

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
BİY-DR-2008-0001**

**AYDIN YÖRESİNDE YETİŞEN BAZI ENDEMİK  
BİTKİLERDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN  
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Ali ÖZMEN**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK**

**AYDIN-2008**

**KABUL VE ONAY SAYFASI****T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE  
AYDIN**

Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Ali Özmen tarafından hazırlanan “Aydın Yöresinde Yetişen Bazı Endemik Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı tez 16 / 06 / 2008 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan:	.....	.....	.....
Üye :	.....	.....	.....
Üye :	.....	.....	.....
Üye :	.....	.....	.....
Üye :	.....	.....	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... sayılı kararıyla ...../...../2008 tarihinde onaylanmıştır.

Unvanı, Adı Soyadı  
Enstitü Müdürü

**İNTİHAL BEYAN SAYFASI**

**Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgün olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.**

Adı Soyadı : Ali ÖZMEN

İmza :

## ÖZET

Doktora Tezi

### AYDIN YÖRESİNDE YETİŞEN BAZI ENDEMİK BİTKİLERDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Ali ÖZMEN

Adnan Menderes Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

Bu araştırma Aydın yöresinde yetişen bazı endemik bitkilerden (*Crocus olivieri* ssp. *balansae*, *Scutellaria orientalis* ssp. *carica*, *Scrophularia floribunda* ve *Hypericum adenotrichum*) elde edilen ekstraktların sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla cins özellikleri göz önüne alınarak 4 farklı endemik bitki seçilmiştir. Seçilen bitkilerden farklı yöntemlerle (petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol) elde edilen ekstraktların farklı konsantrasyonları (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 4 mg/ml, 20 mg/ml ve 40 mg/ml) bir lösemi hücre hattı olan HL-60 hücrelerine uygulanarak ekstraktların sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca sitotoksik aktivite sonuçlarına göre etkili olan 3 adet bitkinin HL-60 hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri de Hoechst 33258/Propidium Iodide (HO/PI) boyama yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda seçilen bitkilerden özellikle *H. adenotrichum* bitkisinin hem sitotoksik aktivite hem de apoptotik etki bakımından ön plana çıktığı gözlenmiştir. Sitotoksik aktivite bakımından *S. orientalis* ssp. *carica* ve *S. floribunda*' da etkili olmuştur. Ancak bu iki bitki apoptotik ve nekrotik etki bakımından değerlendirildiğinde, *S. orientalis* ssp. *carica*' nın apoptotik etki bakımından, *S. floribunda*' dan daha etkili olduğu bulunmuştur. *S. floribunda* ise güçlü sitotoksik aktivite göstermesine rağmen, HL-60 hücreleri üzerinde yüksek oranda nekrotik etkiye yol açmıştır.

Çalışma kapsamında seçilen endemik bitkiler sitotoksik aktivite bakımından ilk kez bu tez kapsamında araştırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bitkisel kökenli bileşiklerin araştırılmasına ışık tutması açısından önem taşımaktadır. Daha ileri çalışmalarla bitkilerden elde edilen etkili ekstraktlar içerisindeki etken madde grupları veya bileşikler belirlenerek hücre içerisinde hangi mekanizmalarla ve hangi düzeylerde etkinlik gösterdikleri ortaya konmalıdır.

2008, 100 Sayfa

#### Anahtar Sözcükler

*Crocus olivieri* ssp. *balansae*, *Scutellaria orientalis* ssp. *carica*, *Scrophularia floribunda*, *Hypericum adenotrichum*, HL-60, Hücre Kültürü, Apoptozis, Nekrozis

**ABSTRACT**

Ph.D Thesis

**DETERMINING THE CYTOTOXIC ACTIVITIES OF EXTRACTS  
DERIVED FROM SOME ENDEMIC PLANTS THAT ARE GROWING IN  
AYDIN VICINITY**

Ali ÖZMEN

Adnan Menderes University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

This study has been carried out to determine the cytotoxic activities of the extracts derived from some endemic plants (*Crocus olivieri* ssp. *balansae*, *Scutellaria orientalis* ssp. *carica*, *Scrophularia floribunda* ve *Hypericum adenotrichum*) that are growing in Aydın vicinity. For this purpose 4 different endemic plants have been selected in consideration of genus properties. The cytotoxic activities of different concentrations (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 4 mg/ml, 20 mg/ml and 40 mg/ml) from various extract types (petroleum ether, ethyl acetate, dichloromethane and methanol) of selected plants has been tested against HL-60 leukaemia cell line. In addition the apoptotic and necrotic effects on HL-60 cells of 3 plants which were effective according to the cytotoxic activity results have been investigated with Hoechst 33258/Propidium Iodide (HO/PI) staining.

