



ARAŞTIRMA MAKALESİ

FARKLI NERGİS KÜLTÜR ÇEŞİTLERİ SOĞANLARININ *IN VITRO* ANTIOKSİDAN,
ASETİLKOLİNESTERAZ ve BÜTİRİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİ

İlham ERÖZ POYRAZ ^{1,*} , H. Tuba KIYAN ² , Emrah ZEYBEKOĞLU³, 
M. Ercan ÖZZAMBAK ³ , Nilgün ÖZTÜRK ² 

¹ Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, 26470 Tepebaşı, Eskişehir, Türkiye

² Farmakognози Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, 26470 Tepebaşı, Eskişehir, Türkiye

³ Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 35100 İzmir, Türkiye

ÖZET

Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) inhibisyonu, beyinde β -amiloit birikimini azaltmak ve asetilkolin kullanımını artırmada, yani Alzheimer hastalığının (AD) tedavisinde önemli hedeflerden biridir. Oksidatif stres nedeniyle oluşan serbest radikallerin beyinde nöron ve metal akümülyasyonuna verdiği hasar AD'nin patojenezine doğrudan ilişkilidir. Amaryllidaceae familyası üyelerinin (*Galanthus*, *Leucojum* v.b.) içerdiği galantamin, senile demansın tedavisinde kullanılan AChE inhibitörlerinden biridir. Bu çalışmada, bu familyanın üyesi nergis (*Narcissus* L.) kültür çeşitlerinin soğanlarına ait metanol:kloroform (1:1 (v:v)) ekstralarının, toplam fenolik madde ve polifenol içerikleri belirlenmiştir. Ayrıca ekstraların *in vitro* antioksidan aktiviteleri, AChE ve BChE inhibisyonları ile Alzheimer tedavisi arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları 20.78 ± 0.25 ile 57.97 ± 0.49 mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g ekstre olarak tespit edilmiş, toplam fenolik madde miktarı bakımından en zengin kültür çeşidinin 'Golden Ducat' olduğu görülmüştür. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Diyod Dizisi Dedektörü (DDD) ile çeşitlere göre belirlenen fenolik asitler, 'Golden Ducat', gallik asit ve protokateşik asit; 'Golden Harvest', para-hidroksibenzoik asit; 'Carlton', klorojenik asit; 'Cheerfulness', para-kumarik asit; 'Einstein', ferulik asit şeklindedir. DPPH radikal süpürücü etki açısından 'Einstein' kültür çeşidinin inhibisyon değeri 23.65 ± 0.73 (9.6×10^{-4} derişimde), 'Cheerfulness' kültür çeşidinin inhibisyon değeri 26.69 ± 1.04 (1.8×10^{-3} derişimde) ve 28.51 ± 0.1 (3.6×10^{-3} derişimde) olarak bulunmuştur. 'Carlton' kültür çeşidinden elde edilen ekstre 0.2 mg/mL derişimde %14.61 ile en yüksek metal şelatlayıcı antioksidan etki göstermiştir (Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA): 77.84). 'Strong Gold' çeşidi ekstresi 1.19 (mg/mL) %50 Etkili Derişim (EC₅₀) değeri ile indirgeyici güç ölçümünde diğer türlere göre daha yüksek etki göstermiştir (Bütül Hidroksi Toluen (BHT)'nin %50 Etkili Derişimi (EC₅₀): 0.21), askorbik asit EC₅₀: 0.094). AChE'nin inhibitör etkisi, 'Tête-à-Tête' kültür çeşidi, 200 µg/mL derişimde %53.36 (aynı derişimde donepezil % 92.077) olarak bulunmuştur. BChE inhibitör etki tayininde ise yine 'Tête-à-Tête' kültür çeşidi 200 µg/mL derişimde %30.25 ve 100 µg/mL derişimde %26.8 inhibisyon göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Narcissus* L., Soğan, Antioksidan, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz

**IN VITRO ANTIOXIDANT, ACETYLCHOLINESTERASE and
BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITION ACTIVITIES of DIFFERENT NARCISSUS L.
CULTIVAR BULBS**

ABSTRACT

Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) is one of the important targets in reducing β -amyloid accumulation in the brain and increasing acetylcholine utilization in the treatment of Alzheimer's disease (AD). Damage to neurons and metal accumulation in the brain by free radicals caused by oxidative stress is directly related to the pathogenesis of AD. Galantamine, which is contained by members of the Amaryllidaceae family (*Galanthus*, *Leucojum*, etc.), is one of the AChE inhibitors used in the treatment of senile dementia. In this study, the total phenolic substance and polyphenol contents of the methanol: chloroform (1:1 (v:v)) extracts of narcissus (*Narcissus* L.) cultivar bulbs, which the genus belongs to the mentioned family, were determined. Also, the investigation of the relationship between *in vitro* antioxidant activities, AChE, and BChE inhibitions of the extracts and Alzheimer's treatment was aimed. The total phenolic content of the extracts

