

**T.C**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**HELLEBORUS ORİENTALİS EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK VE**  
**KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERAL ÖZTÜRK**

**TEMMUZ 2018**

**UŞAK**

**T.C**  
**UŞAK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**HELLEBORUS ORİENTALİS EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK VE**  
**KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERAL ÖZTÜRK**

**UŞAK 2018**

## Kabul ve Onay Sayfası

Meral ÖZTÜRK tarafından hazırlanan “*Helleborus orientalis* Ekstraktlarının Biyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN .....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ .....

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi

Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN .....

Biyoloji Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Doç Dr. Recep LİMAN .....

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi İbrahim BULDUK .....

Kimya Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Dr. Öğretim Üyesi Funda Karabağ ÇOBAN .....

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Tarih: 10/ 07/ 2018

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. İsa YEŞİLYURT .....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Meral ÖZTÜRK



**HELLEBORUS ORİENTALİS EKSTRAKTLARININ BİYOLOJİK VE  
KİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Meral ÖZTÜRK**

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Temmuz 2018**

**ÖZET**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Helleborus türleri önemli sekonder metabolitler üretme potansiyelleri nedeniyle fitokimyasal araştırmaların konusu olmuştur, ancak *Helleborus orientalis* türü ile yapılan çalışmaların birkaç tane ile sınırlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle Türkiye’de Kuzey Anadolu bölgesinde doğal olarak yetişen *H. orientalis* bitkisinin metanolik ekstraktlarının toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan içerikleri, fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi, sıvı kromatografi kütle spektrometresi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi analizi ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Yapraklarının metanol ekstraktı ile toplam antioksidan, oksidan seviyeleri comet testi ile DNA hasarı üzerine aktivitesi incelenmiştir. Bitkinin köklerinin sulu ve etanolik ekstraktlarının herbisidal etkisini tespit etmek amacıyla çimlenme üzerine aktivitesi belirlenmiştir. *H. orientalis* bitkisinin çiçek ve yaprak kısmı yüksek fenolik ve flavonoid maddeler içermektedir ve yüksek antioksidan özelliklere sahiptir. Sıvı kromatografi kütle spektrumu analizlerinde yaprakta hellebrigen, köklerinde helleborin, ve hellebrigen, gövdelerinde hellebrin ve çiçeklerinde hellebrin ve helleborin varlığı tespit edilmiştir. *H. orientalis*’in yaprak ekstraktının DNA hasarını ve toplam oksidan düzeylerini azalttığı, toplam antioksidan düzeyini arttırdığı görülmüştür. Bitkinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısmı *Candida glabrata*’da antifungal aktivite gösterirken, kök kısmı da *Enterococcus faecalis* ATCC 51289’de antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bitki köklerinin sulu ekstraktlarının çimlenmeyi inhibe ettiği gözlemlenmiştir.

**Bilim Kodu:**

**Anahtar Kelimeler:** *H. orientalis*, antioksidan, antimikrobiyal, DNA hasarı

**Sayfa Adedi:** 122

**Tez Yöneticisi:** Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN

**DETERMINATION OF BIOLOGICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF  
HELLEBORUS ORIENTALIS EXTRACTS  
(M.Sc. Thesis)**

**Meral Öztürk**

**UNIVERSITY OF UŞAK  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
July 2018**

**ABSTRACT**

In recent years, Helleborus species have been the subject of phytochemical investigations because of their potential to produce important secondary metabolites, but studies with *Helleborus orientalis* have been limited to a few. Therefore, methanolic extracts of *H. orientalis* plant naturally growing in the north of Turkey, the total phenolics, total flavonoid and antioxidant content, fourier transform infrared spectrometry, liquid chromatography mass spectrometry, high performance liquid chromatography analysis and antimicrobial activity was examined. The total antioxidant and oxidant levels of the methanol extracts of leaves were examined and the effects on DNA damage by comet assay test were examined. The activity on germination was determined to determine the herbicidal effect of the root extracts of the plant. The flower and leaf part of *H. orientalis* plant contains high phenolic and flavonoid substances and has high antioxidant properties. Hellebrigen in the leaves of plants, helleborin and hellebrigen in their roots, hellebrin in their bodies and hellebrin and helleborin in their flowers were determined by liquid chromatography mass spectrum analysis. Leaf extract of *H. orientalis* has been shown to increase total antioxidant levels while decreasing DNA damage and total oxidant levels. While the root, stem, leaf and flower part of the plant showed antifungal activity in *Candida glabrata*, the root part of the plant showed antimicrobial activity in *Enterococcus faecalis* ATCC 51289. It has been observed that aqueous extracts of plant roots inhibit germination.

**Science Code:**

**Keywords:** *H. orientalis*, antioxidant, antimicrobial, DNA damage

**Number of Page:** 122

**Supervisor:** Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca benden yardım ve katkılarını esirgemeyen ve bu tezin hazırlanmasında tüm laboratuvar desteğini sağlayan saygı değer hocam Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN'a, Yüksek lisans tez çalıőmalarımnda, yanında çalıőmaktan onur duyduğum, emeğini ve hakkını ödeyemeyeceğim değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi İbrahim BULDUK'a, laboratuvar çalıőmalarımnda katkıları bulunan değerli hocam Doç. Dr. Recep LİMAN'a, ve değerli arkadaşım Hava KÖLEMEK'e, Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve hiçbir destekten kaçınmayan sevgili aileme, sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalıőmasına Uşak Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu (2017-33) onayı alındıktan sonra başlanmıştır ve Bilimsel Araştırma (BAP 2017/TP040) Projesi ile desteklenmiőtir. Katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Meral ÖZTÜRK

Uşak, 2018

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xi
HARİTALARIN LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 <i>Helleborus spp.</i> .....	3
2.2 <i>Helleborus spp</i> 'nin Dünya' da Yayılımı.....	5
2.3 <i>H. orientalis</i> 'in Morfolojik Özellikleri .....	7
2.4 <i>Helleborus spp.</i> 'in Kimyasal Analizi.....	8
2.4.1 Kardiyoaktif Glikozitler .....	11
2.4.2 Steroidal Saponinler .....	12
2.4.3 Ekdozonlar .....	13
2.4.4 Protoanemonin .....	14
2.5 Farmakolojik ve Terapötik Etki.....	15
2.5.1 Antiromatizmal ve Antiinflamatuvar Aktivite .....	16
2.5.2 İmmünomodülatör Aktivite.....	17
2.5.3 Antioksidan Aktivite .....	18
2.5.4 Antimikrobiyal Aktivite .....	20
2.5.5 Sitotoksisite ve Antikanser Özellikler.....	20
2.5.6 Mikropropagasyon ve Genetik Dönüşüm .....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	25
3.1 Materyal .....	25
3.1.1 <i>H. orientalis</i> Temini .....	25
3.1.2 Mikrobiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Suşlar .....	26



3.1.3 Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri .....	26
3.1.4 Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler .....	27
3.1.5 Cihazlar .....	31
3.2 YÖNTEM .....	32
3.2.1 Bitki Materyalinin Tür Tayini .....	32
3.2.2 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon.....	32
3.2.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) Analizi .....	33
3.2.4 Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi (LC-MS) Analizi .....	34
3.2.5 Antioksidan Aktivite Tayini.....	35
3.2.5.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini .....	35
3.2.5.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini .....	36
3.2.5.3 Total Oksidan Seviyesi (TOS).....	36
3.2.5.4. Total Antioksidan Seviye (TAS) .....	37
3.2.5.4 Fenolik Asitlerin HPLC Analizi .....	38
3.2.6 Biyolojik Aktivite Testleri .....	39
3.2.6.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Radikalinin Etkisinin Giderilmesi.....	39
3.2.6.2 Comet Assay ile DNA Üzerine Etkisi .....	40
3.2.6.3 Antimikrobiyal Aktivite .....	42
3.2.6.3.1 Agar Disk Difüzyon Testi.....	42
3.2.6.3.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Testi .....	43
3.2.7 Çimlenme Üzerine Etki.....	44
3.2.8 <i>H. orientalis</i> Kısımlarından Metal Tayini .....	44
4 BULGULAR .....	46
4.1 Bitki Materyalinin Tür Tayini.....	46
4.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) Analizi .....	46
4.3 Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre (LC-MS) Analizi .....	47
4.4 Antioksidan Aktivite Tayini .....	48
4.4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	48
4.4.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini.....	50
4.4.3 Fenolik Asitlerin HPLC Analizi.....	51
4.5 Biyolojik Aktivite Testleri .....	52
4.5.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Radikalinin Etkisinin Giderilmesi.....	52
4.5.2 Comet Assay ile DNA Üzerine Etkisi.....	57

4.5.3 TAS ve TOS Seviyeleri.....	57
4.5.4 Antimikrobiyal Aktivite .....	59
4.5.4.1 Agar Disk Difüzyon Testi .....	59
4.5.4.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Testi.....	60
4.6 Çimlenme Üzerine Etki.....	62
4.7 <i>H. orientalis</i> Kısımlarının Metal Tayini .....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	64
KAYNAKLAR.....	71

	<b>Sayfa</b>
EKLER.....	86
EK-1 FTIR .....	86
EK-2 LC Mass .....	90
EK-3 HPLC.....	98
EK-5 Etik Kurul.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	103

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. 10X PBS içerisinde bulunan kimyasal maddeler.....	29
Çizelge 3.2. Lizis çözeltisi için gerekli kimyasallar.....	29
Çizelge 3.3. Elektroforez tampon çözeltisi için gerekli kimyasal maddeler.....	30
Çizelge 3.4. Nötralizasyon tampon çözeltisi için gerekli kimyasal maddeler.....	30
Çizelge 3.5. Cihazlar, marka ve modelleri.....	31
Çizelge 3.6. HPLC çalışma koşulları.....	38
Çizelge 3.7. Gradient koşulları.....	38
Çizelge 3.8. Kullanılan ekstrakt, eklenen metanol, DPPH karışımı.....	39
Çizelge 4.1. Gallik asit konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri.....	48
Çizelge 4.2. 1 gr numune içerisindeki toplam fenolik madde içeriği mg GAE.....	49
Çizelge 4.3. Kuersetin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri.....	50
Çizelge 4.4. 1 gr numune içerisindeki toplam flavonoid madde içeriği mg QE.....	51
Çizelge 4.5. Fenolik asitleri HPLC analiz sonuçları.....	51
Çizelge 4.6. Bazı antioksidan bileşiklerin EC <sub>50</sub> değerleri.....	52
Çizelge 4.7. Çiçek ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri.....	52
Çizelge 4.8. Yaprak ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri.....	53
Çizelge 4.9. Kök ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri.....	54
Çizelge 4.10. Gövde ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri.....	55
Çizelge 4.11. <i>H. orientalis</i> bitkisinin kısımlarının EC <sub>50</sub> değerleri.....	56
Çizelge 4.12. Helleborusun mononükleer lökositlerde H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'e karşı koruyucu etkisi.....	57
Çizelge 4.13. Gruplarda TAS, TOS seviyeleri ve OSI indeksi.....	58
Çizelge 4.14. Agar disk difüzyon testi sonuçları (mm).....	59
Çizelge 4.15. Bitki numunelerinin MİK konsantrasyonu .....	61
Çizelge 4.16. Farklı konsantrasyonlardaki kök ekstraktının günlere göre çimlenme sayısı.....	62
Çizelge 4.17. <i>H. orientalis</i> kısımlarının metal tayini.....	63

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. <i>H. niger</i> (Noel gülü), <i>H. purpurascens</i> (Mor çöpleme).....	6
Şekil 2.2. <i>H. orientalis</i> bitkisinin doğal ortamındaki görünüşü .....	7
Şekil 2.3. Helleborus bitkisinin kısımları .....	8
Şekil 2.4. Helleborin, hellebrin, hellebrigenin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.5. Kardenolid ve bufadienolidler .....	12
Şekil 2.6. <i>Helleborus spp.</i> içinde bulunan saponin iskeleti.....	13
Şekil 2.7. Ekdozon .....	13
Şekil 2.8. 20 hidroksi ekdison.....	14
Şekil 2.9. Protoanemonin yıkım yolu.....	15
Şekil 3.1. MİK için dilüsyonların hazırlanması .....	43
Şekil 4.1. Toplam fenolik madde içerik doğrusallık grafiği.....	49
Şekil 4.2. Toplam flavonoid madde içerik doğrusallık grafiği.....	50
Şekil 4.3. Çiçeğin farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri .....	53
Şekil 4.4. Yaprığın farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri .....	54
Şekil 4.5. Kökün farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri .....	55
Şekil 4.6. Gövdenin farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri.....	56

## RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. <i>H. orientalis</i> bitkisinin (a; gövde b; yaprak ve çiçek, c; kök) kısımları.....	26
Resim 3.2. Ultrasonik su banyosunda metanol ile bitki ekstraktı.....	32
Resim 3.3. %1, %5, %10, %20 oranında etanol ve su ekstraktları.....	33
Resim 3.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre cihazı (FTIR).....	34
Resim 3.5. LC-MS cihazı.....	34
Resim 3.6. UV-Vis spektrofotometre cihazı.....	35
Resim 3.7. Elısa cihazı.....	37
Resim 3.8. Test maddelerinin farklı konsantrasyonları.....	40
Resim 3.9. 0- Hasarsız DNA, I-Çok az hasarlanmış DNA, II-Az hasarlanmış DNA, III- hasarlanmış DNA, IV- tümüyle hasarlanmış DNA.....	42
Resim 3.10. Etanol ve su ekstraktları ile nemlendirme.....	44
Resim 3.11. Nitrik asit ile yakma işlemi.....	45
Resim 3.12. ICP-MS cihazı.....	45
Resim 4.1. A ve B antimikrobiyal ajanların, C ve D bitkinin kısımlarının metanol ekstraktlarının disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi.....	60
Resim 4.2. <i>E. faecalis</i> ATCC 51289 ve <i>Candida glabrata</i> 'nın MİK konsantrasyonu.....	61
Resim 4.3. <i>E. coli</i> ATCC 25922 ve <i>S. aureus</i> ATCC 25923'un MİK konsantrasyonu.....	61
Resim 4.4. Sulu ekstraktın çimlenmeye etkisi.....	62
Resim 4.5. Etanol ekstraktın çimlenmeye etkisi.....	62

## HARİTALARIN LİSTESİ

**Harita**

**Sayfa**

Harita 3.1. *H. orientalis*'in toplandığı bölge.....25



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Abs</b>	Absorbans
<b>cm</b>	Santimetre
<b>dk</b>	Dakika
<b>g/L</b>	Gram / litre
<b>kg</b>	Kilogram
<b>kHz</b>	Kilohertz
<b>M</b>	Molar
<b>Mf</b>	MacFarland
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>ppm</b>	Milyonda bir
<b>rpm</b>	Dakikadaki devir sayısı
<b>µg / ml</b>	Mikrogram / mililitre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>µmol</b>	Mikromol
<b>µL</b>	Mikrolitre

V Volt  
g/mol Gram / mol

### **Kısaltmalar**

### **Açıklama**

**ABD** Amerika Birleşik Devletleri  
**DNA** Deoksiribonükleik Asit  
**DPPH** 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil  
**EC<sub>50</sub>** Etkili Konsantrasyon  
**EDTA** Disodyum Etilen Diamin Tetra Asetat Dihidrat  
**ELISA** Enzim Bağlantılı Bağışıklık Testi  
**FTIR** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi  
**GAE** Gallik Asit Eşdeğeri  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Hidrojen Peroksit  
**HPLC-MS** Yüksek Performanslı- Sıvı Kromatografisi  
**ICP-MS** İndüktif Eşleşmiş Plazma  
Kütle Spektrometresi  
**LC-MS** Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometresi  
**LMA** Düşük Erime Agaroz  
**MHA** Müller Hinton Agar  
**MİK** Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu  
**MCS-18** Makrosiklik Karbon Suboksit  
**NA** Nutrient Agar



<b>NMA</b>	Normal Erime Agaroz
<b>OSI</b>	Oksidatif Stres İndeksi
<b>PBS</b>	Fosfat Buffer Tamponu
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SR Ca-ATPaz</b>	Sarkoplazmik Retikulum Kalsiyum ATPaz
<b>TOS</b>	Total Oksidan Seviye
<b>TAS</b>	Total Antioksidan Seviye
<b>QE</b>	Kuersetin Eşdeğeri
<b>1D ve 2D NMR</b>	Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi

# 1.GİRİŞ

Ranunculaceae familyası ( Dügün çiçeğigiller ) Dünya’da 59 cins ve 1900 kadar tür ile temsil edilen büyük bir familyadır. Familya bitkileri Kuzey ve Güney yarımkürenin ılıman ve soğuk bölgelerinde daha fazla olmakla birlikte tüm Dünya’da yayılış göstermektedir [1, 2]. Ranunculaceae familyasına ait Helleborus cinsi, kardiyak glikozit içeren zehirli ve tıbbi açıdan da önemli bir bitkidir. Helleborus cinsinin Dünya’da yaklaşık olarak 22 türü bulunmaktadır [3]. Bu türler Avrupa kıtasının doğusu, orta kısmı ve güneyinde Kafkasya sınırlarına kadar yayılmaktadır. Helleborus cinsi Türkiye'nin Kuzey kıyıları ile Güneydoğu kısımları boyuncada kendisini göstermektedir [4]. Temel olarak Avrupa ve Asya'ya özgü olan türün bazıları biyolojik ve tıbbi potansiyelleri açısından taranmıştır ve insektisidal, antianjezik, antiromatizma, immünosupresif, antikanser aktivitesi gibi ilginç özellikler göstermiştir [5-8]. Balkanlarda Helleborus ekstraktları uzun yıllardan beri ağrı kesici antiinflamatuvar ve veterinerlikte enfeksiyon hastalıklarına karşı ilaç olarak kullanılmaktadır.

Helleborusun bilinen türleri arasında *H. orientalis* 1789 yılında Jean-Baptiste Lamarck tarafından tanımlanmıştır. Halk arasında dana bağırtan, karacaot, akçöpleme, patlak çiçeği gibi yöresel isimlerle bilinen bu tür, Yunanistan ve Türkiye'de doğal olarak yetişmektedir [9]. Genellikle orman açıklıklarında yetişen, yeşilimsi beyaz renkli gösterişli çiçeklere sahip ve toprak altında yumruları olan çok yıllık otsu bir bitkidir.

*H. orientalis* ile ilgili yapılan çalışmalar Helleborus türlerinin hastalıkların yeni tedavilerinde kullanılabilecek doğal bileşikleri içerdiğini göstermiştir. *H. orientalis* bitkisinden elde edilen furostanol glikozitler [10], furostanol saponin ve steroidler [11], steroidal saponinler [12], bufadienolid ve spirostanol glikozitlerin varlığı tesbit edilmiştir [13, 14]. *H. orientalis*'in kökleri Kuzey Anadolu’da büyükbaş hayvanların bronşit ve benzeri göğüs hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Çok önceden dahilen kurt düşürücü ve adet söktürücü olarak kullanılmış olsa da zehirli ve tahriş edici özelliklerinden dolayı bitkinin bu tip kullanımı terkedilmiştir [15-17]. Helleborus türlerinde bu etkilere sahip olan maddeler

helleborin, hellebrin, hellebrigen ve helleborein'dir [18]. Helleborus türlerinde bulunan bu etken maddelerden olan hellebrin, kardiyotonik glikoziti ve helleborin isimli saponin glikozitinin yanısıra, akonitik asit, eterik yağlar ve kalsiyum fosfor gibi maddelerde bulundurmaktadır [19-24]. Yapılan çalışmalarda klinik uygulamaların azlığı nedeniyle çok az yan etki ve toksisite çalışmaları bulunmaktadır. Bu nedenle yapılacak bilimsel çalışmalarla herhangi bir bölgede bulunan tıbbi bitkiler ile bu bitkilerin botaniksel ve ekolojik özelliklerinin belirlenmeside önemlidir.

Bu cinsin farmasötik etkisi ve bitkilerin yetiştirildiği toprak ve klima özelliklerine göre kimyasal içeriklerinin değiştiği düşünüldüğünde, bu bölgede yetişen *Helleborus spp.* ile ilgili çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu çalışma ile Karadeniz bölgesinde yetişen *H. orientalis*'in yaprak, çiçek, gövde ve kök'ün bazı kimyasal ve biyolojik aktivitelerinin ölçülmesi amaçlanmıştır. *H. orientalis* bitkisi doğal ortamından toplandıktan sonra kurutulup ekstraksiyon işlemini takiben antioksidan, oksidan, toplam fenolik içerikleri, toplam flavonoid içerikleri, antimikrobiyal aktiviteleri, DNA hasarı üzerine pozitif ve negatif etkileri, çimlenme üzerine etkisi ve bitki kısımlarından metal tayini yapılarak incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 *Helleborus spp.*

Ranunculaceae ( Dügün çiçeğigiller ) familyasının süs bitkilerinden olan Helleborus cinsi Orta, Güney ve Doğu Avrupa'dan Kafkasya sınırlarına kadar uzanan geniş bir yayılma alanına sahiptir [25-27]. Avrupa ve Batı Asya'nın farklı bölgelerine yayılan Helleborus cinsi 22 tür içerir [28-30]. Antarktika hariç tüm kıtalarda bulunan Ranunculaceae familyası, ılıman ve boreal bölgelerde çoğu türü mestik veya ıslak ortamlarda yetişen otsu, uzun ömürlü yıllık bitkilerden oluşan kozmopolit bir ailedir [31, 32]. Ranunculaceae familyasının *Aconitum* (Kurtboğan) ve *Delphinium* (Saray Çiçeği) gibi türleri içerdikleri alkoloitlerden dolayı çok zehirlidirler. *Aconitum* (Kurtboğan) antik çağlarda sakat ve yaşlı erkeklerin ölüm cezalarında kullanılmış ve *Delphinium* (Saray Çiçeği) tohumları veterinerlikte vücut parazitlerini öldürmekte kullanılmıştır [33].

Doğal koşullarda kireçtaşı topraklarında, uzun ömürlü bitkilerin ve yaprak döken ağaçların yakınında yetişen Hellebor türleri, glokom (Ranunculaceae) ailesine ait oldukları için anemonlarla yakından ilişkilidir. Sıcak ve nemli yaz, çiçek tomurcuklarının oluşumunu destekler. Yaz kuraklığı helleborların çiçeklenmesini olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle, yaz sıcağında, düzenli olarak sulanmalıdır. Yavaş büyürler, fakat zamanla büyük kümelere dönüşerek sayısız çiçeklenme sürgünleri oluştururlar. Rüzgâr, soğuk ve kar yağıyor olsa da hellebor türleri çiçek açar. Kışın soğuk hava parlamalarından bağımsız olarak narin olmasına rağmen, güçlü ve dayanıklı bitkilerdir. Helleborus türlerindeki çiçeklenme Şubat ve Mart aylarında görülür [34].

Helleborusun bilinen türleri aşağıda verilmiştir;

- *H. viridis* (Yeşil çöpleme)
- *H. niger* (Noel gülü)
- *H. orientalis* (Çöpleme)
- *H. vesicarius* (Patlak otu)

- *H. foetidus* (Kokuşuk çöpleme)
- *H. purpurascens* (Mor çöpleme)
- *H. odorus* (Kokulu çöpleme)
- *H. argutifolius* (Korsika çöplemesi)
- *H. abruzzicus*
- *H. atrorubens* (Kırmızı çöpleme)
- *H. bocconeii*
- *H. hercegovinus*
- *H. liguricus*
- *H. lividus*
- *H. multifidus*
- *H. torquatus*
- *H. thibetanus*

Bu cinse ait bitkiler ishal, hemoroit, kalp yetmezliği, melankoli, sarılık, karaciğer rahatsızlıkları, gut hastalığı ve ülser gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır [4].

Helleborus cinsinin Türkiye'de doğal olarak yetişen iki türü vardır [35-37]. Bunlardan biri *H. orientalis* olup, çok önceden *H. niger* ve *H. foetidus* [38, 39] diye tanıtılan türlerin determinasyonu sonucu meydana gelmiştir. *H. orientalis* Kuzey Anadolu'da geniş bir yayılma alanına sahiptir. Genellikle orman açıklıklarında ve orman altlarında yetişir [40]. Halk arasında bohça otu, kara çöpleme, siyah harbak, boynuz otu, danabağırtan, danakıran gibi birçok isim ile adlandırılan zehirli bir tür olarak bilinmektedir. Kökleri, Kuzey Anadolu köylerinde, büyükbaş hayvanların bronşit ve benzeri göğüs hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır [23, 39]. Bitkinin rizom ve köklerinden hazırlanan dekoksilyon halk hekimliğinde, dolaşım bozukluklarında kalp güçlendirici olarak, vücut ısısını yükselttiğinden hipotermi oluşturmak için ve keçilerin süt kesen hastalığına ve hayvanların ektoparazitlerine karşı kullanılmaktadır [41].

Türkiye'de yetişen diğer tür *H. vesicarius*'dur. Dağlık alanlarda, çalılıklarda ve yamaçlarda yetişen bu bitki Türkiye'de Güneydoğu Anadolu bölgesinde bulunur. Toroslarda yetişen bu bitki halk arasında patlak otu olarak bilinmektedir [40]. Bitkinin açık yeşil yaprakları üç parçaya bölünmüştür. Ocak ve Mart ayları arasında bitkide görünen yeşil renkli çiçekler, çan şeklindedir. Çok yıllık otsu bir bitki olup bahar mevsiminde Mayıs ayında

çiçeklenir. Çiçeklerin kenarı kırmızı veya kahverengi olabilir. Bitkinin çiçekleri her taç yaprağının yarısı kadar uzunlukta bitkinin ucuna doğru ve renkleri mordur. *H. vesicarius*'un gövdesinin yapraklı ve meyvelerinin şişkin olması nedeniyle diğer Helleborus türlerinden ayırt edilir. Bitkinin sapları ile birlikte uzunluğu 60 cm yüksekliğe ulaşmaktadır [4]. *H. vesicarius* içerdiği kardiyak glikozitler nedeniyle zehirli bir bitki türüdür. Çok yıllık Helleborus türlerinin hepsi diploiddir ( $2n = 2x = 32$ ) [42-44]. Bitki yapısına, melezleşme yeteneğine, polen morfolojisine ve tohum özelliklerine göre Helleborus cinsi altı bölüme (Syncarpus, Griphopus, Chenopus, Helleborus, Helleborastrum, Dicarpon) ayrılmıştır [45].

## 2.2 *Helleborus spp*'nin Dünya' da Yayılımı

Helleborus türünün birçoğu Balkan bölgesinde yoğunlaşmıştır. Sadece *H. thibetanus*, Doğu Asya'ya özgüdür [29]. *H. thibetanus* Çin'de endemiktir. Adrien René Franchet tarafından tanımlanan ranunkel bitki türüdür [46]. Bu bitki Çin halk tıbbında sistit, üretrit, yaralar ve travmatik yaralanmaların tedavisinde kullanılmaktadır [47].

*H. purpurascens*, Batı ve Orta Avrupa, Büyük Britanya, İspanya ve Portekiz'den doğuya, Akdeniz bölgesi ve Orta Avrupa'dan doğuya Romanya ve Ukrayna'ya yayılmıştır [48, 49]. Polonya florasının ender ve nesli tükenmekte olan bitkisi karacaotu moru (*H. purpurascens*), Batı Bieszczady Dağları'nda (Doğu-Karpatlar) doğal olarak yetişir. Bu bitkinin çiçekleri aşağıya doğru açar. Çiçekler ilk olarak yeşilimsi kahverengi görünür ve daha sonra mor-kahverenkli halini alır (Şekil 2.1) [50].

*H. niger* Güney ve Orta Avrupa'da yaygın olarak dağılmıştır [51]. *H. niger*'in (Noel gülü) rizomlarından *H. nigri rhizoma* alt türü oluşmuştur ve drog olarak kullanılmıştır [52]. En çok yetiştirilen Polonya bahçelerinde beyaz helleborine (*H. niger*)'dir. *H. niger* manolya gibi çok eski tarihlerden bu yana yetiştirilen bir bahçe bitkisidir [53]. Noel gülü kışın başından baharın sonlarına kadar çiçek üretebilir. Hafif kışlarda çiçekler gerçekten Noel zamanında ortaya çıkabilir ve nisan veya mayıs ayına kadar devam edebilir. [54]. Bazal yaprakları ve göreceli olarak büyük çiçekleri (6-13 cm çapında) vardır. Fertilizasyondan sonra beyazdan yeşile döner [55]. Çiçekleri mor, yeşil ve beyazın çeşitli tonlarında büyük, çekicidir (Şekil 2.1). Tohumlar genellikle Mayıs ayında olgunlaşır [44, 54, 56]. Fransa, Almanya, Hollanda, İsviçre ve Belçika'daki en popüler kesme çiçeklerden biridir [57].



Şekil 2.1. *H. niger* (Noel gülü), *H. purpurascens* (Mor çöpleme) [58, 59].

Slovenya'da, *H. odorus* (kokulu hellebore) çok çeşitli bir tür olarak kabul edilir. *H. odorus* daha büyük çiçeklere sahiptir. Kışın yapraklarının sertliği ile ayırt edici bir özelliğidir. Slovenya'da *H. odorus*'un yaprakları kışa dayanıklıdır [60].

Orta ve Güney Avrupa, Yunanistan dağlık bölgelerinde yetişen *H. foetidus*, kokuşmuş hellebore, çiçekli bitki türüdür. *H. foetidus*, Linnaeus tarafından bilinen, Batı Avrupa'nın yaygın yapraklı köklü bir türüdür [61]. İngiltere'nin birçok bölgesinde, özellikle kireçtaşı topraklarında bulunurlar. Kırmızı saçakları olan çan şeklindeki yeşil çiçeklere sahiptir. Şubattan Nisan'a kadar çiçek açar. Tohumlar düşene kadar çiçek açtığı zaman bile dekoratiftir. Bitkiler 50 cm yüksekliğe kadar ulaşır.

Korsika hellebore (*H. argutifolius*) 50 cm'ye kadar uzanır. Erken ilkbaharda (Ocak-Mart arası) bardak şeklinde sarımsı-yeşil çiçekler ve parlak yaprakları vardır [34]. *H. argutifolius* 120 cm yüksekliğe kadar uzanan, kaba dikenli, yeşil veya daha az aynı renkli damarlara sahiptir. Çiçeklenme yoğun bir şekilde olur ve çiçekleri soluk yeşil renktedir [61]. *H. viridis* Batı ve Orta Avrupa'da, Doğuda Kuzey İtalya ve Avusturya'da yaygın olarak dağılmıştır [62]. *H. viridis* ve *H. niger* hellebore bitkilerinde göze çarpan juvenil özellikler göstermiştir [63, 55].

*H. lividus*, bahçelerde ve özellikle Batı Avrupa'da saksı bitkileri veya kesme çiçek için yetiştiriliyorlar. Tencere içinde satılan çiçekli Noel gülü (*H. niger*), bu açıdan iyi bir örnektir [64, 65]. Diğer hellebore türleri de sert yaprakları nedeniyle popülerlik kazanıyor. *H. lividus*'un 45 cm'yi aşan yumuşak dekoratif yaprakları vardır. Üst yapraklarda ara sıra çok iyi aralıklı dişler bulunur. Rozetlerde düzenlenmiş üç yapraklı yaprakları ve gümüş

lekeleri olan koyu yeşil renkleri vardır. Şubatın Nisan ayına kadar bitki yeşil-kahverengimsi çiçek salkımına dönüşür. Çok belirgin beyazımsı damarlar ile koyu yeşil, kahverengimsi-pembe renkli çiçekleri bulunur [61]. *H. caucasicus*, Batı Gürcistan topraklarında yaygın olarak dağılan Yunanistan ve Kafkasya florasının endemik bir bitkisidir [66].

### 2.3 *H. orientalis*'in Morfolojik Özellikleri

*H. orientalis* Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) süs otu, çömlek bitkileri ve kesme çiçekleri olarak bilinir. Dağlık kesimlerde yetişen 30-40 cm yüksekliğinde, çok yıllık otsu ve rizomlu bir bitkidir [20,21].



Şekil 2.2. *H. orientalis* bitkisinin doğal ortamındaki görünüşü [67]

Çiçekleri 5 yapraklı ve küçük fincanımsı göbeğin etrafını çevrelerler. (Şekil 2.3). Çiçekler 7,5 cm'ye kadar uzanır ve çiçeklerin yukarı bakan formları bulunur [68]. Helleborus türünde periantın dış halkası (kaliks) renk, şekil ve büyüklük bakımından, 20-35 mm uzunlukta, hafif tırnaklı farklı sepallerden meydana gelmiştir. Periantın iç halkasını oluşturan çok sayıda (16-20) nektaryum küçük, tubular (huni şeklinde), iki dudaklı ve parçalardan oluşur. Stamenler spiral dizilişli ve çok sayıdadır. Çiçek eksenine göre dışa doğru yönelmiştir. Meyva bir kaç tohumlu folikül topluluğudur. Tek karpelli (apokarp) olup karpelin dikişi boyunca açılır. Plasentalanma ovüller karpellerin kenarına bağlıdır. Çiçek yaprakları dökülmeden aylarca kalabilir. *H. orientalis*' de başkaca gövde yaprağı bulunmaz. Gövdesinde, büyüklükleri az çok farklı olan brakteler bulunmaktadır. Bu türe ait bitkilerin, güzel çiçeklere ek olarak, çok dekoratif parlak yaprakları vardır. Türlerin bir kısmı,



çiçeklerle biten yapraklı saplardan oluşup doğrudan kökten yetişir. Yapraklar anatomik olarak incelendiğinde alt epidermada Helleborus (Ranunculaceae) tipi stomalar görülür. Rozet yaprakları tek, uzun saplı, pedal, 7-10 dar eliptik loblu ve parçaları geniş dişlidir. *H. orientalis* yapraklarının alt yüzünde bacilliform tüyler bulunur. Tohum 2-3 mm, kahverengi, 6 taneden fazladır (Şekil 2.3) [69].



Şekil 2.3. *Helleborus* bitkisinin kısımları [69]

Rizomları yatık vaziyette, siyah renkte 5-10 mm çapındadır. Kökler silindir biçimde gri-siyah renkli boyuna çizgili, 1-3 mm çapındadır. Yer altı kısımları, nişasta granülleri ve olizomları büyük miktarda metabolik olarak biriktirir. Rizom ekstraktlarının kardiyotoniksedatif, abartus ve aynı zamanda antioksidatif, antiinflumatuvar, antimikrobiyal aktiviteye sahip teröpatik ve farmokolojik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir [70].

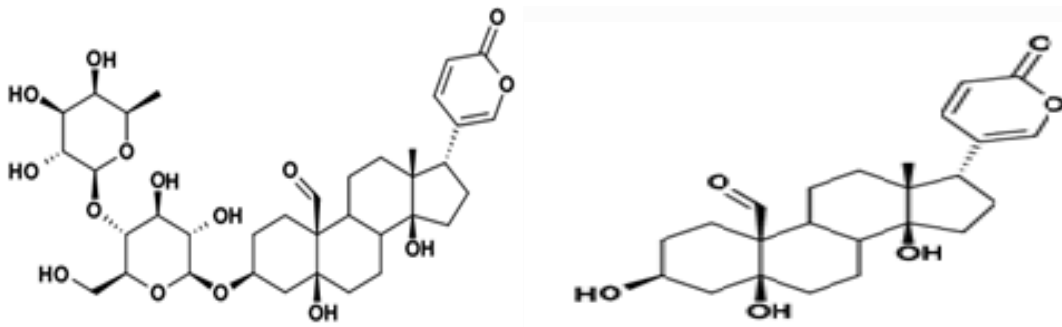
#### 2.4 *Helleborus spp.*'in Kimyasal Analizi

Son birkaç yılda farklı *Helleborus* türleri fitokimyasal çalışmaların konusu haline gelmiştir. Bitki özütlerinin biyokimyasal karakterizasyonu değerli ikincil üretim potansiyelleri metabolitler ve analitik gelişim nedeniyle daha hızlı gerçekleştirme fırsatı sunmuştur. Sırayla biyokimyasal içeriğini deşifre etmek için, farklı kimyasal analiz teknikleri kullanılmıştır. Bu analitik yöntemler TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), HPLC-MS (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi), RPHPLC (Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), GC (Gaz Kromatografisi) ve 1D ve 2D NMR

teknikleri ile çeşitli spektroskopik yöntemlerden COZY (İlişkili Spektroskopi), TOCSY (Toplam Korelasyon Spektroskopisi), ROESY (Döner Çerçeve Nükleer Overhauser Etkisi Spektroskopisi), HMQC (Heteronükleer Çoklu Kuantum Korelasyonu), HMBC (Heteronükleer Çoklu Bağ İlişkisi) kullanılmıştır.

