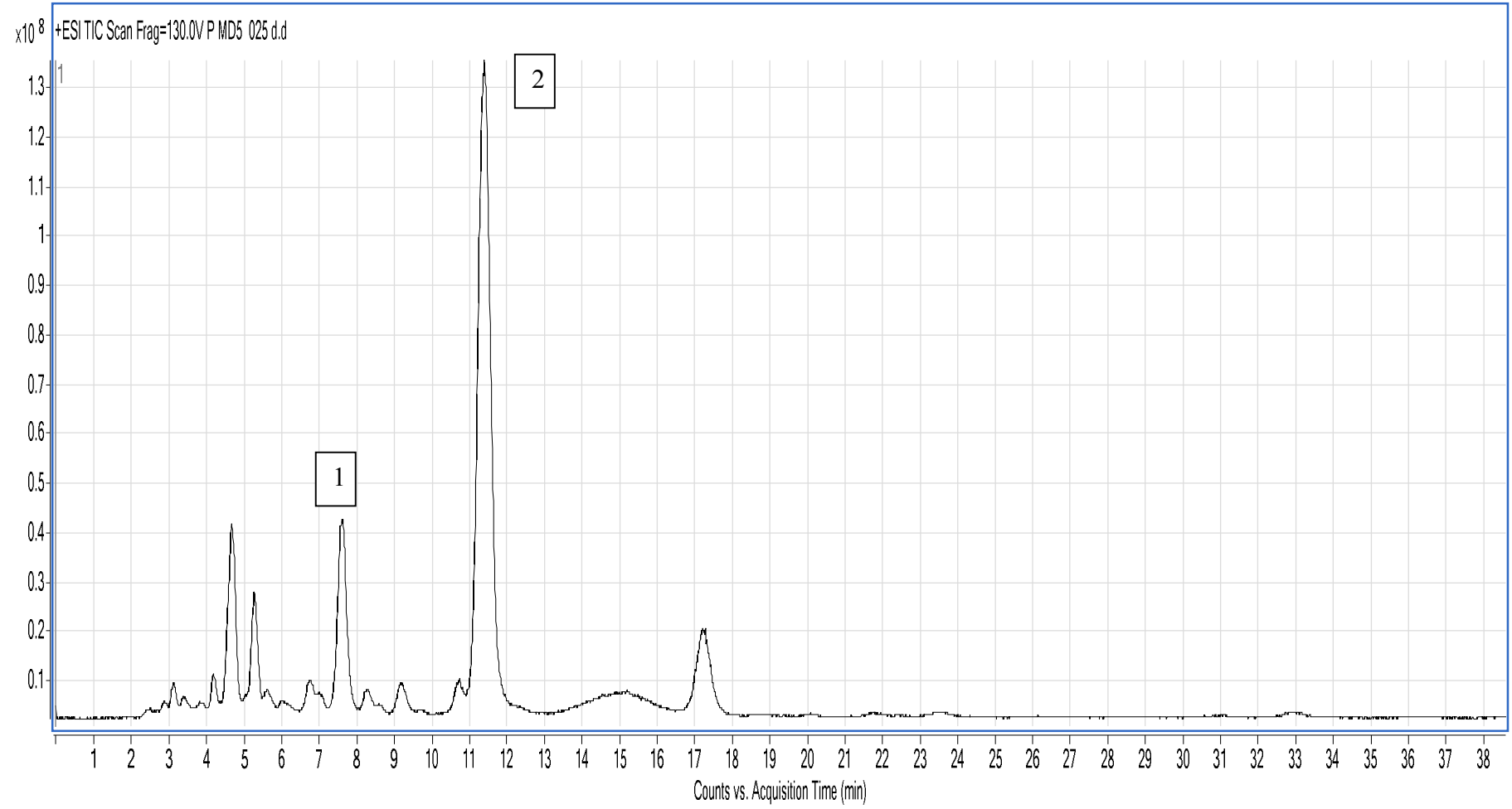
Kromatogram 4.3. *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün diklorometan ekstresinin alkaloid fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Sekoantofin; 2: Bilinmeyen alkaloid; 3: Sekoantofin *N*-oksit; 4: Antofin *N*-oksit)



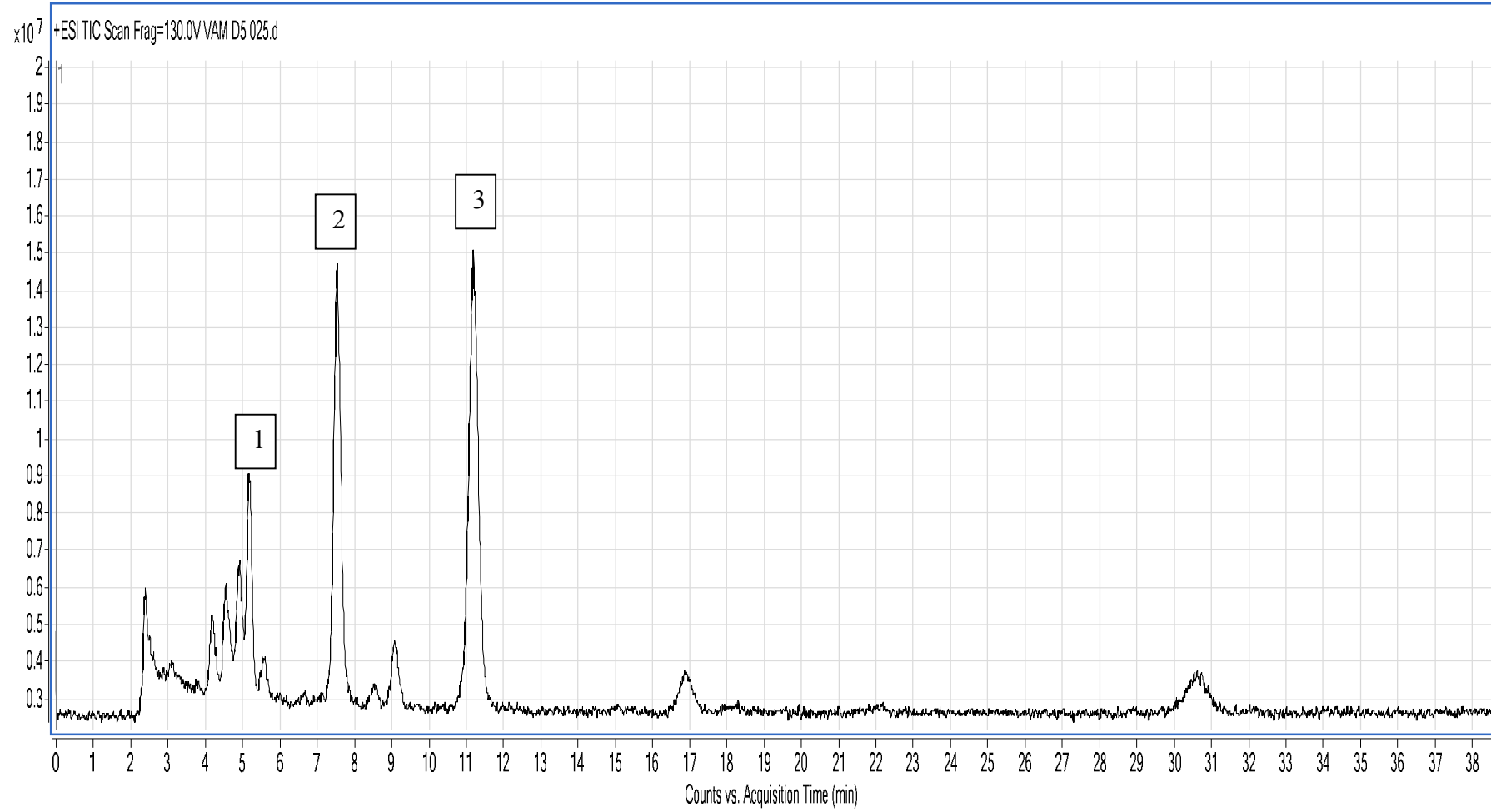
Kromatogram 4.4. *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod). (1: Sekoantofin; 2: Sekoantofin *N*-oksit; 3: Antofin *N*-oksit)



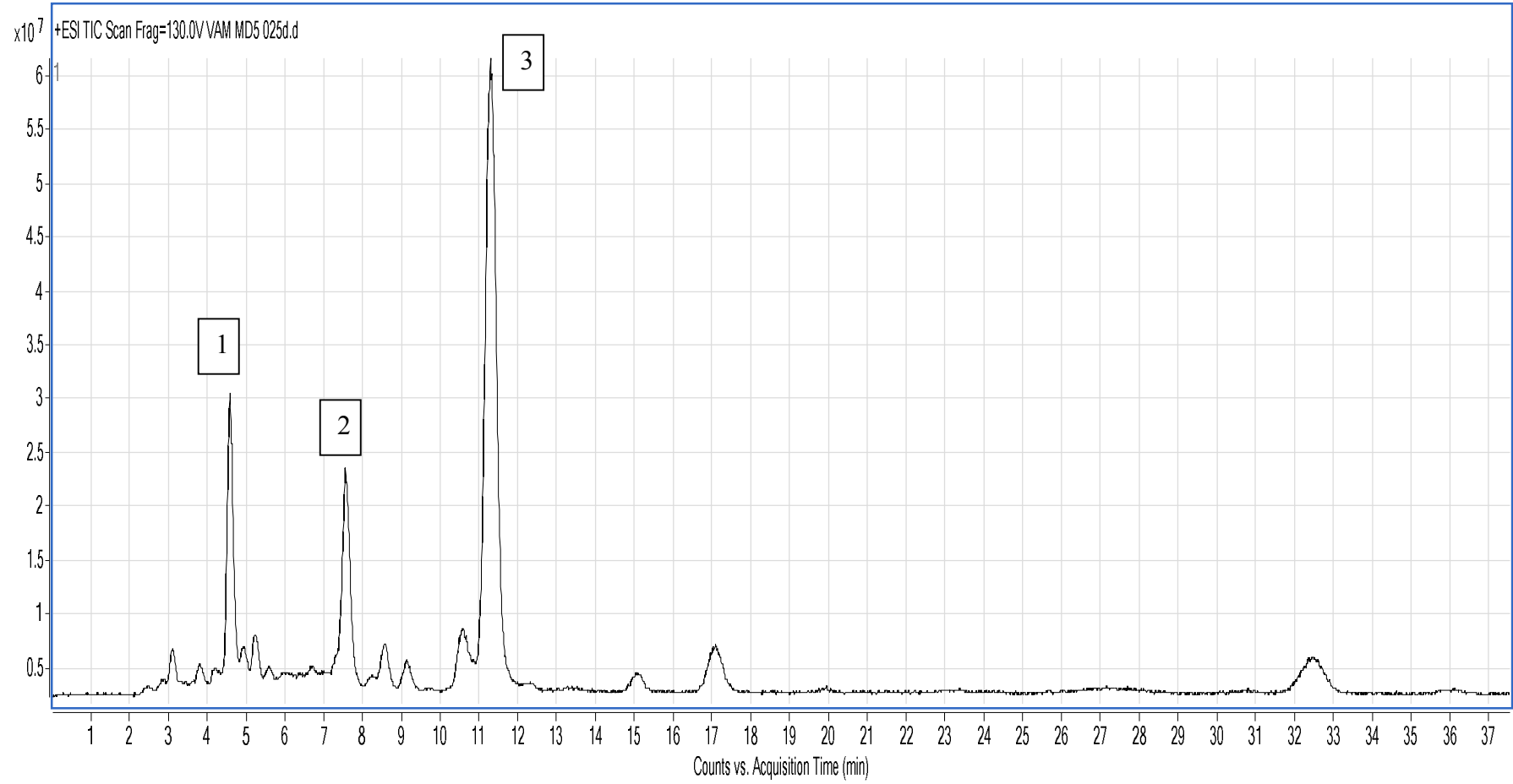
Kromatogram 4.5. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün diklorometan ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Bilinmeyen alkaloit; 2: Sekoantofin *N*-oksit; 3: Antofin *N*-oksit)



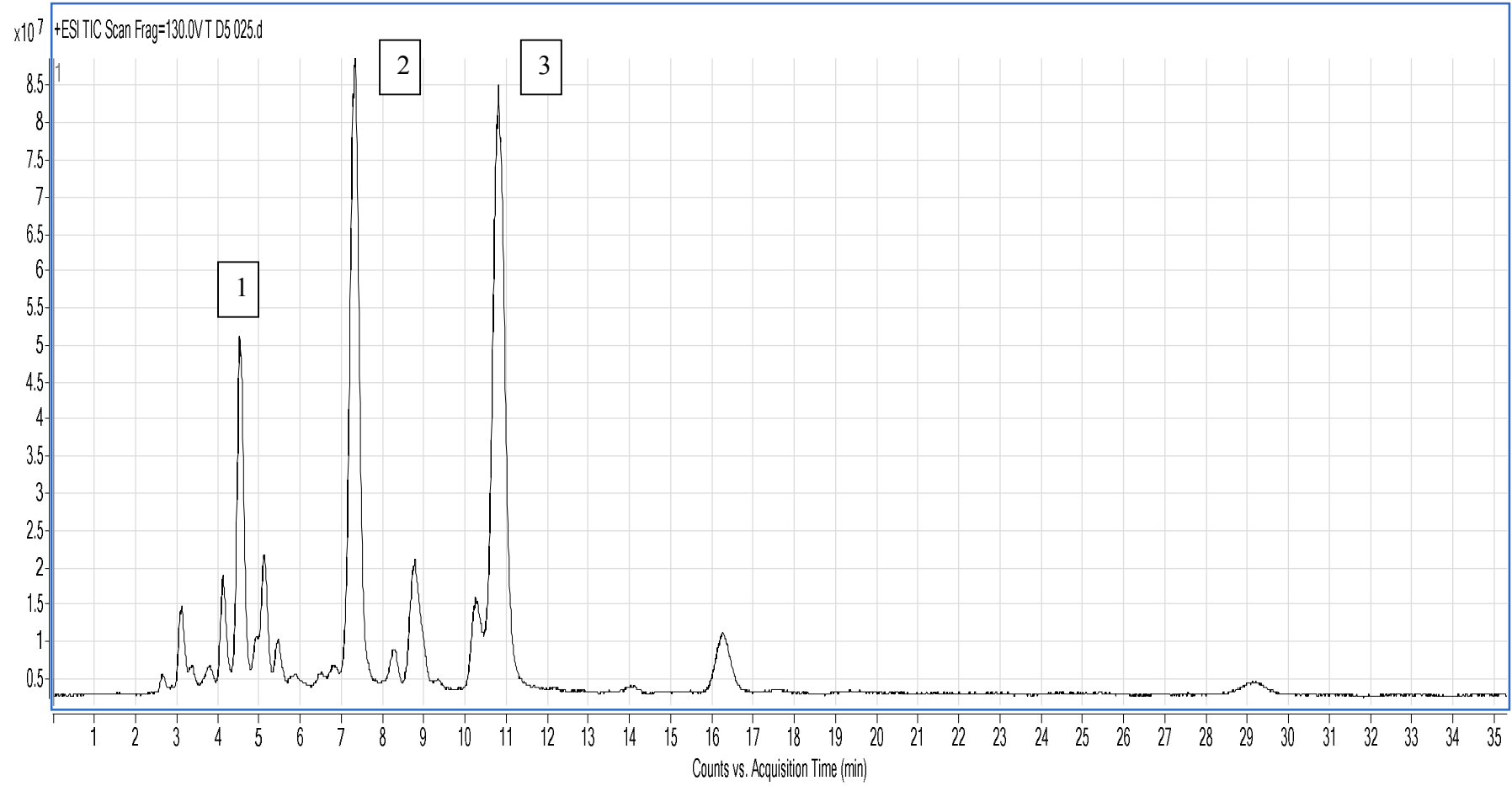
Kromatogram 4.6. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloid fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Sekoantofin *N*-oksit; 2: Antofin *N*-oksit)



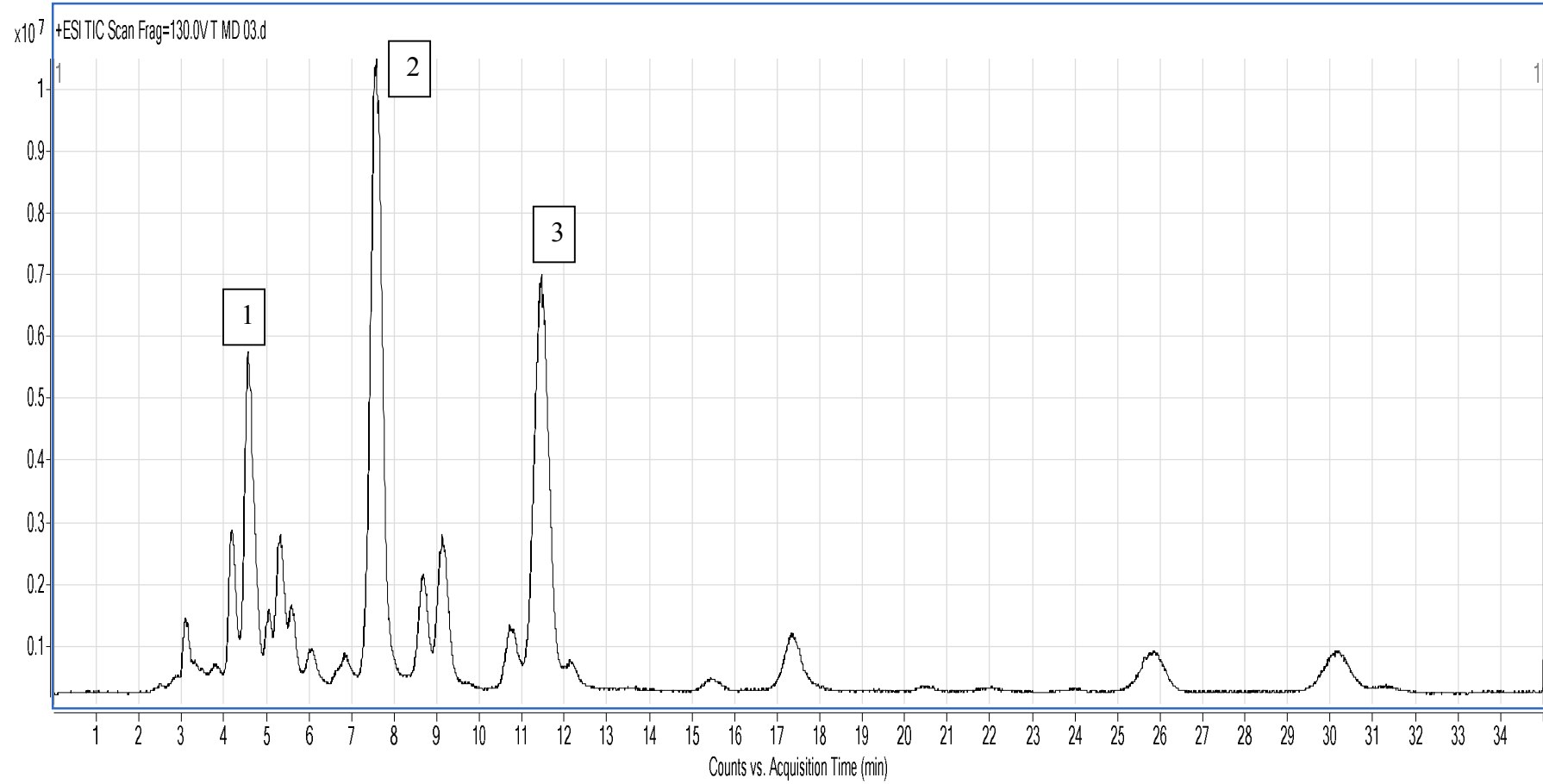
Kromatogram 4.7. *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün diklorometan ekstresinin alkaloid fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Bilinmeyen alkaloid; 2: Sekoantofin *N*-oksit; 3: Antofin *N*-oksit)



Kromatogram 4.8. *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod). (1: Sekoantofin; 2: Sekoantofin *N*-oksit; 3: Antofin *N*-oksit)



Kromatogram 4.9. *V. parviflorum* türünün diklorometan ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Sekoantofin; 2: Sekoantofin *N*-oksit; 3: Antofin *N*-oksit)



Kromatogram 4.10. *V. parviflorum* türünün diklorometan:metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).
(1: Sekoantofin; 2: Sekoantofin *N*-oksit; 3: Antofin *N*-oksit)

Çalışılan türlerin LC/MS/MS analiz sonuçları genel olarak değerlendirilmiş ve türlerde bulunduğu tespit edilen ana alkaloidler ilgili kromatogramlar incelenerek görülen miktarlar göz önüne alınarak sırasıyla Çizelge 4.17. de özetlenmiştir.