was determined between 20.78 ± 0.25 and 57.97 ± 0.49 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract, and it was observed that 'Golden Ducat' had the richest one for total phenolic content. Determined phenolic acids by High-Pressure Liquid Chromatography-Diode Array Detector (DDD) for 'Golden Ducat' cultivar were gallic acid and protocatechuic acid; for 'Golden Harvest' cultivar was para-hydroxybenzoic acid; for 'Carlton' cultivar was chlorogenic acid; for 'Cheerfulnes' cultivar was para-coumaric acid and for 'Einstein' cultivar was ferulic acid. In terms of DPPH• radical scavenging activity, the inhibition value of the cultivar 'Einstein' was 23.65 ± 0.73 (at 9.6×10^{-4} concentration), the inhibition value of the cultivar 'Cheerfulnes' was 26.69 ± 1.04 (at 1.8×10^{-3} concentration) and 28.51 ± 0.1 (3.6×10^{-3} concentration). The extract obtained from the cultivar 'Carlton' showed the highest metal-chelating antioxidant activity with 14.61% at 0.2 mg/mL concentration (Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA): 77.84). The extract of 'Strong Gold' variety showed higher activity on reducing power measurement with a 50% Effective Concentration (EC₅₀) value of 1.19 (mg/mL) compared to other species (50% Effective Concentration of Butylated Hydroxytoluene (BHT) (EC₅₀): 0.21), ascorbic acid EC₅₀: 0.094). The inhibitory activity of AChE was found to be 53.36% (donepezil 92.077% at the same concentration) in the cultivar 'Tête-à-Tête' at 200 µg/mL concentration. For the BChE inhibitory activity, the cultivar 'Tête-à-Tête' was showed 30.25% inhibition at 200 µg/mL and 26.8% inhibition at 100 µg/mL.

Keywords: *Narcissus* L., Bulbs, Antioxidant, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase

1. GİRİŞ

Amaryllidaceae familyasına ait *Narcissus* L. cinsi dünyada 80 tür ile temsil edilir. Doğal olarak melezlenme potansiyeli, geniş bir coğrafyada dağılımı, kültüre alınması, ilgi çeken çiçekleri, süs bitkisi olarak öneminin ve çeşitliliğinin artmasına neden olmuştur. Aynı familyada yer alan *Galanthus* L. ve *Leucojum* L. cinslerinin morfin benzeri bir alkaloid olan galantaminin doğal kaynakları olmaları, familyadaki diğer cinslerin bu alkaloid açısından önemlerini arttırmıştır. Galantamin, merkezi kolinerjik etkileri nedeni ile Alzheimer'da terapötik bir ajandır. Takrin (hepatotoksositeye neden olur) ve fisostigmin gibi hastalığın tedavisinde kullanılan diğer antikolinesteraz bileşiklerine göre, ajitasyon ve insomnia gibi hafif yan etkilere sahiptir. Bu nedenle galantamin, senile demansının tedavisinde yapısal olarak ilişkili diğer AChE inhibitörlerinden daha iyi bir terapötik ajan durumundadır [1].

Nörodejeneratif bir rahatsızlık olan Alzheimer hastalığı (AD), kolinerjik sistemdeki eksiklikler ile β -amiloit (A β)'in nörofibriler ağlar ve amiloit plaklar formunda birikimi ile karakterizedir. Kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek süreçlerinin düzenlenmesi üzerindeki rolü nedeniyle antikolinesteraz yaklaşım, anti-Alzheimer ilaçlarının geliştirilmesinde önem taşımaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolini hidroliz eden asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) enzimini inhibe ederek kolinerjik iletimi arttırmaktadırlar. Hem AChE, hem de bütirikolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) enzimi yaşlılık plaklarının oluşumunun ilk evreleri boyunca meydana gelen A β agregasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle AChE ve BChE inhibisyonu, beyinde A β birikimini azaltmak ve asetilkolin kullanımını arttırmak suretiyle Alzheimer hastalığının etkili tedavisinde kritik hedefler teşkil etmektedir [2].

Oksidatif stres nedeni ile serbest radikal oluşumunun, nöronlara hasar vermesi ve beyinde metal birikimine neden olması, AD'nin patojenezi ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle AD'ye karşı kullanılan terapötik bir ajanın hem AChE inhibitörü, hem de hastalığın patojenezinde oluşan β -amiloit plaklarda metal birikimi nedeni ile metal şelatlayıcı antioksidan etkiye sahip olması tedavide önem taşımaktadır [3].

Bu çalışmada, bazı nergis kültür çeşitlerinin soğanlarına ait ekstraktların, toplam fenolik madde ve polifenol içeriklerinin belirlenmesi, *in vitro* antioksidan potansiyelleri ile *in vitro* AChE ve BChE inhibisyonlarının Alzheimer tedavisi arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada, Asya Lale firmasından temin edilmiş, yabancı orjinli 10 farklı nergis kültür çeşidinin (*Narcissus* cv. 'Strong Gold', 'Golden Harvest', 'Fortissimo', 'Cheerfulnes', 'Golden Ducat', 'Mount

Hood', 'Tête-à-Tête', 'Precocious', 'Einstein') aynı ekolojik koşullarda ikinci vejetasyon dönemini tamamlamış olan soğanları kullanılmıştır.

2.2. Ekstraksiyon

Deneyisel çalışmada kullanılacak nergis kültür çeşitlerine ait soğanlar soyulup, parçalanarak etüvde yaklaşık 8 saat bekletilerek kurutulmuş, ekstraksiyon işlemine kadar +4 °C'de saklanmıştır. Buzdolabında saklanan soğanlar 10 gram (g) tartılarak metanol:kloroform (1:1, (v/v)) karışımı ile 24 saat masere edilmiş (n=3), birleştirilen süzüntüler alçak basınç altında rotavaporda yoğunlaştırılmıştır [4]. Elde edilen ekstrelerin fitokimyasal özellikleri kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

2.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Hazırlanan ekstrelerin içerdiği toplam fenolik madde derişimleri Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir [5]. Bu spektrofotometrik yöntem, fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu çözeltilisinde bulunan fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin kompleks polimerik iyonları ile oksidasyonu sonucu oluşan mavi renkli molibden-tungsten kompleksinin absorpsiyonunun 750 nm dalga boyunda ölçülmesi ilkesine dayanır. Bu amaçla, 0.5 ml örnek (0.5 mg/mL (%50 MeOH'da)), 2.5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltilisi (%20'lik, a/h, suda) karıştırılarak, 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Çözeltilerin absorpsiyon değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunarak, standart olarak kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak toplam fenol miktarı g ekstrede mg gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

2.4. Fenolik Asitlerin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)-Diyod Dizisi Dedektörü (DDD) ile Tanımlanması

Çalışılan ekstrelerin içerdiği fenolik asitlerin miktar tayinleri, uygun ters-faz kolon ve gradient elüsyon çözücü sistemi kullanılarak YBSK-DDD yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [6]. Sonuçların değerlendirilmesinde, ayırımın tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla iç standart (Internal Standart) (IS) yöntemi kullanılmış, sunulan analiz koşullarında ilgili fenolik asitlerle birlikte sisteme IS olarak propil paraben eklenmiş ve IS'nin karışıklığa neden olmayan bir bölgede pik verdiği gözlenmiştir.