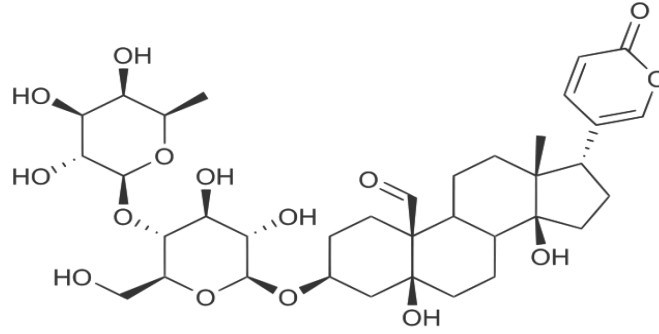
Helleborus cinsinin kimyasal bileşenleri ile ilgili olarak, lipitler ve yağ asitleri dahil olmak üzere birçok bileşik izole edilmiştir [71]. 1943 yılında Karrer ilk defa *H. niger*' den hellebrin olarak adlandırıldığı bir kardiyak glikozit izole etmiştir. 1970'lerde Helleborus türlerinden kardiyak glikozitler (hellebirin, D-glukohellebrin, steroidal saponinler, ekdisteroidler ve  $\alpha$ -laktomlar (proteomani)) tanımlanmıştır [72]. Helleborus türlerinin kökünde (helleborin, helleborein, hellebrin (Şekil 2.4)), alkoloitler (celliamin, sprintillamin, sprintillin), acı maddeler, yağ, reçine, akotinic asit, kalsiyum fosfat, bufadienolid glikozitleri ve steroidal saponinleri tesbit edilmiştir [23, 73, 74]. Aynı zamanda bu türe ait bitkilerin yaprak çiçek ve gövdesinde de helleborin, hellebrin, hellebrigenin ve helleborein maddeleri tespit edilmiştir [18].

Hellebirin yapısı 1995 yılında Muhr ve arkadaşları [75], 2D NMR tekniği kullanılarak yapılmıştır. En fazla *H. purpurascens* türlerinin kökleri ve rizomlarında izole edilen ve incelenen Helleborus'un en bilinen kardiyak glikozitidir [76]. 1976 yılında Helleborus türlerinden elde edilen sapogeninler ülserleri tedavi etmek için ABD'den patentlenerek tescillenmiştir. Bu doğal bileşik şimdiye kadar bildirilen çoklu bioaktivlik aralıklarını açıklayabilecek geniş yapısal çeşitliliğe sahiptir [77].



Hellebrin

Hellebrigenin



helleborin

Şekil 2.4. Helleborin, hellebrin, hellebrigenin kimyasal yapısı [72, 78]

Hellebrin, desglukohellebrin, hellebrigenin, bufatetraenolid ve spirostan-tip steroidlerin izleri *H. odorus*' un kökleri ve rizomlarından izole edilmiştir. Ayrıca, bu türlerden ilk kez  $\beta$ -ekdisteron ve 5B-hidroksisisteron izole edilmiştir [78,79]. Buzas ve diğerlerinin (1948) bulgularına göre [80], hellebrin bir bioside'dir ki, aglikon'un iki mol şekerle konjugasyonu teşkil edilmiş olup altılı lakton halkası bulundurulur. Diglukozid hellebrin (C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>O<sub>12</sub>)'e ayrılır. Bununda hidroklorik asit ile parçalanmasıyla 1-Rhamnose ve hellebrigenin (C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>) meydana gelir [79].

Karrer'e göre hellebrin helleborine göre daha fazla tesirlidir. Daha önce helleboreinin saf bir madde olmadığı anlaşılmıştır ve farmokolojik tesirlerini bildirmişlerdir [81]. Hellebrigenin ve helleboretin'in aynı olup helleborein'in fermantatif ayrışması sonucu meydana gelmiştir. Saponinglikozit helleborin (C<sub>28</sub> H<sub>36</sub> O<sub>6</sub>) suda erimez, kalbe tesir etmez, drasticum ve narcoticum'dur. Helleborus glikozitleri bitkinin kuruması ile kaybolmazlar, ancak devamlı kaynatmakla harap olurlar. Helleborus saponinleri hafif hemoliz yaparlar.

Keller ve Schöbel'e göre (1928), *H. viridis* köklerinde bundan başka % 0,1 - 0,2 celliamin (C<sub>21</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N, erime noktası 127-131 °C), sprintillamin (C<sub>28</sub> H<sub>45</sub>O<sub>4</sub> N, erime noktası 228-229 °C), sprintillin (C<sub>2</sub> H<sub>41</sub> O<sub>3</sub> N, erime noktası 141-142 °C) ve alkaloidler (C<sub>25</sub> H<sub>43</sub>O<sub>6</sub> N, erime noktası 267-268 °C)'de bulunur [82]. Bu bakımdan *H. viridis*, *H. niger*'den daha zehirlidir.

*H. purpurascens*'den kardiyak glikozitler, polifenolik bileşikler, flavonoidler, steroidal saponinler, alkaloidler ve helletiyoninler [83, 84], *H. caucasicus*'den steroidal bileşikler, steroidal glikozitler ve steroidal sapogenler [85, 86], *H. niger*'den indol-asetik asit

türevi [87], sitokininler [88], flavonoid glikozitler ve fenolik glikozit türevleri [89], *H. thibetanus*'tan spirostanol sülfonat [90, 91], bufadienolidler ve hellebrigenin [92], *H. viridis*'ten saponinler [93], furostanol saponinler ve kuersetin glikozitler [94], *H. foetidis*'dan açıl kuersetin glikozit [95], *H. torquatus*' dan steroid ve bufadienolidler [96], gibi doğal bileşiklerin izole edildiği rapor edilmiştir.

#### ❖ Fenolik Bileşikler

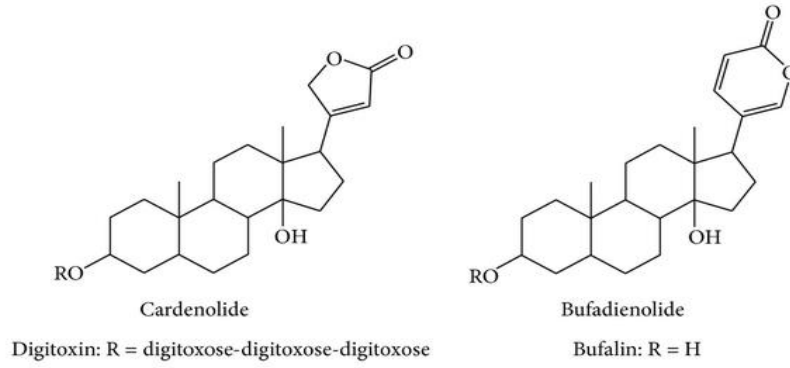
Fenolik bileşikler bitkilerde fazlaca bulunup zararlı böceklerle ve hayvanlara karşı bitkiyi korurlar. Bitkilerde bulunan fenolik asitler flavonoidler, isoflavonoidler, tokofereoller ve tanen fenolik bileşiklerdendir [97].

#### ❖ Glikozitler

Glikozitler bitkilerin gelişme dönemine, iklim ve gübreleme koşullarına göre değişebilmektedir. Glikozitler şeker ile karbonhidrat olmayan bir grubun ester bağları ile bağlanmasından oluşmuş, enzim veya seyreltik asitlerin etkisiyle şeker olmayan bir kısım ile bir veya daha fazla şeker molekülüne ayrılan bileşiklerdir [98]. Bazı glikozitlerin etkisi, hayvanların sindirim sistemindeki enzimlerin bu maddeleri hidrolize etmesi sonucu ortaya çıkmaktadır.

#### 2.4.1 Kardiyoaktif Glikozitler

Bitkilerde, hem monokotiledonlarda hem de angiospermlerde kardiyoaktif glikozitler keşfedilmiştir. Kardiyoaktif glikozitlerin terapötik etkisi aglikonun yapısına ve eklenen şeker birimlerinin tipine ve sayısına bağlıdır. İki tür aglikon bilinmektedir bunlar; kardenolidler (*Digitalis purpurea*'dan digitoksigenin - C23 bileşikleri) ve bufadienolidler (*H. niger*'den hellebrigenin- C24 yapıları)'dir (Şekil 2.5). Lakton halkası, kardenolidlerde beş üyeli ve bufadienolidlerde altı üyelidir. Kardenolidler yaygın maddeler olup, bu bileşikleri veren birkaç cinsi vardır. Bunlar *Strophanthus*, *Convallaria* ve *Digitalis*'dir [99].



Şekil 2.5. Kardenolid ve bufadienolidler [100]

Bufadienolidler,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPaz enzimini inhibe ederek kalbin kasılma gücünü arttıran önemli kardiyak glikozitlerdir [101]. Ayrıca hayvanlara karşı zehirli aktiviteler de gösterirler [102]. Bazı bufadienolidler antineoplastik ve hücre büyümesi inhibe edici özelliklere sahiptir [103].

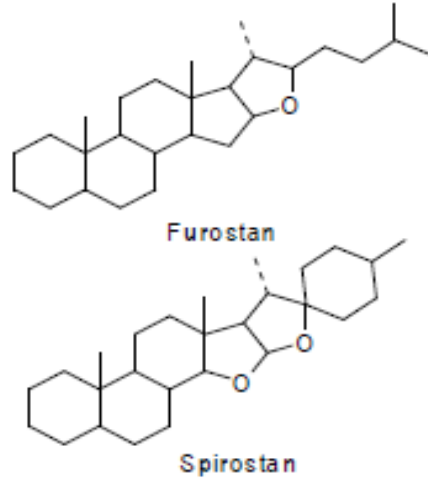
#### 2.4.2 Steroidal Saponinler

Sekonder metabolitlerden olan saponinler yüksek molekül ağırlığa sahip bir triterpenik (30 karbonlu) veya steroidal (27 karbonlu) çekirdek üzerinde şeker üniteleri taşıyan, bitkisel veya marin organizmalarda bulunan aktif bileşiklerdir [104].

1976'da ülserleri tedavi etmek ve ana sapogeninleri *Helleborus spp.* ABD Patenti (O.I. Bruchköbel, 1976, Helleborus'tan ana sapogenin içeren ilaç, 3,956,491 sayılı ABD Patenti) altında kaydedilmiştir. Bu doğal bileşikler sınıfı, şimdiye kadar bildirilen çoklu biyoaktivite aralıklarını açıklayabilecek geniş bir yapısal çeşitliliğe sahiptir [77].

Steroidal saponinlerin bazıları, bağışıklık düzenleyici, antihepatotoksik, antiviral ve antifungal aktivitelerin yanı sıra kansere bağlı aktiviteye sahiptir. Saponinler kardiyovasküler, merkezi sinir ve endokrin üzerinde önemli etkiye sahiptir. Antimutajenik, molusisidal, antihelmintik, kardiyovasküler, analjezik, antipiretik, adaptojenik, ekspektoran ve antitussif, hipoglisemik, hipokolesterolemik, antiviral, antibakteriyel, immunostimulan, anti-HIV, sitotoksik ve antitümör gibi aktivitelere sahip fungusidal ve pisisidal etkinlikleri çok iyi bilinen saponinlerin her geçen gün artan bilimsel çalışmalara konu olmuştur [105].

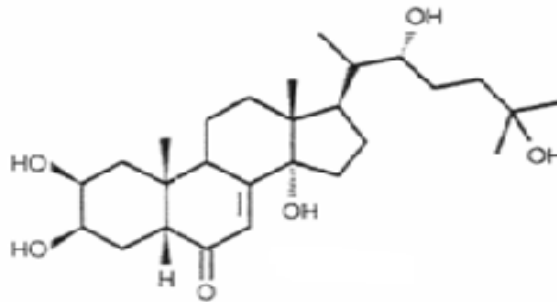
Aynı zamanda ilaç endüstrisinde kendine etken veya yardımcı madde olarak çok farklı kullanım alanları bulmuştur. Bitkiler âleminde saponinlerin genelde % 90'ı glikozit formunda (saponozit) bulunmaktadır. Örneğin, tümör inhibitörü olmalarından dolayı bazı saponinler, son zamanlarda farmakolojik olarak aktif anti-tümör moleküller olarak hedef durumuna gelmişlerdir. Helleborus türlerindeki saponoidlerin furostan ve spirostan iskelet yapıda olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *Helleborus spp.* içinde bulunan saponin iskeleti [100]

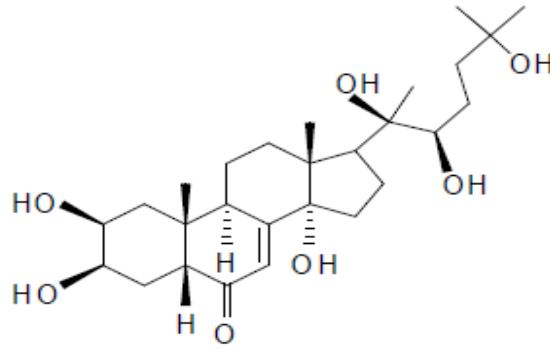
### 2.4.3 Ekdozonlar

Polar yapıya sahip olan ekdozonlar (Şekil 2.7) terpenoidler olarak sınıflandırılan bitki kökenli sterollerdir [99].



Şekil 2.7. Ekdozon [100]

Ekdisteroidlerin en büyük konsantrasyonu bitkilerin savunma mekanizmasında yer alan dokularda etki gösterdiği rapor edilmiştir. Böceklerle karşı koruyucu etki gösteren ve böceklerde tüy salgılayan hormonların aktivitesini bu yapılar gösterebilir. Bu nedenle böceklerde tüy dökülmesi bozulur, gelişim durur ve bunun sonucunda mortaliteye sebep olur [106, 107]. Fitoektisteroidlerin başlıca farmakolojik özellikleri, adaptif genetik ve antidepresif, hepatoprotektif bağlı olarak, kimyasal önleyici (kanserli tedavi), diyabet kontrolü, mantarlara ve bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstermesidir. Fitodesteroidlerin, ferns, gymnosperm ve angiospermeleri temsil eden 100'den fazla karasal bitki ailesinde meydana geldiği bildirilmiştir [108]. Ekdisteroidler ayrıca böcek ve kabuklu ailelerde de bulunabilir [109]. Helleborus türlerinden en sık bulunan ve en iyi türleri 20 hidroksi ekdisondur (Şekil 2.8).



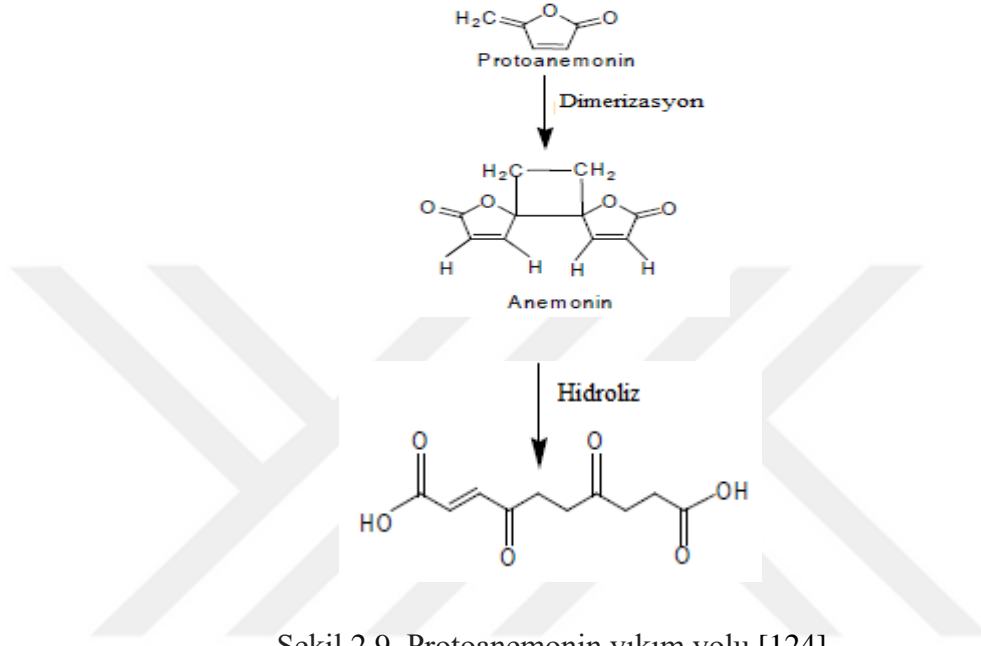
Şekil 2.8. 20 hidroksi ekdison [100]

#### 2.4.4 Protoanemonin

Protoanemonin hidrokspenta 2,4-dienik asitin zehirli bir  $\alpha$ -laktomudur [110]. Frohne ve İfander protoanemonini SH grupları için yüksek dereceli uçucu ve yağlı bir madde olarak tanımlamışlardır [111]. Protoanemoninler antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal ve antimutajenik etkiye sahip biyolojik aktif bileşikler olarak düşünülmektedir [112-116].

Bitki kurduğunda protoanemonin hava ile temasa girer ve toksik olmayan karboksilik asite hidrolize olmayan anomonine dimerleşir (Şekil 2.9) [117]. Hem anomonin hemde protoanemonin sakinleştirici etkisi vardır [118]. Anomonin ayrıca antispazmatik özelliğe sahiptir [119]. Anomoninler, sellülozozin aktivitesini inhibe eder ve insan

melanositlerinin mRNA ve protein seviyesini etkileyerek melanin sentezini inhibe ederler. Bu nedenle anomoninler hipopikmentasyonu sağlamak amacıyla kozmetik ajan olarak kullanılabilir [120]. Anomoninler indüklenebilir nitrikoksitsentaz ifadesini düzenleyerek nitrikoksit üretimini inhibe edebilir [121, 122]. Bu durum antiinflamatuvar etkinin nedenini açıklar [122, 123].



Şekil 2.9. Protoanemonin yıkım yolu [124]

Yeni kimyasal bileşikler *Helleborus spp.* ve pek çoğunun tıbbi araştırmalar için farmakolojik etkinliğinin olduğunu ve umut verici potansiyeli olduğunu göstermiştir.

## 2.5 Farmakolojik ve Terapötik Etki

Çeşitli hayvan modellerinde ve *in vitro* sistemlerde *Helleborus spp.* ekstraktları kullanılarak tam veya kısmi olarak farmakolojik ve terapötik etki çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda antimutajenik, kardiyovasküler, analjezik, antipiretik, antiviral, antibakteriyel, sitotoksik ve antitümör gibi etkiler göstermektedir.



### 2.5.1 Antiromatizmal ve Antiinflamatuvar Aktivite

Yapılan son çalışmalar Helleborus türlerinin hastalıkların yeni tedavilerinde kullanılabilecek doğal bileşikleri içerdiğini göstermiştir. Bu bitkiler uzun yıllardan beri ödem, arthritis ve ülser gibi değişik hastalıkların tedavisinde geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Aynı zamanda Balkanlarda uzun yıllardan beri ağrı kesici antiinflamatuvar ve veterinerlikte enfeksiyon hastalıklarına karşı ilaç olarak kullanılmaktadır.

Tıpta en fazla kullanılan *H. niger* Avrupadaki halk ilacı olarak geleneksel tıpa göre daha farklı alanlarda kullanılmıştır. Almanya'da *H. niger*, menenjit, konvülsiyonlar, hidrosefali, dropsy ve kaşeksi nedeniyle tümörlerde homeopati kullanılmış ve antroposervikal tıbbında tümör tedavisi için bir adjuvan olarak kullanılmıştır [125]. Ayrıca eklem ağrılarının giderilmesinde hapsurma tozu ve emetik olarak kullanılmıştır [110]. Paracelsus nigerin kurutulmuş yaprakları ile yapılan iksiri hastalarına uzun ömürlü yaşamaları için verdiği bilinmektedir [44]. Antibizans döneminde *H. niger*'in kalbi güçlendirmek için kullanıldığı, bunun yanısıra arterler ve sinirler üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinmektedir [53].

Kerek, ilk kez *H. purpurascens* kök ekstraktından yapılmış olan Boicil [6] adlı ilacın yararlı etkisini sunmuştur (V. Boici, 1977, Helleborus bitkisinden türetilen analjezik madde ve bunu yapma yöntemi, 4,012,505 sayılı ABD Patenti). Uzun romatizmal ağrıları tedavi etmek için Romanya'da başarıyla kullanılmıştır. *H. purpurascens* özleri, myorelaksan ve kan damarlarını düzenleyen kalıcı analjezik ve yüksek biyolojik aktivite sergilemiştir. İtalyan halk hekimliği, Helleborus hipogöz organlarının bir tozunun, sindirim, mide ve acı-tonik yardımı olarak içsel kullanımını bildirmiştir [126].

*H. orientalis*'de antiinflamatuvar aktivite ve antinosiseptif aktiviteyi belirlemek için bir p-benzokinonun neden olduğu abdominal daralma testini belirlemek için bir karragenan ile indüklenen arka paw ödem modeli kullanılarak farelerde test edilmiştir. *H. orientalis* köklerinin etanolik ekstraktlarının herhangi bir mide hasarı oluşturmadan antiinflamatuvar aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Hem alkol hem de sulu kök ve bitki özlerinin antinosiseptif aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [127].

*H. foetidus*, *H. niger* ve *H. viridis* sıtmanın tedavisinde kullanılmıştır [128]. Yunanistan'da diş ağrısı için *H. cyclophyllus*'u kullanılmıştır. *H. cyclophyllus*'un

yapraklarından çay yapılarak ses güçlenmesi için kullanılmıştır. İtalyanlarda yunanlılar gibi *H. foetidus* ve *H. bocconei*'yi diş ağrısı için kullanmışlardır. Türkiye'de *H. orientalis* kökleri de aynı amaç için kullanılmıştır [129-131]. Karadağ bölgesinde egzama, cilt kızarıklığı ve kaşıntı tedavisinde *H. odorus* kökleri kullanılmıştır. Helleborus türlerinde kullanılan glikozitler, alkaloidler ve speroidermlerin aktivitesinden sorumlu unsurlar olarak kabul edilmektedir [132]. Danimarkalılar halk tıbbında epilepsi ve kanvülsüyon tedavisinde sakinleştirici etkisi olan Hellebor yapraklarından çay yapıp kullanmışlardır [133]. İtalya'da *H. foetidus* ve *H. viridis* domuz, koyun, inek katır ve eşek enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. *Pneumoniae*'nin teşhisinde bitkinin kök parçalarını kullanmışlardır. Bunun için supkutan kesiğe kök parçası ekleyip, ertesi gün kesikler şişerse hayvanın hastalandığı görülmüştür [130, 134].

Pakistanda veteriner hekimler *H. niger*'in ezilmiş yapraklarını antihelmintik olarak kullanmışlardır [135]. *H. foetidus* ve *H. viridis*, *Monophadnus spp.* larvalarının hemolifinde, bitki hücrelerine kıyasla 200 kat daha yüksek konsantrasyonda olduğu bulunmuştur. Bu durum bu bileşiğin olası böcek yırtıcılarına karşı *Monophadnus* larvalarını koruduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bazı böcekler için bu bitkide bulunan özel kimyasalların böcek avcılarına karşı kullanıldığıda görülmüştür [136].

## 2.5.2 İmmünomodülatör Aktivite

Bağışıklık sistemini etkileyen immunomodülatör maddeler bu sistem üzerinde uyarıcı ve baskılayıcı etkiler göstermektedir [137]. Son zamanlarda non spesifik immunomodulatörler başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etkiler göstererek mikrobiyal, sentetik ve endojen kaynaklı olabilir [137, 138].

*Helleborus spp.*'nin daha önce hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmasında, immünoestimülatör etki gösterdiği gözlemlenmiştir. *H. purpurascens*'in köklerinden elde edilen ekstraktla koyunlarda gelişmiş bir bağışıklık yanıtı olduğu bildirilmiştir [139]. Zayıf hemoliz ve spesifik olmayan savunma mekanizmalarının hızlı aktivasyonu, *H. odorus* kök ve rizom ekstraktlarını farklı konsantrasyonları, deri altına intraperitoneal ve intramüsküler uygulamasının yapıldığı rapor edilmiştir [140]. Helleborus ekstraktlarının bu sonuçları, hayvanlarda non spesifik immün yanıtını tetikleyebilir [141].

*Helleborus spp.*'nin yeni kimyasal varlık olarak sınıflandırılan *H. purpurascens* köklerinden ekstrakte edilen ve saflaştırılan çoklu anyonik bileşik olan MCS-18 (makrosiklik karbon suboksit) (NCE) ve bitki kaynaklı [142], Na, K-ATPaz ve SR Ca-ATPaz'ın oldukça güçlü bir inhibitörü olarak karakterize edilmiştir [143, 144]. MCS-18 karmaşık bir yapıya sahiptir ve son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bağışıklık düzenleyici sitokin İnterlökin-10 ve büyüme faktörünün regülasyonunu indükleyici özelliğe sahiptir [145].

### 2.5.3 Antioksidan Aktivite

Antioksidan, hedef molekülün oksidasyona uğramasını geciktiren veya önleyen güçlü bir substrattır. Antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikallerin kimyasal reaksiyonlarının bir sonucu olan hücresel bileşenlerin hasarını engellemektir. Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu engelleme ve serbest radikalleri süpürme yoluyla sebep oldukları doku hasarını engellerler.

Hücresel metabolizmanın ürünlerinden olan ROS (reaktif oksijen türleri), hücre sinyallemesi, homeostaz ve apoptosis, konak savunma genlerinin aktivasyonu ve iyon transport sistemlerinin mobilizasyonu gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Yüksek derecede reaktif oksijen türleri, radikal ve nonradikal yapıyı sunan moleküller (süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^-$ ), tekli oksijen ( $O_2$ )) veya iyonlardır. Bu ara maddeler, oksidatif biyokimyasal reaksiyonlar ve dış faktörlerin bir sonucu olarak hücrelerde sürekli olarak oluşur [146, 147]. Hücreler normal olarak ROS hasarına karşı kendilerini savunabilir ve bu karmaşık süreç farklı molekül tiplerini (enzimler, süperoksit dismutazlar, katalazlar, laktoperoksidazlar, glutatyon peroksidazlar ve peroksiredoksinler), küçük hücresel antioksidanları (askorbik asit, tokoferol, ürik asit ve glutatyon) ve ısı şok proteinlerini içerir [148]. Örneğin; katalaz ve süperoksit dismutaz, hidrojen peroksit ve süperoksitin bu bileşikleri oksijen ve suya dönüştürerek zararlı etkilerini iyileştirir [149]. ROS bağışıklık sistemi işleyişinde önemli bir role sahiptir. UV, ısıya maruz kalma, ilaçlar, gıda ürünleri vb. gibi stres uyarıcıları, ROS seviyelerini önemli ölçüde artırır. Bu, hücre yapılarında önemli hasar değişikliklerine yol açabilir. Örneğin; DNA lipitlerde polidoyunmuş yağ asitlerinin zararları, oksidasyonu, proteinlerdeki amino asitlerin oksidasyonu,

ko-faktörlerin oksidasyonu ile oksidatif olarak inaktive edilmiş spesifik enzimlerdir [150, 151]. Bu durum “oksidatif stres” olarak bilinir [152]. Reaktif oksijen türlerini regüle etme yeteneğine sahip bileşikler önemlidir. ROS'un üretimini veya etkilerini azaltmak için terapötik müdahale, tedavi edici müdahale, doğal veya sentetik antioksidanlarla tedaviyi içerir. Serbest radikal aracılı hastalıkların önleyici müdahalesi, ROS'un güçlü temizleyicilerine ihtiyaç duyar [153, 154]. Pek çok bitki, insan vücudundaki fazla serbest radikalleri temizlemek için kullanılabilir vitaminler, karotenoidler, flavonoidler gibi önemli miktarda antioksidan içerir [155]. Doğal antioksidanların potansiyelini ortadan kaldıran serbest radikaller, hastalıklar ve antioksidan türleri arasında değişmektedir [156]. Bitki kaynaklı doğal antioksidanlar, oksidatif hasar sürecini yavaşlatan bir koruma önlemi sağlarlar [157].

*H. purpurascens*'den beş aşamalı olarak saflaştırılmış MCS ürünleri, ROS üretiminin olası antioksidanları ve modülatörleri olarak test edilmiş ve insan polimorfonükleer granülosit hücrelerinde serbest bırakılmıştır. MCS-Dx fraksiyonlarından birinin, güçlü bir ROS temizleyicisi olduğu kanıtlanmış ve antioksidan tedavide adjuvan olarak kullanılabilir hale gelmiştir [158]. Ultrafiltrasyon ile konsantre edilen basit bir sulu veya hidroalkolik özütün bile yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Hidrofobik ekstraktının DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) inhibisyon değeri, en yüksek antioksidan aktivitesini % 79'nu gösterirken, konsantre sulu ekstrakt, % 73 DPPH inhibisyonu göstermiştir [159].

Arakar ve arkadaşları (2011), *H. odoratus*'un kök ekstraktlarının yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [160]. Bu araştırmacılar aynı zamanda *H. multifidus* ve *H. hercegovinus* yaprak ekstraktlarında yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. *Helleborus spp.*'de bulunan ve antioksidan olduğu kanıtlanan diğer bir bileşik, suda çözünebilir antioksidanlar, klorpromazin ve emoksipin ile aynı şekilde florid ile uyarılmış bir solunum patlaması modülatörü olarak görev yapan bir ekdisteroid olan 20 hidroksindir [161]. Tek başına veya sinerji içinde hareket eden 20 hidroksin antioksidan aktiviteden sorumlu olabilir.

#### 2.5.4 Antimikrobiyal Aktivite

*Helleborus spp.*'nin hayvanlarda bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için birçok alanda kullanılmasına rağmen, bu türlerin bazılarının antimikrobiyal aktiviteleri taranmamıştır. Bu yönüyle ilgili sadece birkaç çalışma bulunmuştur [162, 163]. *H. bocconei* kök ekstraktlarının solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizma suşlarına (*Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922, ve *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637), karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir. Bunlar kök metanolik ekstraktı ve bufadienolid fraksiyonu, *Moraxella catarrhalis'e* (0.2, 0.1) ve *Streptococcus pneumoniae'ya* (0.4, 0.1) karşı en düşük MİK değerlerini (100 µg/ ml) göstermiştir [162]. Ayrıca bilimsel olarak *H. orientalis* ekstraktlarının *Staphylococcus aureus'a* karşı polimiksin B kadar antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [20, 21]. İran bitkisel bitki ilacını kullanan *H. niger*'in metanolik ekstraktının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelenmiş ve *Candida albicans* ve *Candida utilis'e* karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir [164]. İran halk tıbbında kullanılan *H. niger*'in kök metanolik ekstraktı, klotrimazol dirençli *Candida albicans'a* karşı antikandidal aktivite göstermiştir [165]. *H. purparances* köklerinin domuzlarda ve koyunlardaki enfeksiyon hastalıklarında kronik ağız hastalıklarında transkutanöz implantasyon olarak kullanılan antiinsülinasyon ve antibakteriyel etkilerine dayanarak tedaviler yapılmıştır [141, 166 ]. Sicilya'da *H. bacconei* kökleri pneumoniae teşhisi içinde kullanılmıştır [167, 168].

#### 2.5.5 Sitotoksosite ve Antikanser Özellikler

Helleborus türlerinin toksisitesi olduğu düşünülse de yanlış doz kullanılmasından kaynaklanmıştır. Helleborusun birçok türü içerdiği kimyasal bileşikler ile kanser inhibisyonu ve sitotoksitede başarılı sonuçlar vermiştir. Aynı zamanda bu türler antikanser ilaçları için potansiyel kaynaklar olarak görülmektedir [169].

Helleborustaki toksisite kardiyaksteroidlerin aklikonları tarafından belirlenir. Fakat  $\alpha$ -laktom olan protoanemoni ve kardiyooktif steroidlerde toksik bir birleşiktir. Kardiyooktif

steroidlerin yol açtığı zehirlenmede öncelikle ciddi gastrointestinal lokalizasyon, kusma, diare ve tahriş görülür [170, 171]. Proteanomin ile zehirlenme çoğunlukta hayvanlarda ortaya çıkar ve kusma ile başlar. Bunu şiddetli karın ağrısı takip eder. Bu durum sindirim sistemi ve idrara etki eder. Ağır zehirlenmelerde renkli ishal, idrarda koyulaşma, yürüyüş bozuklukları ve baş dönmesi görülür [172, 173]. Pretoanomin SH grupları içerir ve enzimlerin inaktivasyonuna sebep olduğu için toksik etkiye sahiptir. Merkezi sinir sistemi üzerine akut toksisite etkileri hemodinamik değişikliklerden kaynaklanmayan laterji, konfüzyon ve güçsüzlük içerir. Helleborus zehirlenmelerine bağlı kronik toksisiteyi teşhis etme ve kesinleştirme zordur. Bu anoroksi kilo kaybı, nöropsikiyatrik rahatsızlık, (uyuşukluk, baş ağrısı, kafa karışıklığı vb.) görme bozuklukları ile belirlenebilir. Buna kardiyak bulgular arasındaki kalp ritim bozukluğuda eklenebilir [170].

*H. cyclophyllus* ekstraktının sitotoksik etki göstermediği, ancak antitümoral potansiyele sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bir başka tür olan *H. caucasicus* sitotoksik aktivite göstermiştir. Kök ve rizomun alkollü ekstraktları insan akciğer kanserine (A-549), insan kolorektal kanserine (DLD-1) ve normal deri fibroblastlarına (WS1) karşı test edilmiş ve bunların sitotoksik dozunun oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (0.002 µg / ml) [66].

*H. bocconei* intermedius köklerinden elde edilen ekstraktlar fare C6 glioma hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermiştir. Üç izole bileşik olan, hidrolize bir helleborosid B, bir furospirostanol saponin ve polipodin B, hücre büyümesinin % 60-70 inhibisyonunu kaybeden önemli sitotoksik aktivite göstermiştir [174]. Benzer bir çalışmada, *H. odorus*, *H. multifidus* ve *H. hercegovinus*'un kök ekstraktları, aynı türün lenfoma hücre dizilerinin büyümesini inhibe etmede yaprak ekstraktından daha verimli olduğu kanıtlanmıştır. En güçlü antiproliferatif aktivite, *H. multifidus* ve *H. hercegovinus*'un kök ekstraktları için % 50,14 ve % 49,04'lük lenfoma hücre çizgileri büyümesini inhibe etmiştir [160]. Hellebosaponin C, spirostanol glikozit ve *H. orientalis*'in rizomlarından izole edilen bir başka iki furostanol glikozit, insan oral skuamöz hücre karsinomasına karşı orta düzeyde bir sitotoksik aktivite sergilediği gösterilmiştir [10, 175]. *H. thibetanus*'un rizomlarında bulunan iki yeni bufadienolid (tigencaside A, B), insan kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite açısından test edilmiştir. Testte edilen hücre çizgileri üzerindeki tigencaside A'nın inhibitör konsantrasyonlarının değerleri 105,23- 253,12 µg/ml arasında değiştiği ve tigencaside B değerlerinin de 56,54-86,45 µg/ml arasında olduğu bulunmuştur [90]. *H. purpurascens* sulu

ekstraktı ve *H. purpurascens* hidroalkoloik ekstraktının potansiyel sitostatik ve sitotoksik etkileri yakın zamanda Vochita ve arkadaşları (2011) tarafından değerlendirilmiştir [176]. Toplam ve parçalanmış polifenolik bileşikler, *H. purpurascens*'in köklerinden ve rizomlarından ekstrakte edilmiş ve HeLa kanserli hücreler üzerinde test edilmiştir. 0,45 mikron HFE'nin mikrofiltratı, 30,000'da ilk ultrafiltratın nüfuzu, 10.000'da ikinci ultrafiltrat konsantresi, 10.000'de ikinci ultrafiltratın nüfuzu olarak test edilen biyopreparasyonlar % 90'ın üzerinde değerler ile çok güçlü bir sitostatik etki göstermiştir. Toplam sulu ekstrakt, 30,000'de birinci ultrafiltratın nüfuzu, 3.000'de üçüncü ultrafiltratın konsantresi, 3.000'de üçüncü ultrafiltratın nüfuzu gibi diğer biyopreparasyonlar, tümör hücresinin % 59,46 ve % 67,80 arasındaki inhibisyonunu indüklemiştir. *H. purpurascens*'te bulunan peptid sınıfı tümör terapisinde potansiyel immünotoksinler olarak önerilen tiyoninlerin sitotoksitesisi, potansiyel bir uygulamanın gelişmesine yol açmıştır. Bu uygulamalar ile antitümör tedavisinin desteklemesi beklenen tümöre özgü antikörlerle tiyoninlerin hedeflenmesi sağlanmıştır [53].