Çizelge 4.17. Çalışılan *Vincetoxicum* türlerinde bulunan ana alkaloidler.

Tür	Ana Alkaloidler	
	Diklorometan ekstralarının alkaloid fraksiyonu	Diklorometan:metanol (1:1) ekstralarının alkaloid fraksiyonu
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin <i>N</i> -oksit	Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin oksit
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Sekoantofin <i>N</i> -oksit Antofin <i>N</i> -oksit	Sekoantofin <i>N</i> -oksit Antofin <i>N</i> -oksit
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	5.24 Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin oksit	Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin oksit
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin <i>N</i> -oksit	Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin <i>N</i> -oksit
<i>V. parviflorum</i> *	Antofin <i>N</i> -oksit Sekoantofin <i>N</i> -oksit	Sekoantofin <i>N</i> -oksit Antofin <i>N</i> -oksit

* Endemik türler

Türlerin diklorometan ekstralarının alkaloid fraksiyonları incelendiğinde *V. canescens* subsp. *canescens*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. parviflorum* türlerinde ana alkaloidin antofin *N*-oksit olabileceği; *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünde ise ana alkaloidin sekoantofin *N*-oksit olabileceği LC/MS/MS analizlerinde gözlenmiştir. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* ekstresinde Rt: 5.24 deki alkaloid ana alkaloid olup bunun ise ne olduğu henüz tespit edilememiştir. Fraksiyonlardan tek tek alkaloidlerin preparatif HPLC ile izolasyonu ve ileri spektroskopik analizlerle sonuçların kesinleştirilmesi gereklidir.

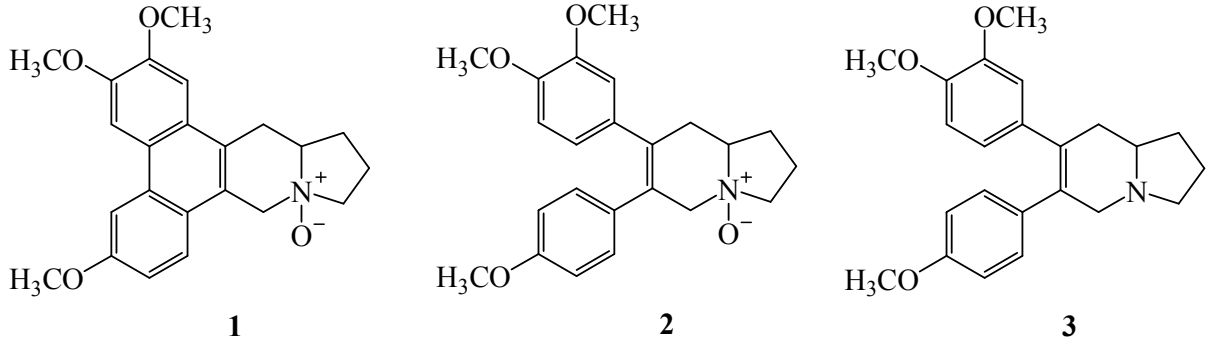
Türlerin diklorometan:metanol (1:1) ekstralarının alkaloid fraksiyonları incelendiğinde ise *V. canescens* subsp. *canescens*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* ve *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türlerinde ana alkaloidin antofin *N*-oksit olabileceği, *V. parviflorum* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* türlerinde ise ana alkaloidin sekoantofin *N*-oksit olabileceği düşünülmektedir.

Çalışılan türler kendi içerisinde yukarıda belirtilen bileşikler açısından incelendiğinde ise *V. canescens* subsp. *canescens*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* ve *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türlerinin hem diklorometan hem de diklorometan:metanol

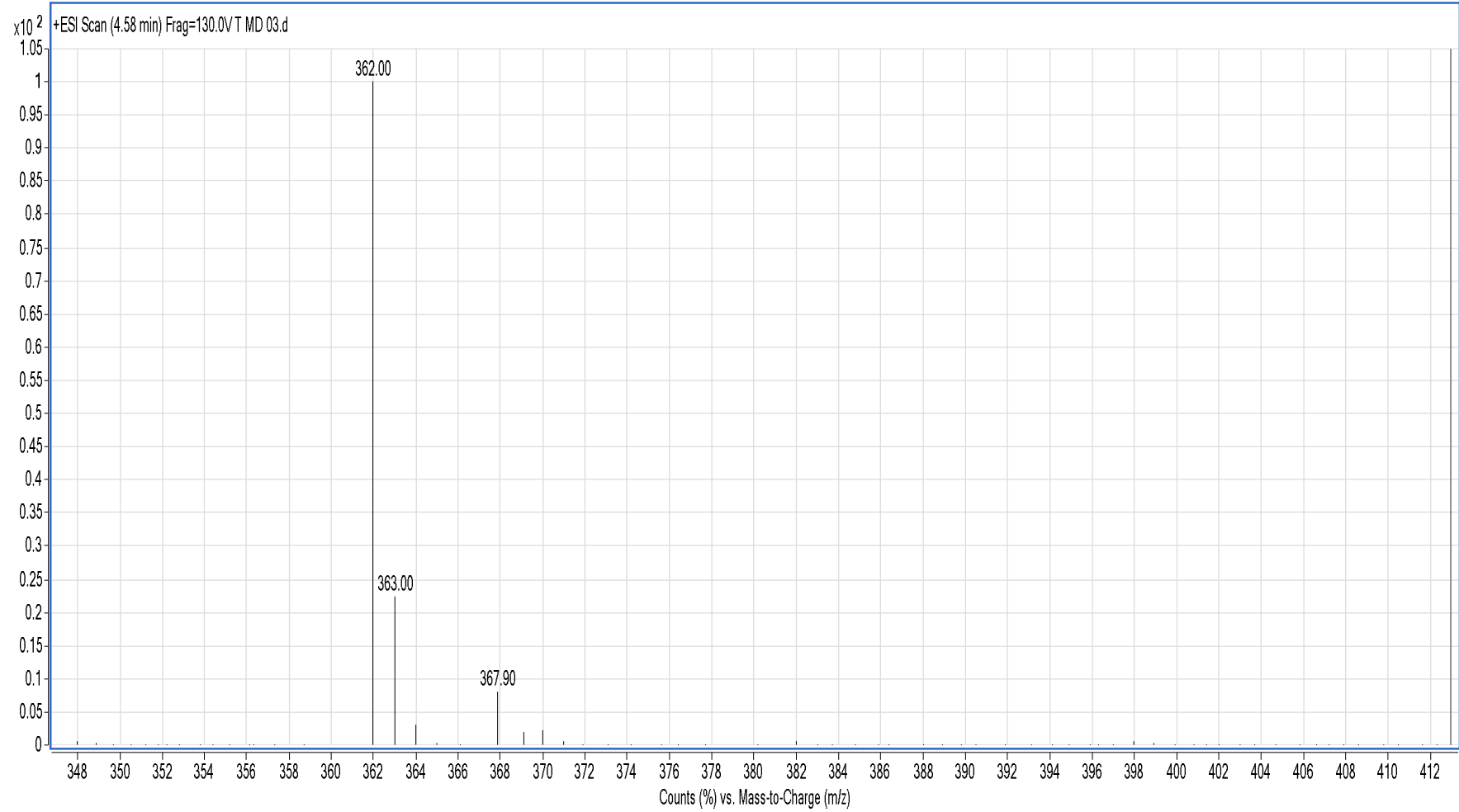
(1:1) ekstrelerinde ana alkaloidin antofin *N*-oksit olabileceği, *V. canescens* subsp. *pedunculata* da ise her iki ekstrede ana alkaloidin sekoantofin *N*-oksit olabileceği düşünülmektedir. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün diklorometanlı ekstresinde 5.24 deki alkaloid ana alkaloid iken; diklorometan:metanol (1:1) ekstresinde ise ana alkaloidin antofin *N*-oksit olabileceği dikkati çekmektedir (Şekil 4.4.). Türlerde tespit edilen ana alkaloidlerin ESI-MSⁿ spektrumları Spektrum 4. 1-6’da verilmiş olup ilgili parçalanma ürünlerine ait bilgiler ise Çizelge 4.18. de görülmektedir.

Çizelge 4.18. Alkaloid fraksiyonlarında bulunduğu düşünülen sekoantofin, sekoantofin *N*-oksit ve antofin *N*-oksit alkaloidlerinin kütle spektrumları.

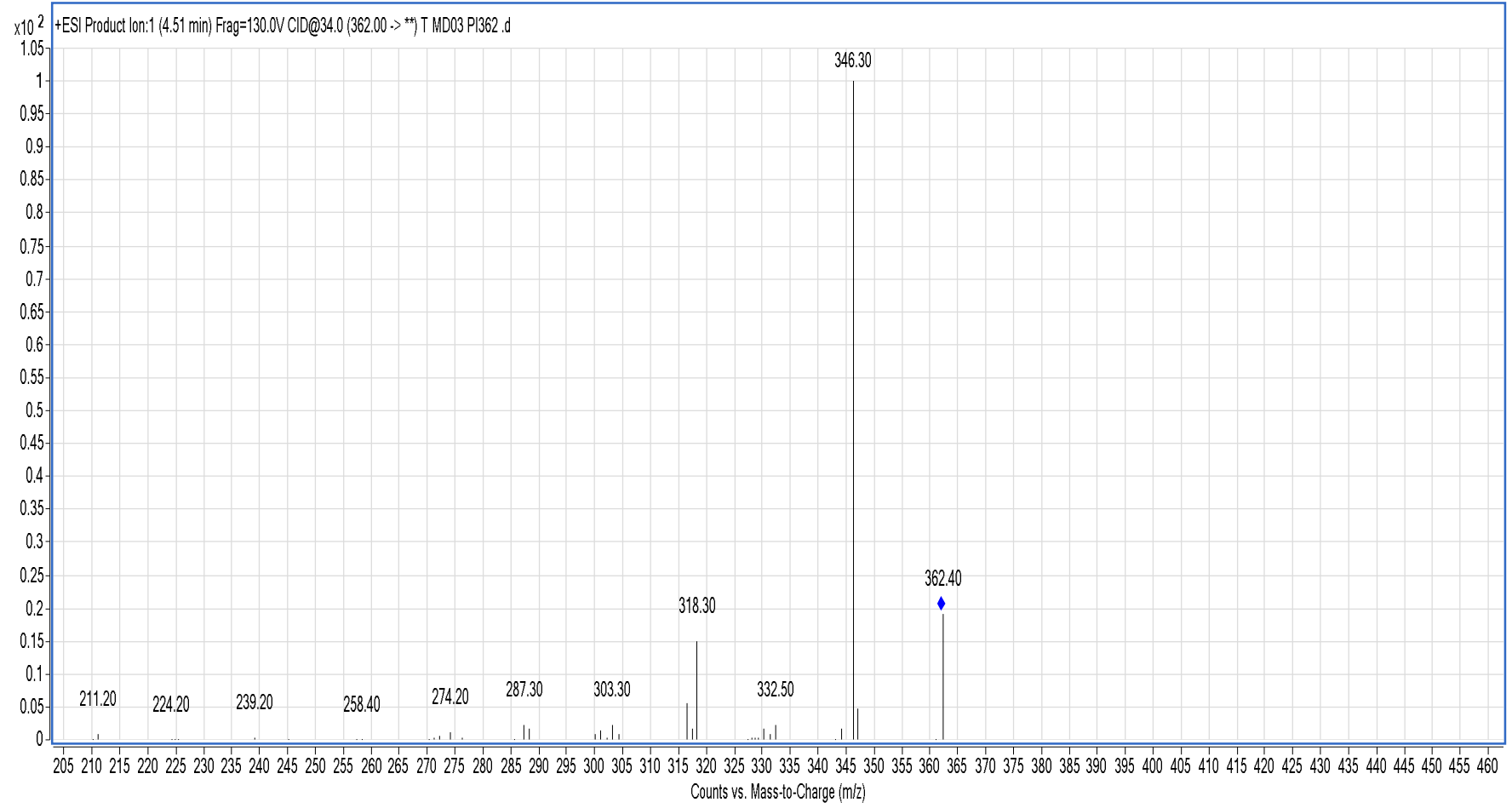
Bileşikler	Rt	MS ¹	MS ² (<i>m/z</i>) (%)
Sekoantofin	4.45	362 ([M-2H ₂]+H ⁺)	346.30 (100), 318.30 (15)
Sekoantofin <i>N</i> -oksit	7.47	382.30 [M+H] ⁺	297.3 (100), 265.2 (32), 202.1 (18), 159.10 (18)
Antofin <i>N</i> -oksit	11.2	380.30 [M+H] ⁺	362.3 (15), 295.4 (50), 294.4 (100)



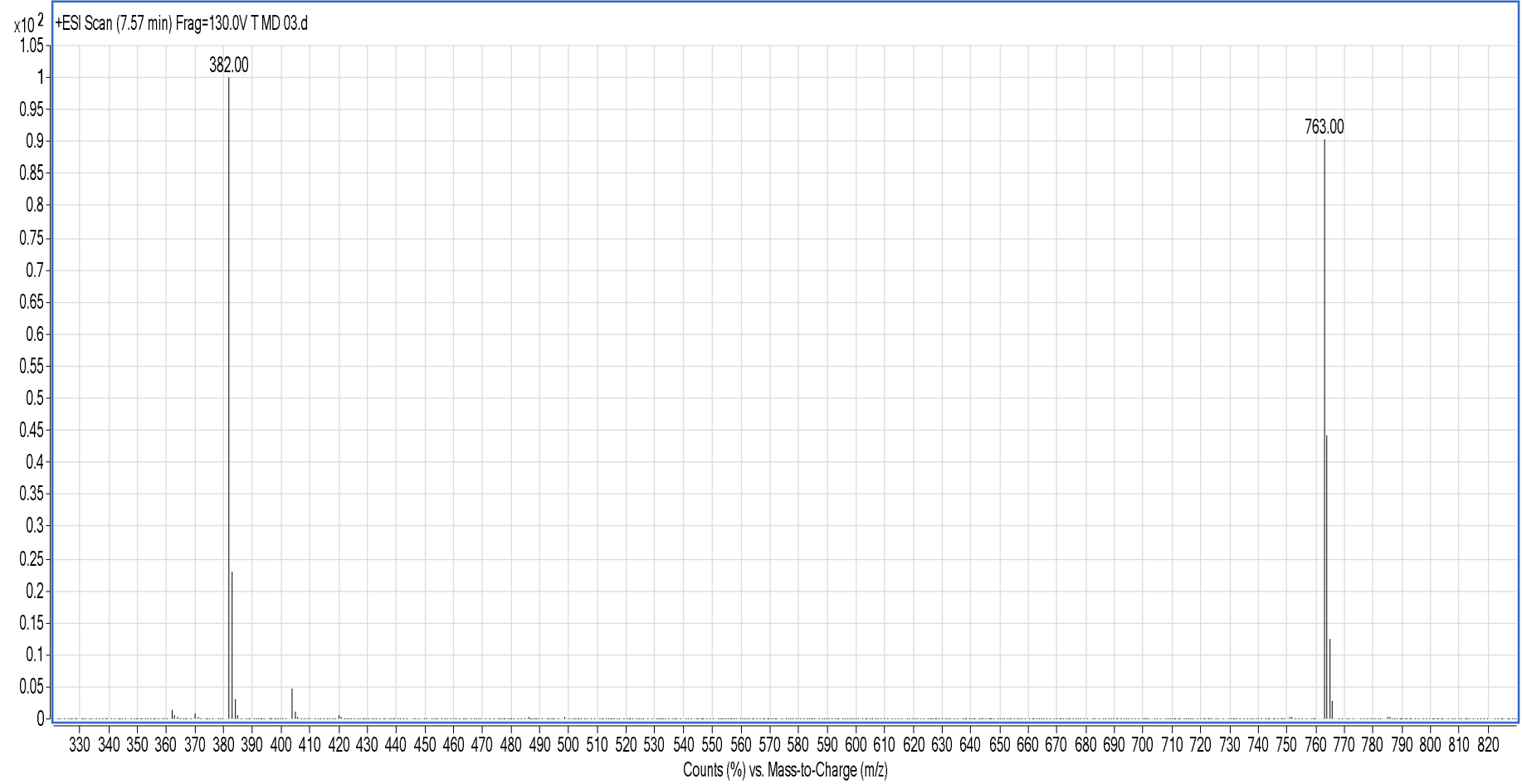
Şekil 4.4. Antofin *N*-oksit (1), Sekoantofin *N*-oksit (2) ve Sekoantofin (3) alkaloidlerinin kimyasal yapısı (32, 45).