2.5. Serbest Radikal Süpürücü Etki

Ekstrelerin 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno ve ark. (1998) [7] tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Metanolde hazırlanmış 9.6×10^{-4} , 1.8×10^{-3} ve 3.6×10^{-3} mg/mL derişimlerdeki örnek çözeltilerinden 0.1, 0.2 ve 0.4 mL alınarak, üzerlerine metanolde hazırlanmış 3 ml DPPH* (2×10^{-2} g/L) çözeltilisi ilave edilmiş, vorteksde 30 saniye karıştırılmış ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 517 nm'de absorpsiyon değerleri kaydedilmiştir. Serbest radikal süpürücü etki (% İnhibisyon) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır [8, 9]:

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

(A: kontrol absorpsiyonu, B: örneğin absorpsiyonu)

Her bir deney 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, referans madde olarak Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) kullanılmıştır.

2.6. Metal Şelatlayıcı Etki

Ekstrelerin Fe²⁺ iyonu şelatlayıcı etkileri Orhan ve Üstün (2011) [10] tarafından rapor edilen spektrofotometrik yöntemle göre tayin edilmiştir. 400 µL örnek (0.2 mg/mL) üzerine 40 µL FeCl₂

(2mM) ve 80 µL Ferrozin (5mM) eklenmiştir, reaksiyon çözeltisi metanol ile 2 mL'ye tamamlanmıştır. 10 dakika bekletilen çözeltilerin 562 nm'de absorbansları ölçülmüş ve metal şelatlama kapasitesi (%) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

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

Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, pozitif kontrol olarak Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (0.2 mg/mL) kullanılmıştır [11].

2.7. İndirgeme Gücü Ölçümü

200 µL örnek çözeltisi (0.5 mg/mL derişimde) üzerine 500 µl fosfat tamponu ve 500 µL %1'lik $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ eklenmiş, karışım 50°C'de etüvde 20 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 500 µL %10'luk trikloro asetik asit (TCA) eklenerek, 4000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 500 µL süpernatant, 500 µL distile su ve 200 µL 0,1'lik $FeCl_3$ ile karıştırılarak elde edilen reaksiyon çözeltisinin absorbansı, 700 nm'de örnek içermeyen reaksiyon karışımına karşı okunmuştur (n=3). Pozitif standart olarak BHT ve askorbik asit kullanılmıştır. Bu yöntemde, antioksidan etki, %50 Etkili Derişim (EC_{50}) değerleri ile ifade edilmiştir. Düşük EC_{50} değerleri, yüksek antioksidan etkinliği göstermektedir [12].

2.8. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirikolinesteraz (BChE) İnhibitör Etki

Ekstrelerin AChE ve BChE inhide edici etkileri Ellman Testi ile belirlenmiştir [13, 14]. Söz konusu spektrofotometrik yöntem, tiyokolinin kromatik bir reaktif ve 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile renkli bir ürün vermesi esasına dayanır. Ekstrelerin enzim inhibitör etkileri, 200, 100, 50 ve 25 µg/mL'lik derişimlerde gerçekleştirilmiştir. Etki değerleri %0-100 aralığında inhibisyon şeklinde değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak AChE inhibitör etki belirlemede donepezil, BChE inhibitör etki yönteminde takrin ve galantamin kullanılmıştır. Enzim inhibisyon çalışmasında hazırlanan çözeltilerin porsiyonlar halinde ayrılması, test bileşiklerinin 96 kuyucuklu plakalara uygulanması, enzim-substrat çözeltilerinin eklenmesi işlemlerinde, BioTek-Precision Power robotik pipetleme sistemi ve enzim protokolü oluşturma, izleme ve spektrofotometrik ölçüm alımı işlemleri, BioTek-Synergy H1 Microplate Reader cihazı kullanılarak yapılmıştır. Her test çözeltisi ve farklı derişimlerdeki inhibitör çözeltileri (20 µL), 96 kuyucuklu plakalara Biotek Precision XS robotik sistemi kullanılarak eklenmiştir. İnhibitör bileşiklerinin her derişimi plaklara 4 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Plakalar, BioTek-Synergy H1 mikropilaka okuyucusuna konarak önce 5 dakika süreyle karıştırılmış daha sonra 25°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde mikropilaka okuyucusu dispenser haznesinde bulunan ikinci test çözeltisinin her bir kuyucuğa 80 µL olacak şekilde ilavesi sağlanmıştır. İkinci test çözeltisi eklendikten sonra 30 sn'lik hızlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır. Bu aşamada 412 nm'de birinci absorbans okuması gerçekleştirilmiştir. Mikropilakalar, reaksiyonun sürmesi için 5 dakika daha karışmaya bırakılmış ve bu süre sonunda ikinci absorbans okuması yapılmıştır. İki okuma arasındaki absorbans farkları alınarak aşağıdaki formüle göre % inhibisyon oranları hesaplanmıştır:

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

B: Blank (kör) (İnhibitör bileşik ve substratın eklenmediği kuyucuk)
K: Kontrol (Sadece inhibitör bileşiğin eklenmediği kuyucuk)
A(B): Blank kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı
A(K): Kontrol kuyucuğuna ait absorbans okuma farkı
A(I): İnhibitör maddelere ait absorbans okuma farkı