At the end of the study, it was examined that from the selected plants especially *H. adenotrichum* is coming on surface in both of cytotoxic activity and apoptotic effect. *S. orientalis* ssp. *carica* and *S. floribunda* has been found also cytotoxic. But, when this two plant have utilized in terms of apoptotic and necrotic effect, it was found that *S.orientalis* ssp. *carica* was more effective than *S. floribunda*, related to apoptotic effect. But *S. floribunda* showed a high ratio of necrotic effect on HL-60 cells in spite of its strong cytotoxic activity.

Selected endemic plants in the scope of the study were investigated for the first time in this Thesis in terms of their cytotoxic activity. The results of this study is important in lighting up the investigation for new plant sources that can be used in cancer therapy. Furthermore the act of mechanisms must be shown and the chemical groups or compounds must be determined in the derived effective extracts.

2008, 100 Pages

**Key Words**

*Crocus olivieri* ssp. *balansae*, *Scutellaria orientalis* ssp. *carica*, *Scrophularia floribunda*, *Hypericum adenotrichum*, HL-60, Cell Culture, Apoptosis, Necrosis

## ÖNSÖZ

Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde her zaman büyük desteğini gördüğüm ve çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren, bilgisini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK' e, Doktora Tez İzleme Komitem'de bulunan ve tez çalışmalarım sırasında benden değerli görüş ve önerilerini esirgemeyen Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Avni GÜVEN ve bölümümüz öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Celal ÜLGER' e değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerine başvurduğum Viyana Tıp Üniversitesi Patoloji Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Georg KRUIPTZA ve çalışma arkadaşlarına içtenlikle teşekkür ederim. Tez çalışması için bitkisel materyal temini konusunda bana çok yardımcı olan değerli çalışma arkadaşım Araş. Gör. Dr. Mesut KIRMACI ve bölümümüz öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Özkan EREN' e teşekkürü borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında karşılaştığım problemlerin çözümlerine katkıda bulunmaları nedeniyle de bölümümüz öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. H. Halil BIYIK ve Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN' e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülebilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, TÜBİTAK' a ve çalışma ortamı sağlaması bakımından da Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bana her zaman manevi yönden destek olan sevgili arkadaşım Gamze BAŞBÜLBÜL' e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim Aylin ÖZMEN' e ve hayatın anlamı olarak gördüğüm, neşe kaynağım olan değerli çocuklarım Yiğit ÖZMEN ve Kerem ÖZMEN' e sonsuz teşekkür ederim.

Ali ÖZMEN

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
I-GİRİŞ.....	1
II-KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
A-GENEL KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
B-CROCUS GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ.....	16
C-SCUTELLARIA GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ.....	17
D-SCROPHULARIA GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ.....	18
E-HYPERICUM GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ.....	19
III-MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
A-AYDIN İLİ SINIRLARINDA BULUNAN ENDEMİK BİTKİLER.....	21
1-Toplanan Taksonlara İlişkin Familya ve Cins Düzeyinde Bilgiler.....	22
a-Familya: Iridaceae (Süsengiller).....	22
b-Familya: Lamiaceae, Labiatae (Ballıbabagiller).....	23