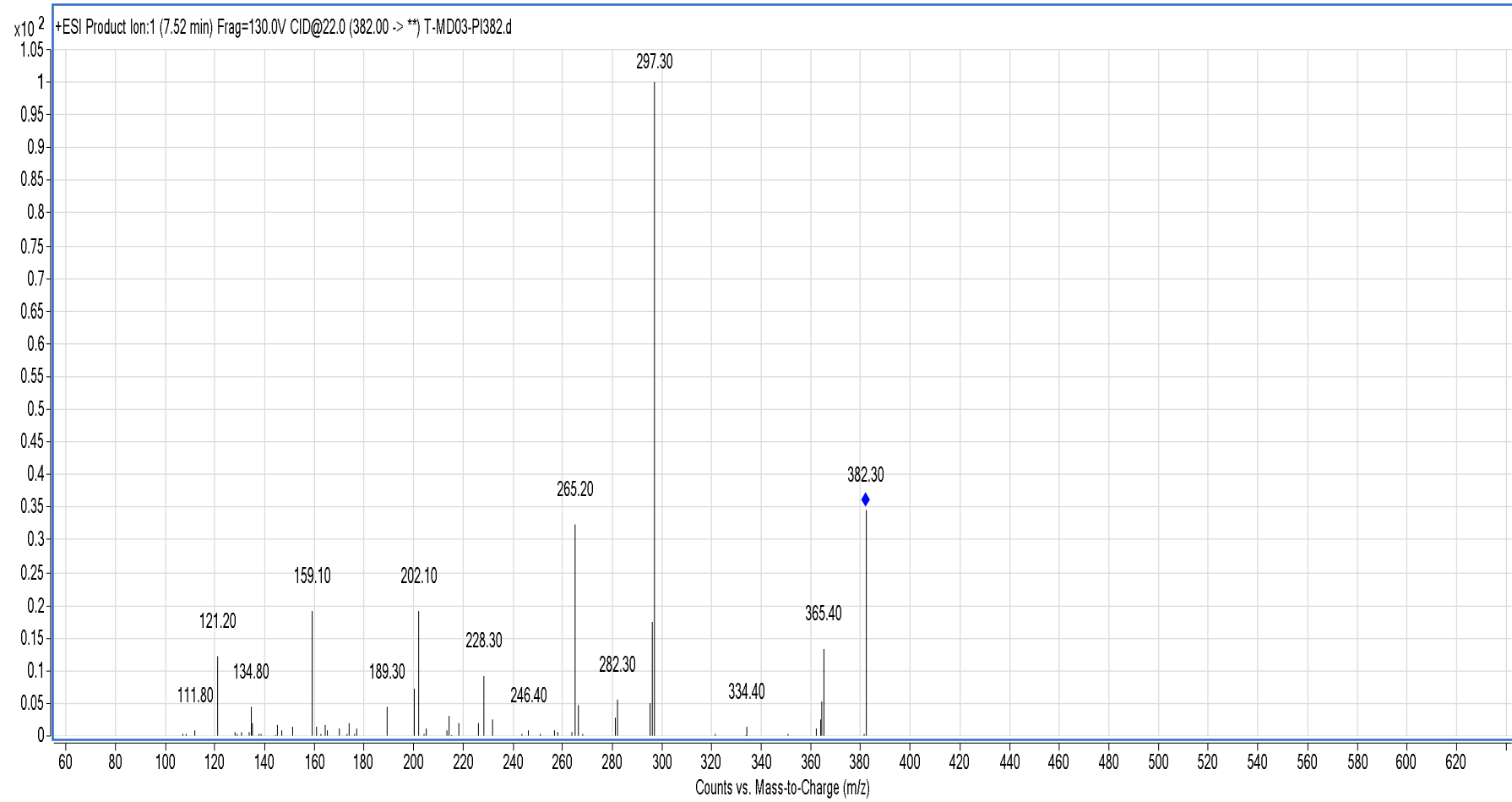
Spektrum 4.1. *V. parviflorum* türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda Sekoantofin'in ESI-MS¹ spektrumu.



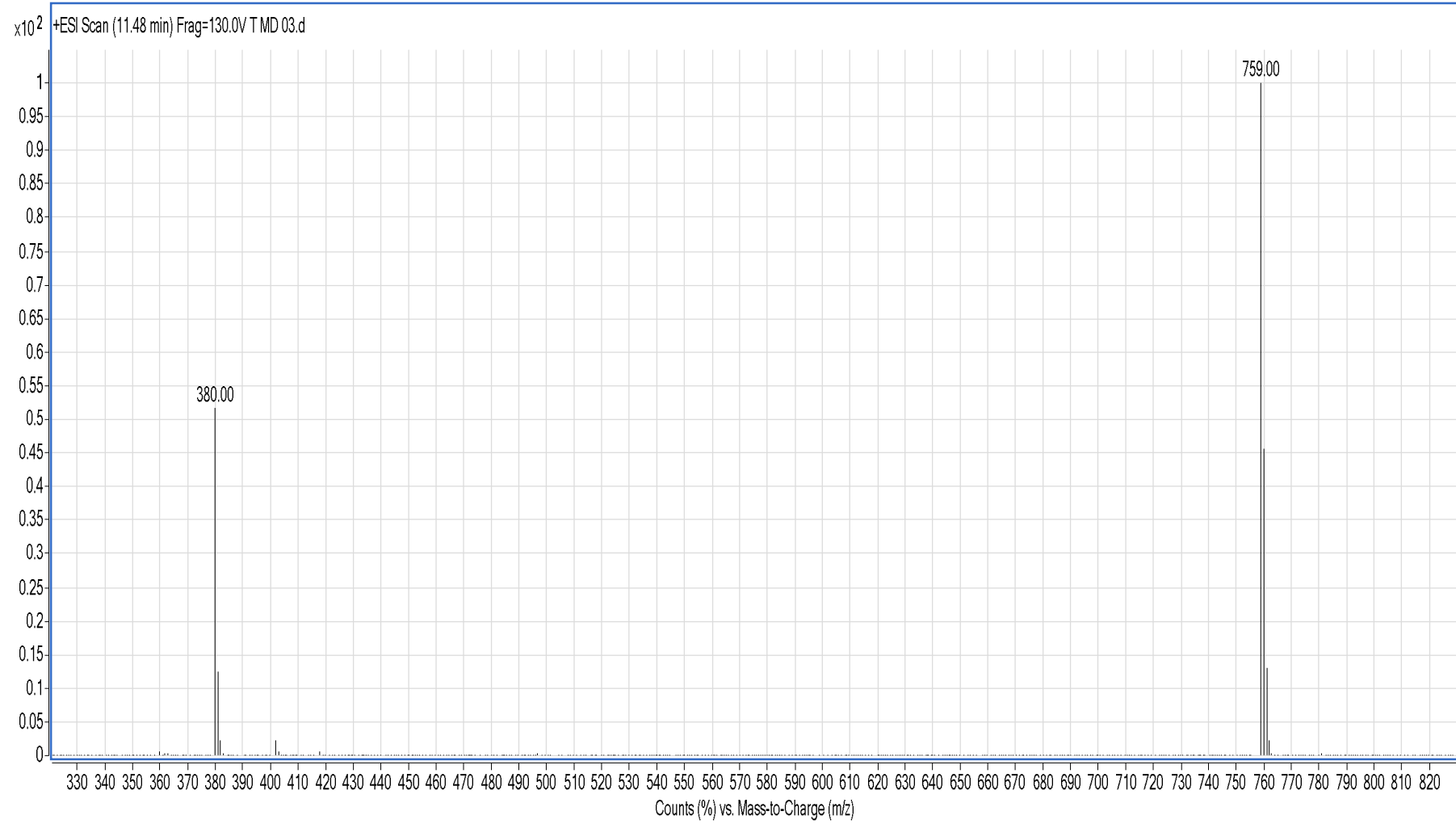
Spektrum 4.2. *V. parviflorum* türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloid fraksiyonunda Sekoantofin'in ESI-MS² spektrumu. Sekoantofin (Rt: 4.45) (ESI MS *m/z* (%)) : 362.40 ([M-2H₂]+H⁺) (18), 346.30 (100), 318.30 (15).



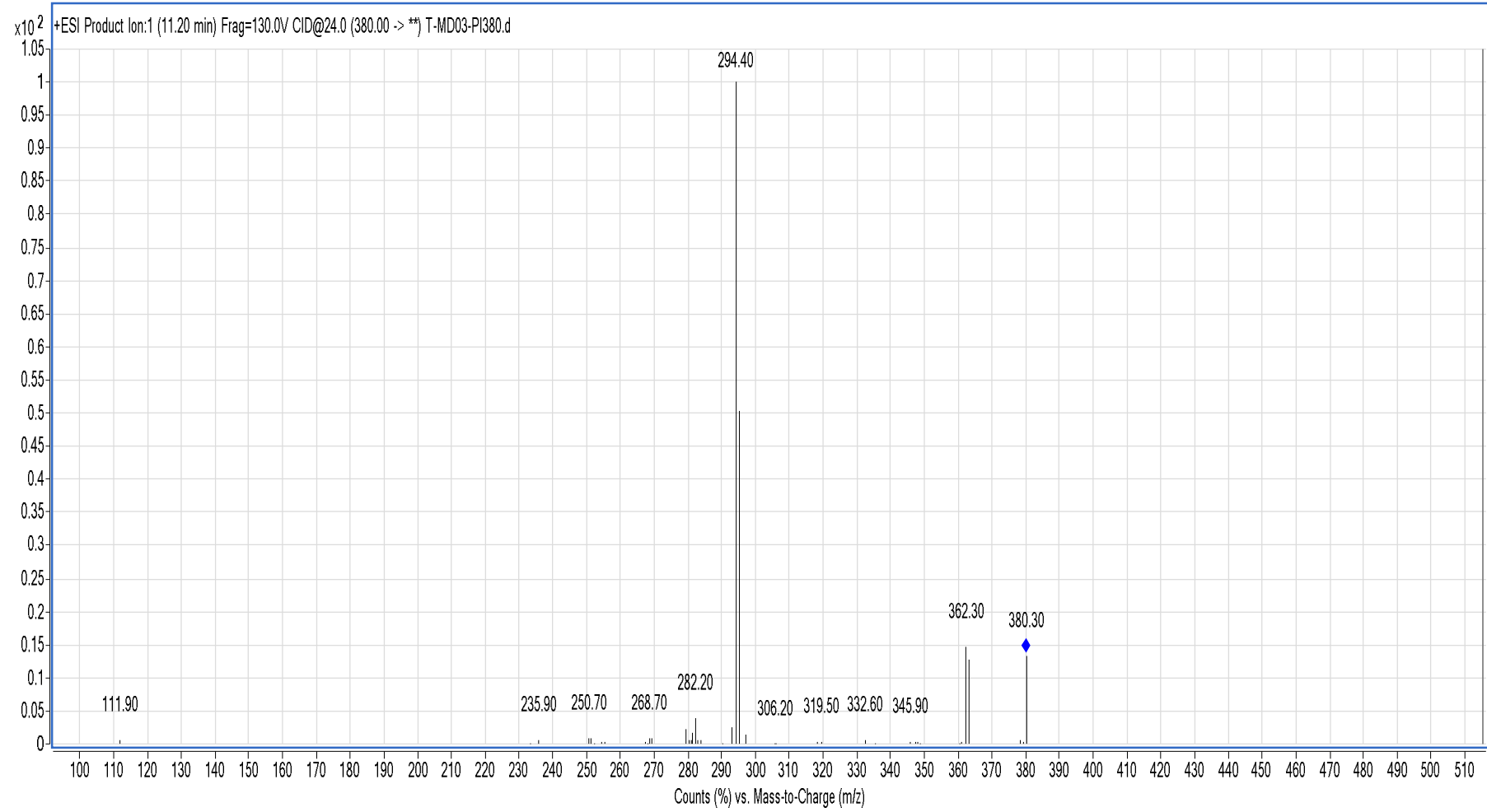
Spektrum 4.3. *V. parviflorum* türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda Sekoantofin *N*-oksit'in ESI-MS¹ spektrumu.



Spektrum 4.4. *V. parviflorum* türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloid fraksiyonunda Sekoantofin *N*-oksit'in ESI-MS² spektrumu. Sekoantofin *N*-oksit (Rt: 7.47) (ESI MS *m/z* (%): 382.30 ([M+H]⁺) (34), 297.3 (100), 265.2 (32), 202.1 (18), 159.10 (18).



Spektrum 4.5. *V. parviflorum* türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloit fraksiyonunda Antofin *N*-oksit'in ESI-MS¹ spektrumu.



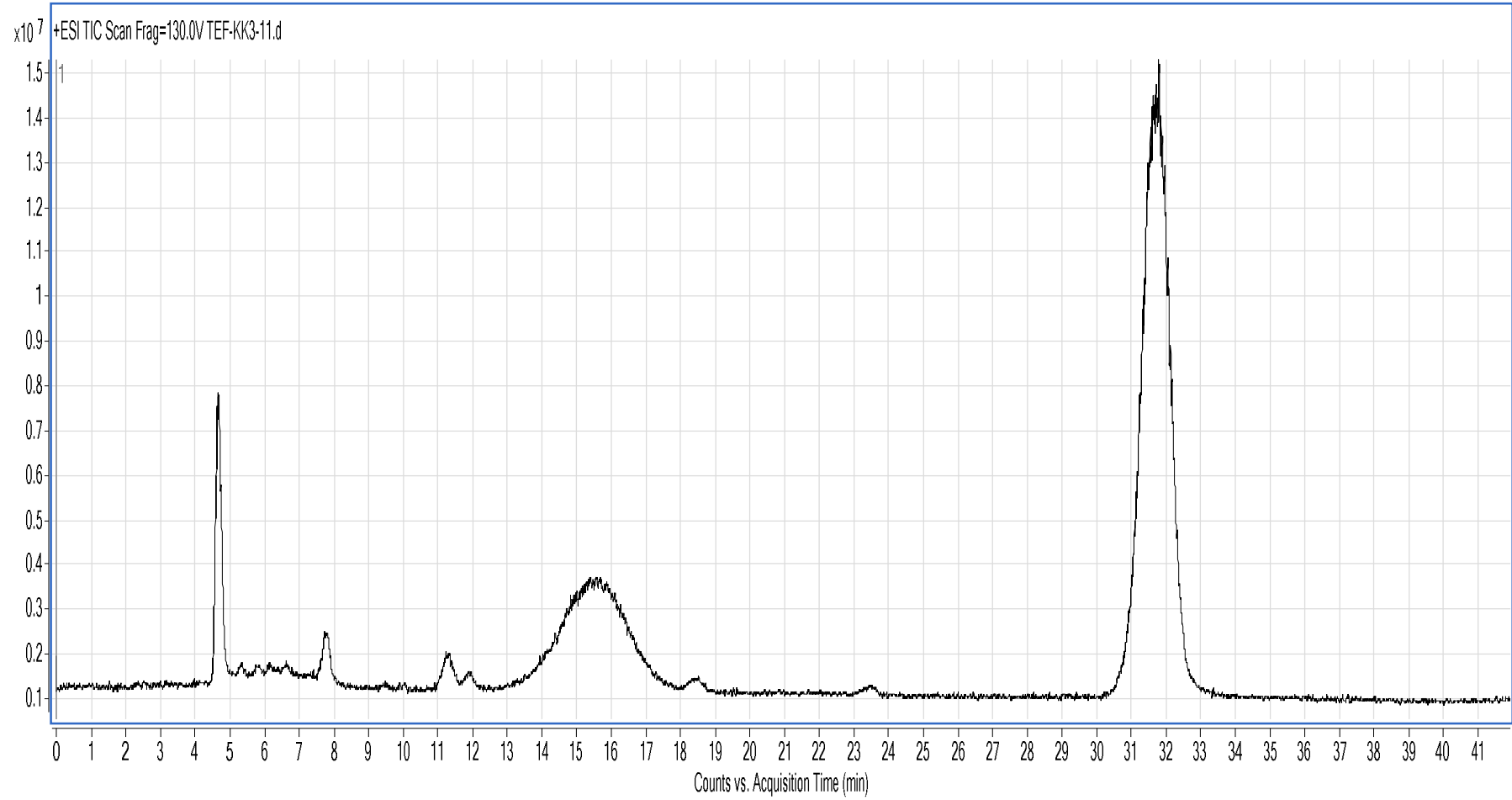
Spektrum 4.6. *V. parviflorum* türünün Diklorometan:Metanol (1:1) ekstresinin alkaloid fraksiyonunda Antofin *N*-oksit'in ESI-MS² spektrumu. Antofin *N*-oksit (Rt: 11.2) (ESI MS *m/z* (%) 380.30 ([M+H]⁺) (14), 362.3 (15), 295.4 (50), 294.4 (100).

4.1.5. Kolon Kromatografisi

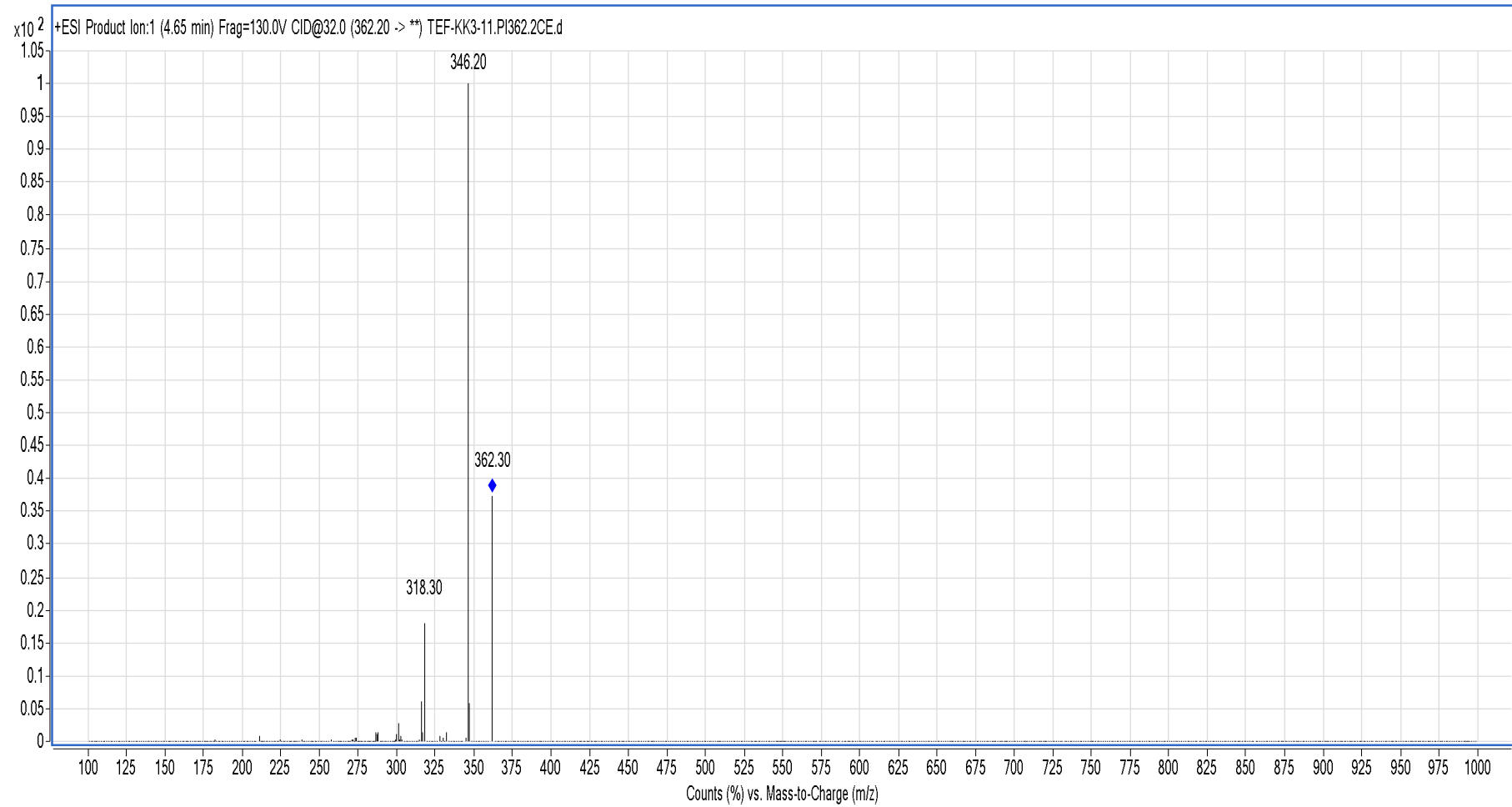
Alkaloit fraksiyonlarının İTK ile yapılan deneyleri sonucunda benzer alkaloitleri taşıdıkları saptanan *V. parviflorum* türünün diklorometanlı ekstresinin alkaloit fraksiyonundaki (0.439 g) maddelerin Kolon Kromatografisi ile izolasyon çalışmaları yapılmış ve İTK kontrollerinde alkaloit taşıdığı belirlenen kloroformlu fraksiyonlar Fr-10 (0.029 g) ve Fr-11 (0.016 g) elde edilmiştir. Elde edilen fraksiyonların (Fr-10, Fr-11) LC/MS/MS analizleri yapılmış ve daha saf olan Fr-11 fraksiyonuna ait kromatogram Kromatogram 4.11. de ve bileşiğin MS/MS analizi sonucunda elde edilen ESI-MS² spektrumu Spektrum 4.7. de verilmiştir.