Kerek (2010) tarafından, hellethioninlerin antikanser özellikleri bildirilmiştir [177]. Tek başına veya birbirine bağlı olarak hareket eden hellethioninler, farklı kanser hücre dizilerinde proliferasyonu inhibe etmişlerdir. Hellethionin C, çok düşük konsantrasyonda (2 µg / ml), MFC-7 hücre çizgisinde proliferasyonun net bir şekilde önlenmesine neden olur. Hellethionin C ve hellethionin D, 100 µg / ml'lik bir konsantrasyonda, kolon kanseri hücre çizgi kültürü 205'i, güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. 100 µg/ml'de MCS-18 ile kombinasyon halinde 50 µg/ml olan Hellethionin C, % 66 ile kolon kanseri hücre çizgi kültürü 205'in büyümesini engeller. 100 µg / ml konsantrasyonda hellethionin B, hellethionin C ve hellethionin D'nin bir karışımı da bir akciğer karsinom hücre hattının (% 50) büyümesini engelleyebilmiştir. Yakın zamanda kaydedilmiş bir başka patentte, hellebrin, hellebrigenin ve sentetik organik kimyadan başlayarak yeni kardiyak steroidlerin elde edilmesi için yöntemleri tarif etmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda 21 yeni hellebrin ve hellebrigenin türevleri genel toksisite ile sitotoksik aktiviteyi azaltmıştır. Bu bileşikler, *in vitro* sitotoksitesite testlerinde altı insan kanseri hücre hattına karşı test edilmiş ve bu bileşiklerin birçoğu, nanomolar aralıkta inhibisyon konsantrasyon değerleri ile çok güçlü *in vitro* antitümör aktivite göstermiştir. Bu yüzden bu bileşikler kanser tedavisi için ilaç olarak önerilmiştir. Kansere karşı potansiyel bileşik seçiciliğini araştırmak için iki normal fibroblast hücre çizgisi kullanmışlardır [178]. Hellebrin ve hellebrigenin türevlerine karşı

seçiciliğini işaret etmiştir. Çok değerli kimyasal bileşiklere sahip olan *Helleborus spp.*'nin geniş bir farmakolojik ajan ve biyoaktif moleküller için potansiyel havuzlar olduğunu göstermiştir. Bir DNA dengesizleştirme riski elde etmek için *H. niger*'in sulu ekstraktları test edilmiştir. DNA hasarını tespit etmek için Kardeş Kromatit Değişim testi kullanılmıştır. Sonuç olarak *H. niger* sulu ekstraktının immünmodülatör özelliklere sahip olduğunu ve DNA dengesizleşmesinin hafif etkilerini gösterdiklerini ve insan periferik kan mononükleer hücreleri üzerinde bir mutajenik etkiye sahip olabileceğini bulmuşlardır. Ayrıca, lösemi hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptoza neden olan etkiler de tanımlanmıştır [179]. *H. niger* ekstraktları hematolojik maligniteleri içeren *in vitro* testler için kullanılmıştır. Hücre çoğalmasının engellenmesi, mitokondriyal yol ve kaspaz-3 işlemi yoluyla spesifik apoptoz indüksiyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Lenfoma, lösemi ve melanom hücrelerinde apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. Bir lenfoma hücre hattına 0,75 mg/ml *H. niger* özü konsantrasyonu eklendiğinde, proliferasyon oranının % 96,5'ne kadar bir inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Lenfoma hücre kültürüne bir sitostatik ilaç olan vinkristin eklendiğinde de birbirine bağlı etkiler gözlenmiştir. Melanom hattındaki apoptoz Bcl-2 proteinin aşırı ekspresyonu ile ilişkili olsa da, *H. niger* ekstraktına karşı duyarlılık kaydedilmiştir [8]. *H. niger*'in geleneksel kullanımlar dışında kanser, lösemi, lenfoma gibi hastalıklarda tedavi edici özelliğini araştırmışlardır. Bunun için suda çözülmüş Noel Gülü ekstraktı insanlardan alınan çeşitli kanser hücrelerine verilmiş ve Noel Gülü ekstesinin sağlıklı hücrelere dokunmadan kanserli hücrelere nüfuz ederek bu hücrelerin kendi kendilerini imha etmesine yol açtığı görülmüştür.

Danakıran (*H. orientalis*), erken ilkbaharda merada otun bol olmadığı zamanda genç hayvanlar tarafından yanlışlıkla tüketilerek, küçük ve büyükbaş hayvanlarda ağır zehirlenmelere yol açmaktadır. *H. foetidus*'un kökleri vajinaya uygulanarak düşük oluşması sağlanmıştır [180]. *H. foetidus* anti-böcek ve zehirli aktivite göstermiştir [5].



## 2.5.6 Mikropropagasyon ve Genetik Dönüşüm

Son zamanlarda Helleborları *in vitro* yetiştirip bunları incelemek ve özelliklerini kullanmak, yeni yöntemler bulmak için daha kolay olmuştur. Mikropropagasyon, kallus kültürü, hücre süspansiyonu kültürü veya somaklonal varyasyondan oluşan *in vitro* teknikler, sekonder metabolitlerin üretimini artırabilir. Generatif çoğaltım sınırlıdır, çünkü tohumlar ana bitkilerden yayıldıktan sonra birkaç ay filizlendirmek gerekir. *H. niger* tohumları, ilkel embriyolar ile ısınma ve üreme döngüleri ile parçalanabilen derin, basit, morfo-fizyolojik bir uyusukluğa sahiptir [181]. Smulders ve Klerk (2011), aynı kaynağa sahip 4 farklı Helleborus çeşitinin, yeni alt kültürler sırasında yeni çeşitlerin üretiminde ve yeni kimyasal bileşiklerin sentezlenmesinde kullanılacak bir özellik olarak değiştirilmediğini bildirmişlerdir [182]. Bu yeni önemli kimyasalların izolasyonu ve tanımlanmasından sonra, bu potansiyeli kullanmanın bir sonraki adımı, moleküler tarım olacağı gösterilmiştir. Yeni özelliklere sahip genetik olarak yapılandırılmış bitkiler, böcek saldırısına ve gelişmiş yabancı ot kontrolüne karşı ekstra direnç gösterebilir veya büyük miktarda farmasötik olarak aktif bileşik üretebilir. Bilgisayar tabanlı analiz, doğal ürünlerin, kombinatoriyal sentez için sistematik olarak kullanılabilen, moleküler çerçevelerin ve iskelelerin dikkate değer yapısal çeşitliliğini sergilediğini ortaya koymuştur. Doğal ürünler, benzersiz moleküler çerçeveler ve arzu edilen ilaç benzeri özelliklerden oluşan zengin bir havuz sunar ve bunları moleküler tasarım açısından ideal başlangıç noktaları haline getirir [183]. Hedeflenen ilacın köklerde yer aldığı ve tohumların çimlenme oranının düşük olduğu, Helleborus gibi bitkiler söz konusu olduğunda, sürdürülebilir çoğaltmanın daha iyi bir seçenek olabileceği düşünülmektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 *H. orientalis* Temini

Çalışmada kullanılan bitki materyali örnekleri (Resim 3.1), 10 Nisan 2017 tarihinde Giresun Piraziz civarında (Enlem 40.924°- Boylam 38.128°- Yükseklik 290 m) (Bkz Harita 3.1) [184] Uşak Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu Dr. Öğretim Üyesi İbrahim Bulduk tarafından temin edilerek, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Prof. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından teşhis edilmiştir. Herbarium adı ve kayıt numarası AKU-9324'dır.

Harita 3.1. Çalışmada kullanılan bitki materyali örneklerinin toplandığı bölge





Resim 3.1. *H. orientalis* bitkisinin (a; gövde b; yaprak ve çiçek, c; kök) kısımları

### 3.1.2 Mikrobiyolojik Çalışmalarda Kullanılan Suşlar

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için kullanılan bakteri ve maya suşları (*Streptococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, *Klebsiella pneumoniae* NRLLB 4420, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida glabrata*) Uşak Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

### 3.1.3 Çalışmalarda Kullanılan Besiyerleri

#### Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck)

Et infüzyonu	2,0 g/L
Kazein hidrolizati	17,5 g/L
Nişasta	1,5 g/L
Agar	13,0 g/L.
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121° C’de 15 dakika steril edildikten sonra antimikrobiyal aktivite analizi için kullanılmıştır.

### **Nutrient Broth (NB) (Merck)**

Etili pepton	5,0 gr/L
Et özü	3,0 gr/L
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra minimum inhibisyon konsantrasyonunu belirlemek için ve antimikrobiyal aktivite için kullanılmıştır.

### **Nutrient Agar (NA) Merck**

Etili pepton	5,0 gr/L
Et özü	3,0 gr/l
Agar	5,0 gr/L
Distile su	1000 mL

Otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra antimikrobiyal aktivite analizi için kullanılmıştır.

### **3.1.4 Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler**

#### **❖ Ekstraksiyon İşlemi için Hazırlanan Çözelti**

700 mL saf metanol içerisine 300 mL deiyonize su eklenip çözündürülerek %70’lik metanol hazırlanmıştır.

#### **❖ Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler**

100 mg gallik asit tartılarak 100 mL metanol içinde 1000 ppm’lik gallik asit standart çözeltisi hazırlanarak toplam fenolik madde miktarı tayininde standart eğrinin oluşturulmasında kullanılmıştır. 7,5 gr sodyum karbonat 1 L distile su içinde çözündürülerek sodyum karbonat solüsyonu hazırlanmıştır.

### ❖ **Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi için Kullanılan Çözeltiler**

100 mg kuersetin tartılıp 100 mL metanol ile seyreltilerek kuersetin standardı hazırlanarak toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için standart eğrinin oluşturulmasında kullanılmıştır.

5 gr NaNO<sub>2</sub> tartılıp 100 mL distile su içinde çözündürülerek, % 5'lik sodyum nitrit (NaNO<sub>2</sub>) çözeltisi hazırlanmıştır. 100 mL distile su içine 4 gr NaOH eklenerek sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanmıştır. 10 gr AlCl<sub>3</sub> tartılıp 100 mL distile suya tamamlanarak % 10 alüminyum klorür çözeltisi hazırlanmıştır. % 5 NaNO<sub>2</sub>, NaOH çözeltisi ve % 10 AlCl<sub>3</sub> toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi deneyinde kullanılmıştır.

### ❖ **Fenolik Asitlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizi**

1000 mL distile suyun içerisine 200 µL trifloroasetik asit eklenip karıştırılarak Mobil faz A solüsyonu hazırlanmıştır. 1000 mL metanol içerisine 200 µL trifloroasetik asit eklenip karıştırılarak Mobil faz B solüsyonu hazırlanmıştır.

### ❖ **Commet Assay ile DNA Üzerine Etkisi için Hazırlanan Çözeltiler**

#### • **% 1'lik NMA (Normal Erime Agoroz)**

NMA 0,02 gr/L

1X PBS 2 mL

0,02 gr NMA tartılarak 1X PBS ile bir cam tüp içerisinde berraklaşınca kadar kaynatıldıktan sonra 50-60 °C'ye kadar soğuması beklenmiştir. Bu sırada lamalar 50 °C'de tutulmuştur. Rodajlı slaytlar 50 °C'ye ayarlanmış hotplate'in üzerine yerleştirilmiştir. NMA çözeltisinin sıcaklığı ile lamaların sıcaklığının eşit olması sağlanmıştır. Ardından NMA lamlara 90-100 µl (45'lik açı ile bir lam ile sürme preparat şeklinde) olacak şekilde yayılarak comet deneyinde kullanılmıştır.

#### • **% 0,8'lik LMA (Düşük Erime Agaroz )**

LMA 0,016 gr

1X PBS 2 mL

0.016 gr LMA tartılarak 1X PBS ile bir cam tüp içerisinde berraklaşmaya kadar kaynatıldıktan sonra 37 °C'ye kadar soğuması beklenmiştir. Daha sonra lamlara yayılma işlemi yapılarak comet deneyinde kullanılmıştır.

- **10X PBS (Fosfat Buffer Solüsyonu)**

Çizelge 3.1. 10X PBS içerisinde bulunan kimyasal maddeler

Kimyasal içerik	50 mL
NaCl (Sodyum klorür)	4 gr
KCl (Potasyum klorür)	0,1 gr
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> P (Potasyum fosfat monobazik)	0,1 gr
HN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P (Disodyum hidrojen fosfat)	0,575 gr
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl, MV=157,6 (Trizma hidroklorür)	1,6 gr

Maddeler bir miktar distile su içerisinde çözülerek 50 mL'ye tamamlandıktan sonra pH 7,4 ayarlanmıştır. Çalışmada 1X PBS kullanılmış olup her çalışmadan önce 1X'lik çözelti taze olarak hazırlanmıştır (1mL stok PBS +9 mL dH<sub>2</sub>O ).

- **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Çözeltisi**

102 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9898 µL 1X PBS ile 0,1 M 10 mL'lik çözelti hazırlanmıştır. Bu solüsyondan 200 µL alınıp 9800 µL 1X PBS ile 200 µM 10 mL'lik çözelti hazırlanmıştır. Bu çözülden de 200 µL alınıp 800µL 1X PBS ile 40 µM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlanmıştır.

- **Lizis Çözeltisi**

Çizelge 3.2. Lizis çözeltisi için gerekli kimyasallar

Kimyasal içerik	150 mL
2,5 M NaCl	22,05 gr
100 mM EDTA (Disodyum etilendiamin tetraasetat dihidrat) C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,58 gr
10 mM trizmabase	0,18 gr

Maddeler tartılıp bir miktar distile su içerisinde çözündürülerek hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır. Lizis solüsyonu hücre ve çekirdek zarını eriterek DNA sarmallarının agaroz içinde serbest kalmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

- **Elektroforez Tampon Çözeltisi**

Çizelge 3.3. Elektroforez tampon çözeltisi için gerekli kimyasal maddeler

Kimyasal içerik	1200 mL
Soğuk distile su	1000 mL
300Mm NaOH (Sodyum hidroksit)	14,4 gr
1Mm EDTA (Disodyum etilendiamin tetraasetat dihidrat) C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O, MW=372,24	0,432 gr

1000 mL soğuk distile suyun üzerine 14,4 gr NaOH ilave edilmiştir. NaOH tamamen çözündükten sonra 0,432 gr EDTA eklenmiştir. EDTA'da tamamen çözündükten sonra pH> 13 ayarlanarak son hacim 1200 mL'ye tamamlanmış olup elektroforez tampon çözeltisi hazırlanmıştır. DNA'ların bu tampon çözelti içerisinde yürütülmesi işleminde kullanılmıştır.

- **Nötralizasyon Tampon Çözeltisi**

Çizelge 3.4. Nötralizasyon tampon çözeltisi için gerekli kimyasal maddeler

Kimyasal içerik	1000 mL
Distile su	800 mL
NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> MW=121,14 Trizmabase	48,5 gr

Trizmabase 800 mL'de suda çözündürüldükten sonra pH 7,5'e (HCl seyreltilmeden yaklaşık 30 mL ilave edilmiş) ayarlanarak son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Alkali tampon çözeltisini slaytlardan uzaklaştırmak için slaytları yıkama amaçlı olarak nötralizasyon tamponu kullanılmıştır [185-188].

- **Boyama solüsyonu**

Stok olarak 10 mg etidyum bromür 50 mL distile su içinde çözdürülmüştür. +4 °C'de saklanan çözelti alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Çalışma solüsyonu olarak 1 mL stok etidyum bromürden alınıp üzerine 9 mL distile su ilave edilerek çözdürülmüştür.

Alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında saklanmıştır. Floresan boya olan etidyum bromür lamların üzerine damlatılarak DNA boyama işlemi için kullanılmıştır [189].

### 3.1.5 Cihazlar

Çizelge 3.5. Cihazlar, marka ve modelleri

Cihaz	Marka model
Ultrasonik Su Banyosu	Wisebath marka
Santrifüj	Awel MF20-F20
UV-Spektrofotometre	Shimadzu marka, UV-100 240V model
Etüv	Heating Incubator marka, DHP-9052 model
Vortex	Scilogex marka, MX-S model
FTIR	Perkin elmer marka; Spectrum two model
LC-Mass	Agilent marka;6460 TripleQuad model
HPLC	Agilent marka; Infinity model
Hassas terazi	Mettler Toledo marka; ME203 model
Hotplate	Prowhite marka
Elektroforez	Cleaver marka (CSL-COM20)
Mikroskop	Bap/TAM/F
Orbital çalkalayıcı	Biosan (ES-20)
ICP-MS	Thermo (İcap Q)
Elisa	Termo Scientific



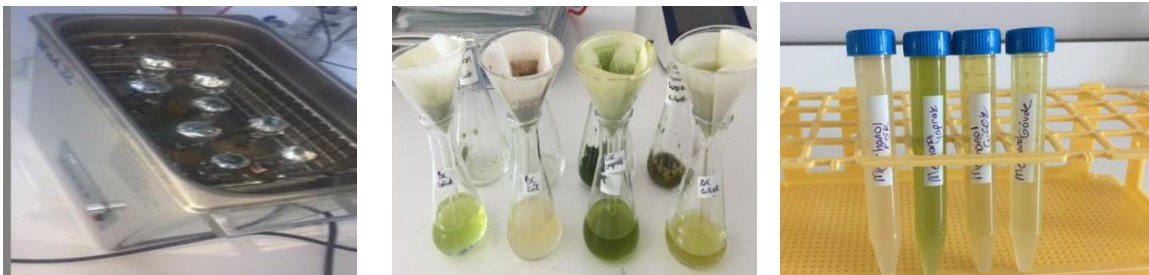
## 3.2 YÖNTEM

### 3.2.1 Bitki Materyalinin Tür Tayini

Türkiye'deki yaygın adı çöpleme olan *H. orientalis* (Ranunculaceae), Giresun Piraziz civarında (Enlem 40.924°- Boylam 38.128°- Yükseklik 290 m) tepelik alanların çalılıklarında yetişmiştir. Bu bitki Uşak Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksek Okulu Dr. Öğretim Üyesi İbrahim Bulduk tarafından 10.04.2017 tarihinde temin edilmiştir. Bitkinin teşhisi Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Prof. Dr. Mustafa Kargıoğlu tarafından “Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası” adlı eserinden [190, 191] faydalanılarak, 12.04.2017 tarihinde teşhis edilmiştir. Türkçe isminin belirlenmesinde, “Türkiye Bitkiler Listesi (Damarlı Bitkiler)” adlı esere [192] bakılmıştır. Herbarium adı ve kayıt numarası AKU-9324'dır.

### 3.2.2 Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

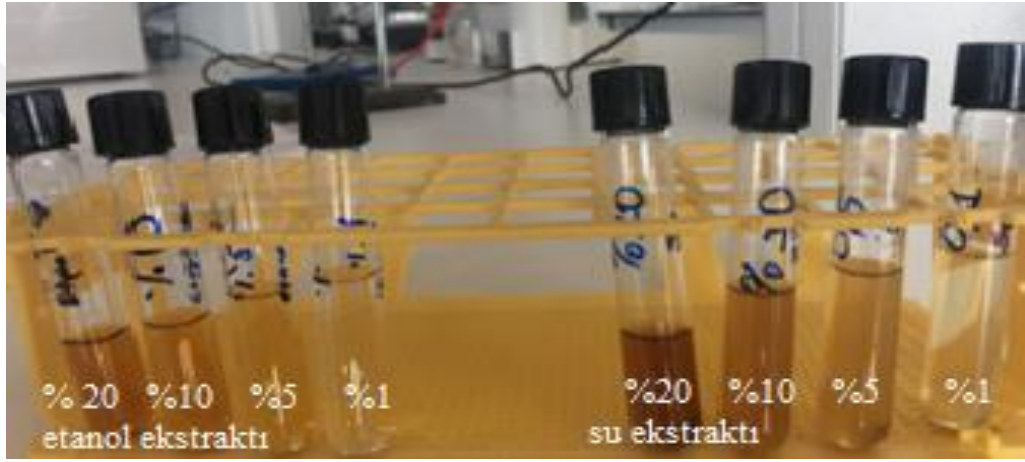
Bitki kısımları  $37 \pm 2$  °C'de sterilizatör içinde kurutulduktan sonra öğütülerek ekstraksiyon işlemine kullanılmıştır. Kurutulan kısımlar ayrı ayrı 1'er gr tartılıp üzerlerine 30 mL çözücü (% 70'lik metanol) ilave edilmiştir. Hazırlanan bu örnekler oda sıcaklığında 30 dk süre ile Wisebath marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar beyaz bant süzgeç kâğıdı (MN 617 Ø 110 mm) ile filtre edilerek (Resim 3.2) biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.



Resim 3.2. Ultrasonik su banyosunda metanol ile bitki ekstraktı

### ❖ Çimlenme Çalışmalarında Kullanılan Ekstraktlar

Çimlenme çalışmaları Özdemir'in (2007) açıkladığı metoda göre yapılmıştır [193]. *H. orientalis* bitkisinin kök kısmı kurutulmuş ve öğütüldükten sonra ayrı ayrı erlenmayerlere 0,1, 0,5, 1 ve 2 gr tartıp üzerine 10 mL distile su ve 10 mL etanol ilave edilip çözdürülmüştür. Orbital çalkalayıcıda 120 rpm'de 24 saat çalkalandıktan sonra filtre kâğıdından süzülerek katı artıklar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra santrifüjde 5000 rpm hızında 15 dakika döndürülerek katı artıklardan tamamen ayrıştırılmıştır. % 1, % 5, % 10, % 20 oranında ekstraktlar elde edilmiştir (Resim 3.3).



Resim 3.3. % 1, % 5, % 10, % 20 oranında etanol ve su ekstraktları

### 3.2.3 Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) Analizi

*H. orientalis* metanol ekstratında bulunan fonksiyonel grupları, (yapıdaki bağların durumunu, muhtemel bağlanma yerleri ve yapının aromatik yada alifatik olup olmadığını vb.) belirlemek için uygulanmıştır. Hazırlanan metanol ekstraktları cam petri kaplarına dökülerek çeker ocakta uçurularak, etüvde 80 °C'de 2 saat kurumaya bırakıldıktan sonra kazıma işlemi yapılmıştır. Elde edilen numuneler Perkin Elmer marka Lambda 35 model FTIR cihazı ile (Resim 3.4) spektrumları alınmıştır. FTIR spektrumları frekans bölgeleri 3500-500 cm<sup>-1</sup> olarak alınmıştır (EK1) [194].



Resim 3.4. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometre cihazı (FTIR)

### 3.2.4 Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi (LC-MS) Analizi

*H. orientalis* bitkisinin yapısındaki bilinmeyen maddeleri belirlemek için uygulanmıştır. Hazırlanan metanol ekstraktları, program (massinter) enjeksiyon hacmi 10  $\mu$ L ayarlanarak, agilent eclipse plus C18 marka 6460 kütle dedektörü ile jetstream iyonlaştırma tekniği kullanılarak 325 °C'de iyonlaşma sıcaklığında mobil faz A % 20 asetonitril ve mobil faz B % 0,1 formik asit içeren % 80'lik distile su hazırlanarak Triple Quadropole LC-Mass cihazı ile analiz edilmiştir [86]. Ayırma işlemi İnfiniti 1200 model UPLC cihazı ile yapılmıştır (Resim 3.5).



Resim 3.5. LC-MS cihazı

### 3.2.5 Antioksidan Aktivite Tayini

#### 3.2.5.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Ham ekstraktın toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir [195]. Öncelikle kalibrasyon tablosu oluşturmak için 100 mg gallik asit tartılarak bir miktar metanol içinde çözüldürülmüş ve hacim 100 mL'ye metanol ile tamamlanarak 1000 ppm'lik gallik asit stok standart çözeltisi hazırlanmıştır. Stok standart solüsyondan 50, 100, 150, 200, 250 ppm'lik gallik asit çözeltileri hazırlandıktan sonra UV-Vis spektrofotometre cihazında 765 nm'de absorbans değerleri belirlenerek elde edilen veriler kalibrasyon eğrisinin çiziminde kullanılmıştır.

Ekstraktlardaki fenolik madde miktarını belirlemek için 10 mL'lik deney tüplerine 1000 µL metanolik bitki ekstraktı, 500 µL folin ciocalteu reagent solüsyonu, 4,5 mL deiyonize su, 4 mL sodyum karbonat solüsyonu eklenerek 30 dk 40 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda UV-Vis spektrofotometre cihazında 765 nm'de absorbansları okunarak toplam fenolik madde miktarları gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak mg gallik aside eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Çalışmalar 3 defa tekrarlanmıştır.



Resim 3.6. UV-Vis spektrofotometre cihazı

### 3.2.5.2 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini

Ham ekstraktın toplam flavonoid içeriği Alüminyum Klorür Kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir [196]. Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için standart eğri hazırlanmıştır. Bunun için metanol içerisinde 50, 100, 150, 200, 250 ppm'lik kuersetin standart solüsyonları hazırlanarak UV-Vis spektrofotometre cihazında 510 nm dalga boyunda standart çözeltilerin absorbans değerleri belirlenerek, elde edilen veriler kalibrasyon eğrisinin çiziminde kullanılmıştır. 1000 µL metanol ekstraktı üzerine 4 mL saf su ve 0,3 mL % 5'lik sodyum nitrit eklenerek çözelti karıştırılmıştır. 6 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,3 mL % 10'luk alüminyum klorür solüsyonu ile 4 mL 1 mol/ L sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilerek, karışımın son hacmi saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır. 15 dk bekleme süresi sonunda absorbans değeri UV-Vis spektrofotometre cihazında 510 nm' de ölçülerek kuersetin ile çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak mg kuersetin eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Çalışmalar 3 defa tekrarlanmıştır.

### 3.2.5.3 Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Bitki ekstraktının total oksidan seviyelerinin ölçülmesinde Rel Assay RL0024 kiti kullanılmıştır. Comet assay DNA hasarı çalışması yaparken süpernatantlar ependorflara alınarak -20 °C'de muhafaza edilmiş olup bu çalışma için kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisini çizilebilmek için standartlar hazırlanmıştır. 10 µm standarttan 100 µL alıp 100 µL distile su ile seyreltilip vortekslenmiştir. 200 µL 5 µm karışım elde edilmiştir. Bu karışımdan 100 µL alıp 100 µL distile su ile seyreltilip vortekslenmiştir. Bu 2,5 µm karışımdan 100 µL alıp 100 µL distile su ile seyreltilip vortekslenmiştir. Bu işlem 1,25 ve 0,0625'e kadar seyreltilerek standart çözeltiler hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu playtlere önce 37,5 µL standart çözelti sonra sırasıyla 37,5 µL numunelerden konulmuştur. Üzerlerine 250 µL R1 (reagent 1) eklenmiştir. 530 nm'de ilk absorbans okuması ElisaTermo Scientific cihazında (Resim 3.7) ölçümleri yapılmıştır. İlk okumadan sonra 12,5 µL R2 (reagent 2) eklenip 37 °C'de 5 dk etüvde bekletilmiştir. Bu işlemlerin ardından tekrar 530 nm'de okuma yapılmıştır [197]. Çalışmalar 3 defa tekrarlanmıştır.

TOS hesaplanması aşağıdaki gibi yapılmıştır

Örneğin  $\Delta \text{abs.} = 2. \text{Okuma} - 1. \text{okuma}$ ;

Standartın  $\Delta$  abs. = 2. okuma - 1. okuma

TOS = (örneklerin  $\Delta$  abs / standart  $\Delta$  abs) \*10  $\mu$ mol /



Resim 3.7. Elisa cihazı

#### 3.2.5.4. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Rel Assay Diagnostic, RL0017 kiti kullanılarak total antioksidan seviyesi belirlenmiştir. Comet assay DNA hasarı çalışması yaparken süpernatantlar ependorflara alınarak -20 °C’de muhafaza edilmiştir ve bu çalışma için kullanılmıştır. Kitin çalışma prensibi ABTS radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak koyu mavi-yeşil renk oluşumunu arttırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durduracaktır. 10  $\mu$ m standarttan 100  $\mu$ L alıp 100  $\mu$ L distile su ile seyreltilip vortekslenmiştir. 5  $\mu$ m karışım elde edilip bu karışımdan 100  $\mu$ L alıp 100  $\mu$ L distile su ile seyreltilip vortekslenmiştir. 2,5  $\mu$ m bu karışımdan 100  $\mu$ L alıp 100  $\mu$ L distile su ile seyreltilip vortekslenmiştir. Bu işlem 1,25’lik konsantrasyona kadar devam etmiştir. 96 kuyucuklu playtlere önce 15  $\mu$ L standart çözelti sonra sırasıyla 15  $\mu$ L numunelerden konulmuştur. Üzerlerine 250  $\mu$ L R1 (reagent 1) eklenmiştir. 660 nm’de ilk absorbans okuması Elisa Thermo Scientific cihazında (Resim 3.7) ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra 38  $\mu$ L R2 (reagent 2) eklenip 37 °C’de 5 dk etüvde bekletilip 530 nm’de ikinci okuma yapılmıştır [197]. Çalışmalar 3 defa tekrarlanmıştır.

TAS hesaplanması aşağıdaki gibi yapılmıştır;

Örneklerin  $\Delta$  abs. = 2. okuma - 1. okuma

Standartın  $\Delta$  abs. = 2. okuma - 1. okuma

TAS= (örneklerin  $\Delta$  abs / standartın  $\Delta$  abs) mmol / L

Osi değerinin hesaplanması ise (TOS/ TAS ) \*100 şeklinde hesaplanmıştır.

### 3.2.5.4 Fenolik Asitlerin HPLC Analizi

Metanol ekstraktlarındaki fenolik asitlerin miktarı Agilent marka 1260 model HPLC cihazı ile belirlenmiştir. Analizlerde ACE-C18 (5 µm, 4.6 mm X 250 mm, ACE) kolon kullanılmıştır. Kolon termostat sıcaklığı 25 °C’de kontrol edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 10 µl olarak belirlenmiştir. Dedeksiyon 275 nm ve 320 nm. olarak set edilmiş ve çalışma koşulları Çizelge 3.6’da gösterilmiştir. Mobil faz olarak Mobil Faz A % 0,02 TFA (Trifloroasetik asit) içeren su kullanılmıştır. Mobil Faz B olarak % 0,02 TFA (Trifloroasetik asit) içeren metanol kullanılmış ve Çizelge 3.7’de gradient koşulları oluşturulmuştur. Standart olarak 254 nm’de vanillik asit, 275 nm’de gallik asit 320 nm’de kafeik, kumarik ve rosmarinik asit kullanılmıştır [198].

Çizelge 3.6. HPLC çalışma koşulları

HPLC çalışma koşulları	
Model	Infinity
Kolon	ACE-C18 (5 µm, 4,6 mm X 250 mm, ACE)
Mobil Faz	A: % 0.02 TFA(Trifloroasetik asit) içeren su B: % 0.02 TFA (Trifloroasetik asit) içeren metanol
Dedeksiyon	254,275 ve 320 nm
Akış Hızı	1 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Enjeksiyon Miktarı	10 µl

Çizelge 3.7. Gradient Koşulları

Zaman (dk)	Mobil faz A	Mobil faz B
0 dk	% 75	% 25
5 dk	% 75	% 25
10 dk	% 70	% 30
16 dk	% 45	% 55
18 dk	% 45	% 55
25 dk	% 20	% 80
30 dk	% 20	% 80
40 dk	% 25	% 75

### 3.2.6 Biyolojik Aktivite Testleri

#### 3.2.6.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Radikalinin Etkisinin Giderilmesi

Metanol ekstraktlarının serbest radikal giderme aktivitesini belirlemek için 2,2 Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) kullanılmıştır. Analiz, Brand-Williams'ın uyguladığı metoda göre yapılmıştır [199]. Bu yöntemle göre, DPPH' in metanol içerisinde  $10^{-4}$  M konsantrasyonda taze çözeltisi hazırlanmıştır. Bu solüsyondan 1 mL alınmış olup alüminyum folyo kaplı cam tüplere aktarılmıştır. Üzerine Çizelge 3.8'de belirtilen miktarlarda bitki ekstraktlarından ilave edilmiştir. Hacim metanol ile 4 mL'ye tamamlanıp, vortekste karıştırılmıştır. Kontrol tüplerine ise 3 mL antioksidan çözeltisi yerine saf metanol eklenmiştir. 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra Uv-Vis spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda metanole karşı absorbans değeri belirlenmiştir. Çalışmalar 3 defa tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.8. Kullanılan ekstrakt, eklenen metanol, DPPH karışımı

Kullanılan ekstrakt	Metanol	DPPH ( $10^{-4}$ M)
10 µL	2,990 mL	1 mL
20 µL	2,980 mL	1 mL
30 µL	2,970 mL	1 mL
40 µL	2,960 mL	1 mL
50 µL	2,950 mL	1 mL
60 µL	2,940 mL	1 mL
70 µL	2,930 mL	1 mL
80 µL	2,920 mL	1 mL
90 µL	2,910 mL	1 mL
100 µL	2,900 mL	1 mL

DPPH Radikalinin Süpürme Aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(AK - A\ddot{O}) / AK] \times 100]$$

AK: Kontrolün Absorbansı

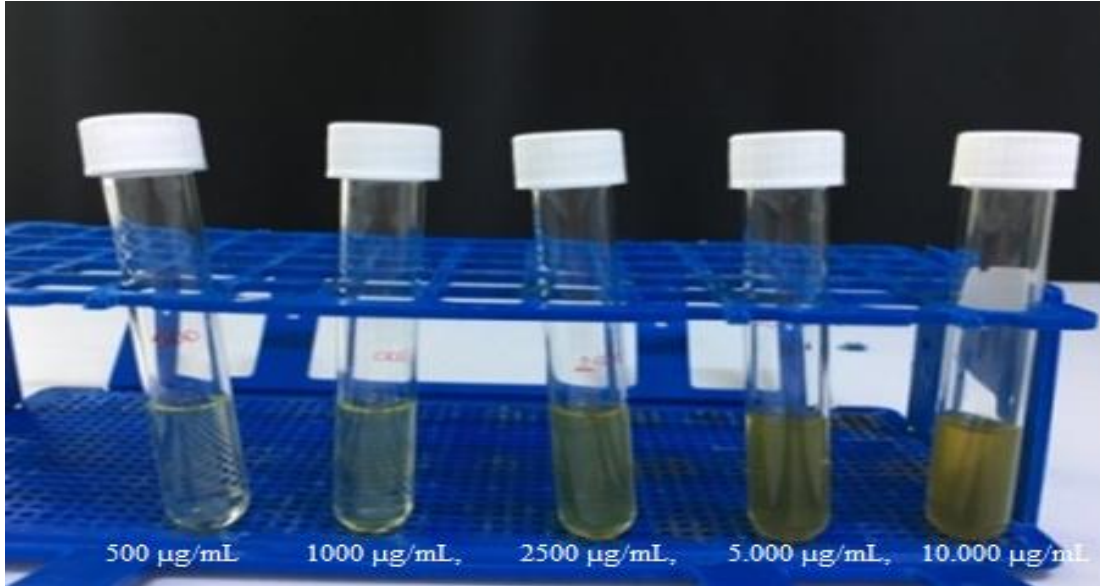
AÖ: Örneğin Absorbansı



Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten linear regresyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir. Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/mL) olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.6.2 Comet Assay ile DNA Üzerine Etkisi

Kurutulmuş öğütölmüş olan bitkinin yaprak kısmından 1 gr alınıp 30 mL % 70'lik metanol ile 30 dk süre ile Wisebath marka 50 kHz frekanslı ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar beyaz bant süzgeç kâğıdı ile filtre edilerek cam petri kaplarına dökölmüştür. Cam petrilerdeki metanol çeker ocakta uçurulduktan sonra etüvde 80 °C'de 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra toz ekstrakt kazıma işlemi ile elde edilerek farklı konsantrasyonlar (500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2500 µg/mL, 5000 µg/mL, 10 000 µg/mL) 1X PBS'de hazırlanmıştır (Resim 3.8). Çalışmada insan periferel kan hücreleri kullanılacağı için, Uşak Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğı Kurulu (2017-33) onayı alındıktan sonra başlanmıştır. İnsan periferel lökosit kültürünün hazırlanması için sağlıklı, sigara içmeyen ve ilaç kullanmayan bireyden heparinize edilmiş tüplere kan örneğı alınmıştır.



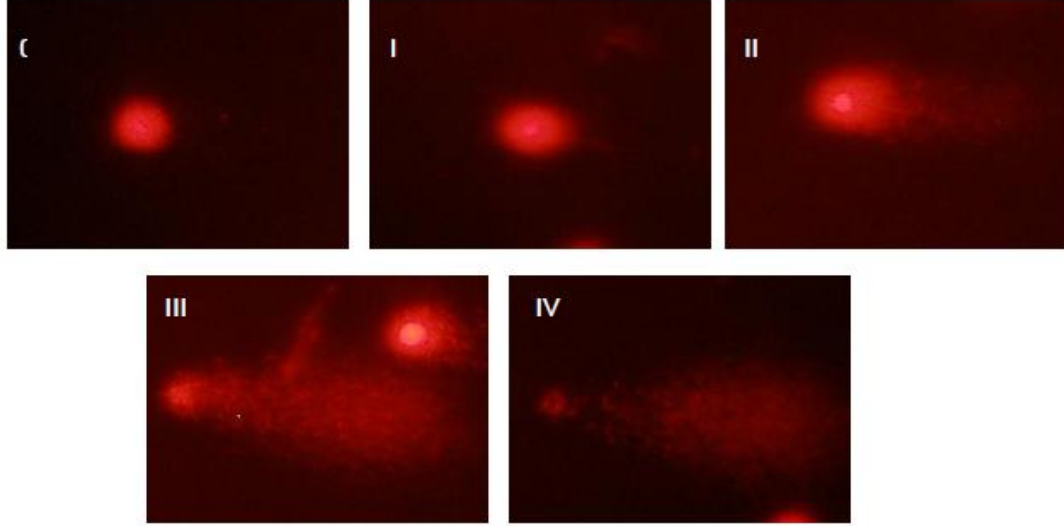
Resim 3.8. Test maddelerinin farklı konsantrasyonları

20 mL kan heparinli tüplere alındıktan sonra ependorf tüplerine histopak ilave edilip, kan örneği 1:1 (500 µL) oranında olacak şekilde tüplerin içerisine eklenmiştir. 2100 rpm'de 20 dk 25 °C'de santrifüj işlemi sonunda histopak üzerindeki interfazda ince bir tabaka halinde yer alan lökositler pipet yardımıyla yeni ependorf tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra üzerlerine yıkama amaçlı 100 µl 1X PBS eklenerek 15 °C'de 1600 rpm'de 10 dk tekrar santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Dipte kalan hücreler yoğunluğuna göre pipet yardımıyla karıştırılarak homojen bir çözeltili elde edilmiştir. Pellete 100 µl 1X PBS eklenerek üzerine 100'er µl test maddelerinin değişik konsantrasyonları eklenmiştir (500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2500 µg/mL, 5000 µg/mL, 10 000 µg/mL). Pozitif kontrol olarak 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, negatif kontrol grubu olarak 1X PBS süspanse edildikten sonra 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Koruyucu etkiyi belirlemek amacıyla 100 µl lökosit üzerine 900 µl test maddelerinin değişik konsantrasyonları (500 µg/mL, 1000 µg/mL, 2500 µg/mL, 5000µg/mL, 10 000 µg/mL), negatif ve pozitif kontrol için ise 900 µl 1X PBS ilave edilmiştir. 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra buzda 100'er µl 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde ependorflar 25 °C'de 1600 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelet comet assay deneyi için, süpernatant TAS-TOS deneyi için kullanılmıştır. Daha sonra her bir pelet 100'er µl PBS ile süspanse edilmiştir.