<b>c-Familya: Scrophulariaceae (Sıracaotugiller, Aslanagzıgiller).....</b>	<b>24</b>
<b>d-Familya: Guttiferae, Clusiaceae, Hypericaceae (Binbirdelikotugiller).....</b>	<b>25</b>
<b>B-BİTKİLERİN TOPLANMASI, SAKLANMASI ve EKSTRAKSİYONU...</b>	<b>27</b>
<b>1-Bitkilerin Toplanması.....</b>	<b>27</b>
<b>2-Bitkisel Ekstraktların Elde Edilmesi.....</b>	<b>28</b>
<b>a-Kimyasallar.....</b>	<b>28</b>
<b>b-Bitkilerin Ekstraksiyonu ve Çözücülerin Uzaklaştırılması.....</b>	<b>28</b>
<b>c-Elde Edilen Ekstraktların Çözünmesi.....</b>	<b>30</b>
<b>C-SİTOTOKSİK DEĞERLENDİRME.....</b>	<b>32</b>
<b>1-HL-60 Hücreleri ile Denemeler.....</b>	<b>32</b>
<b>a-Hücrelerin ve Kültür Ortamlarının Temini.....</b>	<b>32</b>
<b>b-Hücrelerin Çoğaltılması ve Ekstrakt Uygulamaları.....</b>	<b>32</b>
<b>2-Hücre Sayımı.....</b>	<b>34</b>
<b>3-Bölünen Hücre Oranının Hesaplanması.....</b>	<b>35</b>
<b>D-APOPTOZİS VE NEKROZİS YÖNTEMİ.....</b>	<b>35</b>
<b>E-İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRME.....</b>	<b>37</b>
<b>IV-BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
<b>A-HL-60 HÜCRE HATTINDAN ELDE EDİLEN SİTOTOKSİK AKTİVİTE VERİLERİ.....</b>	<b>38</b>
<b>1-Crocus olivieri ssp. balansae Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri.....</b>	<b>38</b>



<b>2-<i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i> Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri.....</b>	<b>42</b>
<b>3-<i>Scrophularia floribunda</i> Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri.....</b>	<b>45</b>
<b>4-<i>Hypericum adenotrichum</i> Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri.....</b>	<b>48</b>
<b>B- HOECHST 33258 / PROPIDIUM IODIDE (HOPI) BOYAMA SONUCUNDA ELDE EDİLEN APOPTOTİK VE NEKROTİK ETKİ VERİLERİ.....</b>	<b>51</b>
<b>1-<i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i> Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Apoptotik ve Nekrotik Etkiler.....</b>	<b>51</b>
<b>2- <i>Scrophularia floribunda</i> Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Apoptotik ve Nekrotik Etkiler.....</b>	<b>53</b>
<b>3- <i>Hypericum adenotrichum</i> Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Apoptotik ve Nekrotik Etkiler.....</b>	<b>55</b>
<b>V-TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>72</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>81</b>

**SİMGELER DİZİNİ**

A-204	Kas dokusu kanseri hücre hattı (İnsan)
A-459	Akciğer kanseri hücre hattı (İnsan)
A-549	Akciğer kanseri hücre hattı (İnsan)
ATCC	American Type Culture Collection
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	B-cell lenfoma 2
CAL-27	Human Tongue Carcinoma Squamous Cell Line
CDC	Hücre döngüsü (Cell Division Cycle)
CDK	Sikline bağlı kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
CHO	Ovaryumu hücre hattı (Hamster)
<i>c-myc</i>	Hücreyel protonkogen (Myc: myelocytomatosis)
CORL23	Akciğer kanseri hücre hattı (İnsan)
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAPI	Floresan boya (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DLD-1	Kolon kanseri hücre hattı (İnsan)
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EN	Endangered (Tehlikede)
FCS	Fetal Calf Serum
H-460	Akciğer kanseri hücre hattı (İnsan)
HCT116	Kolon kanseri hücre hattı (İnsan)

HeLa	Serviks kanseri hücre hattı (İnsan)
HepG2	Karaciğer kanseri hücre hattı (İnsan)
HL-60	Lösemi hücre hattı (İnsan)
HONE-1	Epitelyal tümör hücre hattı (İnsan)
HO/PI	Hoechst 33258/Propidium Iodide
HT-29	Kolon kanseri hücre hattı (İnsan)
IC <sub>50</sub>	% 50 inhibisyon
I <sub>p</sub> C <sub>50</sub>	% 50 inhibisyona yol açan konsantrasyon
KATO-III	Mide kanseri hücre hattı (İnsan)
K-562	Lösemi hücre hattı (İnsan)
KB	Deri kanseri hücre hattı (İnsan)
LNCaP	Prostat kanseri hücre hattı (İnsan)
LR	Lower Risk (Az Tehdit Altında)
LS-174T	Kolon kanseri hücre hattı (İnsan)
MCF-5	Kanserli olmayan meme hücre hattı (İnsan)
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı (İnsan)
MDA-MB-231	Meme kanseri hücre hattı (İnsan)
MDA-MB-468	Meme kanseri hücre hattı (İnsan)
MT-450	Meme kanseri hücre hattı (Rat)
NBT-2	Mesane kanseri hücre hattı (İnsan)
NCEs	Yeni kimyasal yapılar (New Chemical Entities)