4.1.6. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

V. canescens subsp. *pedunculata* türünün diklorometanlı ekstresinin alkaloit fraksiyonu ile Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi çalışmaları sonucu elde edilen fraksiyonların yeterince saf olmadığı görüldüğünden bunlar ile ilgili çalışmalara devam edilmemiştir.



Kromatogram 4.11. *V. parviflorum* türünün diklorometanlı ekstresinin alkaloid fraksiyonundan elde edilen Fr-11 fraksiyonunun TIC kromatogramı (pozitif ESI mod).



Spektrum 4.7. Fr-11 fraksiyonunda Sekoantofin'in ESI-MS² spektrumu.
Sekoantofin (Rt: 4.45) (ESI MS m/z (%): 362.30 ($[M-2H_2]+H^+$) (37), 346.20 (100), 318.30 (18)).

4.2. Biyoaktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.2.1. İnspekt Antifeedant Aktivite

Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin tamamı *S. littoralis* ve *L. decemlineata* larvalarına karşı inspekt antifeedant aktivite için test edildi. Larvalar başlangıçtan 5 gün sonra tartıldı ve larva büyümesinde % 50 inhibisyona neden olan letal dozlar kontrol ile karşılaştırılıp probit analizleri kullanılarak belirlendi. Ayrıca ekstreler çeşitli dozlarda tekrar besinlere karıştırılarak paralel deneylerle larva mortalitesi de araştırıldı. 5 günün sonunda sonuçlar değerlendirilerek LD₅₀ değerleri ve % 95 güven aralığı sınırları (CI₉₅) probit analizleri yapılarak belirlendi.

500 µg/cm² maksimal test dozunda test edilen ekstreler arasında antifeedant aktivite de belirgin farklılıklar bulundu. % 50 ve altındaki inhibisyon değerleri ileri çalışmalara alınmadı. Çalışılan türlerin ekstrelerin tamamına karşı farklı derecelerde hassasiyet gösterdiği belirlendi; ayrıca *L. decemlineata* larvalarının test edilen ekstrelere karşı *S. littoralis* larvalarına göre daha hassas olduğu görüldü.

L. decemlineata

Çalışılan ekstreler genel olarak değerlendirildiğinde test edildikleri en yüksek doz olan 500 µg/cm² dozda *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün EtOH, MeOH ve MeOH:CH₂Cl₂ ekstreleri; *V. parviflorum* türünün EtOH ve CH₂Cl₂ ekstreleri; *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün EtOH ekstresi ve *V. canescens* subsp. *canescens* türünün EtOH ekstresi *L. decemlineata* türünün larvalarına karşı çok yüksek antifeedant aktivite gösterdi.

V. fuscatum subsp. *fuscatum* türünün tüm ekstreleri maksimal dozda % 92'nin üzerinde inhibisyon değeri göstermeleri ile en etkili tür olarak belirlenirken; bunu *V. parviflorum* türüne ait ekstreler izledi. En düşük inhibisyon değerleri ise *V. canescens* subsp. *pedunculata* türüne ait ekstrelerde gözlemlendi. *L. decemlineata* larvalarına karşı EtOH'lı ekstreler genel olarak LD₅₀ değerleri ile diğer ekstrelere göre daha etkili olup *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün EtOH'lı ekstresi 25 µg/cm² LD₅₀ değeri ile en

güçlü etkili ekstre olarak belirlendi. *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün EtOH'lı ekstresi 42 µg/cm²; *V. parviflorum* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi 43 µg/cm² LD₅₀ değeri ile kuvvetli etkilidir. *L. decemlineata* larvalarına karşı MeOH'lı ekstreler genel olarak en düşük etkili veya tamamen etkisizdir (Çizelge 4.19.).

Çizelge 4.19. Test edilen ekstrelerin *L. decemlineata* larvalarına karşı 500 µg/cm² konsantrasyonda antifeedant aktivitesi ve LD₅₀ değerleri.

Tür	Ekstre çeşidi	500 µg/cm ²	LD ₅₀	CI ₉₅ ^a	Chi. ^b
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	CH ₂ Cl ₂	43.6±5.1	ND	-	-
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	99.3±2.7	335	316-356	0.509
	MeOH	3.9±1.8	ND	-	-
	EtOH	100.0±0.0	66	53-77	1.833
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	CH ₂ Cl ₂	24.7±5.2	ND	-	-
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	2.9±3.3	ND	-	-
	MeOH	77.7±3.2	434	421-475	2.125
	EtOH	93.9±2.8	55	47-64	1.787
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	CH ₂ Cl ₂	92.7±3.3	158	133-181	0.181
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	100.0±0.0	185	163-197	2.895
	MeOH	100.0±0.0	195	167-203	3.181
	EtOH	100.0±0.0	25	20-29	4.112
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	CH ₂ Cl ₂	89.5±5.3	141	107-170	0.161
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	59.2±2.5	489	427-516	3.128
	MeOH	40.1±6.5	ND	-	-
	EtOH	100.0±0.0	42	38-48	3.125
<i>V. parviflorum</i> *	CH ₂ Cl ₂	100.0±0.0	43	36-49	2.867
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	86.3±2.8	302	276-327	3.232
	MeOH	57.4±2.8	495	487-512	3.821
	EtOH	100.0±0.0	65	53-76	0.936

*: Endemik türler; ND: Belirlenemedi. ^a: % 95 güven aralığı ; ^b: Kikare değeri, P<0.05 de anlamlı

S. littoralis

Çalışılan ekstreler genel olarak değerlendirildiğinde test edildikleri en yüksek doz olan 500 µg/cm² dozda *V. parviflorum* türünün MeOH:CH₂Cl₂ (1:1) ekstresi; *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün EtOH ekstresi ve *V. canescens* subsp. *canescens* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün EtOH'lı ekstresi *S. littoralis* türünün larvalarına karşı çok yüksek antifeedant aktivite gösterdi. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün tüm ekstreleri orta derecede antifeedant aktiviteli bulundu. *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün EtOH'lı ekstresi ve *V. parviflorum* türünün MeOH:CH₂Cl₂ (1:1) ekstresi *S. littoralis* larvalarına karşı sırasıyla 12 µg/cm²

ve 18 µg/cm² LD₅₀ değerleri ile en yüksek etkiyi gösterdi. *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün EtOH'lı ekstresi 33 µg/cm²; *V. canescens* subsp. *canescens* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi 45 µg/cm² LD₅₀ değeri ile *S. littoralis* larvalarına karşı kuvvetli etkilidir. Çalışılan türlerin MeOH'lı ekstreleri genel olarak *S. littoralis* larvalarına karşı en düşük etkili ekstrelerdir bu nedenle çoğunun ileri denemelerinin yapılmasına gerek duyulmadı (Çizelge 4. 20.).

Çizelge 4.20. Test edilen ekstrelerin *S. littoralis* larvalarına karşı 500 µg/cm² konsantrasyonda antifeedant aktivitesi ve LD₅₀ değerleri.

Tür	Ekstre çeşidi	500 µg/cm ²	LD ₅₀	CI ₉₅ ^a	Chi. ^b
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	CH ₂ Cl ₂	100.0±0.0	45	41-49	3.111
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	44.2±5.7	ND	-	-
	MeOH	41.3±2.7	ND	-	-
	EtOH	72.1±1.6	320	311-337	0.298
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	CH ₂ Cl ₂	74.7±5.2	172	169-188	2.123
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	72.9±2.3	129	111-138	2.115
	MeOH	48.3±7.5	ND	-	-
	EtOH	100.0±0.0	12	11-15	1.222
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	CH ₂ Cl ₂	62.7±2.3	398	389-412	0.678
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	59.3±7.1	431	356-492	1.236
	MeOH	73.7±3.5	132	125-148	2.115
	EtOH	73.3±2.2	110	103-115	3.315
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	CH ₂ Cl ₂	79.2±2.3	323	292-353	1.575
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	43.7±2.5	ND	-	-
	MeOH	42.1±5.5	ND	-	-
	EtOH	100.0±0.0	33	25-38	2.333
<i>V. parviflorum</i> *	CH ₂ Cl ₂	62.3±3.1	489	422-512	3.122
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	100.0±0.0	18	13-25	2.485
	MeOH	32.3±2.5	ND	-	-
	EtOH	88.2±3.1	218	201-225	0.335

*: Endemik türler; ND: Belirlenemedi, ^a: % 95 güven aralığı ; ^b: Kikare değeri, P<0.05 de anlamlı

Büyüme inhibisyonu ve Larva mortalitesi

Test edilen ekstrelerin *S. littoralis* larvalarında larva mortalitesine neden olduğu yapılan paralel deneylerle belirlendi. Büyüme inhibisyonu daha yüksek dozlarda mortalite ile sonuçlanmaktadır. Bu kronik toksisiteye neden olan maddelerde görülen tipik bir durumdur. *V. parviflorum* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi 0.08 mg/g ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi 0.09 mg/g LD₅₀ değeri ile *S. littoralis* larvalarına karşı en yüksek büyüme inhibisyon etkisi gösterdiği görüldü.

Çalışılan türlerden elde edilen ekstrelerden *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi 1.03 mg/g ve *V. parviflorum* türünün CH₂Cl₂'li ekstresi 1.07 mg/g LD₅₀ değeri ile *S. littoralis* larvalarına karşı en yüksek larva mortalitesine sahip olduğu tespit edildi. Genel olarak MeOH'lı ekstrelerin larva mortalitesi ve büyüme inhibisyon etkisi gözlenmedi (Çizelge 4. 21.).

Çizelge 4.21. Test edilen ekstrelerin *S. littoralis* larvalarına karşı mg/g da larva mortalitesi ve büyüme inhibisyon değerleri.

Tür	Ekstre çeşidi	Büyüme inhibisyonu (mg/g) LD ₅₀ (CI ₉₅ ^a)	Mortalite (mg/g) LD ₅₀ (CI ₉₅ ^a)
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	CH ₂ Cl ₂	0.24 (0.17-0.31)	3.82 (2.31-4.28)
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	0.82 (0.72-0.95)	3.63 (2.59-4.24)
	MeOH	6.41 (5.13-7.47)	17.44 (16.97-20.05)
	EtOH	0.45 (0.38-0.54)	3.42 (2.36-5.96)
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	CH ₂ Cl ₂	0.09 (0.04-0.11)	1.03 (0.74-1.88)
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	0.69 (0.60-0.78)	2.78 (2.09-3.34)
	MeOH	1.19 (1.05-1.35)	4.93 (3.82-5.07)
	EtOH	0.17 (0.09-0.23)	3.33 (2.94-4.83)
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	CH ₂ Cl ₂	0.75 (0.66-0.84)	2.65 (2.15-3.64)
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	1.31 (1.19-1.44)	3.53 (2.97-4.49)
	MeOH	ND	ND
	EtOH	0.72 (0.59-0.91)	8.17 (7.61-9.46)
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	CH ₂ Cl ₂	0.23 (0.18-0.28)	1.59 (1.18-2.48)
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	1.84 (1.73-1.95)	3.81 (3.42-4.47)
	MeOH	1.77 (1.59-1.93)	7.21 (5.79-7.89)
	EtOH	0.23 (0.16-0.29)	2.77 (1.78-3.12)
<i>V. parviflorum</i> *	CH ₂ Cl ₂	0.08 (0.03-0.11)	1.07 (0.76-2.01)
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	0.63 (0.52-0.67)	2.06 (1.64-2.31)
	MeOH	2.83 (2.48-3.26)	13.24 (12.87-15.07)
	EtOH	0.29 (0.23-0.33)	1.93 (1.49-3.06)

*: Endemik türler; ND: belirlenemedi. ^a: parantez içerisinde % 95 güven aralığı gösteren değerler

4.2.2. Antifungal Aktivite

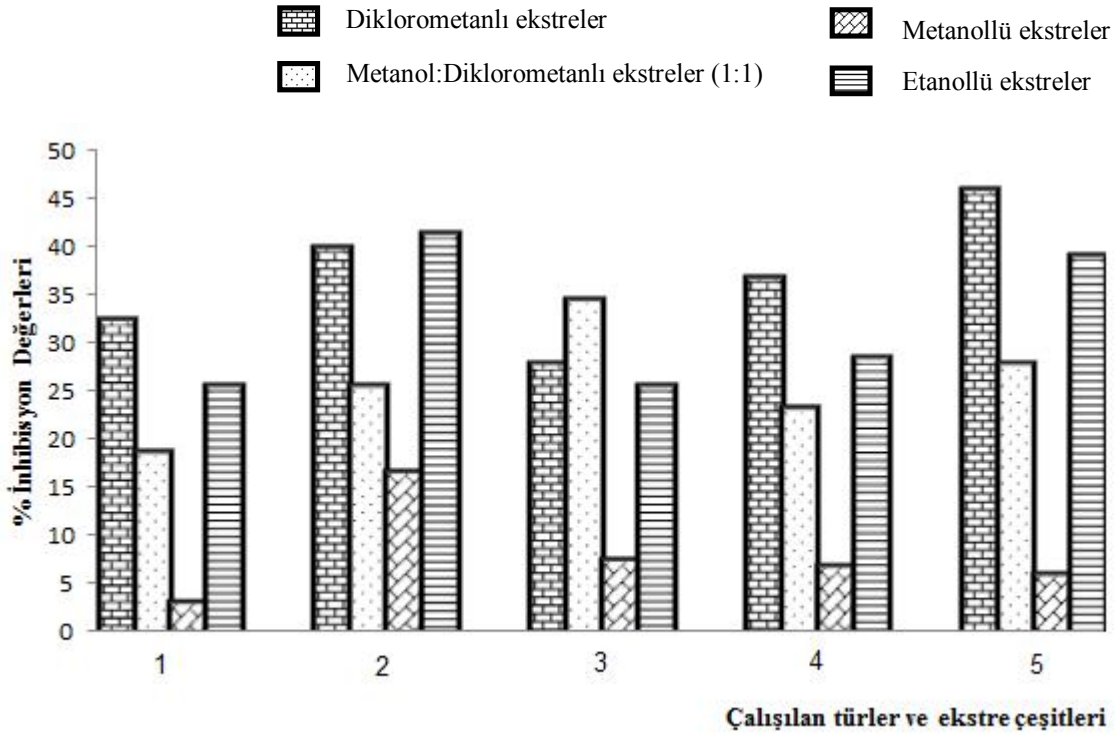
Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin tamamı *A. fumigatus*'a karşı 1 mg/mL konsantrasyonda agar dilüsyon metodu ile antifungal aktiviteleri için test edildi. Uygulama yapılan petrilerde 7 günün sonunda hedef fungusların radyal büyüme inhibisyon yüzdeleri formül yardımı ile hesaplandı. Sonuç olarak çalışılan türlerin 4 farklı çözücü sistemi (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH (1:1), MeOH,

EtOH) ile hazırlanan farklı polaritedeki toprak üstü ekstralarının *A. fumigatus*'a karşı 1 mg/mL konsantrasyonda inhibisyon etkisi olduğu saptanmıştır. En yüksek % inhibisyon değeri *V. parviflorum* türünün CH₂Cl₂ ekstresinde gözlemlendi (% 45.86). Bunu sırasıyla *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün etanollü ekstresinin, aynı türün CH₂Cl₂ ekstresinin ve *V. parviflorum* türünün etanollü ekstresinin izlediği görüldü (% 41.35; % 39.85; % 39.10, sırasıyla). Çalışılan tüm türlerden elde edilen metanollü ekstraların % inhibisyon değerlerinin aynı türün farklı polaritede hazırlanan ekstralarına göre çok daha düşük olduğu belirlendi (Çizelge 4. 22.)(Şekil 4.5.).

Çizelge 4.22. Test edilen ekstraların 1 mg/mL konsantrasyonda *A. fumigatus*'a karşı % inhibisyon değerleri.

Tür	Ekstre çeşidi	% inhibisyon
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	CH ₂ Cl ₂	32.33
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	18.80
	MeOH	3.01
	EtOH	25.56
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	CH ₂ Cl ₂	39.85
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	25.56
	MeOH	16.54
	EtOH	41.35
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	CH ₂ Cl ₂	27.82
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	34.59
	MeOH	7.52
	EtOH	25.56
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	CH ₂ Cl ₂	36.84
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	23.31
	MeOH	6.77
	EtOH	28.57
<i>V. parviflorum</i> *	CH ₂ Cl ₂	45.86
	MeOH:CH ₂ Cl ₂	27.82
	MeOH	6.02
	EtOH	39.10

* Endemik türler



Şekil 4.5. Çalışılan türlerden elde edilen ekstrelerin 1 mg/mL konsantrasyonda *A. fumigatus*'a karşı % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması. (1: *V. canescens* subsp. *canescens*; 2: *V. canescens* subsp. *pedunculata* *; 3: *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*; 4: *V. fuscatum* subsp. *boissieri* *; 5: *V. parviflorum* *; *Endemik türler.)

5. TARTIŞMA

Asclepiadaceae familyasına ait bir cins olan ve yaklaşık 100 türü bulunan *Vincetoxicum* cinsi (7, 8) familyanın Anadolu'da yetişen en zengin taksonu olup 8 tür ile temsil edilmektedir (5).

Vincetoxicum cinsine ait türlerin halk tıbbında; laksatif, antitümör, diüretik, emetik, antimalaryal, antilayşmanyal, diyaforetik, ekspektoran, depuratif, digitaloidik, yara iyi edici, fungal enfeksiyonların ve incinmelerin tedavisi ve mantar zehirlenmelerine karşı antidot olarak kullanımlarının olduğu rapor edilmiştir (14, 18, 26-31).

Vincetoxicum cinsine ait türler üzerinde yapılan çalışmalarda bazı glikozitlerin ve alkaloidlerin varlığı bildirilmiştir (31, 40). Örneğin *V. hirundinaria* türünün alkaloidler, C₂₁-steroid glikozitler, β -sitosteroller, triterpenler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler içerdiği saptanmıştır (28). Ayrıca *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin köklerinin saponozit (vinetoksozit) içerdiği rapor edilmiştir (5).

Fenantroindolizidin alkaloidleri Tiloforin veya *Tylophora* alkaloidleri olarak bilinen öncelikle *Tylophora*, *Vincetoxicum*, *Pergularia* ve *Cynanchum* cinslerini de içerisine alan *Asclepiadaceae* familyası bitkilerinden izole edilmiş olan bu bitkilere karakteristik bileşiklerdir (32, 41, 42, 44, 46). Bu alkaloidlerin: antiinflamatuvar, antiastmatik ve antianafaktik özelliklerinin olduğu *in vivo* çalışmalarla gösterilmiş; ayrıca antiviral, antifungal, antibakteriyal, antiamebik, sitotoksik, antitümör, antialerjik, antiarthritis, antiotoimmün, antilösemik, *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser hücre büyüme inhibisyonu, Santral Sinir Sistemi depresanı, kardiyovasküler ve immünolojik etkiler ve *in vivo* antilupus aktivite gibi geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir. (24, 37, 43, 44, 53, 55, 56, 59-63, 67- 69, 75, 87). Ayrıca fenantroindolizidin alkaloidlerinin insektisit ve insekt feedant/antifeedant aktivite ile ilişkili olduğu tespit edilmiş ve böcekler, tütün mozaik virüsü ve bakterilere karşı antibiyotik aktiviteli olduğu da rapor edilmiştir (24, 61, 76, 78, 79).