37±0,5 °C'de eritilmiş 80 µL % 0,8'lik LMA, 20 µL hücre süspanasyonu ile karıştırıldıktan sonra, önceden hazırlanmış % 1'lik NMA çözeltilisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıp üzerine lamel kapatılmıştır ve buzlu yüzey üzerinde 5 dk bekletilerek agarın polimerleşmesi sağlanmıştır. Agar üzerindeki lamel dikkatli bir şekilde alınarak lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizis çözeltilisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletilmifitir. Daha sonra elektroforez işlemi için, elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltilisi ile doldurulmuştur. Lamlar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirilip, 20 dk akım uygulanmadan bekletilmifitir. 25V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dk elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez işlemi bittikten sonra alınan lamlar 5 dk distile suda bekletilmifitir. Takiben lamlar 15 dk nötralizasyon tampon çözeltilisinde bekletilmifitir. Lamların üzerine 60 µL 20 µg/mL konsantrasyonda olan etidyum bromür çözeltilisi ilave edilmiştir. Her lamda 100 hücre floresan mikroskobunda Koçyiğit ve arkadaşlarına (2010) göre DNA hasar derecesine (0-4) bakılarak (Resim 3.9) sonuçların istatistiksel

değerlendirilmesi (SPSS 23,0 for Windows) paket programında Duncan testi kullanılarak yapılmıştır [200].



Resim 3.9. 0- Hasarsız DNA, I-Çok az hasarlanmış DNA, II-Az hasarlanmış DNA, III- hasarlanmış DNA, IV- tümüyle hasarlanmış DNA [200].

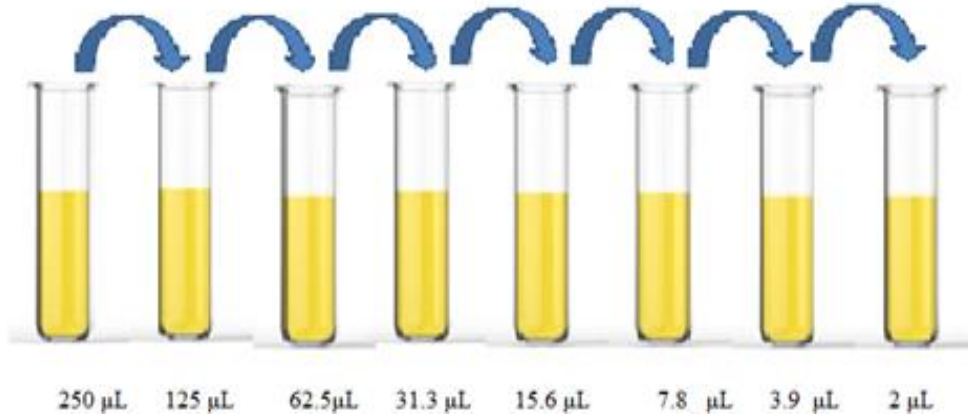
### 3.2.6.3 Antimikrobiyal Aktivite

#### 3.2.6.3.1 Agar Disk Difüzyon Testi

Antimikrobiyal aktivite testleri Berghe ve Vlietinck (1991) tarafından açıklanan metoda göre yapılmıştır [201]. Bitkinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından 5 gr tartıp, 30 mL (% 70'lik) metanol ile ekstrakte edilmiştir. Naylon membran filtreler kullanılarak süzülen ekstraktlar kullanılmıştır. Testte kullanılacak mikroorganizmaların kültür süspansiyonundan 200 µl (yaklaşık olarak  $M_f 0.5$  eşitliğine göre  $10^6$  koloni içerir) eküvyon çubuğu Mueller Hinton agara yayılmıştır. Sonrasında 3 mm kalınlık ve 6 mm çapa sahip disklere 0,22 µm'lik filtreden süzülüp steril bir ortamda tutulan her bir ekstraktan 20 µl emdirilmiştir. Negatif kontrol olarak 20 µl metanol emdirilmiş diskler kullanılmıştır. Streptomisin (S10), Penisilin (P10), Tetramisin (TE30) ve Kloramfenikol (C30) referans antimikrobiyal ajan olarak kullanılmıştır. Sonrasında petri kapları 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi ekstrakt emdirilmiş disklerin etrafındaki zonların ölçülmesi ile sağlanmıştır.

### 3.2.6.3 2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Testi

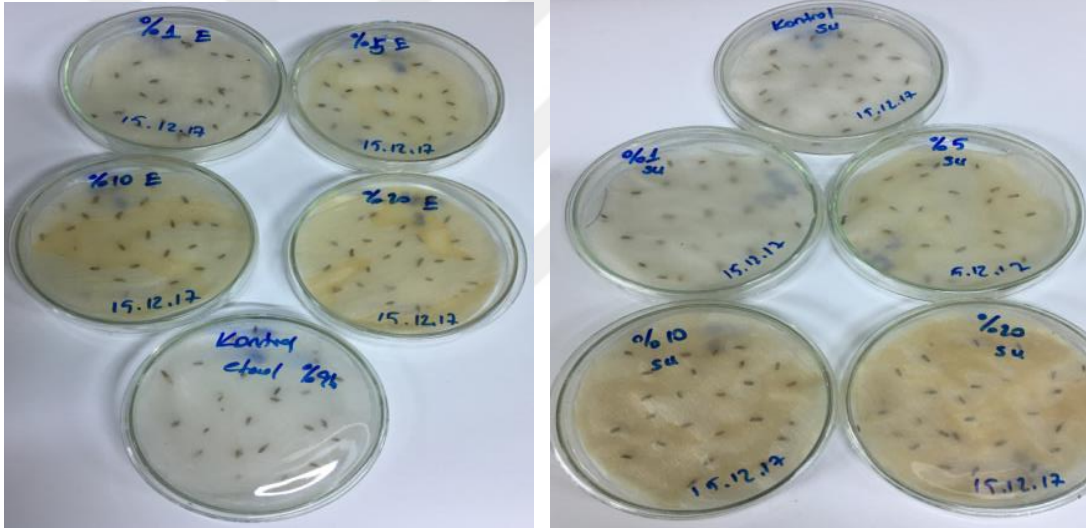
Bir antimikrobiyal ajanın, mikroorganizmanın gelişimini engelleyen en düşük konsantrasyon düzeyi olarak tanımlanır. MİK testi için 96 kuyucuklu steril mikropalaklar kullanılmıştır. İlk baştaki kuyucuğa 125  $\mu\text{L}$  hazırlanan metanolik bitki ekstraktlarından eklenmiştir. 2'den 8'e kadarki kuyucuk serisine 125  $\mu\text{L}$  NB besiyeri konulup, bundan sonra sadece 2. kuyucuğa 125  $\mu\text{L}$  bitki ekstraktlarının stok çözeltisi ilave edilmiştir. 2. kuyucuktaki broth ve bitki ekstraktı iyice karıştırıldıktan sonra 2 numaralı kuyucuktan 125  $\mu\text{L}$  içerik alınarak 3 numaralı kuyucuğa aktarılmış, Bu seri mikrodilüsyon işlemi 8 numaralı kuyucuğa kadar devam ettirilmiş ve sonunda 8 numaralı kuyucuktan 125  $\mu\text{L}$  içerik alınarak dışarı atılmıştır (Şekil 3.1). Daha sonra tüm kuyucuklara ayrı ayrı 10  $\mu\text{L}$  (*Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 ve *Candida glabrata*) mikroorganizmalar konulmuştur. Mikroplağın üstü uygun steril cam ile kapatılıp 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. MİK değeri, mikroorganizmaların üremesini engellendiğinden bulanıklık ya da çökeltme görülmeyen en düşük bitki ekstrakt konsantrasyonu olarak hesaplanmıştır [202].



Şekil 3.1. MİK için dilüsyonların hazırlanması

### 3.2.7 Çimlenme Üzerine Etki

Petri kaplarına 2 kat halinde steril kurutma kağıdı yerleştirilip, üzerine test bitkisine ait 25'er adet marul tohumları (*Lactuca sativa*) homojen olarak dağıtılmıştır. Üzerlerine bir adet kurutma kağıdı konularak farklı konsantrasyonlardaki etanol ve sulu ekstraktlardan (% 1, % 5, % 10, % 20) 6 mL ilave edilmiştir. Kontrol amaçlı olarak distile su ve etanol kullanılarak petri kaplarına 6 mL ilave edilerek nemlendirilmiştir (Resim 3.10). Petri kapları ortalama 24 °C'de 12 saat aydınlık 12 saat karanlık koşullarda 20 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda test bitkisine ait tohumların çimlenmeleri belirlenmiştir [203, 204].



Resim 3.10. Etanol ve su ekstraktları ile nemlendirme

### 3.2.8 *H. orientalis* Kısımlarından Metal Tayini

Kurutulmuş, öğütülmüş kök, gövde, çiçek ve yaprak numunelerinden 0,5 gr tartıp, erlenmayer içerisine konulmuştur. Üzerine 5 mL saf nitrik asit koyup hafif çalkalayarak bitki materyalinin tamamen ıslatılmasıyla erlenmayer içerisine küçük huni konularak çeker ocak içerisinde magnetik karıştırıcı üstünde 90 dk bırakılmıştır (Resim 3.11). Ortamdan nitrik asit uzaklaştıktan sonra bitki eriği açık sarı bir renk haline gelmiştir. Geride kalan materyalin parçalanması için üzerine 2 mL perklorik asit ilave edilip çeker ocakta magnetik karıştırıcı

üzerine bırakılmıştır. Perklorik asitin keskin beyaz dumanları erlenmayer içini tamamen doldurduktan sonra en az 30 dk daha yakmaya devam edilmiştir. Yakma sonucunda erlenmayer içerisinde en az 1 mL olacak şekilde perklorik asit kalmıştır. Kalan bitki içeriği beyaz renkte olmuştur. Soğuma işlemi olduktan sonra erlenmayere 5 mL saf su ilave edilip çalkalanmıştır. Beyaz bant süzgeç kâğıdı ile 10 mL'lik falkon tüplerine filtre edilerek hacim 10 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Böylelikle nitrik-perklorik asit ile yağ yakma işlemi tamamlanmıştır [205]. Falkon tüpleri ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) ve Kütle Spektrometresi (MS))'e (Resim 3.12) yerleştirilmiştir. Thermo marka İcap Q model, (kütle dedektörü ) Q-tegra programı kullanılarak 10 mL çözeltilerden 1 mL çekilip hazır halde bulunan metal standartları ( $^{11}\text{B}$ ,  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Zn}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{80}\text{Se}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{83}\text{Kr}$ ) kullanılarak tayin yapılmıştır.



Resim 3.11. Nitrik asit ile yakma işlemi



Resim 3.12. ICP-MS cihazı

## 4 BULGULAR

### 4.1 Bitki Materyalinin Tür Tayini

*H. orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımları incelendiğinde rizomların toprak altında yatık durumda silindir şeklinde koyu kahve renkli ve 5-10 mm çapında olduğu görülmüştür. Gövde kısmının 60 cm silindir şeklinde, açık yeşil renkli ve zor kırılan bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca gövdesinde büyüklükleri az çok farklı olan brakteler bulunmaktadır. Rizomdan çıkan ve sapı hemen hemen gövde kadar uzun olan parçalı bir rozet yaprak bulunmaktadır. Yapraklar 3-9 parçalı, tüylü veya çıplak, çanak yaprakları yeşil ve 5 adet, taç yaprakları ise sarı veya krem renginde 5-10 adettir. Yeşil yapraklarının yanında tipik 5 ya da 7 santimetrelik çiçekleri bulunmaktadır. Çiçekleri 5 yapraklıdır ve küçük fincanımsı göbeğin etrafını çevrelemiştir. Tohum 2-3 mm, kahverengi, 6 taneden fazla olduğu görülmüştür.

### 4.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometre (FTIR) Analizi

Bitkinin gövde kısmının FT-IR spektrumu incelendiğinde 3304,4 dalga boylarındaki pik N-H gerilmesi amid, amin alkaloidlerinin varlığını göstermektedir. 2930 dalga boylarındaki pik C-H gerilmesi fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 1723,4 dalga boylarındaki pik C=O gerilmesi saponinlerin varlığını göstermektedir. 1592 dalga boylarındaki pik C=C gerilmesi, fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 1035,9, 1252,6 dalga boylarındaki pikler C-O-C gerilmesini, glikozitlerin varlığını göstermektedir. 918,16 N-D glikozit gerilmesini göstermektedir. Gövde kısmının FT-IR spektrumu EK 1'de gösterilmiştir. Bitkinin kök kısmının FT-IR spektrumu incelendiğinde 3307,1 dalga boylarındaki pik N-H gerilmesi amid, amin alkaloidlerinin varlığını göstermektedir. 2855, 2921,9 ve 3012,8 dalga boylarındaki pikler C-H gerilmesi fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 2106 dalga boylarındaki pik C≡C

gerilmesini göstermektedir. 1707,3 dalga boylarındaki pik C=O gerilmesi saponinlerin varlığını göstermektedir. 1035,9, 1156,3, 1196,4 ve 1274 dalga boylarındaki pikler C-O-C gerilmesi glikozitlerin varlığını göstermektedir. 920,84 N-D glikozit gerilmesini göstermektedir. Kök kısmının FT-IR spektrumu EK 1’de gösterilmiştir.

Bitkinin çiçek kısmının FT-IR spektrumu 3248,3 dalga boylarındaki pik N-H gerilmesi amid, amin alkaloidlerinin varlığını göstermektedir. 2847, 2919,2 dalga boylarındaki pik C-H gerilmesini fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 2114 dalga boylarındaki pik C≡C gerilme gerilmesini göstermektedir. 1394,3 dalga boylarındaki pik CH<sub>3</sub> gerilmesi alkaloid varlığını göstermektedir. 1308,7, 1035,9 dalga boylarındaki pikler C-O-C gerilmesi glikozitlerin varlığını göstermektedir. 920,84 N-D glikozit gerilmesini göstermektedir. Çiçek kısmının FT-IR spektrumu EK 1’de gösterilmiştir. Bitkinin yaprak kısmının FT-IR spektrumu incelendiğinde 3288,4 dalga boylarındaki pik N-H gerilmesi amid, amin alkaloidlerinin varlığını göstermektedir. 2857.7 ve 2921,9 dalga boylarındaki pik C-H gerilmesini fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 2114 dalga boylarındaki C≡C gerilmesini göstermektedir. 1512 dalga boylarındaki pik C=C gerilmesini fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 1038,5 ve 1260,6 dalga boylarındaki pikler C-O-C gerilmesi glikozitlerin varlığını göstermektedir. 920,84 N-D glikozit gerilmesini göstermektedir. Yaprak kısmının FT-IR spektrumu EK 1’de gösterilmiştir.

### 4.3 Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre (LC-MS) Analizi

*H. orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinin LC-MS kromatogramları EK 2’de verilmiştir. Analizlerde Helleborus bitkilerinde bulunan hellebrin (724,80 g/mol, C<sub>36</sub>H<sub>52</sub>O<sub>15</sub>), helleborin (468,60 g/mol, C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>), helleborein (788,83 g/mol, C<sub>37</sub>H<sub>56</sub>O<sub>18</sub>), Hellebortin (564,63 g/mol, C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>11</sub>), Hellebrigen (416,51 g/mol, C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>) gibi etken maddelerin varlığı aranmıştır.

Yaprak kısmında molekül kütlesi 417 g/mol hellebrigen varlığı ortaya çıkmıştır. Kök kısmında molekül kütlesi 463 g/mol olan helleborin ve 417 g/mol olan hellebirgen varlığına saptanmıştır. Gövde kısmında molekül kütlesi 725 g/mol olan hellebrin varlığı ortaya çıkmıştır. Çiçek kısmında molekül kütlesi 725 g/mol olan hellebrin ve 468 g/mol helleborin



varlığı ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda kök kısmında 1 yeni spirostanol glikozit, 2 bufadienolid glikozit, 5 tane yeni spirostanol saponin, 2 yeni furostanol saponin, 2 yeni furospirostanol saponinlerin olduğu tespit edilmiştir (EK 2).

#### 4.4 Antioksidan Aktivite Tayini

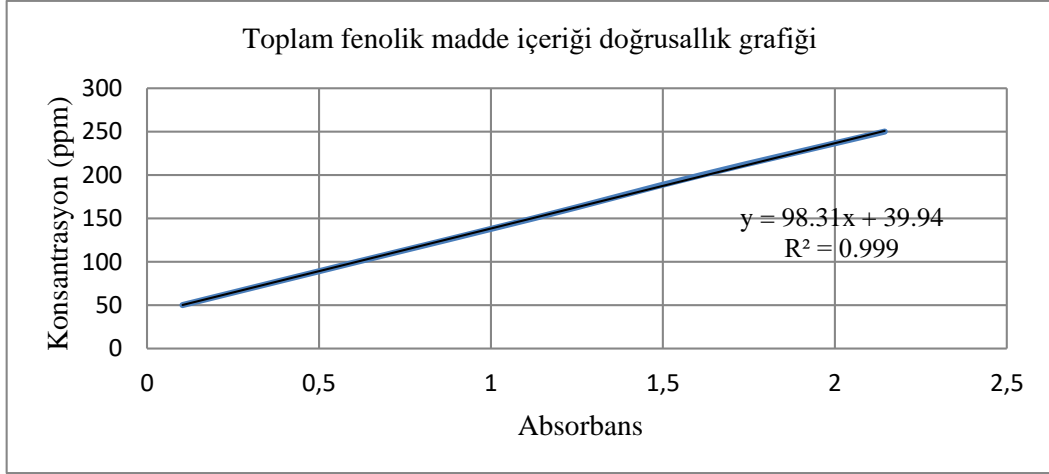
##### 4.4.1 Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Gallik asidin metanolik çözeltisi hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisinin çizilmesinde gallik asit çözeltisi kullanılmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş (50, 100, 150, 200, 250 ppm) konsantrasyonlarda gallik asit solüsyonu standart olarak kullanılmıştır. Bu standart solüsyonların absorbans değerleri Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Gallik asit konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri

Gallik asit konsantrasyonu Ppm	Absorbans
50	0,103
100	0,612
150	1,124
200	1,613
250	2,145

Gallik asit konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Doğrusallığı ( $y= 98.316x+ 39.945$ ) ve regrasyon katsayısı ( $R^2 = 0,99999$ ) olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde içeriğinin doğrusallığı Şekil 4.1’de verilmiştir. Bitki ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. Toplam fenolik madde içeriği doğrusallık grafiği

Gallik asit kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra örnek konsantrasyonlarının absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde belirlenmiştir. Toplam fenolik madde analizi gallik asit kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. 1 gr numune içerisindeki toplam fenolik madde miktarı mg GAE

<i>H. orientalis</i> kısımları	Absorbans	mg GAE/1 gr numune
Çiçek	2,885	19,42± 0 ,24
Yaprak	2,510	17,20± 0,25
Gövde	0,757	6,86± 0,27
Kök	0,338	4,39± 0,28

Toplam fenolik madde, bitkinin çiçek kısmında (19,42 ± 0 ,24 mg GAE/1 gr numune) diğerlerine göre fazla çıktığı görülmüştür. Bunu takiben yaprak örneğinde (17,20 ± 0,25 mg GAE/1 gr numune) fazla çıktığı görülmüştür. En az fenolik madde içeriği ise kök kısmında (4,39 ± 0,28 mg GAE/1 gr numune) görülmüştür.

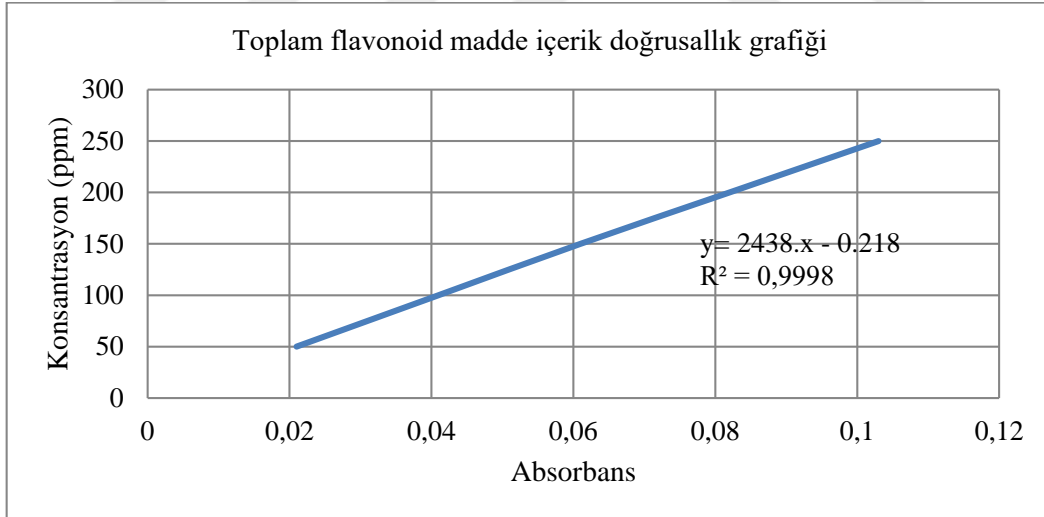
#### 4.4.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Kuersetinin metanolik çözeltisi hazırlanıp kalibrasyon eğrisi çizilmesinde kullanılmıştır. Kuersetin solüsyonu farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 150, 200, 250 ppm) standart olarak kullanılmıştır. Absorbans değerleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kuersetin konsantrasyonuna karşılık absorbans değerleri

Kuersetin konsantrasyonu Ppm	Absorbans Değeri
50	0,021
100	0,041
150	0,061
200	0,082
250	0,103

Kuersetin konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Doğrusallığı ( $y = 2438,6x - 0,2189$ ) ve regrasyon katsayısı ( $R^2 = 0,9998$ ) olarak belirlenmiştir. Metanol ekstraktının toplam flavonoid madde miktarı kuersetin eşdeğeri (QE) olarak verilmiştir.



Şekil 4.2. Toplam flavonoid madde içerik doğrusallık grafiği

Kuersetin kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra örnek konsantrasyonların absorbansı bu kalibrasyon eğrisinin içinde okunacak şekilde belirlenmiştir. Toplam flavonoid madde içeriği kuersetin kalibrasyon denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. Toplam flavonoid madde içeriğinin doğrusallığı Şekil 4.2’de verilmiştir. *H. orientalis*

bitkisinin kısımlarında belirlenen toplam flavonoid madde içerikleri 1 gr numune içerisinde mg QE olarak aşağıda Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. 1gr numune içerisindeki toplam flavonoid madde içeriği mg QE

<i>H. orientalis</i> kısımları	Absorbans	mg QE/ 1 gr Numune
Çiçek	1,624	11,880 ± 0,15
Yaprak	1,396	10,212 ± 0,17
Gövde	0,426	3,116 ± 0,19
Kök	0,351	2,567 ± 0,21

Toplam flavonoid madde miktarı en yüksek oranda bitkinin çiçek kısmında belirlenmiştir. Daha sonra sırasıyla flavonoid madde miktarı yaprak, gövde ve kök kısımlarından azalan oranda tespit edilmiştir.

#### 4.4.3 Fenolik Asitlerin HPLC Analizi

*H. orientalis* bitkisinin kısımlarında HPLC yöntemi ile fenolik asitlerden gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, kumarik asit ve rosmarinik asit varlığı araştırılmıştır. *H. orientalis* bitkisinin kısımlarında HPLC metodu ile yapılan analizlerde çiçeklerinde 26.52 ppm gallik asit, gövdesinde 7.48 ppm rosmarinik asit, yapraklarında 2 ppm kafeik asit ile 19 ppm rosmarinik asit tespit edilmişken köklerinde hiçbir fenolik asit içeriğe rastlanılmamıştır (Çizelge 4.5) EK 3.

Çizelge 4.5. Fenolik asitleri HPLC analiz sonuçları

Test maddeleri	Gallik asit	Vanilik asit	Kafeik asit	Kumarik asit	Rosmarinik asit
Kök	-	-	-	-	-
Gövde	-	-	-	-	7 ppm
Yaprak	-	-	2 ppm	-	19 ppm
Çiçek	27 ppm	-	-	-	-

## 4.5 Biyolojik Aktivite Testleri

### 4.5.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Radikalinin Etkisinin Giderilmesi

UV spektrofotometre de 517 nm dalga boyunda okunan antioksidanların EC<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. EC<sub>50</sub> değerleri Çizelge 4.6' da gösterilmiştir. Bu değerlere göre karşılaştırma yapılmıştır [206].

Çizelge 4.6. Bazı antioksidan bileşiklerin EC<sub>50</sub> değerleri

Antioksidan	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
Vitamin C (standart)	1,697
Trolox (standart)	1,729
Ellagik asit	1,881
Kuarsetin	1,722
Kurkumin	2,800
Resveratrol	3,970
Silimarin	7,812
Vitamin E	3,123

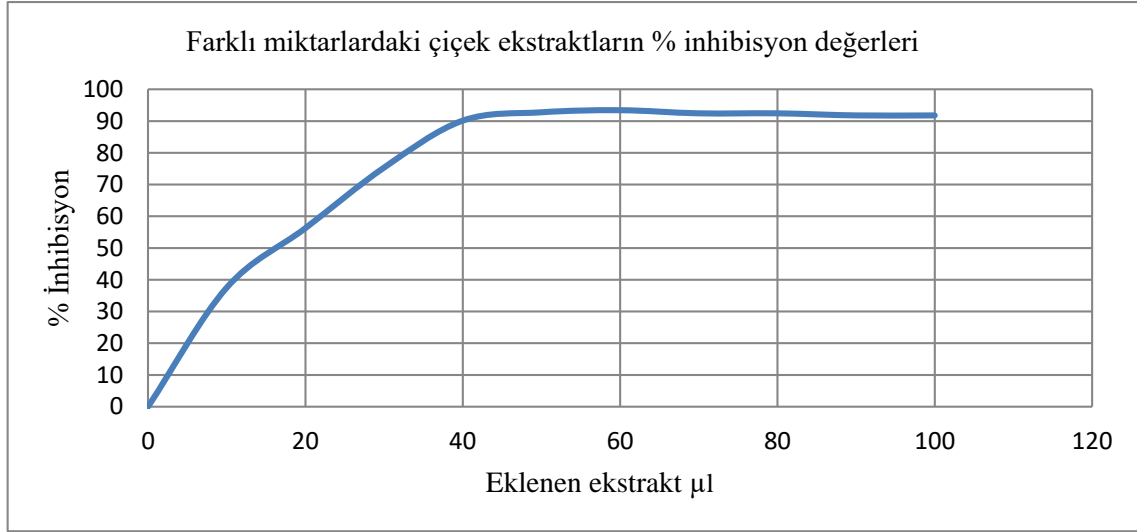
*H. orientalis* bitkisinin çiçek ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri Çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Çiçek ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri

Çiçek ekstraktı µl	Absorbans	% İnhibisyon
0	0,304	0
10	0,190	37,50 ± 2,64
20	0,133	56,25 ± 2,41
30	0,075	75,33 ± 2,38
40	0,030	90,13 ± 2,50
50	0,022	92,76 ± 2,65
60	0,020	93,42 ± 2,87
70	0,023	92,43 ± 2,81
80	0,023	92,43 ± 2,8
90	0025	91,78 ± 2,53
100	0025	91,78 ± 2,55

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten linear regrasyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri

elde edilmiştir. Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/ml) ifade edilmiştir. Çiçek için % 50 inhibisyona neden olan ekstrakt miktarı EC<sub>50</sub> = 18 µl olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Çiçeğin farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri

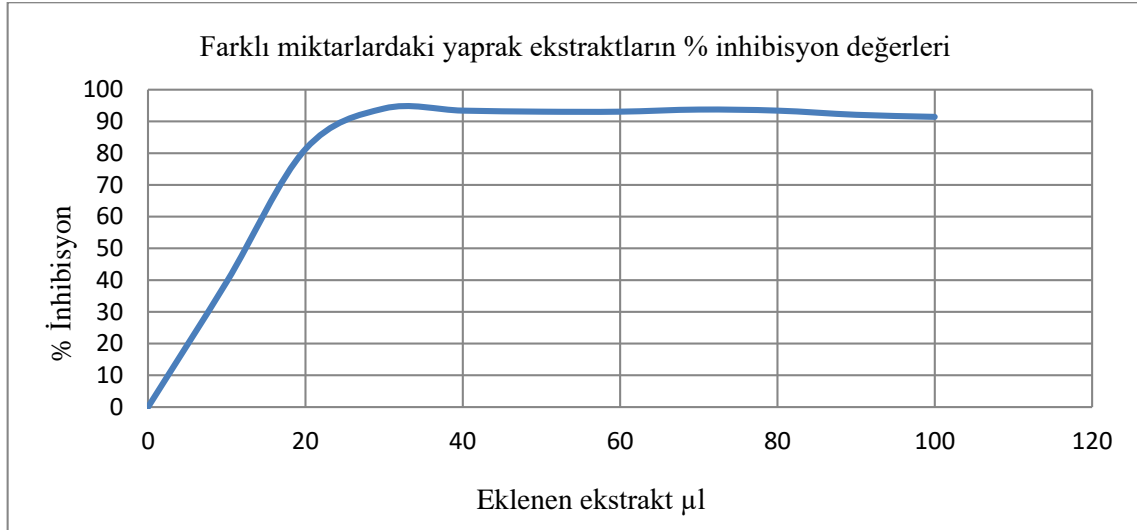
Çiçek ekstraktlarının EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen değer 18 µL'dir. 18 µL ekstrakt içerisindeki çiçek miktarı 0,6 µg'dır. EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen çiçek konsantrasyonu 0,15 µg/ml'dir.

*H. orientalis* bitkisinin yaprak ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Yaprak ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri

Yaprak ekstrakt µl	Absorbans	% İnhibisyon
0	0,304	0
10	0,184	39,47 ± 2,50
20	0,057	81,25 ± 2,52
30	0,018	94,08 ± 2,37
40	0,020	93,42 ± 2,49
50	0,021	93,09 ± 2,58
60	0,021	93,09 ± 2,62
70	0,019	93,75 ± 2,60
80	0,020	93,42 ± 2,65
90	0,024	92,11 ± 2,77
100	0,026	91,45 ± 2,75

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten linear regresyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir. Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/ml) ifade edilmiştir. Yaprak için % 50 inhibisyona neden olan ekstrakt miktarı EC<sub>50</sub>=13 µl olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Yaprığın farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri

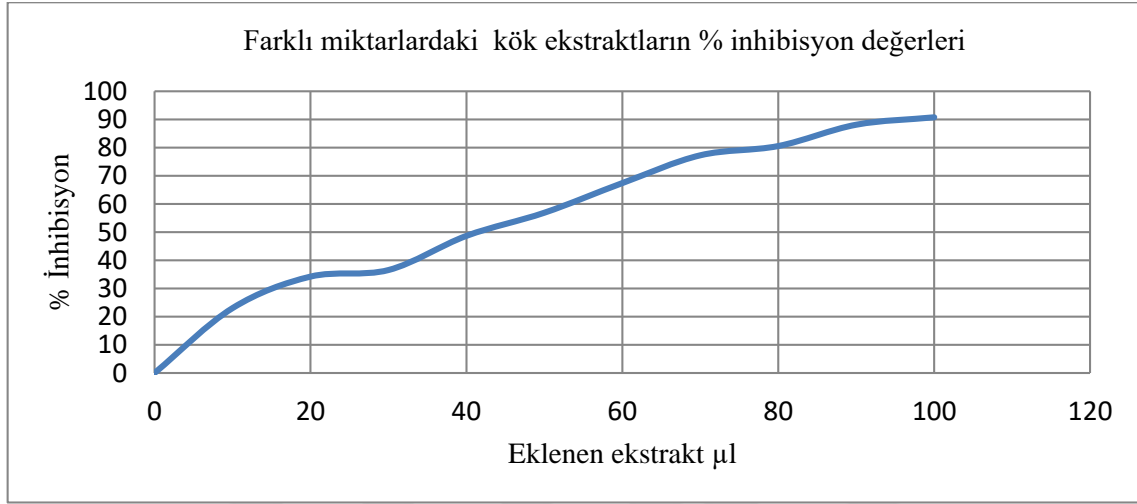
EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen yaprak ekstrakt değeri 13 µL'dir. 13 µL ekstrakt içerisindeki yaprak miktarı 0,43 µg'dır. EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen yaprak konsantrasyonu 0,108 µg/ml'dir.

*H. orientalis* bitkisinin kök ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Kök ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri

Kök ekstrakt µl	Absorbans	% İnhibisyon
0	0,304	0
10	0,234	23,03 ± 2,16
20	0,200	34,21 ± 2,18
30	0,193	36,51 ± 2,24
40	0,156	48,68 ± 2,26
50	0,131	56,91 ± 2,30
60	0,099	67,43 ± 2,38
70	0,069	77,30 ± 2,45
80	0,059	80,59 ± 2,50
90	0,036	88,16 ± 2,52
100	0,028	90,79 ± 2,56

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten linear regresyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir. Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/ml) ifade edilmiştir. Kök için % 50 inhibisyona neden olan ekstrakt miktarı EC<sub>50</sub> = 40 µl olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kökün farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri

EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen kök ekstrakt değeri 40 µL'dir. 40 µL ekstrakt içerisindeki kök miktarı 1,33 µg'dır. EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen kök konsantrasyonu 0,33 µg/ml'dir.

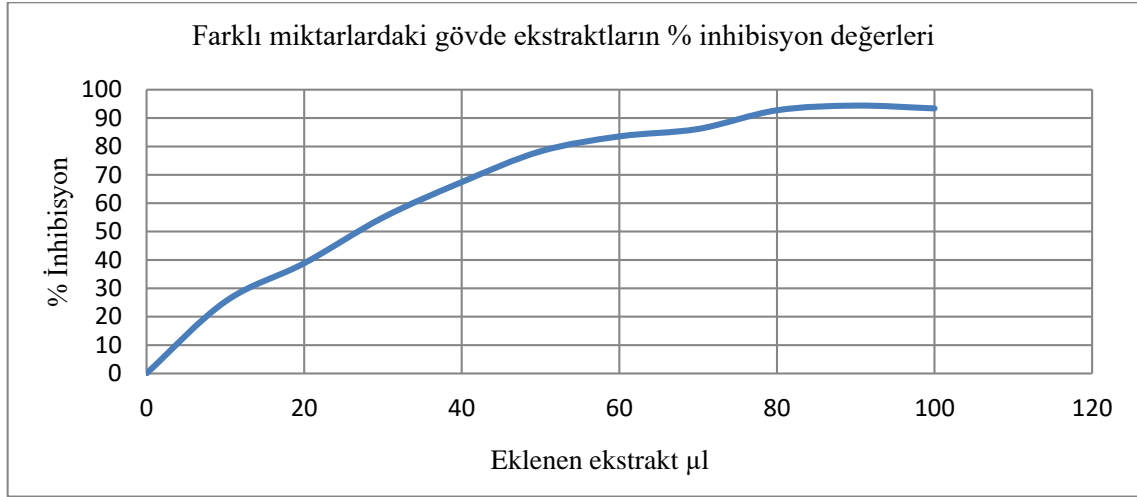
*H. orientalis* bitkisinin gövde ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Gövde ekstraktı miktarına karşı % inhibisyon değerleri

Gövde ekstrakt µl	Absorbans	% İnhibisyon
0	0,304	0
10	0,227	25,33 ± 2,27
20	0,186	38,82 ± 2,31
30	0,137	54,93 ± 2,39
40	0,099	67,43 ± 2,46
50	0,066	78,29 ± 2,51
60	0,050	83,55 ± 2,54
70	0,042	86,18 ± 2,59
80	0,022	92,76 ± 2,62
90	0,017	94,41 ± 2,65
100	0,020	93,42 ± 2,66



Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değeri ile çizilen grafikten linear regrasyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edilmiştir. Sonuçlar EC<sub>50</sub> (µg/ml) ifade edilmiştir. Gövde için % 50 inhibisyona neden olan ekstrakt miktarı EC<sub>50</sub> = 28 µl olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Gövdenin farklı ekstraktlarına karşı % inhibisyon değerleri

EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen gövde ekstrakt değeri 28 µL'dir. 28 µL ekstrakt içerisindeki gövde miktarı 0,93 µg'dır. EC<sub>50</sub> değerine karşılık gelen gövde konsantrasyonu 0,23 µg/ml'dir.