NCI-H460	Akciğer kanseri hücre hattı (İnsan)
RPMI 1640	Moore et. al tarafından geliştirilen hücre kültürü ortamı ( <b>Roswell Park Memorial Institute</b> )
<i>p53</i>	Tümör baskılayıcı gen
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PC-3	Prostat kanseri hücre hattı (İnsan)
PGE2	Prostaglandin E2
SF-268	Glioblastoma hücre hattı (İnsan)
T-24	Mesane kanseri hücre hattı (İnsan)
T-47D	Meme kanseri hücre hattı (İnsan)
TÜBİVES	Türkiye bitkileri veri servisi
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel Teknolojik Araştırma Kurumu
U937	Lösemi hücre hattı (İnsan)
VCR	Vinkristin
VDS	Vindesin
VFL	Vinflunin
VLB	Vinblastin
VRLB	Vinorelbin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Toplanan bitkiler, toplanma tarihleri ve lokaliteleri.....	27
Çizelge 3.2 Kullanılan bitkilerin yaş ve kuru ağırlıkları.....	28
Çizelge 3.3 Elde edilen ekstrakt miktarları.....	31
Çizelge 3.4 Uygulama grupları ve uygulanan ekstrakt miktarları.....	34
Çizelge 3.5 Apoptozis için seçilen bitkiler, ekstraktlar ve konsantrasyonları.....	36
Çizelge 4.1 Kontrol ve <i>Crocus olivieri</i> ssp. <i>balansae</i> bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri.....	39
Çizelge 4.2 Kontrol ve <i>Scutellaria orientalis</i> ssp <i>carica</i> bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri.....	42
Çizelge 4.3 Kontrol ve <i>Scrophularia floribunda</i> bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri.....	45
Çizelge 4.4 Kontrol ve <i>Hypericum adenotrichum</i> bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri.....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 a. Normal hücre.....	9
Şekil 1.1 b. Erken apoptotik hücre.....	9
Şekil 1.2 Nekrotik hücre.....	10
Şekil 1.3 Geç apoptotik hücre.....	10
Şekil 3.1 <i>Crocus olivieri</i> Gay subsp. <i>balansae</i> (Gay ex Baker) Mathew.....	22
Şekil 3.2 <i>Scutellaria orientalis</i> L. subsp. <i>carica</i> Edmondson.....	24
Şekil 3.3 <i>Scrophularia floribunda</i> Boiss. & Bal.....	25
Şekil 3.4 <i>Hypericum adenotrichum</i> Spach.....	26
Şekil 3.5 HO/PI Boyama: normal hücre (a), erken apoptotik (b), geç apoptotik (c) ve nekrotik hücre (d) ayrımı.....	37
Şekil 4.1 a. <i>Crocus olivieri</i> ssp. <i>balansae</i> bitkisine ait petrol eteri (a) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	39
Şekil 4.1 b,c. <i>Crocus olivieri</i> ssp. <i>balansae</i> bitkisine ait etil asetat (b) ve diklormetan (c) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	40
Şekil 4.1 d. <i>Crocus olivieri</i> ssp. <i>balansae</i> bitkisine ait metanol (d) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	41