Literatür taramalarında *Vincetoxicum* cinsine ait türleri ile ilgili az sayıda fitokimyasal ve biyoaktivite çalışmasının yapıldığı görülmüştür. Ayrıca literatürde

Türkiye'de yetişen *Vincetoxicum* cinsine ait türler ile ilgili yapılmış bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Bu cins üzerinde az sayıda araştırmanın yapılmış olması *Vincetoxicum* taksonlarının fitokimyasal ve biyoaktivite açısından incelenmesini gündeme getirmiştir. Bu nedenle Flora of Turkey and The East Aegean Islands'da kayıtlı *Vincetoxicum* cinsine ait üçü endemik olmak üzere 5 takson (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata* (endemik), *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* (endemik) ve *V. parviflorum* (endemik)) araştırma konusu olarak seçilmiştir. Seçilen bu türlerin toprak üstü kısımlarından ve köklerinden elde edilen ekstraler kalitatif olarak etken madde grupları açısından incelenmiş; alkaloid içerdikleri belirlenen toprak üstü kısımlarının ekstraleleri fraksiyonlara ayrılmış ve LC/MS/MS analizleri ile bu fraksiyonlar incelenerek ana alkaloidleri belirlenmiştir. Ayrıca fraksiyonlar kolon kromatografisi uygulanarak tekrar fraksiyonlara ayrılmış ve fraksiyonların LC/MS/MS analizleri birlikte değerlendirilerek fenantroindolizidin alkaloidlerinin varlığı saptanmıştır. Bu çalışmaya ek olarak ekstrelerin antifeedant ve antifungal aktiviteleri de araştırılmıştır.

Çalışılan türler genel etken madde grupları açısından incelendiğinde türlerin tamamında kardiyolojik heterozit ve oz gruplarının bulunduğu; tüm türlerin toprak üstü kısımlarında flavonoid ve alkaloid; köklerinde ise nişasta bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün köklerinde saponozit, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. parviflorum* türünün toprak üstü kısımlarında kateşik tanen varlığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda tüm türlerin antosiyanozit, siyanogenetik heterozit, kumarin, uçucu yağ, sabit yağ ve antrasen türevi heterozit taşımadığı saptanmıştır (Çizelge 5.1.). Türlerden elde edilen ekstrelerin ve fraksiyonların İTK analizleri sonucunda köklerden elde edilen ekstrelerin tamamında ve toprak üstü kısımlarından elde edilen metanol ekstralarında alkaloid bulunmadığı görülmüştür.

Literatürde alkaloidler, kardenolidler, saponinler ve tanenler bu familya bitkilerinde bulunan bileşikler olarak bildirilmiştir (3). *Vincetoxicum* cinsine ait türler üzerinde yapılan çalışmalarda ise glikozitler, alkaloidler, C₂₁-steroid glikozitler, flavonoidler, diğer fenolik bileşikler ve saponozit (köklerde) taşıdıkları saptanmıştır (5, 28, 31, 40).

Çizelge 5.1. Çalışılan türlerin kök ve toprak üstü kısımlarında incelenen ana etken madde gruplarına genel bakış.

Tür	Kullanılan kısım													
		Alkaloit	Flavonoit	Antosiyanozitler	Kumarin	Nişasta	Siyanogenetik Heterozitler	Oz grupları	Uçucu Yağ	Sabit Yağ	Tanen	Saponozit	Antrasen Türevi Heterozitler	Kardiyoaktif Heterozit
<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> *	Kök	-	-	-	-	+	-	Ketoz	-	-	-	-	-	Kardenolit
	T. üstü	+	Flavonon	-	-	-	-	Aldoz	-	-	-	-	-	Kardenolit
<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>	Kök	-	-	-	-	+	-	Aldoz	-	-	-	-	-	Kardenolit
	T. üstü	+	Flavonon	-	-	-	-	Aldoz	-	-	-	-	-	Kardenolit
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>fuscatum</i>	Kök	-	-	-	-	+	-	Ketoz	-	-	-	-	-	Kardenolit
	T. üstü	+	Flavonon	-	-	-	-	Ketoz	-	-	Kateşik Tanen	-	-	Kardenolit
<i>V. fuscatum</i> subsp. <i>boissieri</i> *	Kök	-	-	-	-	+	-	Ketoz	-	-	-	+	-	Kardenolit
	T. üstü	+	Flavonon	-	-	-	-	Aldoz	-	-	Kateşik Tanen	-	-	Kardenolit
<i>V. parviflorum</i> *	Kök	-	-	-	-	+	-	Ketoz	-	-	-	-	-	Kardenolit
	T. üstü	+	Flavonon	-	-	-	-	Aldoz	-	-	Kateşik Tanen	-	-	Kardenolit

* Endemik türler; +: var; -: yok

Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstraların alkaloid fraksiyonları LC/MS/MS ile incelendiğinde ana alkaloidler yönünden ekstraların benzer oldukları belirlenmiştir. Tüm türler de sekoantofin *N*-oksid veya antofin *N*-oksid olduğu düşünülen iki alkaloidin ana alkaloid olarak bulunduğu saptanmıştır. *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün diklorometan ekstresinde $R_t=5.24$ de yapısı henüz belirlenemeyen bir ana alkaloid bulunmuştur. Ayrıca *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün her iki ekstresinde ve *V. fuscatum* subsp. *boissieri* türünün diklorometan ekstresinde ise sekoantofin olduğu düşünülen bileşiğin diğerlerine göre daha düşük oranda bulunduğu tespit edilmiştir.

Vincetoxicum cinsine ait türlerle (ör: *V. officinale*) yapılan çeşitli araştırmalarda tiloforin ve yapısı tam olarak aydınlatılamamış benzer bir alkaloidin izole edildiği bildirilmiştir. Capo ve Saa tarafından 1989 yılında yapılan bir çalışmada *V. nigrum* türünün toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinin alkaloid fraksiyonunda (-)-antofin ve tanımlanamayan iki minör alkaloid izole edilmiştir (89).

Lavault ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılan bir çalışmada *V. hirundinaria* türünün köklerinin hekzan ekstresinden 10β -(-)-antofin *N*-oksid ve 10α -(-)-antofin *N*-oksid; kök ve gövde kabuklarının kloroform ekstralarından ayrı ayrı (-)-antofin, (-)-6-*O*-demetilantofin ve (-)-14-hidroksiantofin izole edilmiştir (37).

Staerk ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada endemik bir tür olan *V. pumilum* türünün kök ve toprak üstü kısımlarının MeOH-CH₂Cl₂'li ekstralarının alkaloid fraksiyonundan (-)-13 α -antofin, (-)-10 β ,13 α -antofin *N*-oksid ve (-)-14 β -hidroksi-10 β ,13 α -antofin *N*-oksid alkaloidleri izole edilmiştir (7).

Mogg ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün taze yaprak, olgun meyve ve köklerinden hazırlanan etanol ekstralarından biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yardımıyla (-)-antofin ve (-)-antofin'den farklı fakat sınıflandırılmamış ikinci bir bileşik izole edilmiştir (24).

V. rossicum türüne ek olarak fenantroindolizidin alkaloidlerinden özellikle (-)-antofin, antofin oksit ve birçok türevlerinin *V. hirundinaria* türünün toprak üstü kısımlarından ve köklerinden de az miktarda izole edildiği bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda *V. pumilum* türünün köklerinde, *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin ise kök, yaprak ve tohumlarında (-)-antofin'in varlığı gösterilmiştir (66).

Çalışılan türlerin LC/MS/MS analizleri sonucunda diklorometan ve

metanol:diklorometan (1:1) ekstralarında fenantroindolizidin alkaloidlerinin (sekoantofin, sekoantofin *N*-oksit, antofin *N*-oksit olabileceđi dűşünűlen alkaloidler) varlıđının saptanması *Vincetoxicum* türleri üzerine yapılan bir çok çalıřma ile de paralellik göstermiřtir.

Çalışılan türler insekt-antifeedant aktivite açısından incelendiğinde türlerin tamamının test edildikleri *L. decemlineata* ve *S. littoralis* larvalarına karşı farklı derecelerde hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. *L. decemlineata* türünün larvalarına karşı *V. fuscatum* subsp. *fuscatum* türünün etanol, metanol ve metanol:diklorometan (1:1) ekstraları; *V. parviflorum* türünün etanol ve diklorometan ekstraları; *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. canescens* subsp. *canescens* türlerinin etanol ekstraları; *S. littoralis* türünün larvalarına karşı ise *V. parviflorum* türünün metanol:diklorometan (1:1) ekstresi; *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* türlerinin etanol ekstraları ve *V. canescens* subsp. *canescens* türünün diklorometan ekstresi çok yüksek antifeedant aktivite göstermiştir (100.0±0.0). Türlerden elde edilen farklı polaritedeki ekstralar arasında özellikle metanol ekstraların ya etkilerinin belirlenemediği veya dűřük etkili olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *L. decemlineata* larvalarının test edilen ekstralara karşı *S. littoralis* larvalarına göre daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Test edilen ekstraların *S. littoralis* larvalarında larva mortalitesine neden olduğu yapılan paralel deneylerle belirlenmiştir.

Vincetoxicum cinsi ile yakın akraba *T. indica* türünün alkaloid ekstresinin % 0.01 konsantrasyonda *S. litura* larvalarının beslenmesini engellediği belirlenmiştir. Bu türün kök, yaprak, tohum ve kabuklarından elde edilen ekstraların yüzyıllardır geleneksel insektisitler olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Kathuria ve Kaushik tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada *T. indica* türünün ham yaprak ekstralarının (etanol, hekzan ekstraları ve ham alkaloid fraksiyonları) *H. armigera* larvalarına karşı antifeedant aktiviteleri araştırılmış ve larva beslenmesini azaltmada *T. indica* türünün yapraklarının etanol ekstresinden elde edilen alkaloid fraksiyonunun daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Alkaloid fraksiyonunun % 1 konsantrasyonda % 58 inhibisyona neden olduğu, ham yaprak ekstralarının aktivitesinin ise aynı konsantrasyonda % 25 den az olduğu ve *T. indica* türünün alkaloidlerinin *H. armigera* türünün beslenmesini doza bağımlı olarak etkilediği saptanmıştır (76).

Mogg ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün kök, taze yaprak ve olgun meyvelerinden elde edilen etanol ekstraları, kök ekstresinin fraksiyonlarından elde edilen (-)-antofin ve tanımlanamamış ikinci bileşik/bileşikler ile etanollü kök ekstresinin asidik, bazik ve sulu fraksiyonları *A. cinctus*, *D. arcuata* ve *O. nubilalis* türlerine karşı insekt-antifeedant aktiviteleri için test edilmiştir. Bitkide bulunan bileşik/bileşiklerin *A. cinctus* larvalarına karşı antifeedant aktivite gösterdiği; *D. arcuata* ve *O. nubilalis* larvalarına karşı toksik olduğu tespit edilmiştir. Fenantroindolizidin alkaloitlerinin insekt-antifeedant aktivite ile ilişkili olduğu bu çalışma ile desteklenmiş ve *V. rossicum* türünün insektisidal/insekt-antifeedant bileşik(ler) içerdiği gösterilmiştir (24).

Pavela ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yaptığı bir çalışmada içlerinde *V. hirundinaria* türünün metanol ekstrenin de olduğu bitkilerin *S. littoralis* ve *L. decemlineata* larvalarına karşı antifeedant aktivitesi araştırılmış ve ön taramalarda *V. hirundinaria* türünün neden olduğu % beslenme caydırıcılık indeksine bakıldığında *S. littoralis* türü için bu değer 99.2 ± 1.5 ve *L. decemlineata* türü için ise bu değer 72.1 ± 6.5 olarak belirlenmiştir. Çalışmalara en etkili 4 tür ile devam edilmiş ve kontrol ile karşılaştırıldığında bitkilerin *S. littoralis* larvalarında % 50 (ED₅₀) ve % 90 (ED₉₀) beslenme caydırıcılığına neden olan etkili dozları verilmiş ve *V. hirundinaria* türünden elde edilen ekstrenin ED₅₀ ve ED₉₀ (sırasıyla 11 µg/cm² ve 99 µg/cm² değerleri) değerleri ile en yüksek etkiyi gösterdiği görülmüştür. Ayrıca çalışmada *S. littoralis* larvalarının test edilen ekstrelelere daha az duyarlı olduğu; *L. decemlineata* larvalarının ise tüm ekstrelelere çok daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (28). Literatürler insekt-antifeedant aktivite açısından incelendiğinde *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin çeşitli böcek larvalarına karşı yüksek insekt-antifeedant aktivite gösterdiği görülmüştür (28, 160). Çalışmada seçilen türlerin tamamının test edilen böcek larvalarına (*S. littoralis* ve *L. decemlineata* larvaları) karşı insekt-antifeedant aktivite göstermesi literatür bilgileri ile paralellik göstermiştir. İnsekt-antifeedant aktivitenin genel olarak alkaloitler, terpenler, saponinler ve polifenollerden ileri geldiği saptanmış olmakla birlikte literatürlerde *Vincetoxicum* cinsine ait türler ile yapılan çalışmalarda türlerin alkaloit fraksiyonlarının ekstrelerinden daha aktif olduğu da tespit edilmiş ayrıca bu etkiden fenantroindolizidin alkaloitlerinin de sorumlu olduğu bildirilmiştir. Çalışmada türlerden elde edilen ekstreler arasında alkaloit taşımadığı belirlenen metanol ekstrelerin düşük

etkili veya etkisiz olduklarının belirlenmesi, çalışılan türlerde görülen bu aktivitenin türlerde bulunan alkaloidlerden özellikle fenantroindolizidin alkaloidlerinden kaynaklandığını düşündürmüştür. Ayrıca çalışmada *L. decemlineata* larvalarının *S. littoralis* larvalarına göre test edilen ekstrelere karşı daha hassas olduğunun görülmesi literatürlerde *S. littoralis* larvalarının total polifagus olması nedeniyle olifagus *L. decemlineata* larvalarına göre test edilen ekstrelere bulunan bazı maddelere düşük hassasiyet gösterdiği düşüncesine de paralellik göstermiştir.

Antifeedant etki gösteren bileşiklerin sekonder metabolitlerin tüm bileşen gruplarında bulunduğu tespit edilmiş ve etkili insekt beslenme inhibitör etkisinin; özellikle terpenler, alkaloidler, saponinler ve polifenollerden ileri geldiği saptanmıştır (28). Tez çalışmamızda incelenen türlerin LC/MS/MS analizleri sonucunda diklorometan ve metanol:diklorometan (1:1) ekstrelerinde fenantroindolizidin alkaloidlerinin bulunduğu tespit edilmesi ve ayrıca alkaloid taşımadığı saptanan metanol ekstrelerinde etkinin belirlenememesi veya düşük etkinin gözlenmesi türlerde görülen insekt-antifeedant aktivitenin fenantroindolizidin alkaloidlerinden kaynaklandığı düşüncesini desteklemektedir.

Çalışılan türlerin toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrelerin tamamı *A. fumigatus*'a karşı agar dilüsyon metodu ile antifungal aktiviteleri için test edilmiş ve 4 farklı çözücü sistemi (diklorometan, metanol:diklorometan (1:1), metanol, etanol) ile hazırlanan farklı polaritedeki toprak üstü ekstrelerinin *A. fumigatus*'a karşı 1 mg/mL konsantrasyonda inhibisyon etkisi olduğu saptanmıştır. En yüksek % inhibisyon değeri *V. parviflorum* türünün diklorometan ekstresinde gözlenmiştir (% 45.86). Bunu sırasıyla *V. canescens* subsp. *pedunculata* türünün etanol ekstresi, aynı türün diklorometan ekstresi ve *V. parviflorum* türünün etanol ekstresinin izlediği görülmüştür (% 41.35; % 39.85; % 39.10, sırasıyla). Ayrıca çalışılan tüm türlerden elde edilen metanol ekstrelerin % inhibisyon değerlerinin aynı türün farklı polaritede hazırlanan ekstrelerine göre çok daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Capo ve Saa tarafından 1989 yılında yapılan bir çalışmada *V. nigrum* türünün kök ve yapraklarının alkaloid ekstresinden elde edilen (-)- antofin ve iki minör alkaloidin antifungal ve antibakteriyal aktivitesi olduğunu gösterilmiştir (89). Cappucino tarafından 2004 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün kök ekstrelerinin geniş spektrumlu antifungal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (13). Gibson ve

arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün kök ekstraktlarında bulunan antofin'in geniş spektrumlu antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (66). *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin fenantroindolizidin alkaloidleri içerdiği bilinmekte olup; bu alkaloidlerin ilgi çekici biyolojik özellikleri arasında *C. albicans*'a karşı belirgin sitotoksik etkisi olduğu ve bu nedenle anti-*Candida albicans* etkili yani seçici antifungal aktivite olduğu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (31, 40, 61).

Zaidi ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan bir çalışmada *V. stocksii* türünün 12 fungus ve 12 bakteri suşuna karşı biyolojik aktivitesi araştırılmış ve metanol ekstresinin *C. albicans*, *B. subtilis* ve *B. cereus*'a karşı belirgin aktivite gösterdiği saptanmıştır (31).

Mogg ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* türünün taze yaprak, olgun meyve ve köklerinden hazırlanan etanol ekstraktları bakteriyel ve fungal büyüme inhibisyon aktiviteleri için test edilmiştir. Farklı filamentöz ve maya benzeri funguslara ve geniş konakçı aralığı olan bitki patojenlerine karşı belirgin antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca (-)-antofin'in bakterilere nazaran funguslara karşı daha etkili inhibitör aktivite olduğu ve dahası (-)-antofin'in çok çeşitli bitki türlerinde patojen etkili olan ve önemli patojenler olan funguslara karşı net inhibitör aktivite olduğu saptanmıştır (24).

Subramaniam ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada *F. fistulosa* türünün gövde kabuklarından (-)-13 α -antofin, (-)-14 β -hidroksiantofin ve (-)-13 α -secoantofin izole edilmiş; (-)-13 α -antofin bileşimini içeren alkaloid ekstresinin *A. fumigatus* ATCC 46645 ve *C. albicans* ATCC 900280 fungal suşlarına karşı antifungal aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (172).

Wang ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada fenantroindolizidin alkaloid serileri ve bunların tuz türevlerinin fungisidal aktivitesine bakılmış; antofin ve deoksitiloforinin'in 50 μ g/mL konsantrasyonlarda *A. solani*, *C. arachidicola*, *P. piricola* ve *C. cucumerinum*'a karşı % 70-% 100 inhibisyon oranı ile iyi fungisidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (173).

Gibson ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada *V. rossicum* ve *V. nigrum* türlerinin kök, yaprak ve tohumlarından elde edilen (-)-antofin'in *E. coli*, *B. cereus* ve *B. subtilis* bakteri suşları ve *C. acutatum*, *F. graminearum*, *B. bassiana* ve *M. anisopliae* fungal suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesine bakılmış ve (-)-

antofin'in antifungal aktivitesi 10µg ve 100µg konsantrasyonlarda gözlenirken; antibakteriyel aktivitesi ise sadece en yüksek konsantrasyonda gözlenmiştir (66).