Çizelge 4.11. *H. orientalis* bitkisinin kısımlarının EC<sub>50</sub> değerleri

<i>H. orientalis</i> bitkisinin kısımları	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
Çiçek	0,15 ± 0,015
Yaprak	0,18 ± 0,017
Gövde	0,23 ± 0,018
Kök	0,33 ± 0,019

*H. orientalis* bitkisinin Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi DPPH radikalini süpürme aktivitesi en yüksek olarak çiçek ekstraktında bulunmuştur. En düşük DPPH radikalini süpürme aktivitesi ise kök kısmında belirlenmiştir. Sonuç itibariyle bitki ekstraktlarının pek çok antioksidan maddeye göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

#### 4.5.2 Comet Assay ile DNA Üzerine Etkisi

*H. orientalis*'in yaprak ekstraktının insan mononükleer lökositlerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karşı koruyucu etkisi Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. En düşük DNA hasarına kontrol grubunda (6±1) en yüksek DNA hasarına ise 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda (305,33 ± 5,51) rastlanılmıştır. Helleborusun yaprak ekstraktı konsantrasyonları arttıkça koruyucu etki artmış ve 2500 µg/mL üzeri dozlarda istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.12. Helleborusun mononükleer lökositlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e karşı koruyucu etkisi

Uygulama grupları	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)*
	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	6 ± 1a
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	305,33 ± 5.51b
500 µg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	304,33 ± 3.21b
1000 µg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	302 ± 5.57bc
2500 µg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	296.33 ± 2.52cd
5.000 µg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	293.33 ± 3.06de
10.000 µg/mL + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	288.67 ± 3.51e

\* Sütunlardaki farklı harfler p < 0.05 düzeyinde önemli (Duncan çoklu karşılaştırma testi)

#### 4.5.3 TAS ve TOS Seviyeleri

TOS düzeylerinde anlamlı artışlar görülürken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda TAS düzeyini kontrol grubuna göre azalttığı görülmüştür (Çizelge 4.13 ). Ek olarak, tedavi yaprağı ekstraktı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda kontrol grubuna göre artmış oksidan seviyelerine düşmüştür (p <0.05). Bu sonuçlar yaprak ekstraktı uygulamasının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna göre oksidatif stresi azalttığını göstermiştir (P <0.05).

Çizelge 4.13. Gruplarda TAS, TOS seviyeleri ve OSI indeksi

Uygulama grupları	TAS (mmol Trolox Equiv./ L.)	TOS (mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equiv. / L.)	OSI
Kontrol	7,3± 0,02 <sup>a</sup>	11,2± 0,85 <sup>a</sup>	3,21± 1,2 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,4± 0,21 <sup>b</sup>	25,3± 0,74 <sup>b</sup>	8,14± 3,12 <sup>b</sup>
500 µg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,2± 0,14 <sup>b</sup>	24,12± 0,72 <sup>b</sup>	8,10± 3,11 <sup>b</sup>
1000 µg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,1± 0,11 <sup>b</sup> <sup>c</sup>	23,17± 0,69 <sup>b</sup>	8,10± 3,14 <sup>b</sup>
2500 µg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,3± 0,67 <sup>cd</sup>	19,07± 0,67 <sup>c</sup>	4,25± 2,14 <sup>c</sup>
5.000 µg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,1± 0,64 <sup>de</sup>	19,21± 0,64 <sup>dc</sup>	4,29± 2,11 <sup>dc</sup>
10.000µg/L + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,2± 0,61 <sup>e</sup>	19,11± 0,81 <sup>dc</sup>	4,32± 3,01 <sup>dc</sup>

Aynı harfe sahip olan araçlar istatistiksel olarak 0.05 düzeyinde farklılık göstermemektedir.

SD: Standart Sapma.

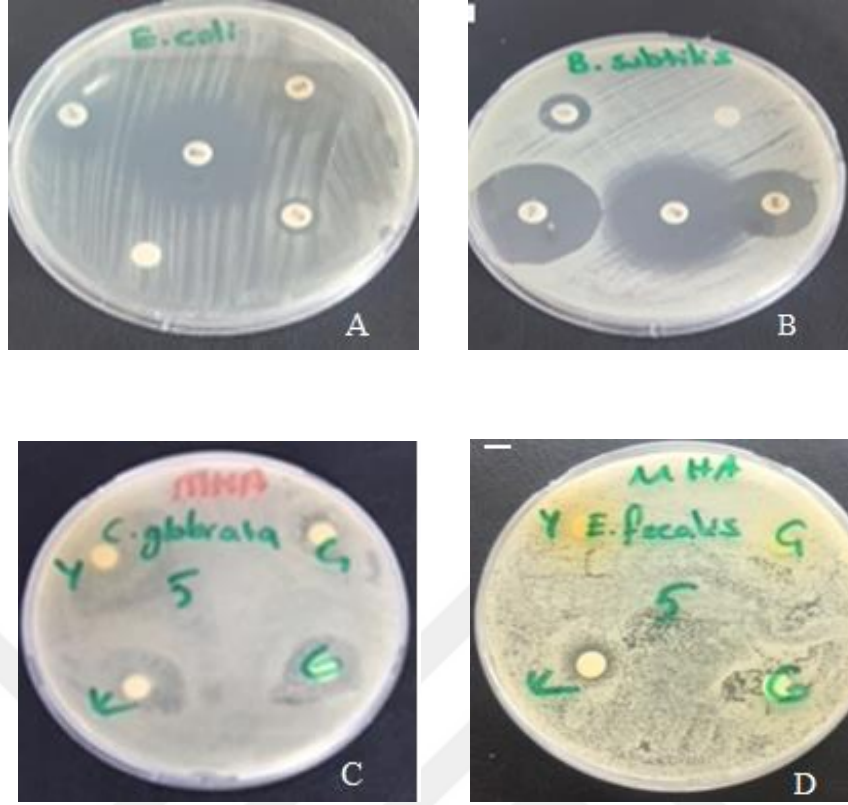
#### 4.5.4 Antimikrobiyal Aktivite

##### 4.5.4.1 Agar Disk Difüzyon Testi

Kök, gövde, yaprak ve çiçek metanol ekstraktının sadece *Candida glabrata*'da etki ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca kökte *E. faecalis* ATCC 51289'de etki ettiği gözlemlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan metanolün suşlara etki etmediği Çizelge 4.14'de gösterilmiştir. Antimikrobiyal ajan olarak kullanılan S10, P10, TE30 ve C30 antibiyotik disklerin zon çapları Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Agar disk difüzyon testi sonuçları (mm)

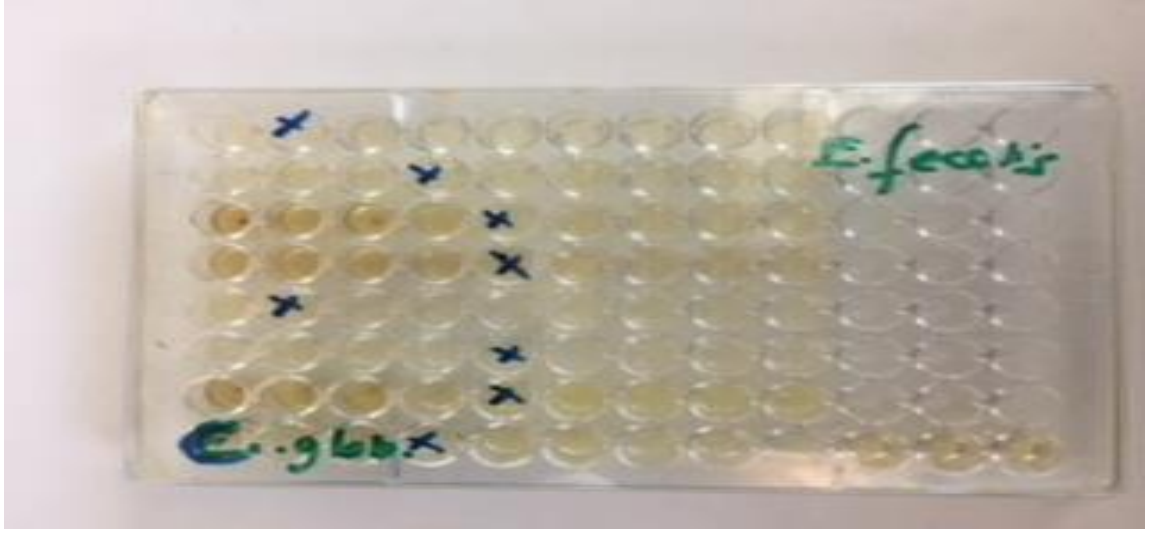
Mikroorganizma	P10	C30	TE30	S10	Kontrol	Kök	Gövde	Yaprak	Çiçek
<i>S. faecalis</i>	30	25	14	20	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 1911	45	27	27	23	-	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	-	35	28	20	-	24	17	32	11
<i>K. pneumoniae</i> NRLLB4420	28	23	15	20	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	28	25	13	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	30	35	20	12	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	45	20	22	16	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC5 51289	20	25	25	-	-	8	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	15	15	22	-	-	-	-	-



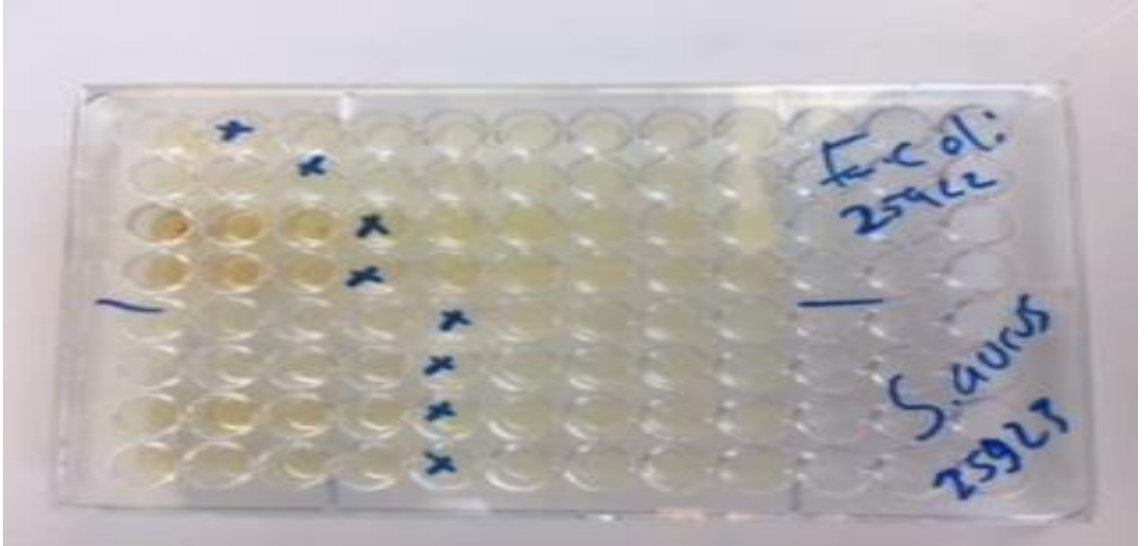
Resim 4.1. A ve B antimikrobiyal ajanların, C ve D bitkinin kısımlarının metanol ekstraktlarının disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi

#### 4.5.4.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Testi

*H. orientalis*'in kök, gövde, çiçek ve yaprak metanol ekstraktının MİK değerlerine bakıldığında (Çizelge 4.15), kök kısmınının *E. faecalis* ATCC 51299, *C. glabrata*, *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 'de 125  $\mu$ L'lik dilüsyonda üremeleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Resim 4.2, 4.3). Gövde kısmında *E. faecalis* ATCC5 1299'de 31,3  $\mu$ L, *C. glabrata*'da 15,6, *E. coli* ATCC 25922'de 62,5  $\mu$ L ve *S. aureus* ATCC 25923'de 15,6  $\mu$ L'lik dilüsyonda üremeleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Yaprak kısmında *E. coli* ATCC 25922'de 31,3  $\mu$ L, *E. faecalis* ATCC 51299 ve *S. aureus* 25923 'de 15,6  $\mu$ L'lik dilüsyonda üremeleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Çiçek kısmında *E. faecalis* ATCC 51299 ve *S. aureus* ATCC 25923'de 15,6  $\mu$ L, *C. glabrata* ve *E. coli* ATCC 25922'de 31,3  $\mu$ L'lik dilüsyonda üremeleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Resim 4.2, 4.3).



Resim 4.2. *E. faecalis* ATCC 51289 ve *Candida glabrata*'nın MİK konsantrasyonu



Resim 4.3. *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923'un MİK konsantrasyonu

Çizelge 4.15. Bitki numunelerinin MİK konsantrasyonu ( $\mu\text{L}$ )

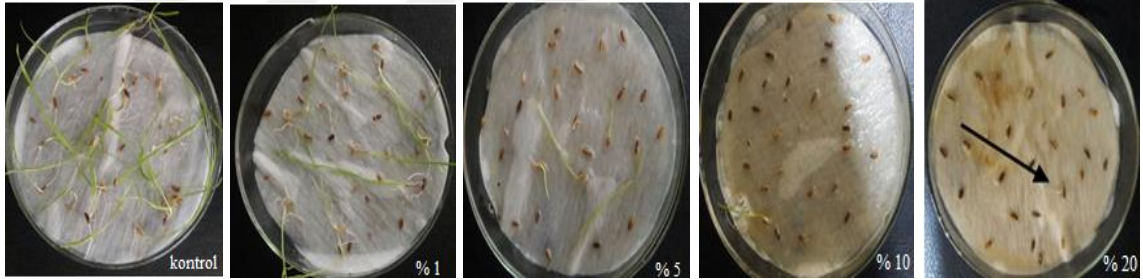
Mikroorganizma	kök	gövde	yaprak	çiçek
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	125	31,3	15,6	15,6
<i>Candida glabrata</i>	125	15,6	15,6	31,3
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	62,5	31,3	31,3
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	125	15,6	15,6	15,6

#### 4.6 Çimlenme Üzerine Etki

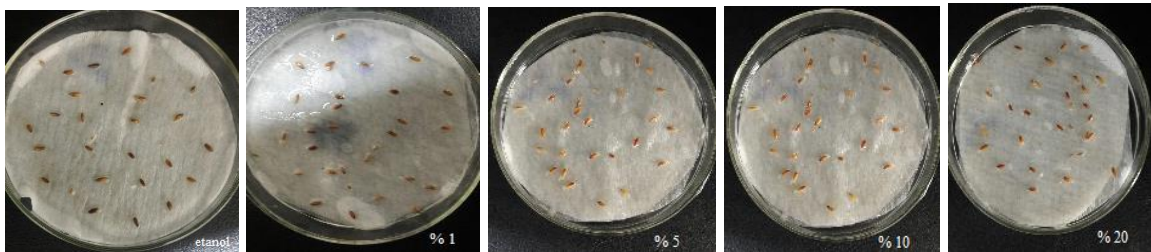
Farklı miktarlardaki kök ekstraktının artan doz oranına bağlı olarak 5 gün ara ile çimlenme sayısı ölçülmüştür. 5. günde sadece kontrol gurubunda 5 tane tohumun çimlendiği görülmüş diğerlerinde çimlenme meydana gelmemiştir. 10. günden 20. güne kadar kontrol grubunda çimlenme görülmüştür. 10., 15., ve 20. günde doza bağlı olarak çimlenme görülmüştür (Resim 4.4). Kontrol grubuna göre artan dozda çimlenme giderek engellenmiştir (Çizelge 4.16). Etanol ile ekstraksiyon kullanılmasında hiçbir çimlenme meydana gelmemiştir (Resim 4.5).

Çizelge 4.16. Farklı konsantrasyonlardaki kök ekstraktının günlere göre çimlenme sayısı

Kök Doz	5.gün çimlenme sayısı	10.gün çimlenme sayısı	15. gün çimlenme sayısı	20. gün çimlenme sayısı
Kontrol	5	17	20	22
% 1	-	8	10	13
% 5	-	2	4	6
% 10	-	1	1	2
% 20	-	-	1	1



Resim 4.4. Kontrol, % 1'lik, % 5'lik, % 10'lik, % 20'lik sulu ekstraktın çimlenmesi



Resim 4.5. Kontrol, % 1'lik, % 5'lik, % 10'lik, % 20'lik etanol ekstraktın çimlenmesi

#### 4.7 *H. orientalis* Kısımlarının Metal Tayini

Doğal ortamından toplanan *H. orientalis* bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının metal içerik sonuçları (Çizelge 4.17)'de verilmiştir. Kök kısmında zengince bulunan metal  $^{24}\text{Mg}$  35,767 ppm (mg/kg), gövde kısmında en fazla bulunan metal  $^{24}\text{Mg}$  23,700 ppm, yaprak kısmında en fazla bulunan metal  $^{24}\text{Mg}$  31,786 ppm ve çiçek kısmında en fazla metal içeriği  $^{24}\text{Mg}$  53,993 ppm olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. *H. orientalis* kısımlarının metal tayini

Test Maddeleri	$^{11}\text{B}$ mg/kg	$^{24}\text{Mg}$ mg/kg	$^{55}\text{Mn}$ mg/kg	$^{59}\text{Co}$ mg/kg	$^{60}\text{Ni}$ $\mu\text{g/kg}$	$^{63}\text{Cu}$ mg/kg	$^{64}\text{Zn}$ mg/kg	$^{66}\text{Zn}$ mg/kg	$^{77}\text{Se}$ mg/kg	$^{80}\text{Se}$ mg/kg	$^{82}\text{Se}$ mg/kg
Blank	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Kök	0,19	35,76	2,27	0,01	64,38	0,14	0,74	0,76	0,61	0,49	0,00
Gövde	0,99	23,70	0,57	0,00	33,21	0,11	1,15	1,17	0,68	0,57	0,00
Yaprak	0,51	31,78	1,95	0,01	60,85	0,16	0,42	0,42	1,01	0,78	0,00
Çiçek	0,59	53,99	2,01	0,00	64,61	0,15	0,53	0,62	1,61	0,73	0,00



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Medikal öneme sahip bitkilerden ekstrakte edilen doğal bileşikler yeni biyoaktif maddelerin bulunması için büyük bir öneme sahiptir. Helleborus türlerinden başlıca Kardiyoaktif glikozitler, sterol saponozitler, ekdisterooidler ve laktonlar dahil olmak üzere birçok biyoaktif bileşik izole edilmiş [72], ve bunlar antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal etkiler göstermiştir.

Son birkaç yıldır farklı Helleborus türleri önemli sekonder metabolitler üretme potansiyelleri nedeniyle fitokimyasal araştırmalara konu olmasına rağmen literatür taramalarımızda *H. orientalis* türü ile yapılan çalışmaların birkaç tane ile sınırlı olduğu görülmüştür [10, 14, 127, 207, 208]. *H. orientalis*'in toplam fenolik ve flavonoid içeriği ve comet assay ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' e karşı koruyucu etkisi hakkında bir veri yayınlanmamıştır. Biyokimyasal içeriği, farklı kimyasal analiz teknikleri kullanılarak biyolojik ve kimyasal aktiviteleri test edilmiştir.

*H. orientalis* (Ranunculaceae), Yunanistan ve Türkiye'ye de doğal olarak bulunur. Ülkemizde bu tür Kuzey Anadolu'da özellikle Karadeniz kıyılarında yayılış gösterir [209]. Çalışmamızda 2017 Nisan ayında Giresun (Piraziz) bölgesinden toplanan (Herbaryum adı ve kayıt numarası: AKU-9324) bitki materyali analizler için teşhis edildikten sonra kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda, Giresun, Piraziz ilinde doğal olarak yetişen *H. orientalis*'in olası antioksidan özellikleri, antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA hasarı üzerine pozitif ve negatif etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda *H. orientalis* kök, gövde, çiçek ve yaprak metanol ekstraktlarının içeriği spektrofotometrik yöntemlerin yanı sıra FTIR, HPLC, MS ile belirlenmiştir.

“Fenolik” veya “polifenolik” terimi, bir veya birkaç hidroksil grubu (OH) içeren benzenik halkaya sahip olan bileşikler tanımlar. Reaktiflikleri, fenolik fonksiyonun asidik karakteri ve benzen halkasının nükleofilik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Karbon iskeletine göre flavonoid bileşikler polifenoller ve flavonoid olmayan olmak üzere 2 grupta sınıflandırılır [210]. Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri olduğu için antikarsinojen,

antimutajen ve antimikrobiyal aktivite gösterirler ve bu bakımdan da sağlık için olumlu etkileri vardır. Flavonoidler en önemli antioksidan ve serbest radikal tutucu ve zincir kırıcılar olarak bilinmektedirler [211].

FTIR spektrumundaki 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  deki bantlar C=O ve C=C karbonil gruplarının gerilmesinden kaynaklanır. Aynı zamanda bu bölge fenolik moleküllerle ilişkilidir [212]. 1540–1175  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesindeki titreşimin O-H, C-O, C-H ve C=C deformasyonundan [213], ya da flavonol ve fenol kaynaklı olabileceğini bildirmiştir [212, 214, 215]. Masek ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada 940–1175  $\text{cm}^{-1}$  spektral bölgesindeki titreşim ise C–OH gruplarının yanı sıra fenoldeki C-O ve karbonhidrat yapısındaki C-C ve C-O' ye bağlı olduğunu bildirmişlerdir [214].

FTIR spektrumunda 4000-450  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki pikler EK 1' de gösterilmiştir. Kök, gövde, çiçek ve yaprak metanol ekstraktlarında C-H, C=O, C-O-C, C–OH, C=C bağ gerilmesi mevcut olup bu durum *H. orientalis* metanol ekstraktlarında fenolik bileşiklerin bulunduğunu göstermektedir. HPLC analiz sonuçları ile spektrometrik fenolik madde miktarı benzerlik göstermektedir.

*H. orientalis* gövdesinin metanol ekstratının FT-IR spektrumu incelendiğinde 3304,4 dalga boylarındaki pik N-H gerilmesi ile ekstrakta amid, amin alkoloidlerinin varlığını göstermektedir. 2930 dalga boylarındaki pik C-H gerilmesini fenolik aromatik bileşiklerin gövde de bulunduğunu, 1723,4 dalga boylarındaki pik C=O gerilmesi ile saponinlerin varlığını göstermektedir. 1592 dalga boylarındaki pik C=C gerilmesini fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 1035,9, 1252,6 dalga boylarındaki pikler C-O-C gerilmesini glikozitlerin varlığını göstermektedir. 918,16 N-D glikozit gerilmesi EK 1' de gösterilmiştir. *H. orientalis* kök kısmının FT-IR spektrumundaki 3307,1 dalga boylarındaki pik amid, amin ve alkoloidlerde saptanan N-H gerilmesini göstermektedir. 2855, 2921,9 ve 3012,8 dalga boylarındaki pikler C-H gerilmesi kaynaklı olup fenolik aromatik bileşiklerin kök etanol ekstraktında bulunduğunu göstermektedir. 2106 dalga boylarındaki pik C=C gerilimini, 1707,3 dalga boylarındaki pik C=O gerilimini göstermekte olup, bu durum saponinlerin varlığına bağlıdır. 1035,9, 1156,3, 1196,4 ve 1274 dalga boylarındaki pikler glikozitlerin varlığında ortaya çıkan C-O-C gerilmesidir. 920,84 N-D glikozit gerilmesi EK 1' de gösterilmiştir. Bitkinin çiçek kısmının FT-IR spektrumu incelendiğinde: 3248,3 dalga boylarındaki pik N-H gerilmesi amid, amin alkoloidlerinin varlığını göstermektedir. 2847,

2919,2 dalga boylarındaki pik C-H gerilmesini fenolik aromatik bileşiklerin olduğunu göstermektedir. 2114 dalga sayısındaki pik C = C gerilmesini göstermektedir. 1394,3 dalga boylarındaki pik CH<sub>3</sub> gerilmesi alkaloid varlığını göstermektedir. 1308,7, 1035,9 dalga boylarındaki pikler C-O-C gerilmesi glikozitlerin varlığını göstermektedir. 920,84 N-D glikozit gerilmesi EK 1’de gösterilmiştir. Dolayısıyla fenolik bileşikler antioksidan özelliğe sahip olduğundan, çalışmamızda çıkan sonuçlarda da fenolik bileşiklere saptandığı için antioksidan özelliğe sahip olduğunu söyleyebiliriz.

*H. orientalis* bitkisinin farklı kısımlarındaki toplam fenolik madde içerikleri spektrofotometrik yöntemlerle analizde 1 gr numune içerisinde mg GAE olarak ifade edilmiştir. Çizelge 4.2’ de görüldüğü üzere Folin cicaltou yöntemi ile çiçek örneklerinde maksimum fenolik madde bulunmuş olup (19.42± 0,24 mg GAE/1 gr numune), bunu yaprak örneği (17,20 ± 0,25mg GAE/1 gr numune) izlemektedir.

*H. orientalis* bitkisinin kök, çiçek, gövde ve yaprak metanol ekstraktlarında en fazla toplam flavonoid madde içeriği spektrofotometrik ölçümde (11,880± 0,15mg QE/ 1 gr) çiçekte ve yaprakta (10.212± 0,17 mg QE/ 1 gr) bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar FTIR spektrum bulgularını desteklemektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara benzer şekilde, Poun ve arkadaşları, *H. purpurascens* ve *H. officinale* polifenolik ekstraktlarını değerlendirmişler ve bitkinin çiçeklerinde yüksek fenol içeriği olduğunu ve bunu yaprak örneğinin izlediğini bildirmişlerdir [216].

En son yapılan araştırmalar, Helleborus ekstraktının tümörlere karşı aktif olduğunu, evrimlerini inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır. Ancak bu konuyla ilgili birkaç çelişki ve tartışma olduğu belirlenmiştir. Konsantre *H. purpurascens* ekstraktlarının yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve bu nedenle daha ileri tıbbi uygulamalar için iyi bir kaynak olarak kabul edilebileceği düşünülmüştür. Biyoaktif bileşikleri yoğunlaştırmak için membran işlemleriyle yüksek antioksidan aktiviteli konsantre *H. purpurascens* ekstraktlarının elde edilebileceği belirlenmiştir [159].

Cakara ve arkadaşları (2011), *H. kokorus* özlerinin biraz daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, ancak *H. multifidus* ve *H. odorus*’un, *H. hercegovinus*’ a göre daha güçlü antiproliferatif aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir [160]. Toplam fenolik

madde ve antioksidatif özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Yaprak ekstraktının daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve ikincil metabolitlerin içeriklerinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan kök ekstraktları, yüksek oranda antiproliferatif aktivite gösteren *H. hercegovinus* yapraklarının etanolik ekstraktları haricinde daha yüksek antitümöz aktivite sergilemiştir [160]. Çalışmamızda da yaprak özütlerindeki fenolik ve flavonoid madde içeriği kök özütlerine göre oranla daha fazla bulunmuştur.

Kumar ve Laltha (2014), *H. niger*' in etanol ekstraktlarının streptozotosin ve nikotinamide bağlı diyabet sıçanlarda indüklenmiş tip 2 diyabet modelinde antioksidan aktivite sergilediğini bildirmişlerdir [217]. Çalışmamızda, *H. orientalis* ekstraksiyonunda solvent olarak metanol kullanılmıştır. Ekstraktların antioksidan aktivitesini ölçmek için DPPH' nin kolay ve doğru şekilde uygulanması gerekmektedir [218, 219]. Bu çalışmada, DPPH radikalinin süpürme aktivitesi en yüksek çiçek ekstraktında bulunmuştur. En düşük DPPH radikalinin süpürme aktivitesi kökte belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin önemli bir antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir ve bitkisel özlerin aktivitesinin fenolik bileşiklerin varlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [208, 220].

*H. niger*' in sıvı kromatografisinde ve kütle spektrumunda hidroksisinnamik asitler ve başka polar bileşikler içeren kafeik asit hex-hex I, hex-hex II (341 MS<sup>2</sup>), kafeik asit hex (161 MS<sup>2</sup>), flavonol glikozitlerde kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex I ve hex II (301 MS<sup>2</sup>, 595 MS<sup>2</sup> 445 MS<sup>3</sup>), kuersetin 3-O-hex-pent (301 MS<sup>2</sup>), kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex, (609 MS<sup>3</sup>), kuersetin hex-hex (301 MS<sup>2</sup>), kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex, (725 MS<sup>2</sup>, 429 MS<sup>3</sup>), kaempferol hex-hex I (489 MS<sup>2</sup>), kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex-hex (725 MS<sup>2</sup> MS<sup>3</sup>) moleküler ağırlıkları belirlenmiştir [223].

Bu çalışmaya benzer olarak *H. orientalis* bitkisinin kök, gövde yaprak ve çiçek kısımlarının metanol ekstraktlarının LC-MS kromatogramlarının analiz sonuçlarına bakıldığında, kardioaktif glikozitlerin molekül ağırlıklarına eşdeğer glikozitler tesbit edilmiştir. Veriler çiçekte ve gövde de hellebrin, yaprakta hellebrigen, kökte hellebrigen ve helleborin' in varlığı EK 2'de gösterilmiştir. *H. orientalis* bitkisinin yaprak kısmında hidroksisinnamik asitler ve başka polar bileşikler içeren kafeik asit hex (161 MS<sup>2</sup>), flavonol glikozitleri içeren kuersetin 3-O-hex-pent (301 MS<sup>2</sup>), kuersetin hex-hex (301 MS<sup>2</sup>), kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex I ve hex II (301 MS<sup>2</sup>, 595 MS<sup>2</sup> 445 MS<sup>3</sup>), kaempferol 3-O-

hex-pent-7-O-hex, (429 MS<sup>3</sup>, 593 MS<sup>3</sup>)'e rastlanmıştır. Kök kısmının flavonol glikozitlerini içeren kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex I ve hex II (301, 445, 463 MS<sup>3</sup>)'e rastlanmıştır. Gövde kısmında flavonol glikozitlerini içeren kuersetin hex-hex (301 MS<sup>2</sup>), kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex I ve hex II (301, 445 MS<sup>3</sup>), kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex, (609 MS<sup>3</sup>), kaempferol hex-hex I (489 MS<sup>2</sup>) ve kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex-hex (725 MS<sup>2</sup>MS<sup>3</sup>) molekül ağırlıklarının ortaya çıktığı EK 2'de gözlemlenmiştir. Çiçek kısmında hidroksisinnamik asitler ve başka polar bileşikleri içeren kafeik asit hex-hex II (341 MS<sup>2</sup>), flavonol glikozitleri içeren kuersetin 3-O-hex-pent (301 MS<sup>2</sup>), kuersetin hex-hex (301 MS<sup>2</sup>), kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex, (429 MS<sup>3</sup>), kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex, (429 MS<sup>3</sup>), kuersetin 3-O-hex-pent-7-O-hex, (609 MS<sup>3</sup>), kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex-hex (725 MS<sup>2</sup>MS<sup>3</sup>), kaempferol 3-O-hex-pent-7-O-hex, (725 MS<sup>2</sup>)'e EK 2'de rastlanmıştır.

*H. orientalis*'in yaprak metanol ekstraktında kafeik asit (1,86 ppm) ve yüksek miktarda rosmarinik asit (18,98 ppm) varlığı saptanmıştır. Gövde metanol ekstraktlarında rosmarinik asit (7,48 ppm) tesbit edilmiştir. Benzer şekilde çiçek metanol ekstraktında sadece gallik asit tesbit edilmesine rağmen oranının yüksek olduğu (26,52 ppm) belirlenmiştir. Kök metanol ekstraktında denenen standart çözeltilerden, hiçbir fenolik asit içeriğe rastlanılmamıştır (EK 3). Eldeki veriler doğrultusunda *H. orientalis* metanol ekstraktları HPLC analizlerinde, fenolik asit içeriğinin en fazla çiçek ve yaprakta olduğu saptanmıştır. Fenolik madde olarak ekstraktlarda gallik asit miktarı fazla çıktığı için Folin cicaltou yöntemi ile spektrometrik uygulamada, fenolik madde miktar tayinininde gallik asit standart olarak kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Üç fenolik asit ferulik asit, kafeik asit ve klorojenik asit olarak tanımlanırken, araştırılan flavonoidler, *H. atrorubens* yapraklarının metanolik ekstraktında kaempferol ve kuersetin türevleri olarak ispatlanmıştır [220, 222]. Çalışmamızda fenolik asitler, çiçeklerde 26,52 ppm gallik asit ve yapraklarda 2 ppm kafeik asit olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışma, kafeik asitin anti-mutajenik ve anti-kanserojen özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Chen ve arkadaşları (1995), kafeik asidin lipoperoksil radikallerini (ROO), lipid peroksidasyon zinciri reaksiyonunu inhibe eden bir hidrojen atomu (karşılık gelen hidroperoksida) vererek azaltabildiğini göstermiştir [223].

Shahri ve arkadaşları (2011) fenolik asit içeriğinin çiçeklenme fazının I ve II. evresinde düştüğünü, faz IV'de ise arttığını bildirmişlerdir [208]. Bu nedenle, koruyucu

etkilerin belirlenmesi için fenolik asit içeriği yüksek olan yaprak ekstraktı kullanılmıştır. *H. orientalis* fenolik içerik bakımından zengin olup, literatür taramasında *H. orientalis*'in bitki ekstraktlarında comet testi ile ilgili bir çalışmanın bulunmadığı görülmüştür. Comet (tek hücreli jel elektroforezi), ökaryotik hücrelerdeki deoksiribonükleik asit (DNA) iplikçisindeki kırıkları belirleyerek DNA hasarı ve tamirini belirlemede kullanılan etkin ve güncel bir yöntemdir.

*H. orientalis*'in oksidatif strese karşı koruyucu etkisi TAS, TOS yöntemi ve comet testi kullanılarak belirlenmiştir. *H. orientalis* bitkisinin yaprak ekstraktı, comet denemesinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e karşı doza bağlı bir şekilde ( $r = 0.86$   $p < 0.01$ ) tüm konsantrasyonlarda DNA hasarını azaltmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda ( $3,4 \pm 0,21$ ) TAS düzeyleri anlamlı olarak ( $p < 0,05$ ) azalırken, *H. orientalis* bu grupta anlamlı olarak ( $p < 0,05$ ) artmış ve yaprak ekstraktlarının konsantrasyonu olarak kullanılmıştır. Koruyucu etki 2500 µg/mL ( $6,3 \pm 0,67$ ) dozlarda artmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. TOS düzeylerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda ( $25,3 \pm 0,74$ ) anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) arttığı ve *H. orientalis*'in gruplarda anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda yaprak ekstraktının, insan periferik kan hücrelerindeki DNA hasarını azalttığı, TAS düzeylerini arttırdığı, TOS seviyesini azalttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla yaprakta bulunan yüksek antioksidandan dolayı TAS-TOS çalışması, comet çalışmasını desteklemiştir. Bu, *H. orientalis*'in yaprak ekstraktının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı koruyucu etkisinin aktivitesi hakkındaki ilk rapordur. Çalışma, *H. orientalis* ekstraktlarının yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, dolayısıyla ileri tıbbi uygulamalar için iyi bir kaynak olabileceğini göstermektedir.

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda steroidal saponinlerin bazılarının antibakteriyel aktivite gösterdiği [105], fitoektisteroidlerin mantarlara ve bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği [108] ve Protoanemoninlerin antimikrobiyal, antibakteriyel, antifungal ve antimutajenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [112- 116]. *H. bocconeii* kök ekstraktlarının solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan mikroorganizma suşlarına karşı (*Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13637), antibakteriyel aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir. Kök metanolik ekstraktın ve bufadienolid fraksiyonun, antibakteriyel aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir. Ayrıca kök metanolik

ekstraktı ve bufadienolid fraksiyonu, *Moraxella catarrhalis'e* (0.2, 0.1) ve *Streptococcus pneumonia'ya* (0.4, 0.1) karşı en düşük MİK değerlerini (100 µg / ml) göstermiştir [162]. İran'da *H. niger*'in metanolik ekstraktının *Candida albicans* ve *Candida utilis'e* karşı antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir [164]. Türkiye'de Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişen *H. vesicarius* 'un metanol, bütanol, heksan ve su ekstraktlarının bazı Gram (+) ve Gram (-) bakterileri üzerine antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve *S. aureus*, *E. faecalis'e* karşı anitbakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca ekstraktların tamamının *Candida albicans* üzerinde orta derecede antifungal etki gösterdiğini bildirmişlerdir [40].

Çalışmamızda da *H. orientalis* bitkisinin kök, gövde, çiçek ve yaprak kısımlarının metanolik ekstraktı *Candida glabrata* 'da antifungal aktivite göstermiştir. Kök metanolik ekstraktında *E. faecalis* ATCC5 51289 'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Resim 4.1). Ayrıca çalışmamızda *H. orientalis* bitkisinin ayrı ayrı metanol ekstraktından MİK değerlerine bakıldığında kök kısmının *E. faecalis* ATCC 51299, *C. glabrata*, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923'de 125 µL (Resim 4.2, 4.3), gövde kısmında *E. faecalis* ATCC 51299'de 31,3 µL, *C. glabrata* 'da 15,6 µL, *E. coli* 25922'de 62,5 µL, *S. aureus* 25923'de 15,6 µL, yaprak kısmında *E. faecalis* ATCC 51299 ve *S. aureus* 25923'de 15,6 µL, *E. coli* 25922' de 31,3 µL, çiçek kısmında *E. faecalis* ATCC 51299, *S. aureus* 25923'de 15,6 µL, *C. glabrata* ve *E. coli* 25922' de 31,3 µL'lik dilüsyonlarda üremeleri inhibe ettiği belirlenmiştir (Resim 4.2, 4.3). Helleborus türüne ait bitkilerin kök kısmında bulunan kimyasal bileşiklerin spirostanol glikozit, bufadienolid, 2 bufadienolid glikozit, 5 tane yeni spirostanol saponin ve 2 yeni furostanol saponin olduğu tespit edilmiştir. *H. orientalis* 'in antimikrobiyal aktivite göstermeside bu kimyasal bileşiklerden kaynaklandığını göstermektedir.