Şekil 4.2 a,b. <i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i> bitkisine ait petrol eteri (a) ve etil asetat (b) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	43
Şekil 4.2 c,d. <i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i> bitkisine ait diklormetan (c) ve metanol (d) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	44
Şekil 4.3 a,b. <i>Scrophularia floribunda</i> bitkisine ait petrol eteri (a) ve etil asetat (b) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	46
Şekil 4.3 c,d. <i>Scrophularia floribunda</i> bitkisine ait diklormetan (c) ve metanol (d) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	47
Şekil 4.4 a,b. <i>Hypericum adenotrichum</i> bitkisine ait petrol eteri (a) ve etil asetat (b) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	49
Şekil 4.4 c,d. <i>Hypericum adenotrichum</i> bitkisine ait diklormetan (c) ve metanol (d) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri.....	50
Şekil 4.5 <i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i> bitkisine ait metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri.....	52
Şekil 4.6 a. <i>S.orientalis</i> ssp. <i>carica</i> metanol ekstraktının 4 mg/ml' lik konsantrasyonun 24 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....	53

- Şekil 4.6 b. *S.orientalis* ssp. *carica* metanol ekstraktının 4 mg/ml' lik konsantrasyonun 48 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....53
- Şekil 4.7 *Scrophularia floribunda* bitkisine ait metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri.....54
- Şekil 4.8 a. *S. floribunda* metanol ekstraktının 4 mg/ml' lik konsantrasyonun 24 saatlik süre sonucunda oluşturduğu nekrotik etkiler..... 55
- Şekil 4.8 b. *S. floribunda* metanol ekstraktının 4 mg/ml' lik konsantrasyonun 48 saatlik süre sonucunda oluşturduğu nekrotik etkiler..... 55
- Şekil 4.9 *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait petrol eteri ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri.....56
- Şekil 4.10 a. *H. adenotrichum* petrol eteri ekstraktının 4 mg/ml' lik konsantrasyonunun 24 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....57
- Şekil 4.10 b. *H. adenotrichum* petrol eteri ekstraktının 20 mg/ml' lik konsantrasyonunun 24 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....57
- Şekil 4.11 *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait etil asetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri.....58
- Şekil 4.12 a. *H. adenotrichum* etil asetat ekstraktının 20 mg/ml' lik konsantrasyonunun 24 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....59



- Şekil 4.12 b. *H. adenotrichum* etil asetat ekstraktının 20 mg/ml' lik konsantrasyonunun 48 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....59
- Şekil 4.13 *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait diklormetan ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri.....60
- Şekil 4.14 a. *H. adenotrichum* diklormetan ekstraktının 20 mg/ml' lik konsantrasyonunun 24 saatlik süre sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....61
- Şekil 4.14 b. *H. adenotrichum* diklormetan ekstraktının 20 mg/ml' lik konsantrasyonunun 48 saatlik süre sonunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler.....61

## I-GİRİŞ

İnsanların bitkileri tıbbi amaçlı olarak kullanmaları çok eski tarihlere dayanmaktadır. Bitkilerden binlerce yıldır ilaç olarak faydalanılmıştır. Bitkilerden 19. yüzyılın başlarında ilk elde edilen bileşik morfin olmuştur. Bitkilerden ilaç elde edilmesi morfine ilave olarak, kokain, kodein, digitoksin ve kuinin gibi halen kullanılmakta olan ilk ilaçların elde edilmesi ile sonuçlanmıştır (Balunas ve Kinghorn, 2005). Bu ilaçlar başlangıçta; tentür, çay, lapa, toz ve diğer bitkisel formülasyonlar şeklinde kullanılmışlardır. Zaman içerisinde tedavi amaçlı olarak spesifik bitkiler kullanılmaya başlanmıştır ve daha uygun uygulama yöntemleri keşfedilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) araştırmaları, dünya popülasyonunun %80'inin geleneksel tedavi yöntemlerini kullandığını ortaya koymuştur (Brian, 2002).