Literatürler antifungal aktivite açısından değerlendirildiğinde *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin antifungal aktiviteye sahip olduğunu ve bu türlerden elde edilen veya sentez çalışmaları sonucu elde edilen fenantroindolizidin alkaloitlerinin de test edilmesi ile bu etkinin özellikle fenantroindolizidin alkaloitlerinden kaynaklandığı düşüncesi desteklenmiştir. Çalışılan türlerin LC/MS/MS analizleri sonucunda diklorometan ve metanol:diklorometan (1:1) ekstralarında seçici antifungal aktiviteli oldukları bilinen fenantroindolizidin alkaloitlerinin bulunduğu saptanması ve ayrıca alkaloit taşımadığı belirlenen metanol ekstralarında düşük etkinin tespit edilmesi türlerde görülen antifungal aktivitenin bu bileşiklerden kaynaklandığı düşüncesini desteklemiş ve elde edilen bulgular literatür bilgileri ile de paralellik göstermiştir. Çalışmada türlerin tamamının test edildikleri *A. fumigatus*'a karşı anti fungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. En düşük etkinin alkaloit taşımadığı belirlenen metanol ekstralarında görülmesi etkiden sorumlu ana bileşiklerin alkaloitler olduğu fikrini desteklemekle birlikte çalışılan türlerde alkaloitler dışında farklı başka bileşiklerinde antifungal aktiviteden sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yaklaşık 130 cinsi ve 2000 türü içeren *Asclepiadaceae* familyası Anadolu'da 6 cins ve 13 kadar tür ile temsil edilmektedir. *Vincetoxicum* cinsi bu familyanın Anadolu'da yetişen en zengin taksonudur. Türkiye'de yetişen *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin henüz araştırılmamış olması bu türlerin ilgi çekici hale getirmektedir.

Literatür incelendiğinde *Vincetoxicum* türlerinin bazı glikozitler ve alkaloidler başta olmak üzere, β -sitosteroller, triterpenler, flavonoidler, saponozit ve diğer fenolik bileşikler gibi sekonder metabolitleri taşıdığı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda *Vincetoxicum* türlerinin *Tylophora*, *Pergularia* ve *Cynanchum* cinslerini de içerisine alan *Asclepiadaceae* familyası bitkilerinden izole edilmiş ve bu bitkilere karakteristik bileşikler olan fenantroindolizidin alkaloidleri taşıdıkları belirlenmiştir. *Vincetoxicum* türleri üzerinde yapılmış biyoaktivite çalışmalarında ise özellikle antitümör, insekt-antifeedant, antifungal etki üzerinde durulmuştur. Fenantroindolizidin alkaloidlerinin ise özellikle antiinflamatuvar, antiviral, antifungal, antibakteriyal, antiamebik, sitotoksik ve antitümör etkilerine odaklanılmıştır. Yapılan fitokimyasal çalışmalar ise daha çok alkaloidler üzerine özellikle fenantroindolizidin alkaloidleri üzerine yoğunlaşmıştır. Fenantroindolizidin alkaloidlerinin izolasyon çalışmaları sonucu çok az miktarlarda elde edilmeleri doğal kaynak olarak az bulduklarını göstermiş olup; son dönemde preparatif YBSK, LC/MS/MS ve NMR teknikleri kullanılarak yapılarının belirlenmesi ve elde edilmeleri yoluna gidilmiştir. En çok çalışılan türleri *V. hirundinaria*, *V. nigrum* ve *V. rossicum* türleri olarak görülmekte olup bu türlerde veya bu türlerden elde edilen fenantroindolizidin alkaloidleri model alınarak sentezlenen daha etkili türevlerinin insekt-antifeedant, antitümör, sitotoksik, antiviral ve antifungal aktivitelerinin çalışıldığı göze çarpmaktadır. Bu çalışmada araştırma için seçilen *V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata* (endemik), *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* (endemik) ve *V. parviflorum* (endemik) türlerinin fitokimyasal açıdan incelenmesi düşünülmüş ve son yıllarda insan sağlığında çeşitli yararları nedeniyle üzerinde durulan etken madde gruplarından biri olan fenantroindolizidin alkaloidlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Fenantroindolizidin alkaloidlerinin içerikleri; türlerin toprak üstü kısımlarından hazırlanan diklorometan ve metanol:diklorometan (1:1) ekstralarının alkaloid fraksiyonlarının LC/MS/MS analizleri ile belirlenmiş olup fraksiyonlarda sekoantofin, sekoantofin *N*-oksit ve antofin *N*-oksit olabileceği düşünülen üç fenantroindolizidin alkaloidi ana alkaloidler olarak saptanmıştır. Çalışılan türlerin halk arasında geleneksel olarak kullanımına ait herhangi bir kayda rastlanmadığından bu türlerin biyolojik aktivite açısından öncelikle diğer *Vincetoxicum* türlerinde sıklıkla gözlenmiş olan insekt-antifeedant ve antifungal aktiviteleri açısından incelenmesi düşünülmüş ilerdeki fitokimyasal araştırmalara da yarar sağlayabilmesi amacıyla türlerin toprak üstü kısımlarından farklı polaritelerde (diklorometan ve metanol:diklorometan (1:1), metanol ve etanol) ekstralar hazırlanmıştır.

Antifeedant aktivitede testlerinde *Spodoptera littoralis* ve *Leptinotarsa decemlineata* larvalarına karşı test edilen türlerin tamamının etkili olduğu görülmüş olup ekstralar arasında en düşük etki fenantroindolizidin alkaloid taşımayan metanol ekstralarında tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında ve özellikle son dönemlerde doğal ürünlerin kullanımına dayalı biyolojik olarak parçalanabilir, çevre dostu ve çevre için daha güvenli insektisitler üzerine ciddi şekilde odaklanıldığı düşünüldüğünde çalışılan türlerin antifeedant aktivite açısından değerlendirilebilir olduğu görülmektedir.

Bu ekstralara ait antifungal etki testlerinde ise türlerin tamamının *Aspergillus fumigatus*'a karşı dikkat çekici antifungal etki gösterdiği görülmüştür. Buna karşı ekstralar arasında metanollü ekstraların antifungal etki göstermediği belirlenmiştir. Çok az sayıda doğal antifungal ilacın bulunması ve tedavinin pahalı olması nedeniyle daha ucuz ve etkili mücadele için *A. fumigatus*'a karşı antifungal etkisi nedeniyle çalışılan türlerin değerlendirilebilir olacağı düşünülmektedir.

Tez konusu olarak seçilen türler üzerinde yapılan bu araştırma sonuçları bitkilerin antifeedant ve antifungal aktivite açısından değer taşıdığını göstermiştir. Ayrıca çalışılan türlerin fenantroindolizidin alkaloidlerini içerdiği belirlendiğinden ve bu bileşiklerin antitümör ve sitotoksik etkileri bilindiğinden türlerden elde edilen özellikle diklorometan ve metanol:diklorometan (1:1) ekstralarının bu aktiviteler açısından detaylı olarak incelenip aktivitelerin kimyasal birleşim ile ilişkilendirilmesinin uygun olacağı önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Heywood VH.** *Flowering Plants of the World*. London: Oxford University Press, **1979**: 225-226.
2. **Baytop A.** *Farmasötik Botanik*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi yayınları no: 3158, Eczacılık Fakültesi yayınları no: 36, **1983**: 277-278.
3. **Evans CW.** *Trease and Evans Pharmacognosy*. 5th Ed., W.B. Saunders Company Limited, **2002**: 32.
4. **Browicz K.** *Vincetoxicum* N.M. Wolf. In: Davis P.H., ed., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: University Press, **1978**: 6; 163-173.
5. **Tanker N, Koyuncu M, Çoşkun M.** *Farmasötik Botanik*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayınları no: 88, **2004**: 294.
6. **Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E.** *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*. 5. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **1998**: 283-284.
7. **Stærk D, Nezhad KB, Asili J, Emami SA, Ahi A, Sairafianpour M, Jaroszewski JW.** Phenanthroindolizidine alkaloids from *Vincetoxicum pumilum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2005**; 33: 957-960.
8. **Yamashiro T, Fukuda T, Yokoyama J, Maki M.** Molecular phylogeny of *Vincetoxicum* (*Apocynaceae-Asclepiadoideae*) based on the nucleotide sequences of cp DNA and nrDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **2004**; 31: 689-700.
9. **Liede S.,** *Cynanchum-Rhodostegiella-Vincetoxicum-Tylophora* (*Asclepiadaceae*): new considerations on an old problem. *Taxon*, **1996**; 45: 193-211.
10. **Leimu R.** Variation in the Mating System of *Vincetoxicum hirundinaria* (*Asclepiadaceae*) in Peripheral Island Population. *Annals of Botany*, **2004**; 93: 107-113.
11. **Morisawa T.** Weed Notes: *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench. The Nature Conservancy Wildland Weeds Management and Research, Erişim: <http://tncweeds.ucdavis.edu>, 1999. Erişim tarihi: 2011.
12. **Tewksbury L, Casagrande R, Gassmann A.** Section III: Weeds of Prairies and Grasslands-Swallow worts. In: Van Driesche R, Lyon S, Blossey B, Hoddle M, Reardon R. *Biological Control of Invasive Plants in the Eastern United States*, FHTET-2002-04 Ed. Morgantown: United States Department of Agriculture Forest Service Publication, **2002**: 209-216.

13. **Cappuccino N.** Allee effect in an invasive alien plant, pale swallow-wort *Vincetoxicum rossicum* (Asclepiadaceae). *Oikos*, **2004**; 106:3-8.

14. **DiTommaso A, Lawlor FM, Darbyshire SJ.** The biology of invasive alien plants in Canada 2. *Cynanchum rossicum* (Kleopow) Borhidi [= *Vincetoxicum rossicum* (Kleopow) Barbar.] and *Cynanchum louseae* (L.) Kartesz&Gandhi [= *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench]. *Canadian Journal of Plant Science*, **2004**; 85: 243- 263.

15. **Averill KM, DiTommaso A, Mohler CL, Milbrath LR.** Establishment of the invasive perennial *Vincetoxicum rossicum* across a disturbance gradient in New York State, USA. *Plant Ecol*, **2010**; 211: 65-77.

16. **Weed AS, Casagrande RA.** Biology and larval feeding impact of *Hypena opulenta* (Christoph) (Lepidoptera: Noctuidae): a potential biological control agent for *Vincetoxicum nigrum* and *V. rossicum*. *Biological Control*, **2010**; 53: 214-222.

17. **Leimu R, Riipi M, Staerk D.** Food preference and performance of the larvae of a specialist herbivore: variation among and within host-plant populations. *Acta Oecologica*, **2005**; 28: 325-330.

18. **Lavault M, Richomme P, Bruneton J.** Acetophenones and new pregnane glycosides from the roots of *Vincetoxicum hirundinaria*. *Fitoterapia*, **1999**; 70: 216-220.

19. **Soejarto DD, Bingel AS, Slaytor M, Farnsworth NR.** Fertility regulating agents from plants. *Bulletin of the World Health Organization*, **1978**; 56 (3): 343-352.

20. **Sheeley SE, Raynal DJ.** The distribution and status of species of *Vincetoxicum* in eastern North America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, **1996**; 123(2): 148-156.

21. **Weed AS, Gassmann A, Casagrande RA.** Effects of leaf and root herbivory by potential insect biological control agents on the performance of invasive *Vincetoxicum spp.*. *Biological Control*, **2011**; 56: 50-58.

22. **Blanchard ML, Barney JN, Averill KM, Mohler CL, DiTommaso A.** Does polyembryony confer a competitive advantage to the invasive perennial vine *Vincetoxicum rossicum* (Apocynaceae)?. *American Journal of Botany*, **2010**; 97(2): 251–260.

23. **Hotchkiss EE, DiTommaso A, Brainard DC, Mohler CL.** Survival and performance of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* (Apocynaceae) from seeds of different embryo number under two light environments. *American Journal of Botany*, **2008**; 95(4): 447-453.

24. **Mogg C, Petit P, Cappuccino N, Durst T, McKague C, Foster M, Yack JE, Arnason JT, Smith ML.** Test of the antibiotic properties of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* against bacteria, fungi and insects. *Biochemical systematics and ecology*, **2008**; 36: 383-391.

25. Yamashiro T, Yamashiro A, Yokoyama J, Maki M. Morphological aspects and phylogenetic analyses of pollination systems in the *Tylophora–Vincetoxicum* complex (Apocynaceae-Asclepiadoideae) in Japan. *Biological Journal of the Linnean Society*, **2008**; 93: 325–341.
26. Nowak R, Kisiel W. Hancokinol from *Vincetoxicum officinale*. *Fitoterapia*, **2000**; 71: 584-586.
27. Weston LA, Barney JN, DiTommaso A. A review of the biology and ecology of three invasive perennials in New York State: Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*), mugwort (*Artemisia vulgaris*) and pale swallow-wort (*Vincetoxicum rossicum*). *Plant and Soil*, **2005**; 277: 53-69.
28. Pavela R. Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. *Industrial Crops and Products*, **2010**; 32: 213-219.
29. Coassin-Lokar L, Poldini L. Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia Region (North East Italy). *Journul of Ethnopharmacology*, **1988**; 22: 231- 278.
30. Mansoor A, Ibrahim MA, Zaidi MA, Ahmed M. Antiprotozoal activities of *Vincetoxicum stocksii* and *Carum copticum*. *Bangladesh J Pharmacol*, **2011**; 6: 51-54.
31. Zaidi MA, Crow Jr S.A. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**; 96: 331-334.
32. Staerk D, Christensen J, Lemmich E, Duus J, Olsen CE, Jarszewski JW. Cytotoxic Activity of Some Phenanthroindolizidine *N*-Oxide Alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*. *J. Nat. Prod*, **2000**; 63: 1584-1586.
33. Baytop T. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. İlaveli 2. Baskı, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitap Evleri, **1984**: 372.
34. Leimu R, Lehtila K. Effects of two types of herbivores on the population dynamics of a perennial herb. *Basic and Applied Ecology*, **2006**; 7: 224-235.
35. Muola A, Mutikainen P, Laukkanen L, Lilley M, Leimu R. Genetic variation in herbivore resistance and tolerance: the role of plant life-history stage and type of damage. *European Society for Evolutionary Biology*. **2010**;23:2185-2196.
36. Laukkanen L, Leimu R, Muola A, Lilley M, Salminen JP, Mutikainen P. Plant chemistry and local adaptation of a specialized folivore. *Plos one*, **2012**; 7(5): 1-8.
37. Lavault M, Richomme P, Bruneton J. New phenantroindolizidine *N*-oxides alkaloids isolated from *Vincetoxicum hirundinaria* Medic.. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, **1994**; 68: 225-227.
38. Tuzlacı E, Doğan A. Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharmaceutical Journal*, **2010**; 14: 136-143.

39. **Altundag E, Ozturk M.** Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Social and Behavioral Sciences*, **2011**; 19: 756-777.
40. **Shah AJ, Zaidi MA, Sajjad H, Gilani HAH.** Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Vincetoxicum stocksii* are mediated through calcium channel blockade. *Bangladesh J. Pharmacol.*, **2011**; 6: 46-50.
41. **Min HY, Song SH, Lee B, Kim S, Lee SK.** Inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by antofine and its analogues in RAW 264.7 macrophage cells. *Chemistry & Biodiversity*, **2010**; 7: 409-414.
42. **Wang K, Su B, Wang Z, Wu M, Li Z, Hu Y, Fan Z, Mi N, Wang Q.** Synthesis and Antiviral Activities of phenanthroindolizidine alkaloids and their derivatives. *J. Agric. Food Chem*, **2010**; 58: 2703-2709.
43. **Ikeda T, Yaegashi T, Matsuzaki T, Hashimoto S, Sawada S.** Asymmetric synthesis of phenanthroindolizidine alkaloids with hydroxyl group at the C14 position and evaluation of their antitumor activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2011**; 21: 342-345.
44. **Lv H, Ren J, Ma S, Xu S, Qu J, Liu Z, Zhou Q, Chen X, Yu S.** Synthesis, Biological Evaluation and Mechanism Studies of Deoxytylophorinine and Its Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Plos one*, **2012**; 7(1): e30342. doi:10.1371/journal.pone.0030342.
45. **Staerk D, Lykkeberg AL, Christensen J, Budnik BA, Abe F, Jaroszewski JW.** In Vitro Cytotoxic Activity of Phenanthroindolizidine Alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Cancer Cells. *J. Nat. Prod*, **2002**; 65: 1299-1302.
46. **Wei L, Brossi A, Kendal R, Bastow KF, Morris-Natschke SL, Shi Q, Lee KH.** Antitumor agents 251: Synthesis, cytotoxic evaluation, and structure-activity relationship studies of phenanthrene-based tylophorine derivatives (PBTs) as a new class of antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**; 1: 6560-6569.
47. **Ueda J, Takagi M, Shin-ya K.** Aminocaprophenone- and pyrrolidine- type alkaloids from the leaves of *Ficus septica*. *J. Nat. Prod*, **2009**; 72: 2181-2183.
48. **Pearson WH, Walavalkar R.** Synthesis of (\pm)-tylophorine by the intramolecular cycloaddition of an azide with an ω -chloroalkene. *Tetrahedron*, **1994**; 50(43): 12293-12304.
49. **Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD, Newman RA.** *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**; 119: 195-213.
50. **Xi Z, Zhang R, Yu Z, Ouyang D, Huang R.** Selective interaction between tylophorine B and bulged DNA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2005**; 15: 2673-2677.

51. Yang CW, Chen WL, Wu PL, Tseng HY, Lee SJ. Anti-inflammatory Mechanisms of Phenanthroindolizidine Alkaloids. *Molecular Pharmacology*, **2006**; 69: 749-758.
52. Kim S, Lee YM, Lee J, Lee T, Fu Y, Song Y, Cho J, Kim D. Expedient syntheses of antofine and cryptopleurine via intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Org. Chem.*, **2007**; 72(13): 4886-4891.
53. Rao KN, Bhattacharya RK, Venkatachalam SR. Inhibition of thymidylate synthase and cell growth by the phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine. *Chem. Biol. Interact.*, **1997**; 106: 201-212.
54. Liu ZJ, Lv HN, Li HY, Zhang Y, Zhang HJ, Su FQ, Si YK, Yu SS, Chen XG. Anticancer effect and neurotoxicity of S-(1)-deoxytylophorinidine, a new phenanthroindolizidine alkaloid that interacts with nucleic acids. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2011**; 13(5): 400-408.
55. Lebrun S, Couture A, Deniau E, Grandclaude P. Total synthesis of (±)-antofine and (±)-deoxypergularinine. *Tetrahedron*, **1999**; 55: 2659-2670.
56. Gao W, Bussom S, Grill SP, Gullen EA, Hu YC, Huang X, Zhong S, Kaczmarek C, Gutierrez J, Francis S, Baker DC, Yu S, Cheng YC. Structure-activity studies of phenanthroindolizidine alkaloids as potential antitumor agents. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **2007**; 17: 4338-4342.
57. Ambrosini LM, Cernak TA, Lambert TH. Total synthesis of the tylophora alkaloids rusplinone, 13α-secoantofine, and antofine using a multicatalytic oxidative aminochlorocarbonylation/Friedel-Crafts reaction. *Tetrahedron*, **2010**; 66: 4882-4887.
58. Venkatachalam SR, Badheka LP, Mulchandani NB. Synthesis of a fluoro seko phenanthroindolizidine analogue. *Journal of Fluorine Chemistry*, **1989**; 44: 155-159.
59. Yang CW, Lee YZ, Kang IJ, Barnard DL, Jan TJ, Lin D, Huang CW, Yeh TK, Chao YS, Lee SJ. Identification of phenanthroindolizidines and porcine enteropathogenic coronavirus transmissible gastroenteritis virus and human severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Antiviral Research*, **2010**; 88: 160-168.
60. Ganguly T, Khar A. Induction of apoptosis in a human erythroleukemic cell line K562 by tylophora alkaloids involves release of cytochrome c and activation of caspase 3. *Phytomedicine*, **2002**; 9: 288-295.
61. Yamashita S, Kurono N, Senboku H, Tokuda M, Orito K. Synthesis of phenanthro[9,10-b]indolizidin-9-ones, phenanthro[9,10-b]quinolizidin-9-one, and related benzolactams by Pd(OAc)₂-catalyzed direct aromatic carbonylation. *Eur. J. Org. Chem*, **2009**; 1173-1180.
62. Yang CW, Chuang TH, Wu PL, Huang WH, Lee SJ. Anti-inflammatory effects of 7-methoxycryptopleurine and structure-activity relations of phenanthroindolizidines and phenanthroquinolizidines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2007**; 354:

942-948.