3. SONUÇLAR

Çalışılan nergis kültür çeşitlerinin toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile tayin edilmiş, sonuçlar gallik asit kalibrasyon eşitliği kullanılarak, g ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır (Tablo 1). Tablo 1'e göre nergis kültür çeşitlerinden hazırlanan ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları 20.78 ± 0.25 ile 57.97 ± 0.49 mg GAE/g ekstre arasında bulunmuştur. Toplam fenolik madde miktarı bakımından en zengin kültür çeşidinin 'Golden Ducat' olduğu, onu 'Tête-à-Tête' (56.89 ± 0.26 mg GAE/g ekstre), 'Strong Gold' (48.91 ± 1.80 mg GAE/g ekstre), 'Cheerfulness' (47.37 ± 0.47 mg GAE/g ekstre) 'in takip ettiği görülmüştür.

Tablo 1. Çalışılan ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları.

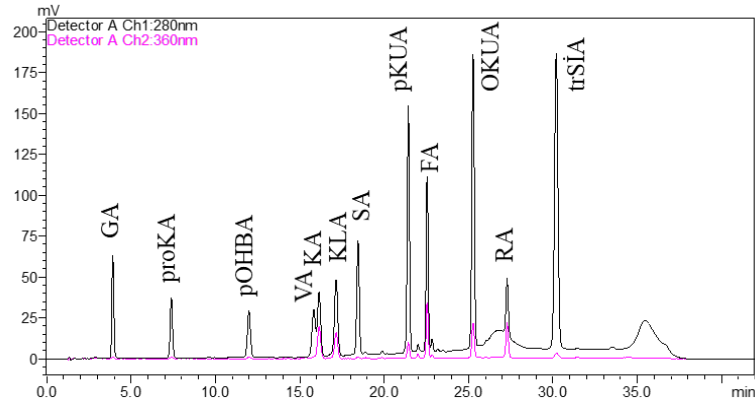
Ekstreler	Toplam Fenolik Madde Miktarları (mg GAE/g ekstre)
'Tête-à-Tête'	56.89 ± 0.26
'Strong Gold'	48.91 ± 1.80
'Einstein'	41.97 ± 3.88
'Cheerfulness'	47.37 ± 0.47
'Golden Harvest'	33.35 ± 2.49
'Golden Ducat'	57.97 ± 0.49
'Carlton'	29.37 ± 1.20
'Precocious'	27.31 ± 0.48
'Fortissimo'	25.56 ± 0.28
'Mount Hood'	20.78 ± 0.25

Çalışılan nergis kültür çeşitlerinden elde edilen ekstrelerin ters faz YBSK-DDD ile belirlenen fenolik asit miktarları Tablo 2'de, kromatogramları ise Şekil 1-3'de verilmiştir.

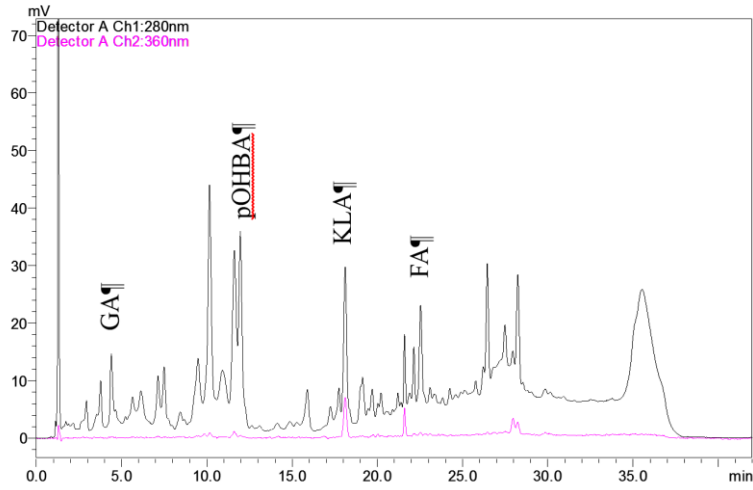
Tablo 2. Çalışılan ekstrelerin YBSK-DDD ile belirlenen fenolik asit miktarları ($\mu\text{g/g}$ ekstre).

Ekstreler	FENOLİK ASİT MİKTARLARI ($\mu\text{g/g}$ ekstre)					
	GA	ProKA	pOHBA	KLA	pKUA	FA
'Tête-à-Tête'	0.34	-	0.02	2.36	-	1.15
'Strong Gold'	0.71	1.87	0.04	3.09	-	1.32
'Einstein'	0.37	0.91	-	1.51	-	4.20
'Cheerfulness'	0.78	0.70	0.03	2.24	1.16	1.24
'Golden Harvest'	0.90	1.79	0.06	5.03	0.65	2.20
'Golden Ducat'	2.87	3.68	0.03	6.29	0.08	2.04
'Carlton'	2.12	1.00	0.03	6.46	0.75	2.54
'Precocious'	0.58	0.56	0.02	3.38	-	3.48
'Fortissimo'	1.48	1.72	0.03	3.70	-	1.95
'Mount Hood'	0.67	0.69	0.01	2.13	0.50	1.84

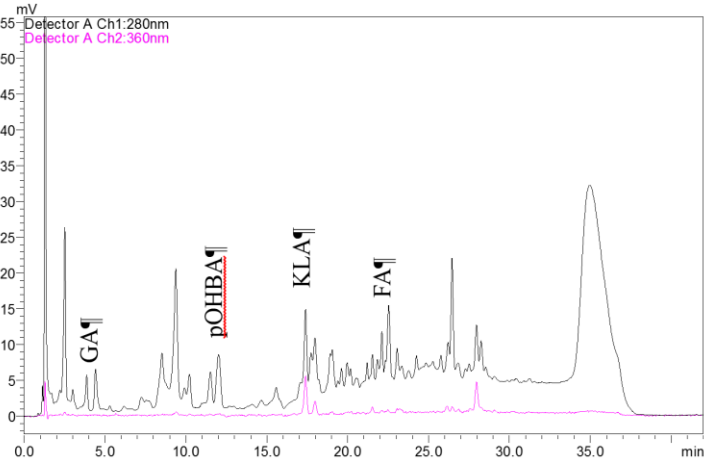
GA: Gallik asit, ProKA: Protokateşik asit, pOHBA: para-Hidroksibenzoik asit, KLA: Klorojenik asit, pKUA: para-Kumarik asit, FA: Ferulik asit.