Graham *et al.* (2000)'a göre; Hartwell'in 1967 yılının sonlarında yayınlamaya başladığı makale serisinde ("insanların kansere karşı kullandıkları bitkiler") anti-kanser özelliği olduğu öne sürülen ve daha önce yayınlanmış ya da yayınlanmamış 3000'in üzerinde bitki türü yer almaktadır. Ayrıca NAPRALERT veritabanı (NAPRALERT: Chicago Illinois Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler ortak araştırma programı tarafından yürütülen bir veritabanı) kullanılarak Hartwell'in çalışmasında yer almayan ancak kansere karşı kullanılan 350'nin üzerindeki bitki de taranmıştır. Bu taramaya ait sonuçlar da Graham *et al.* (2000) tarafından yayınlanmıştır. Bu sonuçlar, kanser tedavisi için bitkilerden yeni bileşiklerin elde edilmesi ve kullanılabilir bitkilerin veritabanındaki mevcut bitkilerle karşılaştırılmasına imkân sağlaması açısından önem taşımaktadır. Günümüzde halen klinik açıdan kanser tedavisinde kullanılabilir çeşitli bitkiler ile bitkilerden çeşitli yöntemlerle elde edilen bitkisel ekstraktlarla ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Mikroorganizmalar, bitkiler ve deniz kökenli ürünler içerdikleri doğal maddeler nedeniyle anti-kanser ilaçlar geliştirmek için oldukça avantajlı kaynaklardır (Cheng *et al.*, 2005). Modern tıp tedavilerinin yanı sıra, kanserin tedavisi için alternatif tedavi amacı ile klinik açıdan araştırılmayı bekleyen çok sayıda bitki ve bitkisel

formülasyon bulunmaktadır. Tamamlayıcı kanser tedavisi açısından bu doğal kaynakların incelenerek yeni anti-kanser bileşiklerin belirlenmesi önemli ve gereklidir.

Bitkilerden elde edilen doğal maddelere “fitokimyasallar” denilmektedir. “Phyto” kelimesi latince kökenli olup “bitki” anlamına gelmektedir. Bu nedenle fitokimyasallara “bitki kimyasalları” da denilmektedir. Bitki kimyasalları; kronik birçok hastalığın riskini azaltan ve bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilebilen biyolojik olarak aktif bitki bileşikleri olarak tanımlanmaktadır. Bugüne kadar 5000’in üzerinde farklı bitki kimyasalının tanımlandığı tahmin edilmektedir. Ancak bitki kimyasallarının büyük bir çoğunluğu halen bilinmemekte ve yararları ile birlikte tanımlanmayı beklemektedir (Liu, 2004) ve yakın zamanlarda bitkilerin ilaç olarak kullanılabilmesi için içerdikleri aktif bileşiklerin saflaştırılması gerekmektedir.

Bitki kimyasalları farklı yönlerde etkilerde bulunarak anti-kanser veya anti-tümör aktivite gösterebilmektedirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasallardan özellikle alkaloidler ve fenolik bileşikler anti-kanser veya anti-tümör aktiviteye sahiptirler. Alkaloidler iğ ipliklerine etki ederek, kanserli hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemelerini engellerken, fenolik bileşikler ise daha çok hücre döngüsü kontrol proteinleri ve apoptozis mekanizmasının uyarılması üzerinde etki yaparlar. Soya fasulyesi ve Legümenlerde de bulunan isoflavonoidler, kanser hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olmakta ve aynı zamanda angienez olayını inhibe etmektedirler. Ayrıca endotelial büyüme faktörünü inhibe ederek tümör büyümesini engellemekte ve apoptozise yol açmaktadırlar (Pillai *et al.*, 2004). Karotenoidler de kanseri engelleyici etkileri bakımından ön plana çıkmaktadırlar.

Bitki kimyasallarının etki mekanizmaları, hücre kültürleri ve moleküler hedefler düzeyinde (reseptörler, reseptör proteinleri, matriks proteinleri, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri vb. gibi) araştırılabilmektedir. Özellikle sitotoksikite görüntüleme modelleri (kanseri hücre kültürleri gibi), anti-kanser ve sitotoksik özelliklere sahip olan bitkisel ekstraktların seçimi için başlangıç verilerini sağlamaktadırlar (Itharat *et al.*, 2004). Veri tabanları incelendiğinde bitkisel kökenli

maddelerin ve etki mekanizmalarının belirlenebilmesi için çok sayıda araştırmanın yapıldığını ve bu araştırmaların günümüzde halen devam etmekte olduğu görülmektedir.