63. **Cui M, Song H, Feng A, Wang Z, Wang Q.** Asymmetric synthesis of (*R*)-antofin and (*R*)-cryptopleurine via proline-catalyzed sequential α -aminooxylation and Horner-Wadsworth-Emmons olefination of aldehyde. *J. Org. Chem.*, **2010**; 75: 7018-7021.
64. **Fu Y, Lee SK, Min HY, Lee T, Lee J, Cheng M, Kim S.** Synthesis and structure-activity studies of antofine analogues as potential anticancer agents. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **2007**; 17: 97-100.
65. **Su CR, Damu AG, Chiang PC, Bastow KF, Morris-Natschke SL, Lee KH, Wu TS.** Total synthesis of phenanthroindolidine alkaloids (\pm)-antofine, (\pm)-deoxypergularinine, and their dehydro congeners and evaluation of their cytotoxic activity. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, **2008**; 16: 6233-6241.
66. **Gibson DM, Krasnoff SB, Biazzo J, Milbrath L.** Phytotoxicity of Antofine from invasive Swallow-Worts. *J. Chem. Ecol.*, **2011**; 37: 871-879.
67. **Rao KN, Bhattacharya RK, Venkatachalam SR.** Thymidylate synthase activity in leukocytes from patients with chronic myelocytic leukemia and acute lymphocytic leukemia and its inhibition by phenanthroindolizidine alkaloids pergularinine and tylophorinidine. *Cancer Letters*, **1998**; 128: 183-188.
68. **Chemler SR.** Phenanthroindolizidines and Phenanthroquinolizidines: Promising alkaloids for anti-cancer therapy. *Curr Bioact Compd.* **2009**; 5(1): 2-19.
69. **Liao SY, Chen JC, Qian L, Shen Y, Zheng KC.** QSAR studies and molecular design of phenanthrene-based tylophorine derivatives with anticancer activity. *QSAR Comb. Sci.*, **2008**; 27(3): 280-288.
70. **Fürstner A, Kennedy JWJ.** Total syntheses of the tylophora alkaloids cryptopleurine, (-)-antofine, (-)-tylophorine, and (-)-ficuseptine C. *Chem. Eur. J.*, **2006**; 12: 7398-7410.
71. **Gao W, Lam W, Zhong S, Kaczmarek C, Baker DC, Cheng YC.** Novel mode of action of Tylophorine analogs as antitumor compounds. *Cancer Research*, **2004**; 64: 678-688.
72. **Li S, Han L, Liu J, Hu Y, Zheng D, Fu Y, Huang X.** Synthesis of seco-chlorinated derivatives of phenanthroindolizidine precursors via Friedel-Crafts Reaction. *Molecules*, **2010**; 15: 8501-8506.
73. **Wang KL, Lü MY, Wang QM, Huang RQ.** Iron (III) chloride-based mild syntheses of phenanthrene and its application to total synthesis of phenanthroindolizidine alkaloids. *Tetrahedron*, **2008**; 64: 7504-7510.
74. **Iida H, Watanabe M, Tanaka M, Kibayashi C.** General synthesis of phenanthroindolizidine, phenanthroquinolizidine, and related alkaloids: preparation of (\pm)-tylophorine, (\pm)-

cryptopleurine, (±)-septicine, and (±)-julandine. *J. Org. Chem.*, **1984**; 49(13): 2412-2418.

75. **Gao W, Chen APC, Leung CH, Gullen ea, Fürstner A, Shi Q, Wei L, Lee KH, Cheng YC.** Structural analogs of tylophora alkaloids may not be functional analogs. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **2008**; 18: 704-709.
76. **Kathuria V, Kaushik N.** Feeding inhibisyon of *Helicoverpa armigera* (Hübner) by *Eucalyptus camaldulensis* and *Tylophora indica* extracts. *Insect. Sci.*, **2005**; 12: 249-254.
77. **Verma, GS, Ramakrishnan V, Mulchandani NB, Chadha MS.** Insect feeding deterrents from the medicinal plant *Tylophora asthmatica*. *Entomol. Exp. Appl.*, **1986**; 40: 99-101.
78. **An TY, Huang RQ, Yang Z, Zhang DK, Li GR, Yao YC, Gao J.** Alkaloids from *Cynachum komarovii* with inhibitory activity against the tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, **2001**; 58: 1267-1269.
79. **Baumgartner B, Erdelmeier CAJ, Wright AD, Rali T, Sticher O.** An antimicrobial alkaloid from *Ficus septica*. *Phytochemistry*, **1990**; 29: 3327-3330.
80. **Wei L, Shi Q, Bastow KF, Bossi A, Morris-Natschke SL, Nakagawa-Goto K, Wu TS, Pan SL, Teng CM, Lee KH.** Antitumor Agents 253. Desing, Synthesis, and Antitumor Evaluation of Noval 9-Substituted Phenanthrene-Based Tylophorin Derivatives as Potential Anticancer Agents, *J. Med. Chem*, **2007**; 50: 3674-3680.
81. **Wang K, Hu Y, Wu M, Li Z, Liu Z, Su B, Yu A, Liu Y, Wang Q.** *m*-CPBA/TFA: an efficient nonmetallic reagent for oxidative coupling of 1,2-diarylethylenes. *Tetrahedron*, **2010**; 66: 9135-9140.
82. **Ciufolini MA, Roschangar F.** A unified strategy fort he synthesis of phenanthroizidine alkaloids: preparation of sterically congested pyridines. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**; 118: 12082-12089.
83. **Paulo A, Houghton PJ.** Chemotaxonomic analysis of the genus *Cryptolepis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**; 31: 155-166.
84. **Wang K, Wang W, Wang Q, Huang R.** Efficient synthesis of aza-phenanthroindolizidine and aza-phenanthroquinolizidine and anticancer activities. *Letters in Organic Chemistry*, **2008**; 5(5): 383-390.
85. **Buckley TF, Rapoport H.** α -amino acids as chiral educts for asymmetric products. Chirally specific syntheses of tylophorine and cryptopleurine. *J. Org. Chem.*, **1983**; 48: 4222-4232.
86. **Rossiter LM, Slater ML, Giessert RE, Sakwa SA, Herr RJ.** A concise palladium-catalyzed carboamination route to (±)-tylophorine. *J. Org.Chem.*, **2009**; 74: 9554-9557.

87. Wang Z, Li Z, Wang K, Wang Q. Efficient and chirally specific synthesis of phenanthroindolizidine alkaloids by parham-type cycloacylation. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**; 292-299.
88. Camacho-Davila A, Herndon JW. Total synthesis of antofin using the net [5+5]-cycloaddition of γ,δ -unsaturated carbene complexes and 2-alkynylphenyl ketones as a key step. *J. Org. Chem.*, **2006**; 71: 6682-6685.
89. Capo M, Saa JM. (-)- Antofine: A Phenanthroindolizidine from *Vincetoxicum nigrum*. *Journal of Natural Products*, **1989**; 52(2): 389-390.
90. Eibler E, Tanner U, Mayer K, Wiegrebe W, Reger H. HPLC-analysis of alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*. *Acta Pharmaceutica*, **1995**; 45(3): 487-493.
91. Michael JP. Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2002**; 19: 719-741.
92. Gellert E, Govindachari TR, Lakshmikantham MV, Ragade IS, Rudzats R, Viswanathan N. The alkaloids of *Tylophora crebriflora*: Structure and Synthesis of Tylocrebrine, a new phenanthroindolizidine Alkaloid. *J. Chem. Soc.*, **1962**; 1008-1014.
93. Gellert E, Rudzats R. The antileukemia activity of tylocrebrine. *Notes*, **1964**; 7: 361-362.
94. Mulchandani NB, Venkatachalam SR. Alkaloids of *Pergularia pallida*. *Phytochemistry*, **1976**; 15:1561-1563.
95. Mulchandani NB, Venkatachalam SR. Tylophorinicine, a phenanthroindolizidine alkaloid from *Tylophora asthmatica* and *Pergularia pallida*. *Phytochemistry*, **1984**; 23(5): 1206.
96. Bhutani KK, Ali M, Atal CK. Alkaloids from *Tylophora hirsuta*. *Phytochemistry*, **1984**; 23(8): 1765-1769.
97. Bhutani KK, Ali M, Atal CK. 13a-Hydroxytylophorine from *Tylophora hirsuta*. *Phytochemistry*, **1985**; 24(11): 2778-2780.
98. Ali M, Bhutani KK. Minor alkaloids of *Tylophora hirsuta*. *Phytochemistry*, **1987**; 26(7): 2089-2092.
99. Bhutani KK, Sharma GL, Ali M. Plant based antiamebic drugs; Part I. Antiamebic activity of phenanthroindolizidine alkaloids; common structural determinants of activity with emetine. *Planta Med.*, **1987**; 53(6): 532-536.
100. Ali M, Bhutani KK. Alkaloids from *Tylophora indica*. *Phytochemistry*, **1989**; 28(12): 3513-3517.

101. Ali M, Ansari SH, Qadry JS. Rare phenanthroindolizidine alkaloids and a substituted phenanthrene, tyloindane, from *Tylophora indica*. *Journal of Natural Products*, **1991**; 54(5): 1271-1278.
102. Abe F, Iwase Y, Yamauchi T, Honda K, Hayashi N. Phenanthroindolizidine alkaloids from *Tylophora tanakae*. *Phytochemistry*, **1995**; 39(3): 695-699.
103. Abe F, Hirokawa M, Yamauchi T, Honda K, Hayashi N, Ishii M, Imagawa S, Iwahana M. Further investigation of phenanthroindolizidine alkaloids from *Tylophora tanakae*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1998**; 46(5):767-769.
104. Michael JP. Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**; 16: 675-696.
105. Komatsu H, Watanabe M, Ohyama M, Enya T, Koyama K, Kanazawa T, Kawahara N, Sugimura T, Wakabayashi K. Phenanthroindolizidine alkaloids as cytotoxic substances in a Danaid butterfly, *Ideopsis similis*, against human cancer cells. *J. Med. Chem.*, **2001**; 44: 1833-1836.
106. Abe F, Yamauchi T, Honda K, Omura H, Hayashi N. Sequestration of phenanthroindolizidine alkaloids by an Asclepiadaceae-feeding danaid butterfly, *Ideopsis similis*. *Phytochemistry*, **2001**; 56: 697-701.
107. Ganguly T, Sainis KB. Inhibition of cellular immune responses by *Tylophora indica* in experimental models. *Phytomedicine*, **2001**; 8(5): 348-355.
108. Xiang Y, Abliz Z, Li L, Huang X, Yu S. Study of structural characteristic features of phenanthroindolizidine alkaloids by fast atom bombardment with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**; 16: 1668-1674.
109. Wu PL, Rao KV, Su CH, Kuoh CS, Wu TS. Phenanthroindolizidine alkaloids and their cytotoxicity from the leaves of *Ficus septica*. *Heterocycles*, **2002**; 57(12): 2401-2408.
110. Huang XS, Yu SS, Liang XT. Two phenanthroindolizidine alkaloids from *Tylophora atrofoliculata*. *Chin. Chem. Lett.*, **2002**; 13(1): 61-64.
111. Michael JP. Indolizidine and quinolizidine alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, **2005**; 22: 603-626.
112. Damu AG, Kuo PC, Shi LS, Li CY, Su CR, Wu TS. Cytotoxic phenanthroindolizidine alkaloids from the roots of *Ficus septica*. *Planta Med.*, **2009**; 75(10): 1152-1156.
113. Min HY, Chung HJ, Kim EH, Kim S, Park EJ, Lee SK. Inhibition of cell growth and potentiation of tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced apoptosis by a phenanthroindolizidine alkaloid antofine in human colon cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, **2010**; 80: 1356-1364.

114. Wei L, Brossi A, Morris-Natschke SL, Bastow KF, Lee KH. Antitumor agents 248. chemistry and antitumor activity of tylophorine-related alkaloids. *Natural Products Chemistry*, **2008**; 34: 3-34.
115. Wiegrebe W, Budzikiewicz H, Faber L. Alkaloide aus *Cynanchum vincetoxicum* (L.) Pers. 3. Mitt.. *Archiv der Pharmazie*, **1970**; 303(12): 1009-1012.
116. Stöckel K, Stöcklin W, Reichstein T. Die Glykoside von *Vincetoxicum hirundinaria* MEDIKUS. 1. Mitteilung: Isolierungen und Spaltprodukte. Glykoside und Aglykone, 316. Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta*, **1969**; 52(5): 1175-1202.
117. Mitsuhashi H, Sakurai K, Nomura T, Kawahara N. Constituents of Asclepiadaceae plants. XVII. Components of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. *Chem. Pharm. Bull.*, **1966**; 14(7): 712-717.
118. Nakagawa T, Hayashi K, Mitsuhashi H. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LIII. The structures of glaucogenin-A, -B, and -C Mono-D-thevetoside from the Chinese drug "Pai-ch'ien" *Cynanchum glaucescens* Hand-Mazz. *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**; 31(3): 870-878.
119. Zhang ZX, Zhou J, Hayashi K, Mitsuhashi H. Studies on the constituents of Asclepiadaceae plants. LVIII. The structures of five glycosides, cynatratoside-A, -B, -C, -D and -E, from the Chinese drug "Pai-wei" *Cynanchum atratum* BUNGE. *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**; 33(4): 1507-1514.
120. Wang L, Lu Y, Zhao Y, Zhou J, Zheng Q. Three new C₂₁-steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum inamoenum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2007**; 9(8): 771-779.
121. Bai H, Li W, Satou T, Wang Y, Koike K. Twelve pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*. *Steroids*, **2009**; 74: 198-207.
122. Xiang WJ, Ma L, Hu LH. C₂₁ Steroidal Glycosides from *Cynanchum wilfordii*. *Helvetica Chimica Acta*, **2009**; 92: 2659-2674.
123. Teng H, Lu Y, Li J, Yang ZG, Mei ZN. Two new steroidal glycosides from the root of *Cynanchum auriculatum*. *Chinese Chemical Letters*, **2011**; 22: 77-80.
124. Mitsuhashi H, Hayashi K, Sawada H. Steroids of *Cynanchum grandifolium* var. *nikoense*. *Phytochemistry*, **1970**; 9: 2403-2405.
125. Zhang Z, Zhou J, Hayashi K, Kaneko K. Atratosides A, B, C and D, steroid glycosides from the root of *Cynanchum atratum*. *Phytochemistry*, **1988**; 27(9): 2935-2941.
126. Li J, Kadota S, Kawata Y, Hattori M, Xu GJ, Namba T. Constituents of the roots of *Cynanchum bungei* DECNE. Isolation and structures of four new glucosides, bungeiside-A, -B, -C, and -D. *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**; 40(12): 3133-3137.

127. Lou H, Li X, Onda M, Konda Y, Machida T, Toda Y, Harigaya M. Further isolation of glycosides from *Cynanchum hancockianum*. *Journal of Natural Products*, **1993**; 56(9): 1437-1443.
128. Abe F, Yamauchi T, Honda K, Hayashi N. Conduritol F glucosides and terpenoid glucosides from *Cynanchum liukuense* and distribution of conduritol F glucosides in several Asclepiadaceae plants. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**; 48(7): 1090-1092.
129. Zhao Y, Fan Q, Xu G, Feng Z, Hao X. Isolation and structural study on carbohydrates from *Cynanchum otophyllum* and *Cynanchum paniculatum*. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2008**; 27: 401-410.
130. Ma XX, Wang D, Zhang YJ, Yang CR. Identification of new qingyangshengenin and caudation glycosides from the roots of *Cynanchum otophyllum*. *Steroids*, **2011**; 76: 1003-1009.
131. Lin YL, Lin TC. Five new pregnane glycosides from *Cynanchum taiwanianum*. *Journal of Natural Product*, **1995**; 58(8): 1167-1173.
132. Abe F, Hirokawa M, Yamauchi T, Honda K, Hayashi N, Nishida R. Glycosides of 14,15-seco- and 13,14:14,15-disecopregnanes from the roots of *Tylophora tanakae*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1999**; 47(10): 1384-1387.
133. Li SL, Tan H, Shen YM, Kawazoe K, Hao XJ. A pair of new C-21 steroidal glycoside epimers from the roots of *Cynanchum paniculatum*. *J. Nat. Prod.*, **2004**; 67: 82-84.
134. Wang L, Shen Y, Xu X, Wei Y, Zhou J. Five new C₂₁ steroidal glycosides from *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski. *Steroids*, **2004**; 69: 319-324.
135. Bai H, Li W, Koike K, Satou T, Chen Y, Nikaido T. Cynanosides A-J, ten novel pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*. *Tetrahedron*, **2005**; 61: 5797-5811.
136. Li X, Sun H, Ye Y, Chen F, Pan Y. C-21 steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum chekiangense* and their immunosuppressive activities. *Steroids*, **2006**; 71: 61-66.
137. Liu Y, Hu Y, Yu S, Fu G, Huang X, Fan L. Steroidal glycosides from *Cynanchum forrestii* Schlechter. *Steroids*, **2006**; 71: 67-76.
138. Warashina T, Noro T. Glycosides of 14, 15-Seco and 13,14: 14,15-Disecopregnanes from the roots of *Cynanchum sublancoletum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**; 54(11): 1551-1560.
139. Tai Y, Cao X, Li X, Pan Y. Identification of C-21 steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum chekiangense* by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2006**; 572: 230-236.