Şekil 1. Standart fenolik asit kromatogramı.



Şekil 2. 'Golden Harvest' ekstreğine ait fenolik asit kromatogramı.



Şekil 3. 'Carlton' ekstreğine ait fenolik asit kromatogramı.

Narcissus kültür çeşitlerinin YBSK-DDD ile belirlenen en yüksek miktardaki fenolik asitleri, 'Golden Ducat' için gallik asit (2.87 µg/g ekstre) ve protokateşik asit (3.68 µg/g ekstre); 'Golden Harvest' için

p-hidroksibenzoik asit (0.06 µg/g ekstre); ‘Carlton’ için klorojenik asit (6.46 µg/g ekstre); ‘Cheerfulnes’ için p-kumarik asit (1.16 µg/g ekstre) ve ‘Precocious’ için ferulik asit (3.48 µg/g ekstre) şeklindedir.

Çalışılan nergis kültür çeşitlerinin DPPH• üzerinden serbest radikal süpürücü etkilerine ait % inhibisyon değerleri Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışılan ekstrelerin DPPH radikal süpürücü antioksidan etki sonuçları.

Ekstre Derişim	% İnhibisyon		
	9.6×10 ⁻⁴ mg/mL	1.8×10 ⁻³ mg/mL	3.6×10 ⁻³ mg/mL
‘Tête-à-Tête’	21.64 ± 1.62	24.24 ± 1.57	26.72 ± 0.69
‘Strong Gold’	20.96 ± 0.71	23.82 ± 2.05	25.52 ± 2.24
‘Einstein’	23.65 ± 0.73	24.03 ± 2.42	26.95 ± 0.26
‘Cheerfulnes’	22.15 ± 0.18	26.69 ± 1.04	28.51 ± 0.1
‘Golden Harvest’	21.79 ± 1.84	24.88 ± 0.73	25.29 ± 0.5
‘Golden Ducat’	20.81 ± 0.41	22.28 ± 1.2	25.17 ± 2.12
‘Carlton’	23.50 ± 0.45	25.31 ± 1.6	26.09 ± 1.0
‘Precocious’	15.06 ± 0.15	16.06 ± 0.33	17.93 ± 0.34
‘Fortissimo’	16.82 ± 0.5	17.01 ± 0.09	18.05 ± 0.53
‘Mount Hood’	15.48 ± 0.47	17.12 ± 0.24	18.16 ± 0.65
BHT	33.28 ± 0.65	44.82 ± 1.96	56.84 ± 1.94
Askorbik Asit	38.25 ± 1.39	53.16 ± 0.33	83.97 ± 1.64

Sonuçlar, ± standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

DPPH• radikal süpürücü antioksidan etki açısından nergis kültür çeşitleri incelendiğinde ‘Einstein’ kültür çeşidinin inhibisyon değeri 23.65 ± 0.73 (9.6 × 10⁻⁴ derişimde), ‘Cheerfulnes’ kültür çeşidinin inhibisyon değeri 26.69 ± 1.04 (1.8 × 10⁻³ derişimde) ve 28.51 ± 0.1 (3.6 × 10⁻³ derişimde) olarak bulunmuştur.

Çalışılan nergis kültür çeşitlerinin metal şelatlayıcı etki sonuçları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışılan ekstrelerin metal şelatlayıcı etki sonuçları

Ekstreler	Antioksidan etki % inhibisyon (0.2 mg/mL)
‘Tête-à-Tête’	2.16 ± 0.38
‘Strong Gold’	-
‘Einstein’	3.63 ± 0.71
‘Cheerfulnes’	-
‘Golden Harvest’	9.22 ± 1.21
‘Golden Ducat’	13.24 ± 1.84
‘Carlton’	14.61 ± 1.72
‘Precocious’	8.43 ± 0.91
‘Fortissimo’	13.33 ± 0.51
‘Mount Hood’	2.55 ± 0.38
EDTA	77.84 ± 4.82

Sonuçlar, ± standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

*(-) etki görülmemiştir.

Metal şelatlayıcı antioksidan etki sonuçları bakımından nergis kültür çeşitleri arasında ‘Carlton’ kültür çeşidi ekstresinin 0.5 mg/mL derişimde %14.61 ile çalışılan diğer ekstrelelere kıyasla yüksek inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir (EDTA: %77.84 (0.5 mg/mL derişimde)).

Çalışılan nergis kültür çeşitlerinin indirgeme gücü ölçümü sonuçları ise Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Çalışılan ekstrelerin indirgeme gücü ölçüm sonuçları.

Ekstreler	EC ₅₀ (mg/mL)
‘Tête-à-Tête’	1.65 ± 0.15
‘Strong Gold’	1.19 ± 0.21
‘Einstein’	1.35 ± 0.11
‘Cheerfulnes’	1.72 ± 0.18
‘Golden Harvest’	1.55 ± 0.31
‘Golden Ducat’	1.77 ± 0.18
‘Carlton’	1.49 ± 0.28
‘Precocious’	1.84 ± 0.34
‘Fortissimo’	1.74 ± 0.41
‘Mount Hood’	1.28 ± 0.28
BHT	0.21 ± 0.08
Askorbik Asit	0.094 ± 0.01

Sonuçlar, ± standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

Redükleyici güç ölçümü ile antioksidan etki bakımından incelenen nergis kültür çeşitleri arasında ‘Strong Gold’ ekstresine ait EC₅₀ değeri 1.19 (mg/mL) olarak elde edilmiştir (BHT EC₅₀ = 0.21, askorbik asit EC₅₀ = 0.094).