Sonuç olarak Helleborus türleri hala değerli bir ürün kaynağı olarak yetersiz araştırılmakta ve daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu çalışma aynı zamanda *H. orientalis* bitki ekstraktının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye karşı koruyucu etkisinin aktivitesi hakkındaki ilk rapordur. Çalışma, *H. orientalis* yaprak ve çiçek ekstraktlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, dolayısıyla başka tıbbi uygulamalar için iyi bir kaynak olabileceğini göstermektedir. Bu araştırmalar, *H. orientalis* ekstraktının saflaştırılmasına ve kimyasal tanımlamasına dayanmalıdır. Bu konuyla ilgili yeni araştırma yaklaşımları, yeni bileşiklerin etkilerinin değerlendirilmesiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Evans, WC., 2002, “Trease and evans pharmacognosy”, 15th. Edition, *Edinburgh: W. B. Saunders*, 23.
- [2] Heywood, V.H., 1979, “Flowering plants of the world”, Oxford: *Oxford University Press*.
- [3] Meiners, J., Debener, T., Schweizer, G., Winkelmann, T., 2011, “Analysis of the taxonomic subdivision within the genus *Helleborus* by nuclear DNA contentand ge-nome-wide DNA markers”, *Sci. Horticult.* 128, 38–47. doi: 10.1016/j.scienta.2010.12.011.
- [4] Anonim, 2012, “Doğu çöplemesi (*Helleborus*)”, *Orman Genel Müdürlüğü Dökümanları*.
- [5] Pascual-Villalobos, M.J., Robledo, A., 1998, “Screening for anti-insect activity in mediterranean plants”, *Industrial Crops and Products* 8, 183-194.
- [6] Kerek, F., 1981, “Boicil, a new and very efficient antialgic, spasmolytic, and blood vessel regulating drug obtained from the plant *Helleborus*”, *Int. Conf. Chem. Biotechnol. Biol. Act. Nat. Prod.* 2, 22–37.
- [7] Horstmann, B., Zinser, E., Turza, N., Kerek, F., Steinkasserer, A., 2008, “MCS-18, a novel natural product isolated from *Helleborus purpurascens* inhibits dendritic cell activation and prevents autoimmunity as shown in vivo using the EAE model”, *Immunobiology* 212, 839–853.
- [8] Jesse, P., Mottke, G., Eberle, J., Seifert, G., Henze, G., Prokop, A., 2009, “Apoptosis-inducing activity of *Helleborus niger* in ALL and AML”, *Pediatr. Blood Cancer*, 52, 464-469.
- [9] Baytop, T., 1999, “Türkiye’de bitkiler ile tedavi, geçmişte ve bugün (İkinci baskı)”, *Nobel Tıp Kitapevi*, İstanbul.
- [10] Mımakı, Y., Matsuo, Y., Watanabe, K., Sakagami, H., 2010, “Furostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*”, *Journal of Natural Medicine*, 64(4): 452-459.
- [11] Akin, S., Anil, H., 2007, “A furostanol saponin and phytoecdysteroid from roots of *Helleborus orientalis*”, *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1): 90-92.
- [12] Watanabe, K., Sakagami, H., Mımakı, Y., 2005. “Four new steroidal saponins from the rhizomes of *Helleborus orientalis*”, *Heterocycles*, 65(4): 775-785.
- [13] Watanabe, K., Mımakı, Y., Sakuma, C., Sashida, Y., 2002, “A novel polyoxygenated spirostanol trisdesmoside from the rhizomes of *Helleborus orientalis*”, *Chemistry Letters*, 8: 772-773.
- [14] Watanabe, K., Sakagami, H., Mımakı, Y., Sashida, Y., 2003, “Bufadienolide and spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*”, *Journal of Natural Products*, 66(2): 236-241.
- [15] İnternet; Anonim 1, 2016, [https://en.wikipedia.org/wiki/Helleborus\\_orientalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Helleborus_orientalis).



- [16] İnternet; Anonim 2, 2017, <http://sifamarket.com/sifali-bitkiler-sozlugu/danakiran>.
- [17] Doğan, G.E., 2012, “*Helleborus* Lam., Şu eserde: Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M.T. (edlr.), “Türkiye bitkileri listesi (Damarlı Bitkiler)”, *Nezihat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*, İstanbul, s. 778.
- [18] İnternet; <http://www.suleymaniyevakfi.org/fitrat-ve-tip-arastirmalari/zakkum-ve-medusa.html>.
- [19] Bartık, M., Piskac, A., 1981, “Veterinary toxicology”, *Elsevier Sci. Publ. Comp., Praha*.p224.
- [20] Baytop, T., 1989, “Türkiye’de zehirli bitkiler, bitki zehirlenmeleri ve tedavi yöntemleri”, *İ.Ü.Ecz.Fak.Yay.* No.54, İstanbul,s. 40-42.
- [21] Baytop, T., Malkoç, G., 1965, “*Helleborus orientalis* lam. var. *Hirsutus* (Schiffin) Hay kökleri üzerinde araştırmalar”, *İ.Ü. Ecz. Fak. Mec.*1(1): 18-31.
- [22] Güley, M., 1960, “Memleketimizde yetişen Helleboruslar”, *A.Ü.Vet. Fak.Dergi*, 7(3): 114-123.
- [23] Kantemir, İ., Temelli, E., 1963, "*Helleborus orientalis* bitkisiyle mukayeseli araştırmalar", *A. Ü. Tıp Fak. Mec. XVI*, (No: 1) *Ankara Üniversitesi Basımevi*.
- [24] Petricic, J., Tarle, D., Knezevic, E. 1977, “*Helleborus* chemotypes from Yugoslavia recognizable by hellebrin contents”, *Acta Pharm, Jugoslav.*, 27(3): 127-129.
- [25] Martinis, Z., 1974, “Formand development of trichomes and trichomoid formationsön the leaves of several *Helleborus* species and their significance for the taxonomy of the genus", *Acta. Bot. Croat.* (33) 93-110.
- [26] Trease, G.E., Evans, W.C., 1972, “Pharmacognosy”, 11 th Edition, *BailliereTindall*, London.
- [27] Tutin, T.G., Heywood T.G., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D. H., Walters, S. M.,Weeb, D. A., 1976, “*Flora Europea*”, 4, (1), *Cambridge University Press*, London.
- [28] Meiners, J., Winkelmann, T., 2012, “Evaluation of reproductive barriers and realisation of interspecific hybridisations depending on genetic distances between species in the genus *Helleborus*”, *BMC Plant Biol.* 2015; 15: 15, First published 27 January, <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00542.x>, Cited by 8.
- [29] Tutin, T.G., 1964, “Ranunculaceae. In: *Flora Europaea*”, *Cambridge University Press*, vol. 1, 206–242.
- [30] Gabryszewska, E., 2016, “Propagation *in vitro* of Hellebores (*Helleborus* L.) review”, *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 16(1) 61–72.
- [31] Jensen, U., Hoot, S.B., Johnnasson, J.T., Kosuge, K., 1995, “Systematic sand phylogeny of the Ranunculaceae – A revised family concept on the basis of molecular data”, *Plant Syst. Evol.*,9 (Supplement): 273-280.

- [32] Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., & Seberg, O., 2007, "Ranunculaceae", Pp. 273-276. In: *Flowering Plant Families of the World*, New York, Firefly Books.
- [33] Pigg, K.B., Devore, M.L., 2005, "Paleoactaea gen. nov. (Ranunculaceae) fruits from the paleogene of north dakota and the london clay", *American Journal Of Botany*, 92(10): 1650–1659.
- [34] İnternet; <http://ladnydom.pl/Ogrody/1,113408,3506700.html>.
- [35] Baytop, A., 1972, "Farmasötik Botanik", *İ. Ü. Ecz. Fak. Yayınları (No: 25)*, Baha Matbaası, İstanbul.
- [36] Baytop, T., 1971, "Farmakognozi, II", *İ. Ü. Yayınları (No: 1685) Ecz. Fak. (No: 12) Baha Matbaası*, İstanbul.
- [37] Karamanoğlu, K., 1973, "Farmasötik botanik", *A. Ü. Ecz. Fak. Yayınları (No: 24)*, A. Ü. Basımevi, Ankara.
- [38] Gürgen, A., 1943, "Türkiye zehirli nebatlarının en ehemmiyetleri üzerinde kimyevi araştırma", *Ankara Z.E.Ç.* 138. 92-94.
- [39] Güley, M., 1956, "Samsun ve trabzon bölgesi tıbbi ve zehirli bitkilerden başlıcalarının farmakodinamik etkileri ve tedavideki önemleri", *A. U. Vet. Fak. Yayınları (No: 49)* 23-6.
- [40] Karabulut T., 2014, "*Helleborus vesicarius* (Ranunculaceae) bitkisinin içerdiği uçucu yağların tayini ve farklı ekstrelerinin antimikrobiyal aktiviteleri", *Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Şanlıurfa*.
- [41] Yılmaz, O., Mısıroğlu, D., 1995, "*Helleborus orientalis* kökleriyle oluşan zehirlenmelerin toksikolojik ve patolojik özellikleri", *Y.Y.Ü. Vet.Fak. Der.*, 6(1-2) : 13-20.
- [42] Benett, M.D., Smith, J.B., 1976, "Nuclear DNA amounts in angiosperms", *Philos. Trans. R. Soc.* 274, 227–274. doi:10.1098/rstb.1976.0044.
- [43] Zonneveld, B.J.M., 2001, "Nuclear DNA contents of allspecies of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate be-tween species and sectional divisions", *Plant. Syst. Evol.* 229, 25–130. doi: 10.1007/s006060170022.
- [44] Mathew, B., 1989, "Hellebores", *AGS Publications Ltd*, pp 180.
- [45] Werner, K., Ebel, F., 1994, "Zur Lebensgeschichte der Gattung *Helleborus* L. (*Ranunculaceae*)", *Flora*, 189, 97–130.
- [46] Roskov, Y., Kunze, T., Orrell, T., Abucay, L., Paglinawan, L., Culham, A., Bailly, N., Kirk, P., Bourgoin, T., Baillargeon, G., Decock, W., De Wever, A., Didžiulis V. (ed)., 2014, "Türler 2000 ve ITIS yaşam kataloğu, *Yıllık kontrol listesi*", Tür, İngiltere.
- [47] Guo, Z.J., Wang, J.X., Su, Y.F., Wei, Y.X., Zhu, Y.H., 2003, "Shaanxi qiyao. shaanxi science and technology press", *Shaanxi*, China, 35 pp.
- [48] Wissner, W., Kating, H., 1974, "Botanical and phytochemical inves-tigations of species of the genus *Helleborus* growing in Europe and Asia Minor, I. Distribution, morphology and cultivation of *Helleborus species*", *Planta Medica* 26, 128–143.

- [49] Ciulei I., Grigorescu E., Stănescu U., 1993, “Medicinal plants, phytochemistry and phytotherapy [Plante medicinale, fitochimie si fitoterapie, Vol. 1]”, *Medical Ed., Bucharest*, (in Romanian).
- [50] Ralska-Jasiewiczowa, M., 1960, “*Helleborus purpurascens* W.K. new species for the Polish flora from the Bieszczady Zachodnie (East Carpathians)”, *Ann. 4, Fragm. Flor. Geobot.*, 6(3), 497–500.
- [51] Šušek, A., Ivančič, A., Lemoine, M.C., Guillemin, J.P., Caneill, J., Šiško, M., 2005, “Variability of christmas rose (*Helleborus niger* L.) populations and its potential use in genetic breeding”, *Acta Biol. Cracov., ser. Botanica*, 42/2, 129–135.
- [52] Tanker, N., Bingöl, F., 1984, “Türkiye’de yetişen *Helleborus* L. türleri üzerinde farmasötik botanik yönünden araştırmalar”, *Ankara Ecz. Fak. Der.*, 14, 25 03, P. 2404.
- [53] Ramoutsaki, I.A., Askitopoulou, H., Konsolaki, E., 2002, “Painrelief and sedation in Roman Byzantine texts: *Mandragoras officinarum*, *Hyoscyamos niger* and *Atropa belladonna*”, *International Congress Series*, 1242, 43–50.
- [54] Vesprini, J.P., Pacini, E., 2005, *Plant Systemat, Evol.* 252, 63–70.
- [55] Salopek-Sondi, B., Magnus, V., 2007, “Developmental studies in the Christmas rose (*Helleborus niger* L.)”, *Int. J. Plant. Dev. Biol.*, 1, 151–159.
- [56] Rice, G., Strangman, E., 1993, “The gardener's guide to growing hellebores”, *Portland, Oregon: Timber Press*, p. 160.
- [57] Poupet, R., Cardin, L., Henri, A., Onesto, J.P., 2006, “Healthy in vitro propagation by meristem tip culture of *Helleborus niger*’s selected clone for cut flower”, *Acta Horticult*, 725, 301–310.
- [58] İnternet; [https://www.rhsplants.co.uk/plants/\\_/perennials/Helleborus-purpurascens/itemno.PL30003372/](https://www.rhsplants.co.uk/plants/_/perennials/Helleborus-purpurascens/itemno.PL30003372/).
- [59] İnternet; <https://carolynsshadegardens.com/tag/Helleborus-purpurascens/>.
- [60] McLewin, W., Mathew, B., 1996, “Hellbores: 6 *Helleborus orientalis* and *Helleborus x hybridus*”, *The New Plantsman*, 5:117-124.
- [61] Yeo P.F., 2018, “The nomenclature of *Helleborus lividus* aiton sens. lat. Ranunculaceae”, *Taxon*, Vol. 35, No. 1, pp. 156-161.
- [62] Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O, Edmondson, J.R., Heywood, V.H., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., 1993, “Flora Europea”, *Cambridge University Press*, Cambridge.
- [63] Aschan, G., Pfanz, H., Vodnik, D., Batič, F., 2005, “Photo-synthetic performance of vegetative and reproductive structures of green hellebore (*Helleborus viridis* L. agg.)”, *Photosynthetica*, 43(1), 55–64. doi: 10.1007/s11099-005-5064-x.
- [64] Piškorník, M., 2003, “Production of Christmas Rose young plants from seedlings during one vegetation season”, *EJPAU, Hort.*, 6(1).

- [65] Trier, H., 2004, "Helleborus", *Fleur Kreativ* 4: 23-25.
- [66] Muzashvili, T., Skhirtladze, A., Sulakvelidze, T., Benidze, M., Mshviladze, V., Legault, J., Pichette, A., Kemertelidze, E., 2006, "Cytotoxic activity of *Helleborus caucasicus* A. Br.", *Georg. Chem. J.*, 6, 684–685.
- [67] Internet; [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helleborus\\_orientalis2.jpg?Uselang=tr](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Helleborus_orientalis2.jpg?Uselang=tr).
- [68] Burrell, C.C., Tyler, J.K., 2006, "Hellebores: A comprehensive guide" *Timber Press, Inc.*, Portland, OR.
- [69] Internet; <http://apelasyon.com/Yazi/87-zehirli-guzellik-hellebore>.
- [70] Van Tellingen, C., 2007, "Pliny's pharmacopoeia or the Roman treatment", *Neth. Heart J.*, 15, 118-120.
- [71] Aitzetmüller, K., Tseveguren, N., Werner, G., 1999, "Seed oil fatty acid patterns of the Aconitum–Delphinium–Helleborus complex (Ranunculaceae) plant system", *Evol.*, 215, pp. 37-47.
- [72] Karrer, W., 1943, "About hellebrin, a crystallized glycosid from *Helleborus nigri* roots [Über Hellebrin, ein kristalisiertes Glycosid aus Radix Hellebori nigri]", *Helv. Chim. Acta*, 26, 1353 (in German).
- [73] Slavik, J., Bochorakova J., Slavikova L., 1987, "Occurrence of magniflorine and corytuberine in some wild or cultivated plants of Czechoslovakia Collection of Czechoslovak Chemical Communications", 52pp.804-811 *View Record in Scopus*.
- [74] Garnier, G., Bezanger- Beauquesne, L., Debraux, G., 1961, "Ressources Medicinales de la Flore Française", 1, 439-446, Paris.
- [75] Muhr, P., Kerek, F., Dreveny, D., Likussar, W., Schubert-Zsilavec, M., 1995, "The structure of hellebrin", *Liebigs Ann.*, 2, 443–444.
- [76] Cioca, C., Cucu, V., 1974, "Quantitative determination of hellebrin in the rhizomes and roots of *Helleborus purpurascens* W. et K.", *Planta Med.*, 26, 250- 253.
- [77] Challinor, V.L., Piacente, S., De Voss, J.J., 2012, "NMR assignment of the absolute configuration of C-25 in furostanol steroidal saponins, *Steroids*", 77, 504–511.
- [78] Colombo, M.L., Tome, F., Servettaz, O., Bugatti, C., 2008, "Phytochemical evaluation of *Helleborus* species growing in Northern Italy", *Pages 219-223 | Received 24 Apr, Accepted 25 Aug 1989, Published online: 27 Sep*.
- [79] Schmutz, I., 1947, *Pharm. Acta. Hei.v.* 22.373.
- [80] Buzas, A., 1948, *Beichstein. To: Helv. Chim. Acla.* 31. 110.
- [81] Fühner, H., 1911, *Arch Pharm.* 269. 179.
- [82] Keller, O Schöbel., W., 1928, *Arch Pharm.* 256.545.

- [83] Colombo, M.L., Tome, F., Servettaz, O., Bugatti, C., 1990, "Phytochemical evaluation of *Helleborus* species growing in northern Italy", *Pharm. Biol.*, 28, 219-223.
- [84] Milbradt, A.G., Kerek, F., Moroder, L., Renner, C., 2003, "Structural Characterization of Hellethionins from *Helleborus purpurascens*", *Biochemistry*, 42, 2404-2411.
- [85] Muzashvili, T. S., Kemertelidze, E. P., 2009, "Steroidal Compounds From *Helleborus caucasicus* Leaves", *Chemistry of natural compounds*, 45(6): 925-926.
- [86] Bassarello, C., Muzashvili, T., Skhirtladze, A., Kemertelidze, E., Pizzi, C., Piacente, S., 2008, "Steroidal glycosides from the underground parts of *Helleborus caucasicus*", *Phytochemistry*, 69(5): 1227-1233.
- [87] Pencik, A., Rolcik, J., Novak, O., Magnus, V., Bartak, P., Buchtik, R., Salopek-Sondi, B., Strnad, M., 2009, "Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction", *Talanta*, 80(2): 651-655.
- [88] Tarkowski, P., Tarkowska, D., Novak, O., Mihaljevic, S., Magnus, V., Strnad, M., Salopek-Sondi, B., 2006, "Cytokinins in the perianth, carpels, and developing fruit of *Helleborus niger* L.", *Journal of experimental botany*, 57(10): 2237-2247.
- [89] Vitalini, S., Braca, A., And Fico, G., 2011, "Study on secondary metabolite content of *Helleborus niger* L.", *Leaves. Fitoterapia*, 82(2): 152-154.
- [90] Yang, F. Y., Su, Y.F., Zhang, X.A., Tu, G.Z., Gao, X.M., Zhang, B. L., 2010, "New spirostanol sulfonate from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* (Ranunculaceae)", *Chemical Research In Chinese Universities*, 26(5): 746-748.
- [91] Yang, J. A., Zhang, Y. H., Miao, F., Zhou, L., And Sun, W., 2010, "Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus*", *Franch. Fitoterapia*, 81(6): 636-639.
- [92] Yang, F. Y., Su, Y. F., Wang, Y., Chai, X., Han, X., Wu, Z. H., And Gao, X. M., 2010, "Bufadienolides and phytoecdystones from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* (Ranunculaceae)", *Biochemical Systematics And Ecology*, 38(4): 759-763.
- [93] Stochmal, A., Perrone, A., Piacente, S., Olezsek, W., 2010, "Saponins in aerial parts of *Helleborus viridis* L.," *Phytochemistry Letters*, 3(3): 129-132.
- [94] Braca, A., Prieto, J. M., De Tommasi, N., Tome, F., Morelli, I., 2004, "Furostanol saponins and kuersetin glycosides from the leaves of *Helleborus viridis* L.", *Phytochemistry*, 65(21): 2921-2928.
- [95] Prieto, J. M., Siciliano, T., Braca, A., 2006, "A new acylated kuersetin glycoside and other secondary metabolites from *Helleborus foetidus*", *Fitoterapia*, 77(3): 203-207.
- [96] Menga, Y., Whitinga, P., Vladimir, S., Reesc, H., Dinana, L., 2001, "Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborus torquatus* (Ranunculaceae)", *Phytochemistry* 57, 401-407.
- [97] Itokura, Y., Habermehl, G., Mebs, D., 1988, "Tannins occurring in the toxic Brazilian plants", *Herbage Abstract*, Vol: 58 No: 12.

- [98] Baydar, H., 2005, "Tıbbi, aromatik ve keyf bitkileri bilimi ve teknolojisi", *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Yayın No: 51, Isparta.
- [99] Dewick, P.M., 2002, "Medicinal natural products: a biosynthetic approach", 2nd ed., *John Wiley & Sons Inc.*, New York, USA.
- [100] Maior, M.C., Dobrata, C., 2013., "Natural compounds discovered in *Helleborus* sp. (Ranunculaceae) with important medical potential", *Article in Central European Journal of Biology*, January.
- [101] Akizawa, T., Mukai, T., Matsukawa, M., Yoshioka, M., Morris, J.F., Butler, V.P., 1994, "Structures of novel bufadienolides in the eggs of toad, *Bufo marinus* Chem", *Pharm. Bull.*, 42, pp.745-756.
- [102] Steyn, P.S., Van, H., 1998, "Bufadienolides of plant and animal origin", *Nat. Prod. Reports*, 15, pp.397-413.
- [103] Yamagishi, T., Yan, X.Z., Wu, R.Y., McPhail, A.R., McPhail, A.T., Lee, K.H., 1988, "Structure and stereochemistry of bryophyllin-A, a novel potent cytotoxic bufadienolide orthoacetate from *Bryophyllum pinnatum*", *Chem. Pharm. Bull.* 36, 1615–1617.
- [104] Bedir, E., Çalis, I., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C., 1998, "Secondary metabolites from the roots of *Astragalus trojanus*," *J. Nat. Prod.*, 62, 563–568 pp.
- [105] Hostetmann, K., Marston, A., 1995, "Chemistry and pharmacology of natural products, saponins", *University press*, Cambridge, 177-195, 548pp.
- [106] Walters, D., 2011, "Plant defense: warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants", 1st ed., *Blackwell Publishing Ltd.*
- [107] Klein, R., 2004, "Phytoecdysteroids", *Journal of American Herbalists Guild*, 18-28.
- [108] Dinan, L., 2001, "Phytoecdysteroids: biological aspects", *Phytochemistry*, 57, 325-339.
- [109] Bruneton, J., 2009, "Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants", 4th ed., Tec & Doc Ed., *Éditions médicales internationales*, Paris, France.
- [110] Adams, M., Berset, C., Kessler, M., Hamburger, M., 2009, "Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders—A survey of European herbals from the 16th and 17th century", *J. Ethnopharmacol.* 121, 343-359.
- [111] Frohne, D., Pfander, H.J., 2005, "Poisonous plants: a handbook for doctors, pharmacists toxicologists, biologists and veterinarians", 2nd ed., *Manson Publishing Inc.*, London.
- [112] Mares, D., 1987, "Antimicrobial activity of protoanemonin, a lactone from ranunculaceous plant", *Mycopathologia*, 98, 133–140.
- [113] Tocan, V., Baron, O., 1969, "Antibiotic effect of protoanemonine isolated from *Ranunculus oxyspermus* M.B.", *Boll. Chim. Farm.*, 108, 789–791.

- [114] Misra, S., Dixit, S., 1980, “Antifungal principle of *Ranunculus sceleratus*”, *Econ. Bot.*, 34, 362–367.
- [115] Minakata, H., Komura, H., Nakanishi, K., Kada, T., 1983, “Protoanemonin, an antimutagen isolated from plants”, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 116, 317–322.
- [116] Martin, M.L., San Roman, L., Dominguez, A., 1990, “In vitro activity of protoanemonin, an antifungal agent”, *Planta Med.*, 56, 66–69.
- [117] Habermehl, G.G., Ziemer, P., 1999, “Mitteleuropäische giftpflanzen und ihre Wirkstoffe [Central European poisonous plants and their active ingredients]”, *Springer*, Berlin, (in German).
- [118] Martin, M.L., Ortiz de Urbina, A.V., Montero, M.J., Carron, R., San Roman, L., 1988, “Pharmacologic effects of lactones isolated from *Pulsatilla alpina* subsp. *Aphfolia*”, *J. Ethnopharmacol.*, 24, 185–191.
- [119] Roth, L., Daunderer, M., Kormann, K., 2006, “Giftpflanzen-pflanzengifte [Poisonous plants-phytotoxins]”, *Nikol verlag*, Hamburg, (in German).
- [120] Huang, Y.H., Lee, T.H., Chan, K.J., Hsu, F.L., Wu, Y.C., Lee, M.-H., 2008, “Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes”, *J. Dermatol. Sci.*, 49, 115–123.
- [121] Hu, Y., Chen, X., Duan, H., Hu, Y.L., Mu, X., 2009, “*Pulsatilla* decoction and its active ingredients inhibit secretion of NO, ET-1, TNF-alpha, and IL-1 alpha in LP Induced rat intestinal microvascular endothelial cells,” *Cell Biochem. Funct.*, 27, 284–288.
- [122] Duan, H., Zhang, Y., Xu, J., Qiao, J., Suo, Z., Hu, G., Mu, X., 2006, “Effect of anemonin on NO, ET-1 and ICAM-1 production in rat intestinal microvascular endothelial cells”, *J. Ethnopharmacol.*, 104, 362–366.
- [123] Lee, T.H., Huang, N.K., Lai, T.C., Yang, A.T.Y., Wang, G.J., 2008, “Anemonin, from *clematis crassifolia*, potent and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor”, *J. Ethnopharmacol.*, 116, 518–527.
- [124] David, G., Spoerke, J.R., Susan, C., 1990, “Toxicity of houseplants”, *Library of Congress*, Card Number 89-70788.
- [125] Bussing, A., Schweitzer, K., 1988, “Effects of a phytopreparation from *Helleborus niger* on immunocompetent cells in vitro”, *J. Ethnopharmacol.*, 59, 139–146.
- [126] Coassini Lokar, L., Poldini, L., 1988, “Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia region (North East Italy)”, *Journal of Ethnopharmacology*, 22pp. 231–278 124.
- [127] Erdemoglu, N., Küpeli, E., Yeşilada, E., 2003, “Antiinflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine”, *J. Ethnopharmacol.*, 89, 123–129.

- [128] Adams, M., Althera, W., Kessler, M., Kluge, M., Hamburger, M., 2011, "Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century", *J. Ethnopharmacol.*, 133, 278–288.
- [129] Brussel, D.E., 2004, "Medicinal plants of Mt. Pelion", Greece, *Econ. Bot.*, 58, S174-S202.
- [130] Scherrer, A.M., Motti, R., Weckerle, C.S., 2005, "Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy)", *J. Ethnopharmacol.*, 97, 129–143.
- [131] Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., 1995, "Traditional medicine in Turkey VII. folk medicine in middle and west black sea regions", *Econ. Bot.*, 49, 406–422.
- [132] Gomes, N.G.M., Campos, M.G., Órfão, J.M.C., Ribeiro, C.A.F., 2009, "Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery", *Prog. Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 33, 1372–1389.
- [133] Jäger, A.K., Gauguin, B., Adersen, A., Gudiksen, L., 2006, "Screening of plants used in Danish folk medicine to treat epilepsy and convulsions", *J. Ethnopharmacol.*, 105, 294–300.
- [134] Cornara, L., La Rocca, A., Marsili, S., Mariotti, M.G., 2009, "Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy)", *J. Ethnopharmacol.*, 125, 16-30.
- [135] Hussain, A., Khan, M.N., Iqbal, Z., Sajid, M.S., 2008, "An account of the botanical anthelmintics used in traditional veterinary practices in Sahiwal district of Punjab", Pakistan, *J. Ethnopharmacol.*, 119, 185–190.
- [136] Prieto, J.M., Schaffner, U., Barker, A., Braca, A., Siciliano, T., Boevé, J.-L., 2007, "Sequestration of furostanol saponins by *Monophadnus* sawfly larvae", *J. Chem. Ecol.*, 33, 513–524.
- [137] Blecha, F., 1988, "Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock", *J Anim Sci.*, 66, 2084-2090.
- [138] Gökçe, G., Irmak, K., Sural, E., Uzlu, E., 1997, "Koyun çiçeğinde immunomodulatorlerin sağaltıcı ve koruyucu etkileri üzerine klinik gözlemler", *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 3, 217-221.
- [139] Nueleanu, V.I., 2008, "The effect of the unspecific therapy with hellebore (*Helleborus purpurascens*) on young sheep, Proceedings, Animal Husbandry", *43rd Croatian and 3rd International Symposium on Agriculture*, (18-21 February, Opatija, Croatia), 791-794.
- [140] Davidović, V., Joksimović Todorović, M., Stojanović, B., Relić, R., 2012, "Plant usage in protecting the farm animal health", *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28, 87-98.
- [141] Bogdan, I., Nechifor, A., Băsea, I., Hruban, E., 1997, "From Romanian folk medicine: nonspecific stimulus therapy using transcutaneous implantation of hellebore (*Helleborus*



purpurascens, Fam. Ranunculaceae) in agriculturally useful animals”, *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.*, 97, 525- 529.

[142] Lupu, A.R., 2009, “MCS-18 potential therapeutic agent in neuro-immunological pathology [MCS-18 - potential agent therapeutic in patologii neuroimune]”, *Ph.D. Thesis, University of Bucharest, Faculty of Biology, Bucharest, Romania.*

[143] Kerek, F., Stimac, R., Apell, H.J., Freudenmann, F., Moroder, L., 2002, “Characterization of the macrocyclic carbon suboxide factors as potent Na, K-ATPase and SR Ca-ATPase inhibitors”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1567, 213-220.

[144] Kerek, F., 2000, “The structure of the digitalis like and natriuretic factors identified as macrocyclic derivatives of the inorganic carbon suboxide”, *Hypertens. Res.*, 23, 33-38.

[145] Szegli, G., Herold, A., Cremer, L., Călugaru, A., Matache, C., Durbaca, S., 2005, “Immunopharmacology studies on MCS-18”, *Investigational Medicinal Product Dossier*, Part 2.2, 1–42.

[146] Knight, J.A., 1995, “Diseases related to oxygen-derived free radicals”, *Ann Clin Lab Sci.*; 25: 111-121.

[147] Fridovich, I., 1995, “Superoxide radical and superoxide dismutases”, *Annu Rev Biochem.*; 64:97–112.

[148] Halliwell, B., 1997, “Antioxidants and human diseases: A general introduction”, *Nutr Rev.*; 55: S44-S52.

[149] Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1985, “Free radicals in biology and medicine”, *Oxford University Press*;pp: 139-189.

[150] Lenaz, G., 2001, “The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology”, *IUBMB Life*; 52:159–164.

[151] Gulam, W., Haseeb, A., 2006, “Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions”, *Journal of Carcinogenesis*; 5:14.

[152] Thannickal, V.J., Fanburg B.L., 2000, “Reactive oxygen species in cell signaling”, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*; 279: L1005–L1028.

[153] Kuppusamy, U.R., Indran, M., Balraj, B.R.S., 2002, “Antioxidant effects of local fruits and vegetable extracts”, *J Trop Med Plants*; 3: 47-53.

[154] Hasan-Ranibar, S., Larijani, B., Abdollahi, M., 2009, “A systematic review of the potential herbal sources of future drugs effective in oxidant-related diseases”, *Inflamm Allergy Drug Targets*; 8(1):2-10.

[155] Iannitti, T., Palmieri, B., 2009, “Antioxidant therapy effectiveness: an up to date”, *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 13(4):245-278.

[156] Bergman, M., Varshavsky, L., Gottlieb, H., Nad Grossman, S., 2001, “The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions”, *Phytochemistry*; 58: 143-152.

- [157] Badulescu, M., Lupu, A.R., Cremer, L., Calugaru, A., Apetrei, N., Moscovici, M., Mocanu, G., 2009, "The modulation of reactive oxygen species production from human polymorphonuclear cells by Curdlan derivatives as Dectin-1 agonists/antagonists", *Rom.Arch.Microbiol.Immunol.*; 68(2): 63-68.
- [158] Apetrei, N.S., Lupu, A.R., Calugaru, A., Kerek, F., Szegli, G., Cremer, L., 2011, "The antioxidant effects of some progressively purified fractions from *Helleborus purpurascens*, Rom.", *Biotechnol. Lett.*, 16, 6673-6681.
- [159] Păun-Roman, G., Neagu, E., Radu, G.L., 2010, "Membrane processes for the purification and concentration of *Helleborus purpurascens* extracts and evaluation of antioxidant activity", *Rev. Chim. (Bucharest)*, 61, 877-881.
- [160] Čakar, J., Parić, A., Vidic, D., Haverić, A., Haverić, S., Maksimović, M., 2011, "Antioxidant and antiproliferative activities of *Helleborus odorus* Waldst. & Kit, *H. multifidus* vis. and *H. hercegovinus martinis*", *Nat. Prod. Res.*, 25, 1969–1974.
- [161] Trenin, D.S., Volodin, V.V., 1999, "20-hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: In vitro evaluation", *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 41, 156–161.
- [162] Puglisi, S., Speciale, A., Acquaviva, R., Ferlito, G., Ragusa, S., De Pasquale, R., 2009, "Antibacterial activity of *Helleborus bocconeii* Ten. subsp. *siculus* root extracts", *J. Ethnopharmacol.*, 125, 175–177.
- [163] Rosselli, S., Maggio, A., Formisano, C., Napolitano, F., Senatore, F., Spadaro, V., 2007, "Chemical composition and antibacterial activity of extracts of *Helleborus bocconeii* Ten. subsp. *intermedius*", *Nat. Prod. Commun.*, 2, 675–679.
- [164] Shahidi Bonjar, G.H., Aghighi, S., Karimi Nik, A., 2004, "Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran", *Journal of Biological Sciences*, 4 (3). pp. 405-412.
- [165] Shahidi Bonjar, G.H., 2004, "Inhibition of Clotrimazole-resistant 'Candida albicans' by plants used in Iranian folkloric medicine", *Fitoterapia*, Volume 75, Issue 1, January 2004, Pages 74-76.
- [166] Pârnu, C., 2000, "Plant's Universe. Small encyclopaedia [Universul plantelor. Mica enciclopedie]", 3rd ed., *Encyclopaedia Ed., Bucharest*, (in Romanian).
- [167] Passalacqua, N.G., De Fine, G., Guarrera P.M., 2006, "Contribution to the knowledge of the veterinary science and of the ethnobotany in Calabria region (Southern Italy)", *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 2, 52.
- [168] Pieroni, A., Nebel, S., Quave, C., Münz, H., Heinrich, M., 2002, "Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbëreshë) of northern Basilicata", Italy, *Fitoterapia*, 73, 217-241.
- [169] Lindholm, P., Gullbo, J., Claesson, P., Göransson, U., Johansson, S., Backlund, A., 2002, "Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts", *J. Biomol. Screen.*, 7, 333-340.