140. **Zheng Z, Zhang W, Kong L, Liang M, Li H, Lin M, Liu R, Zhang C.** Rapid identification of C₂₁ steroidal saponins in *Cynanchum versicolor* Bunge by electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry*, **2007**; 21: 279-285.
141. **Chen H, Xu N, Zhou Y, Qiao L, Cao J, Yao Y, Hua H, Pei Y.** Steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum amplexicaule* Sieb. Et Zucc. *Steroids*, **2008**; 73: 629-636.
142. **Gan H, Xiang WJ, Ma L, Hu LH.** Six new C₂₁ steroidal glycosides from *Cynanchum bungei* DECNE. *Helvetica Chimica Acta*, **2008**; 91: 2222-2234.
143. **Bai H, Li W, Koike K.** Pregnane glycosides from *Cynanchum atratum*. *Steroids*, **2008**; 73: 96-103.
144. **Huang X, Tan AM, Yang SB, Zhang AY, Zhang H.** Two new C₂₁ steroidal glycosides from the stems of *Cynanchum paniculatum* KITAG. *Helvetica Chimica Acta*, **2009**; 92: 937-943.
145. **Gu XJ, Yao N, Qian SH, Li YB, Li P.** Four new C₂₁ steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum auriculatum*. *Helvetica Chimica Acta*, **2009**; 92: 88-97.
146. **Chen G, Xu N, Li ZF, Zhang QH, Wu HH, Pei YH.** Steroidal glycosides with anti-tumor activity from the roots of *Cynanchum wallichii* Wight. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2010**; 12(6): 453-457.
147. **Chen G, Chen H, Li W, Pei YH.** Steroidal glycosides from *Cynanchum amplexicaule*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2011**; 13(8): 756-760.
148. **Lu Y, Xiong H, Teng HL, Yang GZ, Mei ZN.** Three new steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum auriculatum*. *Helvetica Chimica Acta*, **2011**; 94: 1296-1303.
149. **Lu Y, Teng HL, Yang GZ, Mei ZN.** Three new steroidal glycosides from the roots of *Cynanchum auriculatum*. *Molecules*, **2011**; 16: 1901-1909.
150. **Shi LM, Liu WH, Yu Q, Wan HT.** Two new C₂₁ steroids from the roots of *Cynanchum otophyllum*. *Journal of Chemical research*, **2011**; 126-128.
151. **Yang QX, Ge YC, Huang XH, Sun QY.** Cynanauriculoside C-E, three new antidepressant pregnane glycosides from *Cynanchum auriculatum*. *Phytochemistry Letters*, **2011**; 4: 170-175.
152. **Shibano M, Misaka A, Sugiyama K, Taniguchi M, Baba K.** Two secopregnane-type steroidal glycosides from *Cynanchum stauntonii* (Decne.) Schltr. Ex Levl.. *Phytochemistry Letters*, **2012**; 5: 304-308.
153. **Huang XS, Yu SS, Liang XT, Li N.** A novel steroid from *Tylophora atrofoliculata* Metc.. *Journal of Asian Natural Products Research*, **2002**; 4(3): 197-200.

- 154. Jurgens A, Dötterl S, Liede-Schumann S, Meve U.** Chemical diversity of floral volatiles in Asclepiadoideae-Asclepiadeae (Apocynaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **2009**; 36: 842-852.
- 155. Fehlhaber HW, Snatzke G, Toth L, Haznagy A, Makay ZS.** Spektroskopische identifizierung von C/6 und C/7 in *Cynanchum vincetoxicum*. *Planta Med.*, **1969**; 17(1): 40-41.
- 156. Toth L, Haznagy A, Makay ZS.** Beitrag zu den untersuchungen der inhaltsstoffe von *Cynanchum vincetoxicum* VI. *Planta Med.*, **1969**; 17(1): 35-39.
- 157. Konda Y, Urano M, Harigaya Y, Takayanagi H, Ogura H, Li X, Lou H, Onda M.** Novel triterpenes, Hancolupenon and Hancolupenol, from *Cynanchum hancokianum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**; 38(10): 2899-2901.
- 158. Douglass CH, Weston LA, Wolfe D.** Phytotoxicity and potential allelopathy in Pale (*Cynanchum rossicum*) and Black swallowwort (*C. nigrum*). *Invasive Plant Science and Management*, **2011**; 4: 133-141.
- 159. Zhang X, Shan L, Huang H, Yang X, Liang X, Xing A, Huang H, Liu X, Su J, Zhang W.** Rapid identification of acetophenones in two *Cynanchum* species using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2009**; 49: 715-725.
- 160. Pavela R.** Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.*, **2009**; 105: 887-892.
- 161. Pavunraj M, Muthu C, Ignacimuthu S, Janarthanan S, Duraipandiyan V, Raja N, Vimalraj S.** Antifeedant activity of a novel 6-(4,7-hydroxy-heptyl) quinone® from the leaves of the milkweed *Pergularia daemia* on the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hub.) and the tobacco armyworm *Spodoptera litura* (Fab.). *Phytoparasitica*, **2011**; 39:145-150.
- 162. Zoubiri S, Baaliouamer A.** Potentiality of plants as source of insecticide principles. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2011; doi: 10.1016 /j.jscs. 2011. 11.015.
- 163. Lingathurai S, Vendan SE, Paulraj MG, Ignacimuthu S.** Antifeedant and larvicidal activities of *Acalypha fruticosa* Forssk. (Euphorbiaceae) against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) larvae. *Journal of King Saud University(Science)*, **2011**; 23: 11-16.
- 164. Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Paulraj MG.** Antifeedant and larvicidal activities of rhein isolated from the flowers of *Cassia fistula* L.. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2011**; 18: 129-133.
- 165. Sreelatha T, Hymavathi A, Rao VRS, Devanand P, Rani PU, Rao JM, Babu KS.** A new benzil derivative from *Derris scandens*: structure-insecticidal activity study. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **2010**; 20: 549-553.

- 166. Leimu R, Syrjanen K.** Effects of population size, seed predation and plant size on male and female reproductive success in *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae). *Oikos*, **2002**; 98:229-238.
- 167. Agren J, Ehrlen J, Solbreck C.** Spatio-temporal variation in fruit production and seed predation in a perennial herb influenced by habitat quality and population size. *Journal of Ecology*, **2008**; 96: 334-345.
- 168. Tullberg BS, Stille GG, Solbreck C.** Effects of food plant and group size on predator defence: differences between two co-occurring aposematic Lygaeinae bugs. *Ecological Entomology*, **2000**; 25: 220-225.
- 169. Widenfalk O, Gyllenstrand N, Sylven E, Solbreck C.** Identity and phylogenetic status of two sibling gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae: *Contarinia*) on the perennial herb *Vincetoxicum hirundinaria*. *Systematic Entomology*, **2002**; 27: 519-528.
- 170. Widenfalk O, Solbreck C.** Slow response to strong disturbance in an insect population with a temporal refuge. *Oikos*, **2005**; 108: 618-622.
- 171. Weed AS.** Benefits of larval group feeding by *Chrysolina aurichalcea asclepiadis* on *Vincetoxicum*: improved host location or feeding facilitation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **2010**; 137: 220-228.
- 172. Subramaniam G, Ang KKH, Ng S, Buss AD, Butler MS.** A benzopyrroloisoquinoline alkaloid from *Ficus fistulosa*. *Phytochemistry*, **2009**; 2: 88-90.
- 173. Wang K, Wu M, Liu Z, Su B, Li L, Liu YX, Huang R, Liu Y, Wang Q.** Bioactivity of phenanthroindolizidine alkaloids and their salt derivatives. *Nongyaoxue Xuebao*, **2010**; 12(4): 507-510.
- 174. Wang K, Hu Y, Liu Y, Mi N, Fan Z, Liu Y, Wang Q.** Design, Synthesis, and Tylophorine Derivatives as potential antiviral agents. *J. Agric. Food Chem*, **2010**; 58: 12337-12342.
- 175. Xi Z, Zhang R, Yu Z, Ouyang D.** The interaction between tylophorine B and TMV RNA. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **2006**; 16: 4300-4304.
- 176. Li H, Hu T, Wang K, Liu Y, Fan Z, Huang R, Wang Q.** Total synthesis and antiviral activity of enantioenriched (+)-deoxytylophorinine. *Letters in Organic Chemistry*, **2006**; 3: 806-810.
- 177. Zhang S, Wei L, Bastow K, Zheng W, Brossi A, Lee KH, Tropsha A.** Antitumor Agents 252. Application of validated QSAR models to database mining: discovery of novel tylophorine derivatives as potential anticancer agents. *J. Comput Aided Mol. Des.*, **2007**; 21: 97-112.
- 178. Pettit GR, Goswami A, Cragg GM, Schmidt JM, Zou JC.** Antineoplastic agents, 103. the isolation and structure of hypoestestatin 1 ve 2 from the east African *Hypoestes verticillaris*. *Journal of Natural Products*, **1984**; 47(6): 913-919.

179. Wu CM, Yang CW, Lee YZ, Chuang TH, Wu PL, Chao YS, Lee SJ. Tylophorine arrest carcinoma cells at G1 phase by downregulating cyclin A2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2009**; 368: 140-145.
180. Stoye A, Opatz T. Racemization-free synthesis of (*S*)-(+)-tylophorine from L-proline by radical cyclization. *Organic Letters*, **2010**; 12(9): 2140-2141.
181. Kim S, Lee J, Lee T, Park H, Kim D. First asymmetric total synthesis of (-)-antofine by using an enantioselective catalytic phase transfer alkylation. *Organic Letters*, **2003**; 5(15): 2703-2706.
182. Jha S, Bandyopadhyay M, Chaudhuri KN, Ghosh S, Ghosh B. Biotechnological approaches for the production of forskolin, withanolides, colchicine and tylophorine. *Plant Genetic Resources*, **2005**; 3(2): 101-115.
183. Ohyama M, Komatsu H, Watanabe M, Enya T, Koyama K, Sugimura T, Wakabayashi K. Cytotoxic phenanthroindolizidine alkaloids in *Tylophora tanakae* against human gastric carcinoma cells. *Proc. Japan Acad.* **2000**; 76(B): 161-165.
184. Kim S, Lee T, Lee E, Lee J, Fan G, Lee SK, Kim D. Asymmetric total syntheses of (-)-antofine and (-)-cryptopleurine using (*R*)-(*E*)-4-(Tributylstannyl) but-3-en-2-ol. *J. Org. Chem.*, **2004**; 69: 3144-3149.
185. Koyama K, Baba M, Watanabe M, Takahashi H, Ishiyama H, Sugimura T, Wakabayashi K. Cytotoxic agent against human gastric carcinoma cells from a kind of Danaiidae and its host plant. *Proc. Japan Acad.*, **1999**; 75: 7-9.
186. Kimball FS, Tunoori AR, Victory SF, Dutta D, White JM, Himes RH, Georg G. Synthesis, in vitro and in vivo cytotoxicity of 6,7-diaryl-2,3,8,8a-tetrahydroindolizine-5(1H)-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**; 17: 4703-4707.
187. Yang X, Shi Q, Bastow KF, Lee KH. Antitumor Agents. 274. A new synthetic strategy for E-ring SAR study of antofine and cryptopleurine analogues. *Organic Letters*, **2010**; 12(7): 1416-1419.
188. Rao KN, Venkatachalam SR. Inhibition of dihydrofolate reductase and cell growth activity by the phenanthroindolizidine alkaloids Pergularinine and Tylophorinidine: the in vitro cytotoxicity of these plant alkaloids and their potential as antimicrobial and anticancer agents. *Toxicology in Vitro*, **2000**; 14: 53-59.
189. Enbergs H. Effects of the homeopathic preparation Engystol on interferon- γ production by human T-lymphocytes. *Immunological Investigations*, **2006**; 35: 19-27.
190. Roeska K, Seilheimer B. Antiviral activity of Engystol[®] and Grip-Heel[®]: an *in-vitro* assessment. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccine*, **2010**; 1-8.

191. **Clausen J, Wijk RV, Albrecht H.** Infection models in basic research on homeopathy. *Homeopathy*, **2010**; 99: 263-270.
192. **DiTommaso A, Losey JE.** Oviposition preference and larval performance of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) on two invasive swallow-wort species. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **2003**; 108: 205-209.
193. **Mattila HR, Otis GW.** A comparison of the host preference of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) for milkweed (*Asclepias syriaca*) over dog-strangler vine (*Vincetoxicum rossicum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **2003**; 107: 193–199.
194. **Gibson DM, Castrillo LA, Donzelli BGG, Milbrath LR.** First report of blight caused by *Sclerotium rolfsii* on the invasive exotic weed, *Vincetoxicum rossicum* (Pale swallow-wort), in Western New York. *Disease Notes*, **2012**; 96(3): 456.
195. **Van Driesche RG, Carruthers RI, Center T, Hoddle MS, Hough-Goldstein J, Morin L, Smith L, Wagner DL, Blossey B, Brancatini V, Casagrande R, Causton CE, Coetzee JA, Cuda J, Ding J, Fowler SV, Frank JH, Fuerster R, Goolsby J, Grodowitz M, Heard TA, Hill MP, Hoffmann JH, Huber J, Julien M, Kairo MTK, Kenis M, Mason P, Medal J, Messing R, Miller R, Moore A, Neuenschwander P, Newman R, Norambuena H, Palmer WA, Pemberton R, Perez Panduro A, Pratt PD, Rayamajhi M, Salom S, Sands D, Schooler S, Schwarzländer M, Sheppard A, Shaw R, Tipping PW, Van Klinken RD.** Classical biological control for the protection of natural ecosystems. *Biological Control*, **2010**; 54: 2-33.
196. **Gerber E, Krebs C, Murrell C, Moretti M, Rocklin R, Schaffner U.** Exotic invasive knotweeds (*Fallopia spp.*) negatively affect native plant and invertebrate assemblages in European riparian habitats. *Biological Conservation*, **2008**; 141: 646–654.
197. **Kaitera J, Nuorteva H.** *Cronartium flaccidum* produces uredinia and telia on *Melampyrum nemorosum* and on Finnish *Vincetoxicum hirundinaria*. *For. Path.*, **2003**; 33: 205–213.
198. **Samils B, Ihrmark K, Kaitera J, Stenlid J, Barklund P.** New genetic markers for identifying *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* and examining genetic variation within and between lesions of Scots pine blister rust in Sweden. *Fungal biology*, **2011**; 115: 1303-1311.
199. **Yang XM, Shi Q, Yang SC, Chen CY, Yu SL, Bastow KF, Morris-Natschke SL, Wu PC, Lai CY, Wu TS, Pan SL, Teng CM, Lin JC, Yang PC, Lee KH.** Antitumor agents 288: design, synthesis, SAR, and biological studies of novel heteroatom-incorporated antofine and cryptopleurine analogues as potent and selective antitumor agents. *Journal Of Medicinal Chemistry*, **2011**; 54(14): 5097-5107.
200. **Wang Z, Wu M, Wang Y, Li Z, Wang L, Han G, Chen F, Liu Y, Wang K, Zhang A, Meng L, Wang Q.** Synthesis and SAR studies of phenanthroindolizidine and phenanthroquinolizidine alkaloids as potent anti-tumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**; 51: 250-258.

201. Lü MY, Wang KL, Cai F, Wang HY, Wang QM. A novel practical synthesis of phenanthrenes using Iron (III) chloride involved intramolecular oxidative coupling at room temperature. *Chinese Journal of Chemistry*, **2008**; 26: 2241-2248.
202. Pansare SV, Lingampally R, Dyapa R. A simple enantioselective route to functionalized indolizidines: synthesis of (+)-ipalbidine and (-)-antofine. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**; 2235-2238.
203. Chauncy B, Gellert E, Trivedi KN. A new synthesis of phenanthroindolizidine. *Aust. J. Chem.*, **1969**; 22: 427-429.
204. Mangla VK, Bhakuni DS. Synthesis of tylophorine. *Tetrahedron*, **1980**; 36: 2489-2490.
205. Comins DL, Chen X, Morgan LA. Enantiopure *N*-Acyldihydropyridones as synthetic intermediates: asymmetric synthesis of (-)-septicine and (-)-tylophorine. *J. Org. Chem.* **1997**; 62: 7435-7438.
206. Comins DL, Morgan LA. *N*-acyldihydropyridones as synthetic intermediates. Synthesis of (±)-septicine and (±)-tylophorine. *Tetrahedron Letters*, **1991**; 32(42): 5919-5922.
207. Szemes F, Kadlecikova K, Marchalin S, Bobosikova M, Dalla V, Daich A. Diastereoselective access to hexahydro- and octahydrofuro[f]indolizines analogues of phenanthro[f]indolizidines alkaloids. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**; 15: 1763-1770.
208. Takeuchi K, Ishita A, Matsuo J, Ishibashi H. Synthesis of 13a-methylphenanthroindolizidines using radical cascade cyclization: synthetic studies toward (±)-hypoestestation. *Tetrahedron*, **2007**; 63: 11101-11107.
209. Safar P, Zuziova J, Marchalin S, Tothova E, Pronayova N, Svorec L, Vrabel V, Daich A. Highly diastereoselective approach to novel phenylindolizidinols via benzothieno analogues of tylophorine based on reductive desulfurization of benzo[*b*]thiophene. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**; 20: 626-634.
210. Wu M, Li L, Su B, Liu Z, Wang Q. First total synthesis of (-)- and (+)-6-*O*-desmethylantofine. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2011**; 9: 141-145.
211. Tanker M, Şarer E, Atasu E, Yenen M, Özkol N, Kurucu S. *Farmakognozi Uygulama Örnekleri*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, **1986**.
212. Çubukçu B. *Analitik Farmakognozi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi yayın no: 3710, Fakülte yayın no: 62, **1992**.
213. Baytop T. *Farmakognozi Ders Kitabı*. 1. Cilt, İstanbul: İstanbul Üniversitesi yayınları, No:2783, Eczacılık Fakültesi No: 29, Fatih Yayınevi Matbaası, **1980**.

- 214.Şener B, Tosun F, Küsmenoğlu Ş, Ergun F, Türköz S, Toker G, Baykal T, Bingöl F.** *Drogların Morfolojik, Anatomik ve Kimyasal Analiz Örnekleri.* Ankara: Gazi Üniversitesi Seldem Ofset, **1985.**
- 215.Tanker M, Tanker N.** *Farmakognozi.* 2. Cilt, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi yayın no: 65, Ankara Üniversitesi Basımevi, **2003:** 269-273.
- 216.Cui L, Abliz Z, Xia M, Zhao L, Gao S, He W, Xiang Y, Liang F, Yu S.** On-line identification of phenanthroindolizidine alkaloids in a crude extract from *Tylophora atrofoliculata* by liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2004;** 18: 184-190.
- 217.Zabka M, Pavela R, Gabrielova-Slezakova L.** Promising antifungal effect of some Euro-Asiatic plants against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Sci. Food. Agric.*, **2011;** 91: 492-497.

ÖZGEÇMİŞ

04.04.1979 yılında Kayseri ili, Sarız ilçesinde doğdu. İlkokul eğitimini çeşitli illerde tamamladıktan sonra, Mersin Tevfik Sırrı Gür Lisesi'nde orta okul eğitimini, Mersin 19 Mayıs (Süper Lise) Lisesi'nde ise lise eğitimini tamamladı. 1998 yılında başladığı Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden bölüm birincisi olarak 2001-2002 eğitim-öğretim yılında mezun oldu. 08.09.2003 tarihinde Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Meslek Bilimleri Anabilim Dalı, Farmakognozi Programında yüksek lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans eğitimi süresince TÜBİTAK-BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı) den 2210-Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında burs almaya hak kazandı. 2006 yılında Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Aynı yıl Çevre ve Orman Bakanlığı, Kütahya İl Çevre ve Orman Müdürlüğü'ne biyolog olarak atandı. 4 yılı aşkın süre bu kurumda Çevre Yönetimi Şube Müdürlüğü ve ÇED ve Planlama Şube Müdürlüğü bünyesinde Uzman Biyolog olarak çalıştı. Bu süreçte doktora eğitimine devam etti. Doktora eğitimi süresince TÜBİTAK-BİDEB (Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı) den 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında bursu almaya hak kazandı. Halen aynı Anabilim Dalında doktora eğitimine devam etmektedir.

Sevda GÜZEL ÖZAY