Çalışılan nergis kültür çeşitlerinin AChE inhibitör etki sonuçları Tablo 6’da, BChE inhibitör etki sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 6. Çalışılan ekstrelerin AChE inhibitör etki sonuçları

Ekstreler	AChE % İnhibisyon			
	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
‘Tête-à-Tête’	53.366	4.346	-	-
‘Strong Gold’	3.397	2.888	-	-
‘Einstein’	5.602	2.272	-	-
‘Cheerfulnes’	-	-	-	-
‘Golden Harvest’	3.687	-	-	-
‘Golden Ducat’	6.948	4.942	2.715	-
‘Carlton’	5.361	2.979	1.343	-
‘Precocious’	-	-	-	-
‘Fortissimo’	3.033	-	-	-
‘Mount Hood’	9.845	5.283	1.714	-
Donepezil	92.077	91.065	89.357	88.250

Tablo 7. Çalışılan ekstrelerin BChE inhibitör etki sonuçları

Ekstreler	BChE % İnhibisyon			
	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL
'Tête-à-Tête'	30.25	26.85	15.70	10.33
'Strong Gold'	23.27	10.14	7.49	4.38
'Einstein'	11.28	8.39	5.00	3.47
'Cheerfulness'	18.46	12.23	6.97	2.10
'Golden Harvest'	15.26	9.75	4.30	2.42
'Golden Ducat'	9.24	6.31	4.08	3.22
'Carlton'	10.27	7.26	5.74	3.66
'Precocious'	18.36	14.24	10.79	7.33
'Fortissimo'	25.80	19.82	16.37	10.71
'Mount Hood'	20.75	13.86	11.32	8.29
Donepezil	76.89	73.26	69.37	65.31
Takrin	97.50	92.20	89.15	83.60
Galantamin	60.24	52.30	48.22	42.65

Çalışılan ekstreler AChE inhibitör etkisi açısından değerlendirildiğinde, 'Tête-à-Tête' kültür çeşidi 200 µg/mL derişimde %53.366, donepezil %92.077 inhibisyon gösterirken. BChE inhibitör etkisi açısından yine 'Tête-à-Tête' kültür çeşidi 200 µg/mL derişimde %30.25 ve 100 µg/mL derişimde %26.85 inhibisyon (Donepezil: 200 µg/mL derişimde %76.89 100 µg/mL derişimde %73.26) göstermiştir.

4. TARTIŞMA

Alzheimer hastalığı (AD), kolinerjik sistemdeki eksiklikler ve β -amiloit (A β)'in nörofibriler ağlar ve amiloit plaklar formunda birikimi ile karakterize, nörodejeneratif bir rahatsızlıktır. Kolinerjik sistemin öğrenme ve bellek süreçlerinin düzenlenmesi üzerindeki rolü nedeniyle antikolinerjik yaklaşım, anti-Alzheimer ilaçlarının geliştirilmesinde önem taşımaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolini hidroliz eden AChE enzimini inhibe ederek kolinerjik iletimi arttırmaktadır. Hem AChE, hem de BChE enzimi yaşlılık plağı oluşumunun ilk evreleri boyunca meydana gelen A β agregasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Bu nedenle AChE ve BChE inhibisyonu, beyinde A β birikimini azaltmak ve asetilkolin kullanımını artırmak suretiyle Alzheimer hastalığının etkili tedavisinde kritik hedefler teşkil etmektedir. Etki deneylerinde kullanılan takrin, donepezil ve galantamin Alzheimer tedavisinde klinikte şu anda kullanılan kolinesteraz inhibitörü ilaçlardandır [2].

Amaryllidaceae familyası üyeleri, içerdikleri fenantridin grubu alkaloidlerin analjezik, asetilkolinesteraz inhibitörü, β -adrenerjik reseptör stimulanı gibi farmakolojik etkilere sahiptir. Bu familyada yer alan *Narcissus* L. türleri, çoğunlukla soğanlarında norbelladin, likorin, homolikorin, hemantamin, narkiklazın, tazettin, pankreatin ve galantamin gibi alkaloidler içerir. Bu alkaloidlerin sitotoksik, antitümör, AChE inhibitörü, antibakteriyel, antifungal gibi çeşitli farmakolojik ya da biyolojik etkileri nedeni ile *Narcissus* türleri çeşitli çalışmalara konu olmuştur [15-22].

Bitkilerin antioksidan etkileri, içerdikleri fenolik bileşiklerden kaynaklanır. Bunlar serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarını engelleyerek kalp hastalıkları, Alzheimer, kanser, diyabet gibi hastalıklara karşı koruyucu etki gösterir. Bu çalışmada, DPPH• radikal süpürücü etki açısından 'Einstein' kültür çeşidinin 9.6×10^{-4} derişimde % inhibisyon değeri 23.65 ± 0.73 , 'Cheerfulness' kültür çeşidinin 1.8×10^{-3} derişimde % inhibisyon değeri 26.69 ± 1.04 ve 3.6×10^{-3} derişimde 28.51 ± 0.1 olarak bulunmuştur