- [170] Flomenbaum, N.E., Goldfrank, L.R., Hoffman, R.S., Howland, M.A., Lewin, N.A., Nelson, L.S., 2006, "Goldfrank's toxicologic emergencies", 8th ed., *McGraw Hill Companies Inc.*
- [171] True, B.L., Dreisbach, R.H., 2002, "Dreisbach's handbook of poisoning: prevention, diagnosis & treatment", 13th ed., *The Parthenon Publishing Group*, London, UK.
- [172] Cooper, M.R., Johnson, A.W., 1988, "Poisonous plants & fungi", *An Illustrated Guide Stationery Office Books*, Norwich.
- [173] Fuller, T.C., McClintock, E.M., 1986, "Poisonous plants of California", *University of California Press*, Berkeley, California.
- [174] Rosselli, S., Maggio, A., Bruno, M., Spadaro, V., Formisano, C., Irace, C., 2009, "Furostanol saponins and ecdysones with cytotoxic activity from *Helleborus bocconeii* ssp. *intermedius*", *Phytother. Res.*, 23, 1243–1249.
- [175] Mimaki, Y., Watanabe, K., Sakuma, C., Sakagami, H., Sashida, Y., 2003, "Novel polyoxygenated spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*", *Helv. Chim. Acta*, 86, 398-407.
- [176] Vochita, G., Mihai, C.T., Gherghel, D., Iurea, D., Roman, G., Radu G.L., 2011, "New potential antitumoral agents of polyphenolic nature obtained from *Helleborus purpurascens* by membranary micro- and ultrafiltration techniques", *SAAIC*, 12, 41-51.
- [177] Neacșu, C., Ciobanu, C., Barbu, I., Toader, O., Szegli, G., Kerek, F., 2010, "Substance MCS- 18 isolated from *Helleborus purpurascens* is a potent antagonist of the capsaicin receptor, TRPV1, in rat cultured sensory neurons", *Physiol. Res.*, 59, 289-298.
- [178] Dewelle, J., El Yazidi, M., Van Quaquebeke, E., De Neve, N., Mijatović, T., Ingrassia, L., 2010, "Hellebrin ve hellebrigenin türevleri", *WO/ 102673*.
- [179] Büssing, A., Schweizer, K., 1998, "Effects of a phytopreparation from *Helleborus niger* on immunocompetent cells in vitro", *J. Ethnopharmacol.*, 59, 139–146.
- [180] Menković, N., Šavikin, K., Tasić, S., Zdunić, G., Stešević, D., Milosavljević, S., 2011, "Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro)", *J. Ethnopharmacol.*, 133, 97–107.
- [181] Niimi, Y., Han, D.S., Abe, S., 2006, "Temperatures affecting embryo development and seed germination of Christmas rose (*Helleborus niger*) after sowing", *Sci. Horticult.*, 107, 292–296, doi: 10.1016/j.scienta.2005.08.007.
- [182] Smulders, M.J.M., Klerk, G.J., 2011, "Epigenetics in Plant Tissue Culture", *J. Plant Growth Regul.*, 63 137–146.
- [183] Grabowski, K., Schneider, G., 2007, "Properties and architecture of drugs and natural products revisited", *Curr. Chem. Biol.*, 1, 115-127.
- [184] İnternet; <https://www.haritatr.com/piraziz-haritasi-i16c>.

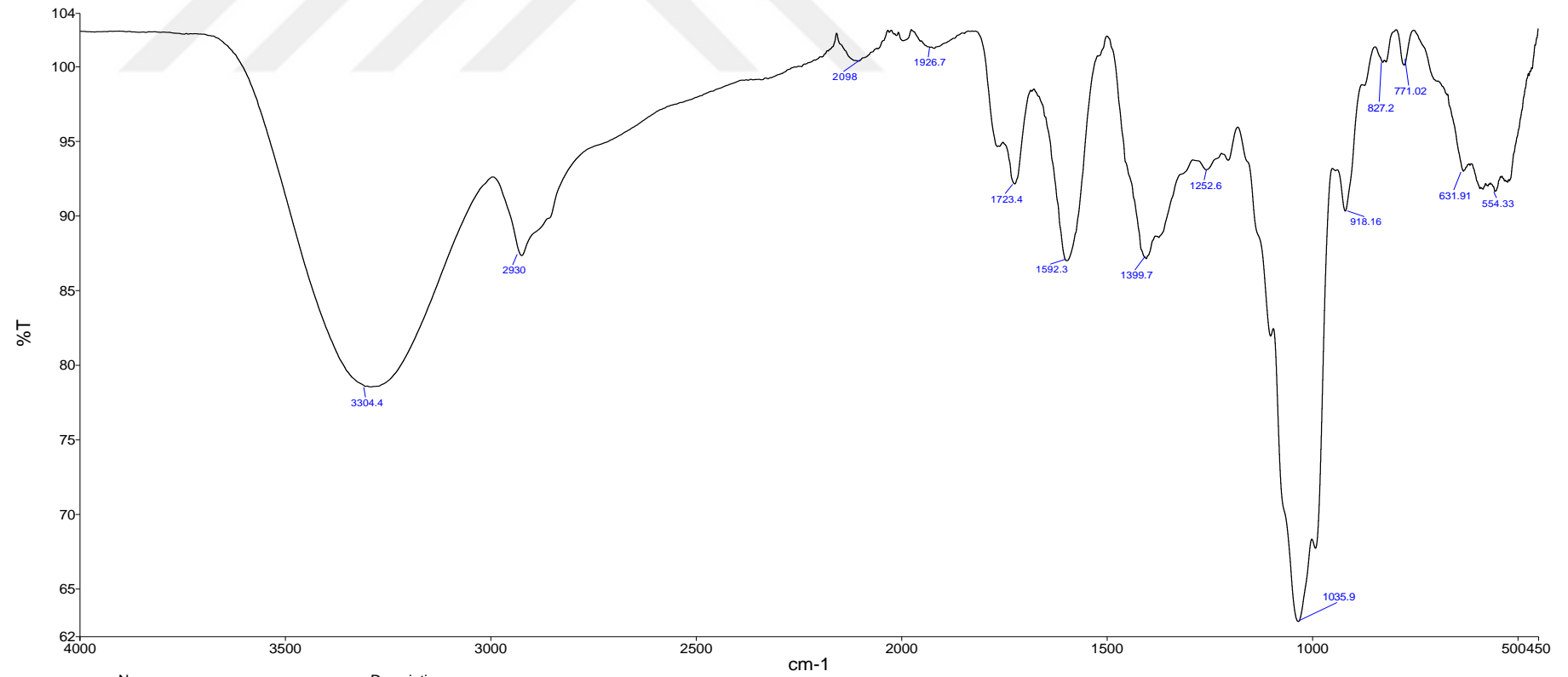
- [185] Ostling, O., Johanson, K.J., 1984, "Micro electrophoretic study of radiation induced DNA damage in Individual mammalian cells" *Biochemical and biophysical research communications*, 123, 291–298.
- [186] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice R.R., Schneider, E.L., 1988, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells" *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- [187] Horoz, M., Bolukbas, C., Bolukbas, F., Kocyigit, A., Aslan, M., Koylu, A.O., Gumus, M., Celik, H., Koksak, M., 2006, "Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation", *Research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, Volume 596, Issues 1-2, Pages 137-142.
- [188] Giovannelli, L., Pitozzi, V., Riolo, S., Dolara, P., 2003, "Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear White blood cells: a novel approach using the comet assay", *Mutation Research* 538 71–80.
- [189] Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, L.S., Celik, H., Erel, O., 2005, "Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis Mutation" *Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*", Volume 585, Issues 1-2, 71-78.
- [190] Davis, P.H., 1965, "Flora of Turkey and The East Aegean Islands", v: 1, p. 96-97, *Edinburgh University*, Edinburgh.
- [191] Davis, P.H., 1985, "Flora of Turkey and The Aegean Islands", V:3, 8, 9 *Edinburg Univ. Press*.
- [192] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., 2012, "Türkiye bitkiler listesi (Damarlı Bitkiler)", *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*, İstanbul.
- [193] Özdemir, Ş., 2007, "Brassicaceae familyasından bazı bitkilere ait ekstraktların yabancı otlarla mücadelede biyo-herbisit olarak kullanılabilirliklerinin araştırılması", *Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü, Yüksek Lisans Tezi*, Antakya.
- [194] Bykov, I., 2008, "Characterization of natural and technical lignins using FTIR spectroscopy", *Lulea University of Technology*, ISSN; 1402- 1552.
- [195] Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J., Medina-Juarez, L., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., Angulo-Guerrero, O., 1999, "Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse", *J.A.O.C.S.*, 76, 144.
- [196] Chang, C., Yang, M., Wen, J.H., 2002, "Chern estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods J.", *FoodDrug Anal.*, 10, pp. 178-18.
- [197] Korcan, S.E., Aksoy, O., Erdoğan, S.F., Çiğerci, İ.H., Konuk, M., 2012, "Evaluation of antibacterial, antioxidant and DNA protective capacity of *Chenopodium album*'s ethanolic leaf extract", *Chemosphere.*, Jan;90(2):374-9. doi: 10.1016/j.chemosphere. 07.030. Epub 2012 Aug 13.

- [198] Wen, D., Li, C., Di, H., Liao, Y., Liu, H., Agric J., 2005, *Food Chem.* 53 6624–6629.
- [199] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology* 28: 25-30.
- [200] Dikilitaş, M., Koçyiğit, A., 2010, “Canlılarda ‘Tek Hücre Jel Elektroferez’ yöntemi ile DNA hasar analizi ( Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi”, *HR.Ü.Z.F.Dergisi*, 14(2): 77-89.
- [201] Berghe, V.A, 1991,”Vlietinck AJ.,screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants”, *MethPlantBiochem.*, 6, 47–68.
- [202] Omar, N., Mohamed, F., Alahmer, S., 2017, “Verbascum cinsine ait bazı türlerin antimikrobiyal aktivitesinin incelenmesi”, *Kastamonu Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı Kastamonu-SYF* 36.
- [203] Önen, H., 2003, “Bazı bitkisel uçucu yağların biyoherbisidal etkileri”, *Türkiye Herboloji Dergisi*, 6 (1): 39-47.
- [204] Yılar, M., Onaran, A., Yanar, Y., Belgüzar, S., Kadioğlu, İ., 2014, “Trachystemon orientalis (L.) G. Don (Kaldırık)’ın Herbisidal ve antifungal potansiyeli”, *Iğdır Üni. Fen BilimLeri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. &Tech.* 4(4): 19-27.
- [205] Kacar, B., 1972, “Bitki ve toprağın kimyasal analizleri: II. Bitki Analizleri”, *Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları*: 453, Uygulama Klavuzu: 155.
- [206] Bardakçı, Ö., 2017, “Bazı sentetik antioksidanların 2, 2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (Dpph) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin araştırılması”, *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Yüksek Lisans Programı*.
- [207] Kültür, S., 2007,”Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey)”. *J Ethnopharmacol.* May 4;111(2):341-64. Epub Dec 12.
- [208] Shahri, W., Tahir, I., Islam, S.T., Bhat, M.A., 2011, “Physiological and biochemical changes associated with flower development and senescence in so far unexplored *Helleborus orientalis* Lam. cv. Olympicus”, *Physiol Mol Biol Plants*, Mar;17(1):33-9. doi: 10.1007/s12298-010-0045-3. Epub, Jan 8.
- [209] Özbucak, T.B., Akçin, Ö.E., Polat, G., 2016, “*Helleborus orientalis* Lam. (Ranunculaceae) türünün farklı yükseltilerdeki bazı ekolojik ve anatomik özelliklerinin karşılaştırılması”, *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, Cilt:6, Sayı:2, 14-27/Ordu Univ. J. Sci. Tech., Vol:6, No:2,14-27.
- [210] Monagas, M., Bartolome, B., Gómezcordovés, C., 2005, “Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45:2, 85-118, DOI: 10.1080/10408690490911710.
- [211] Shahidi, F., Naczki, M., 1995, “Phenolic compounds in grains. in food phenolics, source,chemistry effects applications”, *Technomic Publishing Company Inc. Lancaster PA*, pp. 3-39.

- [212] Tahir, H., Xiaobo, Z., Zhihua, L., Jiyong, S., Zhai, X., Wang, S., Mariod, A., 2017, "Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy", *Food Chemistry* 226, 202–211.
- [213] Gok, S., Severcan, M., Goormaghtigh, E., Kandemir, I., Severcan, F., 2015, "Differentiation of anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis", *Food Chemistry*, 170, 234–240.
- [214] Masek, A., Chrzescijanska, E., Kosmalska, A., & Zaborski, M., 2014, "Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV–VIS, FTIR and GC–MS analysis", *Food Chemistry*, 156, 353–361.
- [215] Nickless, E.M., Holroyd, S.E., Stephens, J.M., Gordon, K.C., & Wargent, J. J., 2014, Analytical FT-Raman spectroscopy to chemotype *Leptospermum scoparium* and generate predictive models for screening for dihydroxyacetone levels in floral nectar", *Journal of Raman Spectroscopy*, 45(10), 890–894.
- [216] Paun, G., Litescu, S.C., Neagu, E., Tache, A., Radu, G.L., "Evaluation of geranium spp.", *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2014; 29(1): 28–34.
- [217] Kumar, K.V., Lalitha, K.G., 2014, "Antihyperglycemic, Antiyperlipidemic and antioxydant activities of ethanolic extract of *Helleborus niger* linn roots in streptozotocin-nicotinamid induced diabetic rats", *Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 13(3): 92-101.
- [218] Erel, O., 2004, "A novel automated direct measurement method fortotal antioxidant capacity using a new generation, morestable ABTS radical cation", *Clin Biochem*", 37:277-285.
- [219] Katalinic, V., 2004, "Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (b)-catechin", *Food Chemistry*, 86:593–600.
- [220] Adedapo, A., 2009, "Antioxidant properties of the methanol extracts of the leaves and stems of celtis", *Africana. Records of Natural Products*.,3: 23–31.
- [221] Duckstein, S.M., Stintzing, C.F., 2014, "Comprehensive study of the phenolics and saponins from *Helleborus niger* L. leaves and stems by liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Chemistry Biodiversity*, Vol. 11.
- [222] Željanić, M., Šarić, M.M., 2001, "Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens*", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 24, Issue 3, January 2001, Pages 353-359.
- [223] Chen, Y.F., 1995, "Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*", *Planta Med.* 61(1):2-8.

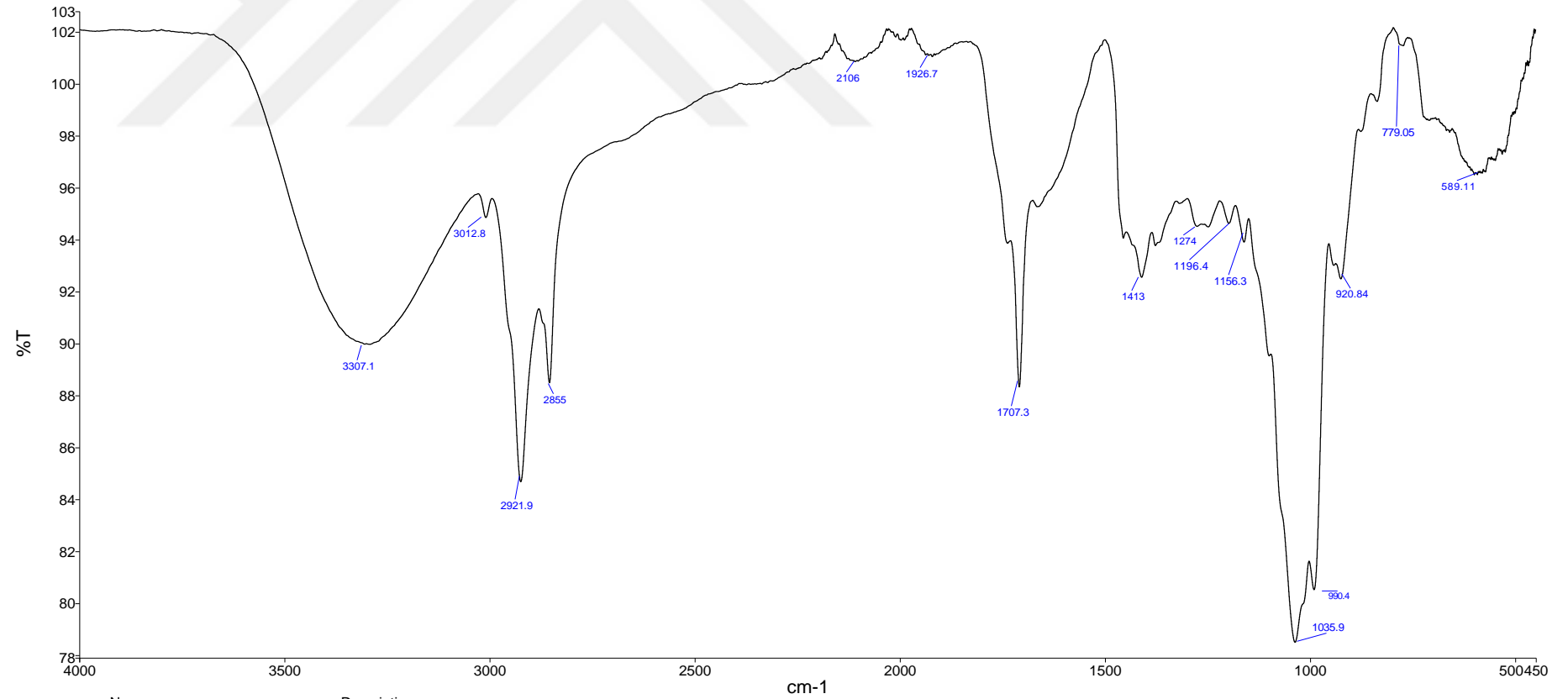
# EKLER

## EK-1 FTIR



Name: helebogövde\_1  
Description: Sample 069 By Administrator Date Thursday, October 12 2017

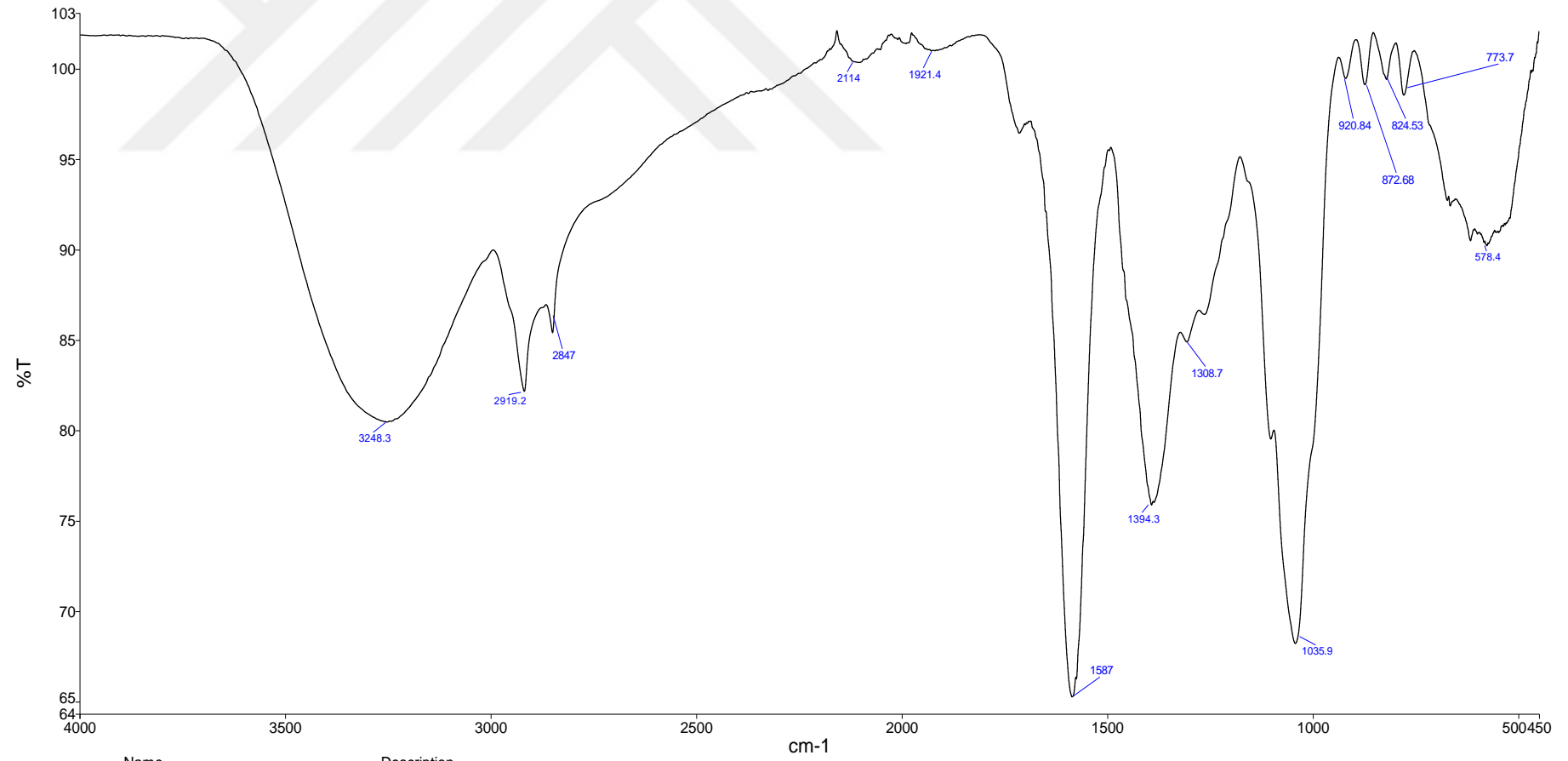
# EK-1 Devam FTIR



Name: helebokök\_1  
Description: Sample 068 By Administrator Date Tuesday, June 20 2017

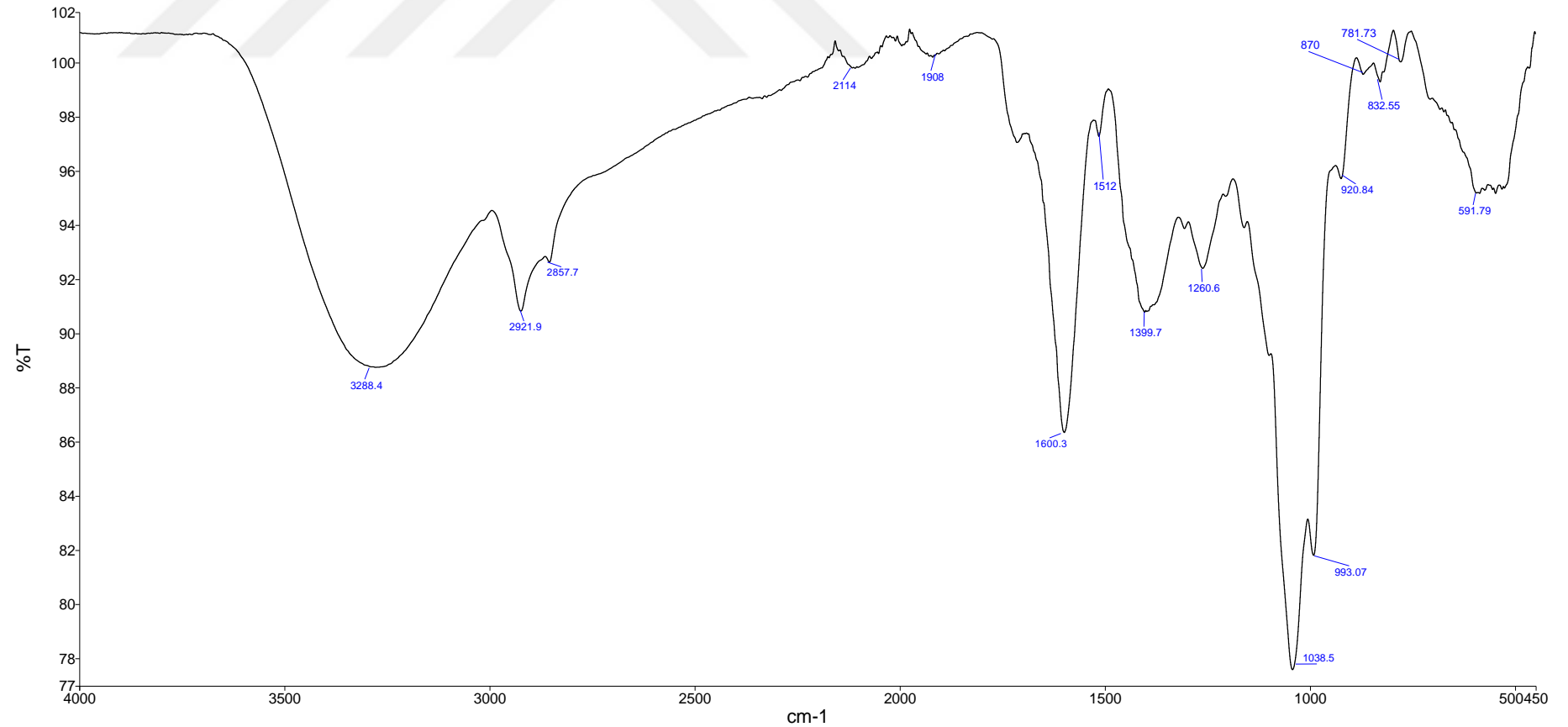


# EK-1 Devam FTIR



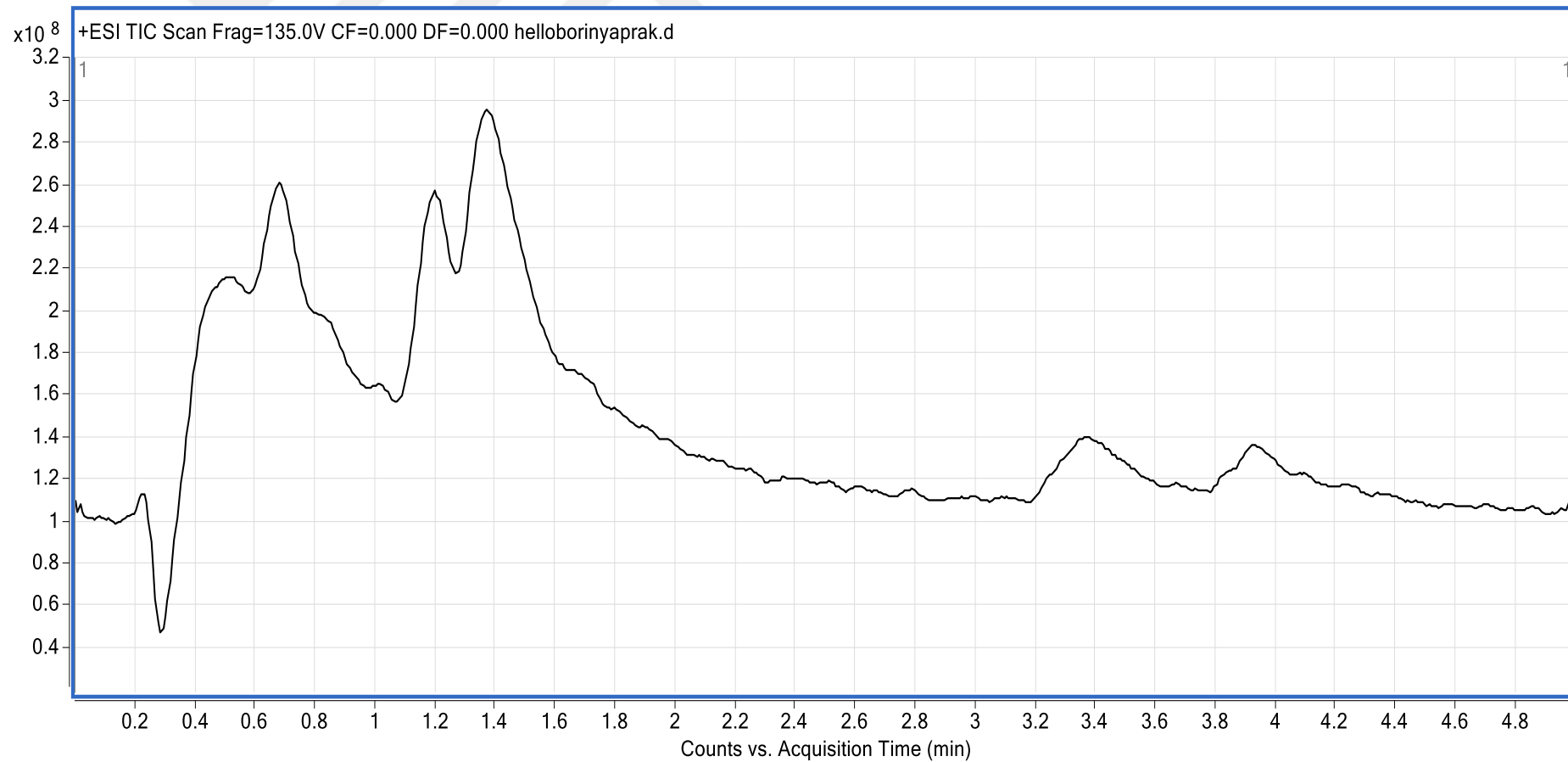
Name: heleboççek\_1\_1  
Description: Sample 070 By Administrator Date Thursday, October 12 2017

# EK-1 Devam FTIR

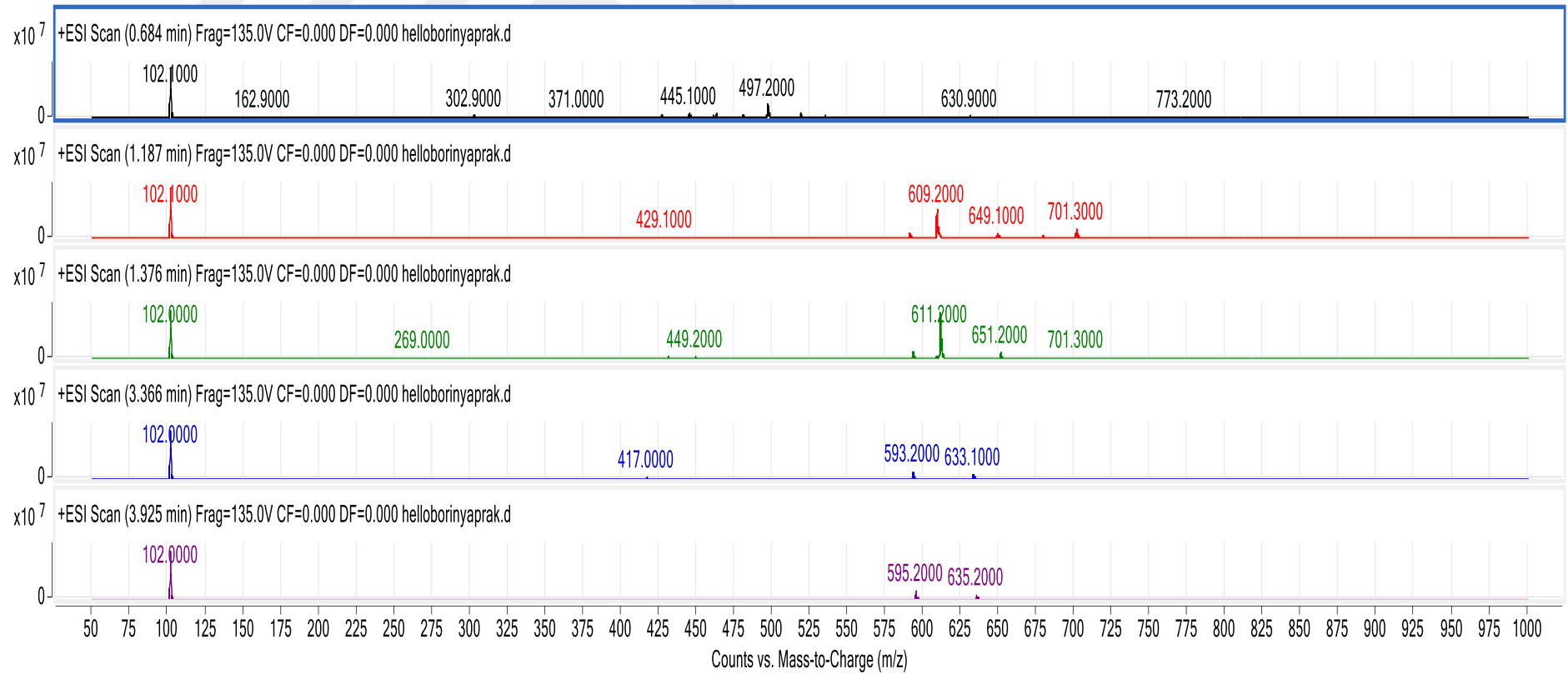


Name: heleboyaprak\_1  
Description: Sample 068 By Administrator Date Thursday, October 12 2017