(% İnhibisyon BHT: 33.28 ± 0.65 ve askorbik asit: 53.16 ± 0.33 , 83.97 ± 1.64). *N. broussonetii* türünün farklı derişimlerdeki etanol ekstresinin radikal süpürücü etkileri, 10-100 mg mL⁻¹ derişimlerde, 82.5-66.9 % inhibisyon değerleri arasında (askorbik asit: %89.8) olduğu gösterilmiştir [23]. Metal şelatlayıcı antioksidan etki sonuçlarına göre EDTA 77.84 inhibisyon gösterirken, Carlton' kültür çeşidinden hazırlanan ekstrenin 0.2 mg/mL konsantrasyonda % inhibisyon değeri 14.61 olarak bulunmuştur. İndirgeme gücü ölçümü tayininde BHT ve askorbik asit (sırası ile EC₅₀ değerleri: 0.21-0.094 mg/mL) bulunurken, 'Strong Gold' çeşidi ekstresinin EC₅₀ değeri 1.19 mg/mL'dir. *Narcissus* türleri ekstresinin metal şelatlayıcı antioksidan etkisi ve indirgeme gücü ile ilgili yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır.

Narcissus kültür çeşitleri ekstresinin toplam fenolik madde miktarları 20.78 ± 0.25 ile 57.97 ± 0.49 mg GAE/g ekstre olarak elde edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı bakımından en zengin kültür çeşidinin 'Golden Ducat' olduğu görülmüştür. YBSK-DDD ile belirlenen fenolik asitler ve miktarları (µg/g ekstre) bakımından 'Golden Ducat', gallik asit ve protokateşik asit; 'Golden Harvest', para-hidroksibenzoik asit; 'Carlton', klorojenik asit; 'Cheerfulness', para-kumarik asit; 'Einstein', ferulik asit bakımından zengindir. *N. pseudonarcissus* ve *N. poeticus*'un toprak üstü kısımlarından hazırlanan %70'lik etanol ekstresinin toplam polifenolik madde miktarı sırası ile 19.74 ± 0.25 mg GAE/g ve 15.25 ± 0.06 mg GAE/g; serbest radikal süpürücü etki için IC₅₀ değerleri 200'den yüksek (Trolax: 11.20 ± 0.20 µg Trolox/mL) olarak elde edilmiştir [24]. *N. papyraceus*'un soğan ve soğan kabuklarının metanol ekstresinde toplam fenolik madde miktarı sırası ile 98 mg GAE/1 g ekstre ve 584 mg GAE/1 g ekstre olarak; serbest radikal süpürücü etki için % inhibisyon değerleri sırası ile %55.5 ve %88.96 olarak verilmiştir [25].

Nörolojik rahatsızlıkların gelişiminde çeşitli metallerin beyinde birikmesinin de rol oynadığı tespit edilmiştir. Örneğin, demir homeostazındaki değişiklikler, hipokampusta ve serebral kortekste değişen demir, ferritin ve transferrin seviyelerinin artışı AD hastalarında görülen farklılıklardır. Demir, Aβ'in birikimine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, demir ve diğer redoks aktif metallerin (örneğin bakır) şelasyonunu içeren terapiler, AD'de değerli bir strateji olarak düşünülmektedir [12]. Oksidatif stres nedeniyle oluşan serbest radikallerin beyinde nöron ve metal akümülyasyonuna verdiği hasar AD'nin patojenezine doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle AD'ye karşı kullanılan terapötik bir ajanın hem AChE inhibitörü, hem de metal şelatlayıcı antioksidan-hastalığın patojenezinde oluşan β-amiloit plaklarda metal birikimi nedeniyle- özelliğe sahip olması tedavide önem taşımaktadır [3].

Narcissus L. cinsi ile aynı familyada yer alan *Galanthus* ve *Leucojum* cinslerinin morfin benzeri bir alkaloid olan galantaminin (merkezi kolinerjik etkileri nedeni ile Alzheimer tedavisinde kullanılan bir terapötik ajan) doğal kaynakları olmaları, familyadaki diğer cinslerin bu alkaloid açısından önemlerini arttırmıştır. Alkaloid ekstresleri ve asetilkolin ve bütirilkolin esteraz inhibisyon etkileri çeşitli çalışmalara konu olmuştur. İspanya'nın farklı bölgelerinde yetişen *Narcissus* türlerinin içerdiği çeşitli alkaloidlerin AChE inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, olgun soğanların metanol ekstresleri kullanılmışta, *N. confusus* en yüksek galantamin miktarına (5.38 ± 0.03 mg/g kuru ağırlık) ve $5.38 \pm 0.46 \times 10^{-2}$ mg bitki kuru ağırlığı/mL olarak en yüksek inhibitör etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [22].

Çalışılan *Narcissus* kültür çeşitleri arasında AChE ve BChE inhibitör etkisi en yüksek olan 'Tête-à-Tête' çeşidi metanol;kloroform ekstresinin, 200 µg/mL derişimde % inhibisyon değerleri 53.66 (aynı derişimde donepezilin % inhibisyonu: 92.077) ve 30.25 (aynı derişimde donepezilin % inhibisyonu: 76,89) olarak bulunmuştur. Literatür taramalarımızda ise *Narcissus poeticus* var *recurvus* ekstresinin eritrositik AChE inhibitör etkisinin (IC₅₀ = 6.0 ± 0.1 µg/mL) olduğu [26], *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol çeşidinin taze soğanlarının etanol ekstresinin AChE ve BuChE inhibisyonu IC₅₀ değerleri sırası ile 191.3 ± 20.2 ve 3.3 ± 0.5 µg/mL olarak belirlenmiştir (AChE için: IC₅₀ (µM) Galantamin: 1.71 ± 0.06 , BuChE için: IC₅₀ (µM) Galantamin: 42.3 ± 1.3) [27].

Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, *Narcissus* kültür çeşitlerinin fenolik bileşimleri ile orantılı olarak iyi bir antioksidan kaynağı olduğu, metabolik bir hastalık olan AD ile ilgili AChE ve BChE enzimlerini orta düzeyde inhibe etme özelliğine sahip olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışılan kültür çeşitlerinin doğal antioksidanlar ve enzim inhibitörleri açısından önemli bir kaynak olduğu düşünülebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1605S304). Çalışmanın gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY ve Araş. Gör. Dr. B. Nurpelin SAĞLIK'a teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu makalenin yayınlanması ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- [1] Hanks GR. The biology of *Narcissus*, in *Narcissus and Daffodil, The Genus Narcissus*. Kirton, UK: Taylor and Francis, 2002.
- [2] Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*, 2013; 36(4): 375-399.
- [3] Şenol FS, Yağcı Tüzün C, Toker G, Erdoğan Orhan İ. An *in vitro* perspective to cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of five *Gentiana* species and *Gentianella caucasea*. *Int J Food Sci Nutr*, 2012; 63(7): 802-812.
- [4] Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomed*, 2007; 14: 289-300.
- [5] Folin O, Ciocalteu V, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *J Biol Chem*, 1928: 73, 627-50.
- [6] Öztürk N, Tunçel M, Tunçel NB. Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials. *J Liq Chromatogr R T*, 2007; 30: 587-596.
- [7] Sanchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F, A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J Sci Food Agr*, 1998; 76, 270-276.
- [8] Öztürk N, Tunçel M, Potoğlu-Erkara İ. Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*. *Pharm Biol*, 2009; 47(2), 120-127.
- [9] Öztürk N, Tunçel M. Assessment of phenolic acid content and *in vitro* antiradical characteristics of hawthorn. *J Med Food*, 2011; 14(6), 664-669.
- [10] Orhan İ, Üstün O. Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *J Food Compos Anal*, 2011; 24: 386-390.
- [11] Liu G, Garrett, M R, Men P, Zhu X, Perry G, Smith MA. Nanoparticle and other metal chelation therapeutics in Alzheimer disease. *BBA-Mol Basis Dis*, 2005; 1741(3): 246-252.
- [12] Yeh JY, Hsieh LH, Wu KT, Tsai CF, Antioxidant properties and antioxidant compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola frondosa* (Maitake). *Molecules*, 2011; 16(4), 3197-3211.
- [13] Çakıroğlu G. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri Olarak Bazı Piridin Türevleri Üzerinde Sentez ve Biyoaktivite Çalışmaları. MSc, Ege University, İzmir, 2009.

- [14] Orhan İ, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yılmaz G, Kan Y, Konuklugil B, Şener B, Choudhary MI. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. Food Chem, 2007; 103: 1247-1254.
- [15] Al-Snafi AE, Constituents and pharmacology of *Narcissus tazetta*. IOSR Journal of Pharmacy, (e)- ISSN: 2250-3013, (p)-ISSN: 2319-4219 Volume 10, 9/I, 2020; 44-53.
- [16] Bastida J, Llabrés JM, Viladomat F, Codina C, Rubiralta M, Feliz M, 9-*O*-Demethylmaritidine: A New Alkaloid from *Narcissus radiganorum*¹, Planta Med, 1989; 524-526.
- [17] Berkov S, Martínez-Francés, V, Bastida, J, Codina C & Ríos S. Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. Phytochem, 2014, 99, 95-106.
- [18] Breiterová K., Koutová D, Maříková J, Havelek R, Kuneš J, Majorošová M & Cahlíková L. Amaryllidaceae Alkaloids of Different Structural Types from *Narcissus* L. cv. Professor Einstein and Their Cytotoxic Activity. Plants, 2020; 9(2), 137.
- [19] de Andrade JP, Pigni NB, Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. J Pharm Biomed Anal, 2012; 70, 13-25.
- [20] Fu KL, Shen YH, Lu L, Li B, He YR, Li B & Zhang WD. Two unusual rearranged flavan derivatives from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. Helv Prod Commun, 2013; 96(2), 338-344.
- [21] Havlasová J, Šafratová M, Siatka T, Štěpánková Š., Novák Z, Ločárek M, Cahlíková L. Chemical composition of bioactive alkaloid extracts from some *Narcissus* species and varieties and their biological activity. Nat Prod Commun, 2014; 9(8), 1934578X1400900823.
- [22] López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. Life Sci 2002; 71(21), 2521-2529.
- [23] Razik A, Adly F, Moussaid M, Berhal C, Moussaid H, Elamrani A, Lotfi M. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities of the extract of a Moroccan endemic *Narcissus*: *Narcissus broussonetii*. IJSRST 2016; Vol. 2 (1), p. 6-11.
- [24] Benedec D, Oniga I, Hanganu D, Gheldiu AM, Puşcaş C, Silaghi-Dumitrescu R, Vlase L. Sources for developing new medicinal products: biochemical investigations on alcoholic extracts obtained from aerial parts of some Romanian Amaryllidaceae species. BMC Complement Altern Med, 2018; 18(1), 226.
- [25] Korcan S.E, Bulduk İ, Kahraman T, Kayhan R, Çitekçi K, Kölemek H, Öztürk M. *Narcissus papyraceus* Soğanlarında Toplam Fenolik Bileşikler, Toplam Antioksidan Kapasite, Toplam Flavonoid Maddelerin ve Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi. Uşak Üniversitesi Fen ve Doğa Bilimleri Dergisi, 2018; 2(1), 10-17.
- [26] Cahlíková L, Benešová N, Macáková K, Kučerac R, Hrstka V, Klimeš J, Opletal L. Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. Nat Prod Commun, 2012; 7(5), 1934578X1200700506.
- [27] Cahlíková L, Ločárek M, Benešová N, Kučera R, Chlebek J, Novák Z, & Opletal L. Isolation and cholinesterase inhibitory activity of *Narcissus* extracts and Amaryllidaceae alkaloid. Nat Prod Commun, 2013; 8(6), 1934578X1300800625.