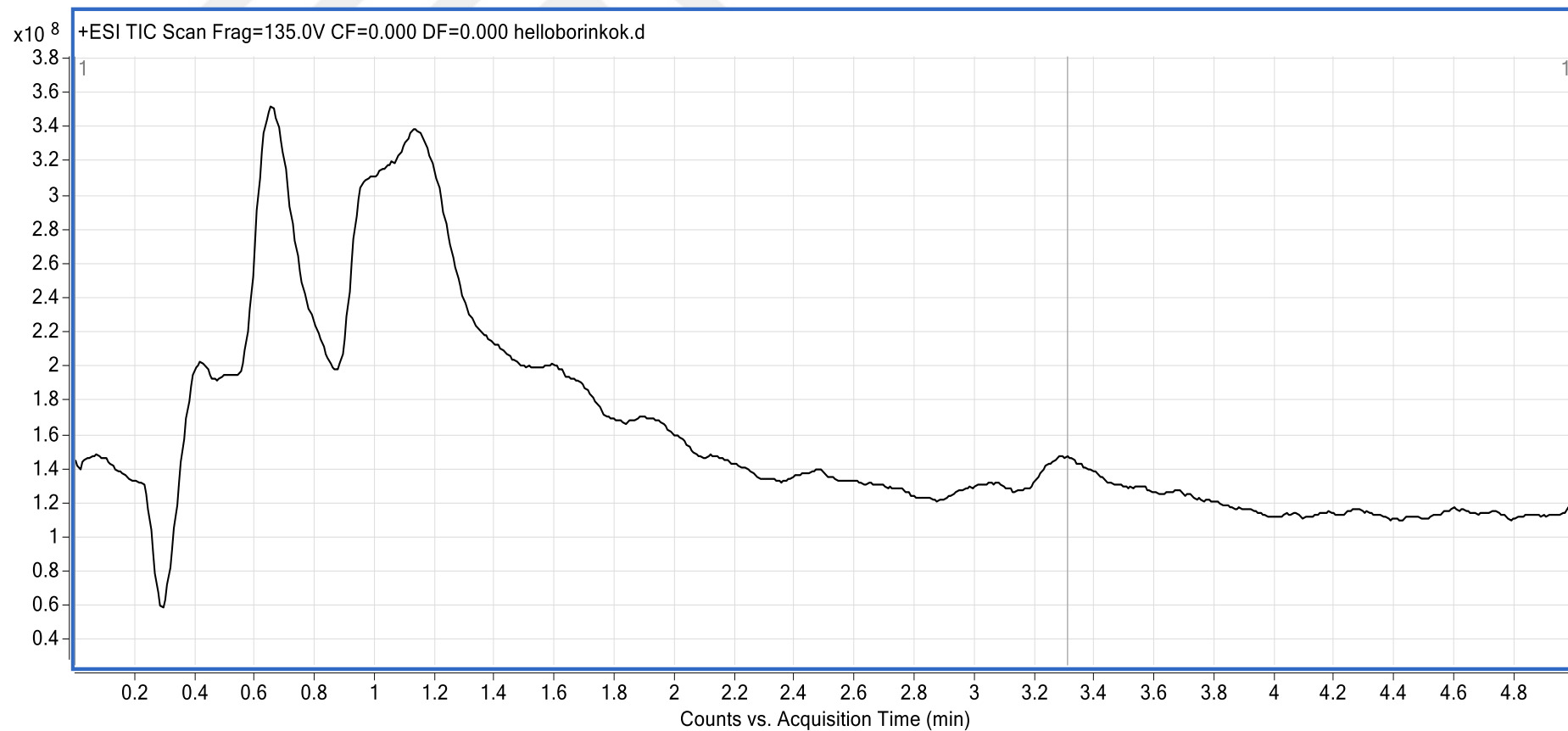
# EK-2 LC Mass



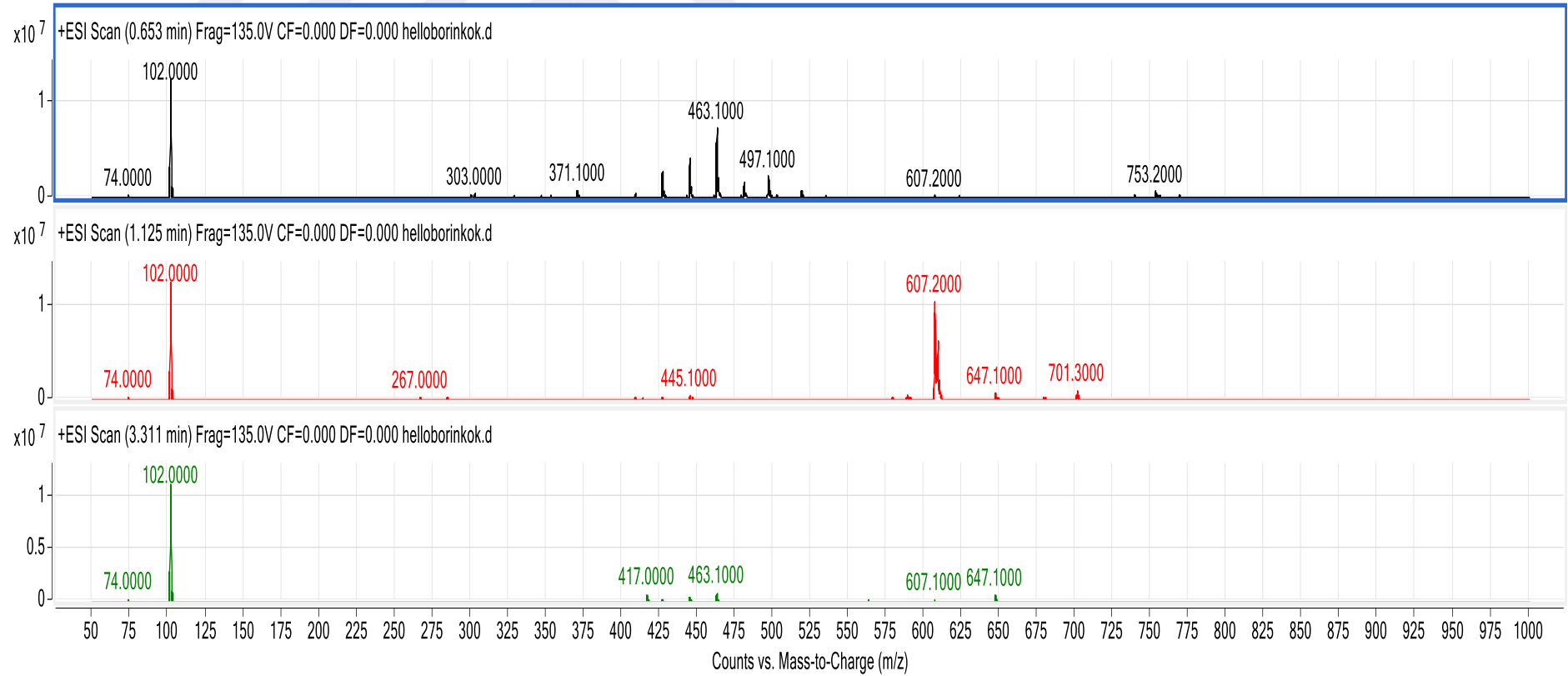
## EK-2 Devam LC- Mass



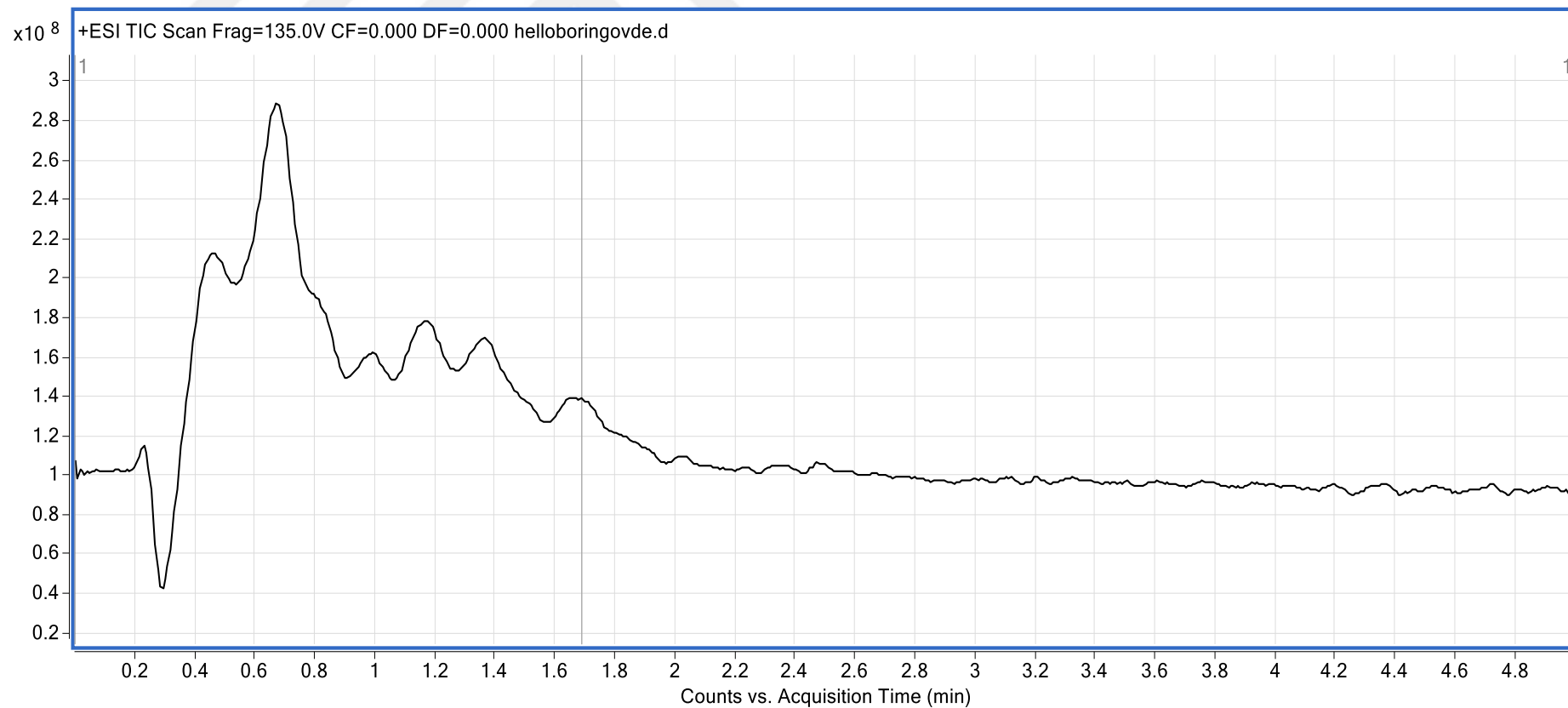
# EK-2 Devam LC- Mass



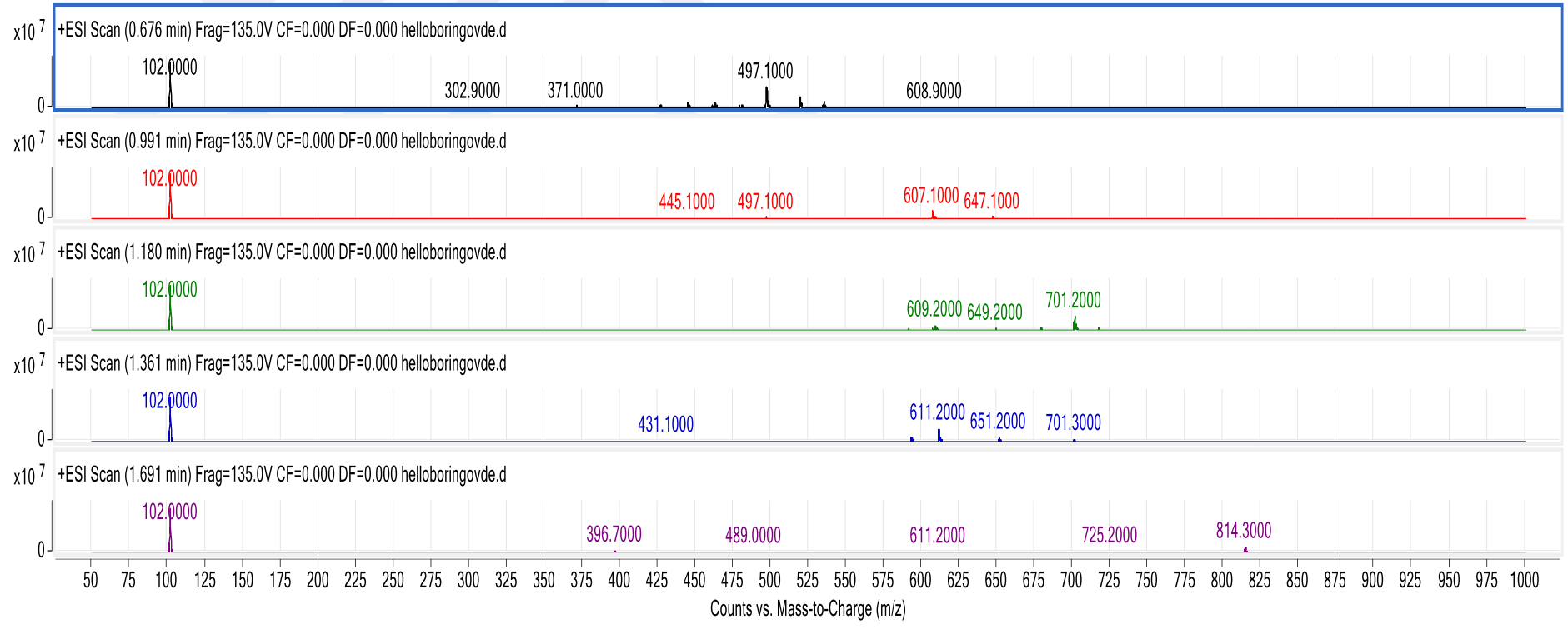
# EK-2 Devam LC- Mass



# EK-2 Devam LC- Mass

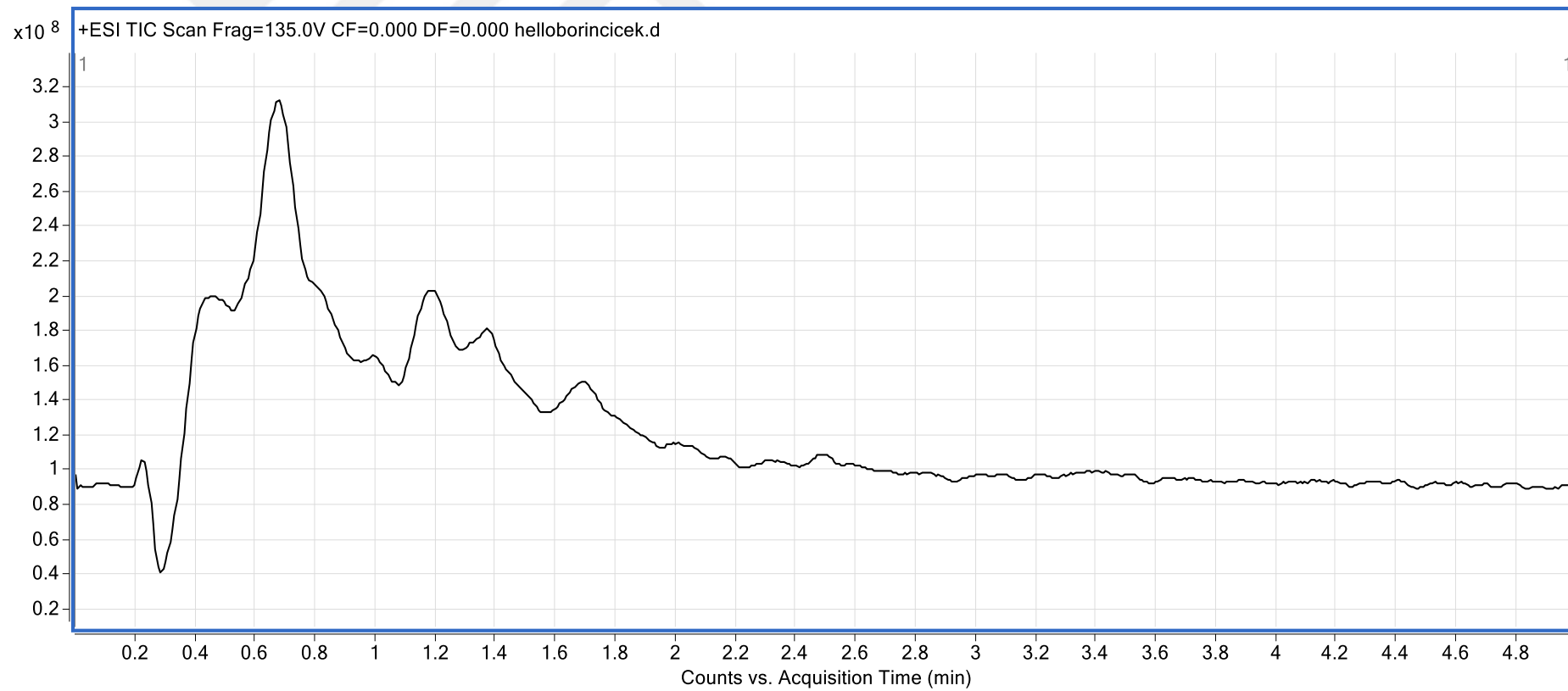


# EK-2 Devam LC- Mass

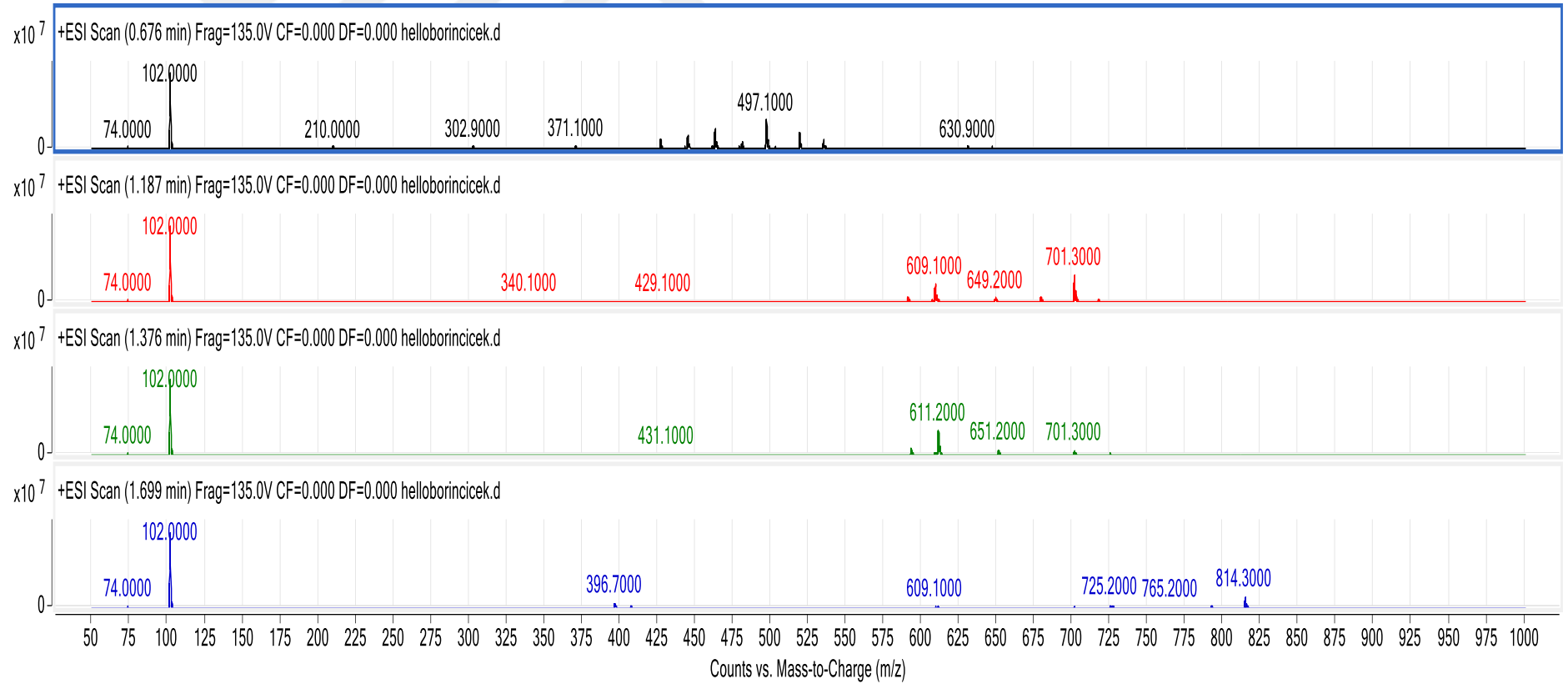




# EK-2 Devam LC- Mass



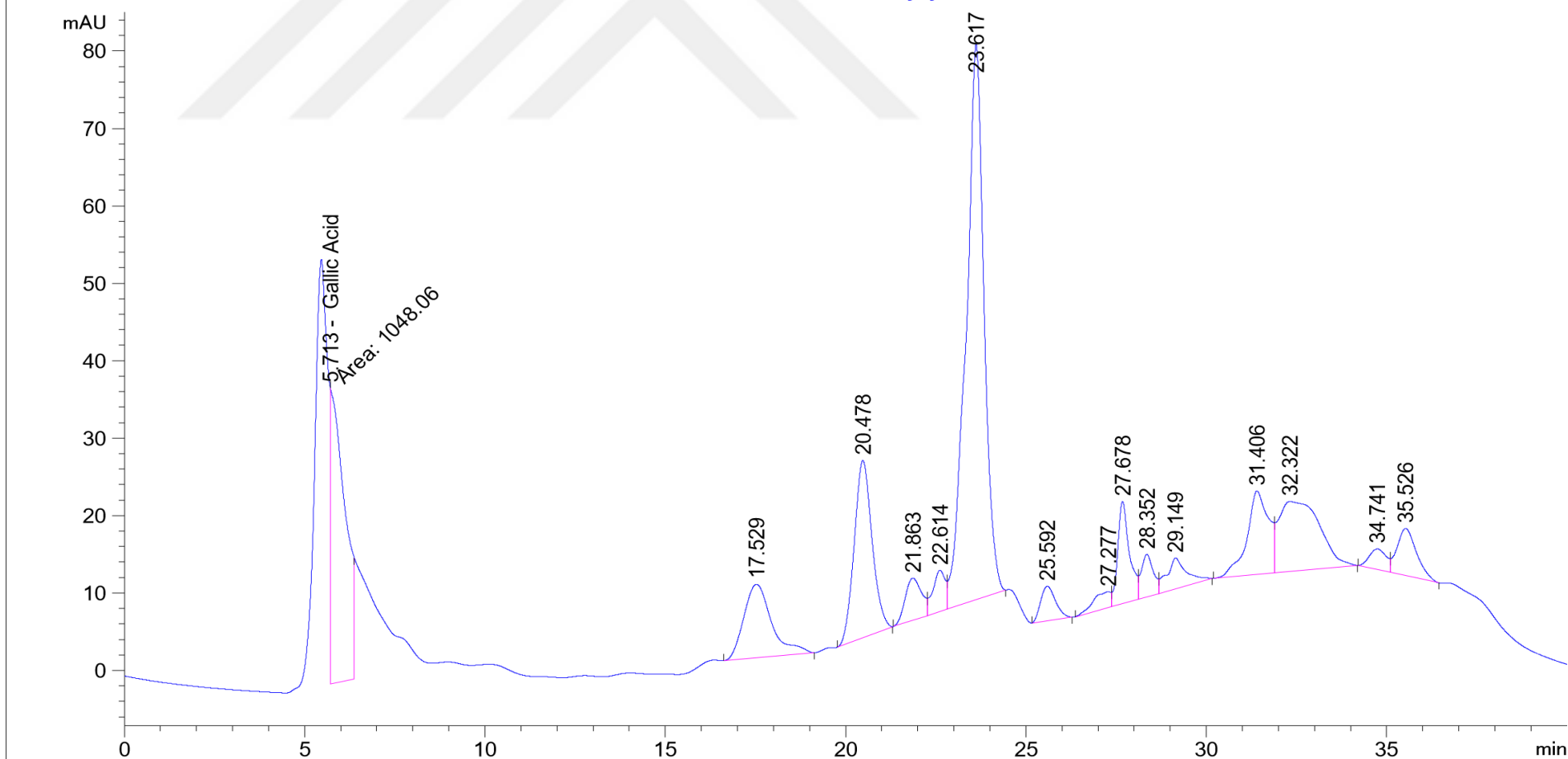
## EK-2 Devam LC- Mass



# EK-3 HPLC

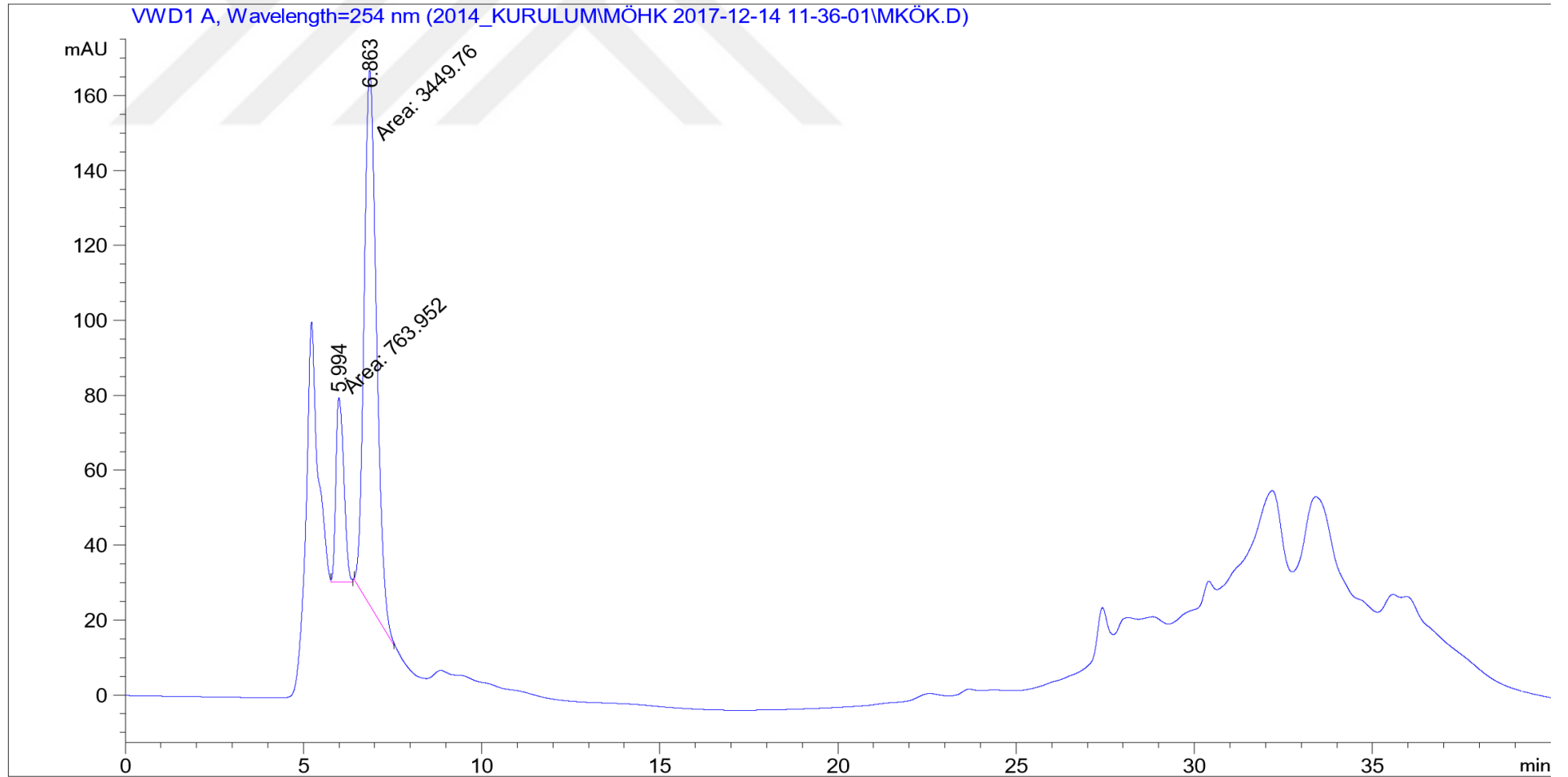
Additional Info : Peak(s) manually integrated

VWD1 A, Wavelength=254 nm (2014\_KURULUMMÖHK 2017-12-14 11-36-01MÇİÇ.D)



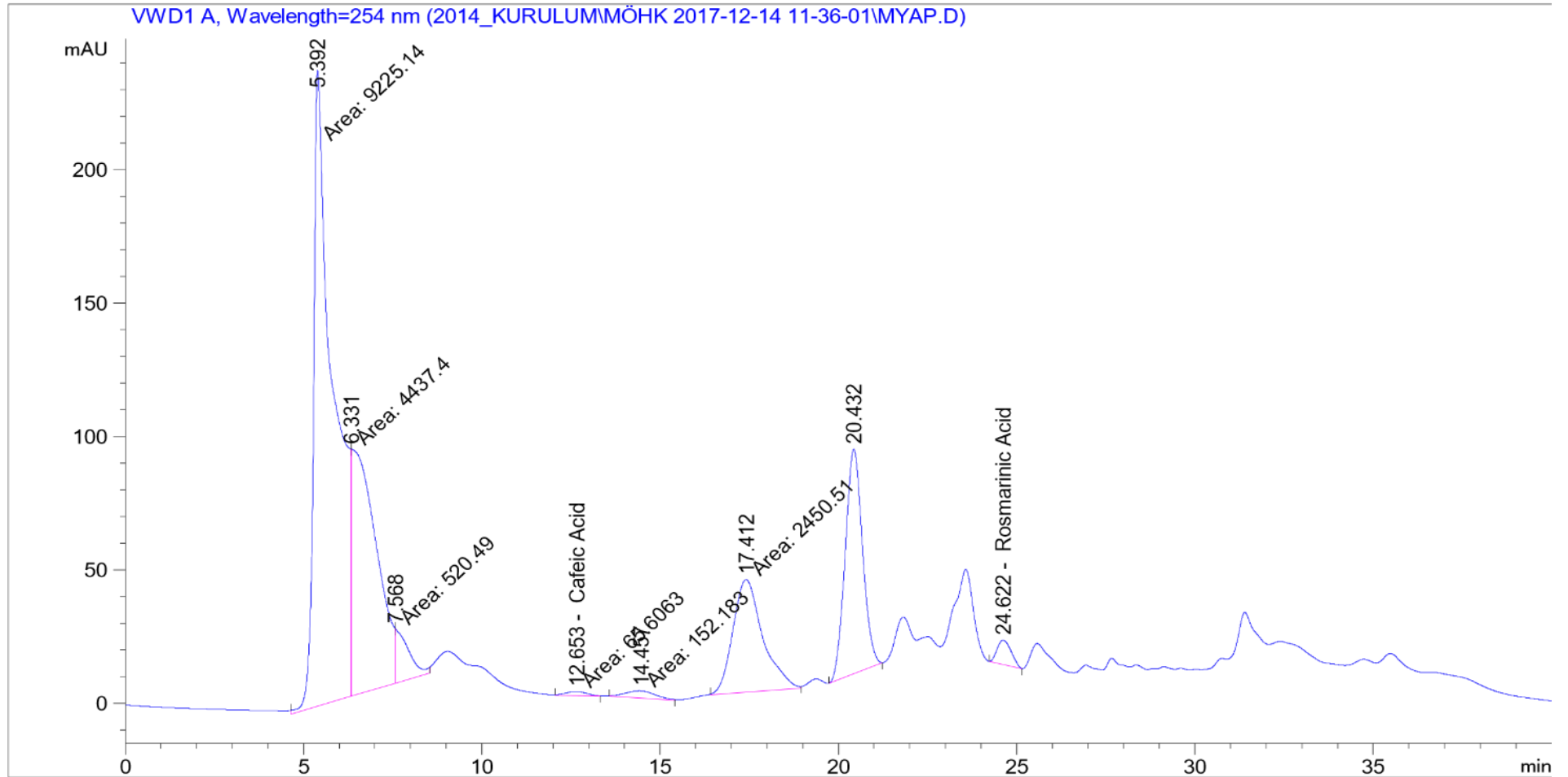
### EK-3 Devam HPLC

Additional Info : Peak(s) manually integrated

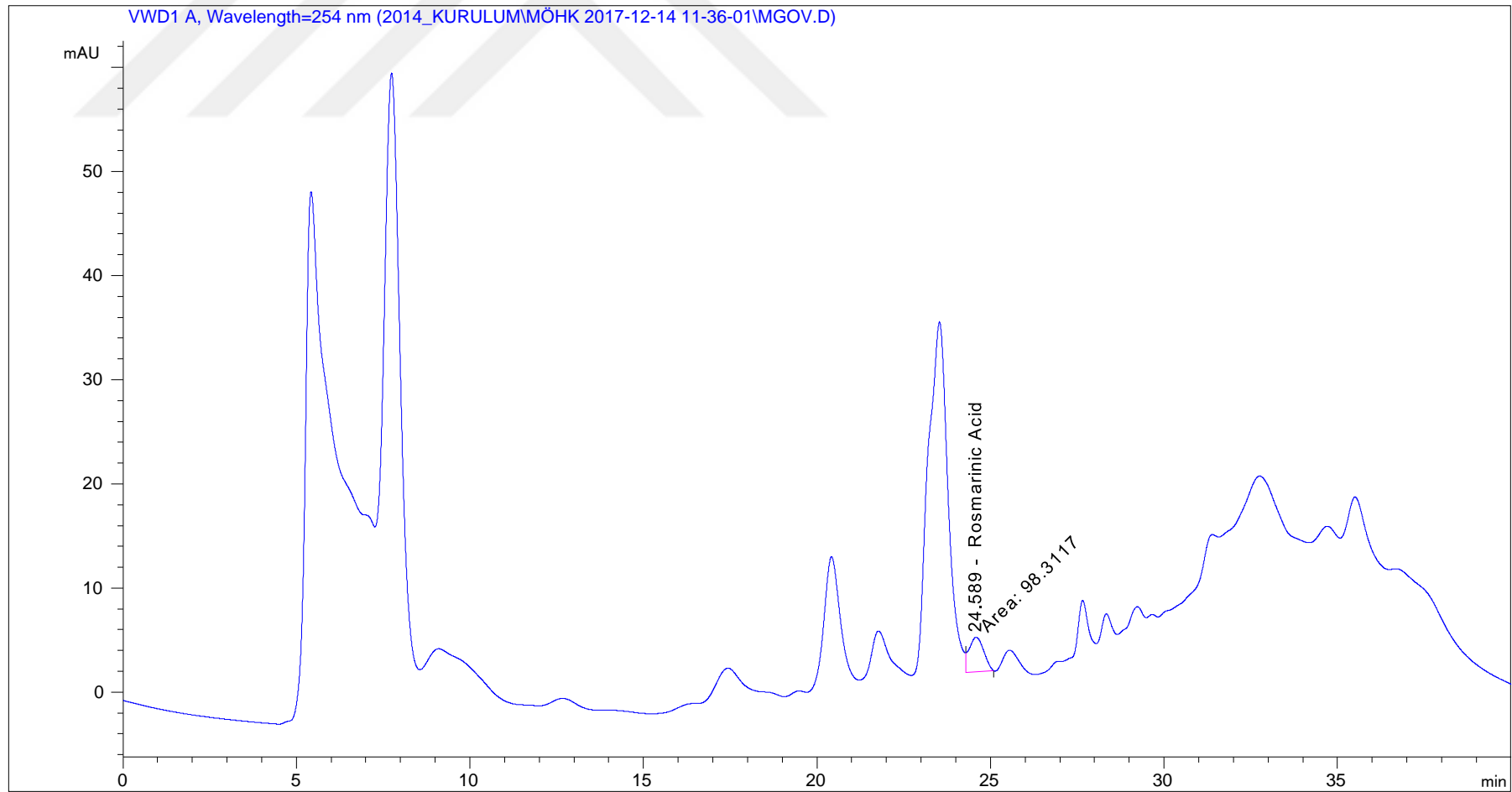


# EK-3 Devam HPLC

Additional Info : Peak(s) manually integrated



**EK-3 Devam HPLC**



## EK-5 Etik Kurul

Evrak Tarih ve Sayısı:

02/06/2017-E.18151

T.C.  
UŞAK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ KURULU KARARLARI

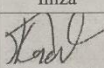
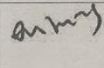
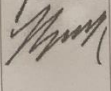
TOPLANTI SAYISI: 06

KARAR TARİHİ: 18.05.2017

Üniversitemiz Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi gereğince, 10.05.2017 günü yapılması planlanan toplantıda yeterli çoğunluk sağlanamadığı için toplantının 18.05.2017 tarihinde yapılmasına karar verilmiş olup Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu, Kurul Başkanı Prof. Dr. Ömer KARAHAN başkanlığında toplanarak gündem maddelerinin görüşülmesine geçilmiştir.

KARAR 2017-33

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN'ın üniversitemiz Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğrencisi Meral ÖZTÜRK ile birlikte Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine başvurmak üzere hazırlamış olduğu "E-lleborus sp. Ekstratlarının Biyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı araştırmasının ve bu araştırma kapsamında uygulanacak yöntemlerin etik açıdan uygun olduğuna katılanların oybirliği ile karar verilmiştir.

No	yenin Adı Soyadı	İmza	No	yenin Adı Soyadı	imza
	Prof. Dr. Omcr KARAHAN Başkan		5	Prof. Dr. Rıdvan ÜNAL Üye	KATILMADI
2	Prof. Dr. Celal ARTUNÇ Başkan Yardımcısı		6	Prof. Dr. Suat ŞAHİNLER Üye	
3	Prof. Dr. safiye Elif KORCAN Üye	KATILMADI	7	Prof. Dr. Kadir OZCAN Üye	
4	Prof. Dr. Erden Erol ÜNLÜER Üye	KATILMADI		Av. Fatih GÜNGÖR Raportör	

02/06/201 TE. 18151

T.C.

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZTÜRK, Meral  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 07.11.1993 Çorum  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : 0538 410 97 66  
e-mail : meralztrk93@gmail.com

### Eğitim

Derece tarihi	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Yüksek Lisans	Uşak Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2018
Lisans	Uşak Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Lise	Eti Lisesi	2011

### Yabancı Dil

İngilizce

### Sunulan ve Basılan Bildiriler

1. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler :

Korcan, S.E., Bulduk, İ., Karafakıoğlu, Y.S., Öztürk, M., Kölemek, H., Kahraman, A., 2017, "Total Phenolic Content And Antimicrobial Activity Of Methanolextract Of *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) Naturallyfound İn Turkey", I. International Congress On Medicin Aland Aromatic Plants "Natural And Healthy Life".

Karafakıoğlu, İ, Bulduk, Korcan, S.E., Öztürk, M., Kölemek, H., Kahraman, A., 2017, "Determination Of Total Phenolic And Antimicrobial Activity İn *Erodium Laciniatum* (Cov.) Willd Collected Fromthe Adana", I. International Congress On Medicin Aland Aromatic Plants "Natural And Healthy Life".



Korcan, S.E., Karafakioğlu, Y.S., Bulduk, İ., Öztürk, M., Kölemek, H., Kahraman, H., 2017, “Total Phenolic Content And Antimicrobial Activity Of Methanol Extract Of *Stachys Obliqua* Waldst.&Kit. And *S. Thracia Davidov* (Lamiaceae) İn Turkey”, I. International Congress on Medicin Aland Aromatic Plants “Natural And Healthy Life”.

Bulduk, İ., Korcan, E., Öztürk, M., Kölemek, H., Kargioğlu, M., 2018, “Türkiye’de Yayılış Gösteren *Helleborus Orientalis* Metanolik Ekstraktlarının Toplam Fenolik, Flavonoid Ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, Konya

Korcan, E., Öztürk, M., Kölemek, H., Bulduk, İ., 2018, “*Helleborus orientalis* Bitkisinin Metanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi”, 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA

Öztürk, M., Kölemek, H., Bulduk, İ., Korcan, E., 2018, “*Helleborus orientalis* Kök Ekstraktlarının Marul Tohumlarının (*Lactuca sativa*) Çimlenmesi Üzerine Herbisidal Etkisi, 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA

Kölemek, H., Bulduk, İ., Korcan, E., Öztürk, M., 2018, “Doğal Ortamından Toplanan *Helleborus orientalis*’de Ağır Metal Tayini”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA

Öztürk, M., Kölemek, H., Bulduk, İ., Korcan, E., 2018, “Haşhaş Kapsülünün (*Papaver somniferum L.*), Metanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA

Bulduk, İ., Korcan, E., Öztürk, M., Kölemek, H., Kargioğlu, M., 2018, “Türkiye’de Yayılış Gösteren *Helleborus orientalis* Metanolik Ekstraktlarının Toplam Fenolik, Flavonoid ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA,

Korcan, E., Öztürk, M., Kölemek, H., Bulduk, İ., 2018, “*Helleborus Orientalis* Bitkisinin Metanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi, 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA,

Öztürk M., Kölemek, H., Bulduk, İ., Korcan, E., 2018, “*Helleborus orientalis* Kök Ekstraktlarının Marul Tohumlarının (*Lactuca sativa*) Çimlenmesi Üzerine Herbisidal Etkisi”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

Kölemek, H., Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M., 2018, “Doğal Ortamından Toplanan *Helleborus Orientalis*’de Ağır Metal Tayini”, 1. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

Öztürk, M., Kölemek H., Bulduk, İ., Korcan E., 2018, “Haşhaş Kapsülünün (*Papaver somniferum L.*), Metanolik Ekstraktının Antimikrobiyal Aktivitesi, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

Kölemek H., Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M., 2018, “Haşhaş Kapsülü Ekstraktlarından Noskapin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

Bulduk, İ., Korcan E., Öztürk M., Kölemek H., 2018, “Haşhaş Kapsülü Ekstraktlarından Morfin Yüklü Hidroksiapatit Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

Korcan E., Öztürk M., Kölemek H., Bulduk, İ., Haşhaş Kapsülünün (Papaver somniferum L.), Metanolik Ekstraktının Toplam Fenolik, Flavonoid ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi”, I. Uluslararası Bitki Biyolojisi Kongresi, KONYA, 2018

Korcan, S.E., Bulduk, İ., Kahraman, T., Kayhan, R., Çitekçi K., Kölemek, H., Öztürk, M., 2018, “Narcissus Papyraceus Soğanlarında Toplam Fenolik Bileşikler, Toplam Antioksidan Kapasite, Toplam Flavonoid Maddelerin Ve Anttimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi”, *Uşak üniversitesi fen ve doğa bilimleri dergisi* 10-17 2018(1).

### **Projeler**

“*Helleborus orientalis* Ekstraktlarının Biyolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi” (Bilimsel Araştırma Projesi) 2016-2017.

“Hidroksiapatit Nanomoleküllerine Tutturulmuş Tıbbi Bitki Ekstraktlarından Elde Edilen Alkolidlerin Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Çalışmaları” (Bilimsel Araştırma Projesi) 2016-2017.

### **Sertifikalar**

1. I.Uluslararası tıbbi ve aromatik bitkiler kongresi KONYA 2017.
2. I.Uluslararası bitki biyolojisi kongresi KONYA, 2018.