Kanser günümüzde ciddi bir sağlık problemidir. Kanserın tanılanmasına, engellenme çabalarına ve tedavideki modern ilerlemelere rağmen bu hastalık dünya çapında milyonlarca insanı etkileyerek onların yaşam kalitelerini düşürmekte ve ölümlere neden olmaktadır. 1990 yılından bu yana dünyada en sık görülen ve ölüme en çok sebep olan akciğer, göğüs, kolon ve mide kanserlerinde %22 oranında artış olmuştur. 2000 yılında dünya çapında toplam 10 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilen yeni kanser vakalarının 6 milyondan fazlasının ölümlerle sonuçlandığı rapor edilmiştir (Balunas ve Kinghorn, 2005). Kanser, Amerika'da ölümlere yol açan ikinci etmendir. Verilere göre, her 4 ölümden birinin nedeni kanserdir. 2002 yılı boyunca 1.28 milyon kişinin kansere yakalandığı ve bunların içerisindeki ölüm oranının %38 olduğu rapor edilmiştir (Brian, 2002).

Kanser, Türkiye'de de 1998 yılında ölüme yol açan hastalıklar arasında ilk sırada bulunan (%38) kalp ve damar hastalıklarını takip ederek ikinci sıraya (%15) yerleşmiştir. Türkiye'de kanser nedeni ile görülen ölümler 1965'ten 1980'e kadar azalma eğiliminde iken; 1980–1990 yılları arasında sabit kalıp, 1990'dan itibaren yeniden artmaya başlamıştır. 1996, 1997 ve 1998 yıllarında erkeklerde ölüm oranı en yüksek kanser türleri sırasıyla bronş-akciğer, mide, prostat, lösemi, bağırsak ve gırtlak kanserleridir. 1996 ve 1997 yıllarında kadınlarda ölüm oranı en yüksek kanser türleri ise, bronş-akciğer, meme, mide, bağırsak, lösemi ve rahim kanserleridir. 1998 yılında ise 1997 yılına göre akciğer kanserinden ölüm sıklığı azalırken, meme kanserine bağlı ölümlerde artış olmuş ve 6. sırada yer alan rahim kanserinin yerini lenf ve kemik iliği kanserleri almıştır (<http://www.turkcancer.org>).

Kanserın populasyonu bu şekilde olumsuz yönde etkilemesinin yanı sıra yüksek tedavi maliyetleri ve hastaların yaşam kalitelerini yükseltme konusundaki çalışmalar da göz önüne alındığında yeni antikanser ilaçların araştırılması önem kazanmaktadır.

Bitkilerden antikanser ilaçların geliştirilmesi kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Son 50 yıl boyunca bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin ve türevlerinin kansere karşı etkinlikleri araştırılmıştır. 1940-2002 yılları arasında kullanılan mevcut kanser ilaçlarının %40'ı doğal ürünlerden veya türevlerinden elde edilmiştir. Günümüzde halen tedavide kullanılan ve bitkisel kökenli olan antikanser ajanlarını dört büyük sınıfta toplamak mümkündür:

Bunlar;

- 1- Vinka alkaloidleri
- 2- Epipodofillotoksinler
- 3- Taksanlar
- 4- Kamptotesinler'dir.

Vinka alkaloidlerinin tarihsel gelişimi iyi bilinmektedir. Vinka alkaloidlerinin kimyasal yapıları geniş bir şekilde araştırılmıştır. Bu alkaloidler Cezayir Menekşesi, *Catharanthus roseus* G. Don (*Vinca rosea* Linn.) bitkisinden elde edilmiştir. Vinka alkaloidlerinin indol ve droindol iskeletlerinde, velbanamin (katharantin) ve vindolin gibi diğer kompleks halkalara göre değişiklikler vardır (Bast *et al.*, 2000). Halk arasında Cezayir Menekşesi ekstraktları oral hipoglisemik özelliklerinden dolayı tıbbi olarak kullanıldığı için bu bitkiler iyi çalışılmıştır.

Araştırmacılar kısa zaman içerisinde bu ajanlarla ilgili çalışmalarını güçlendirmişlerdir ve vinkristin (VCR) ve vinblastini (VLB) izole ederek klinik tedavide kullanıma sunmuşlardır (Bast *et al.*, 2000). Vinka alkaloidleri VCR, VLB ve bunların alt türevleri vinorelbin (VRLB), vindesin (VDS), vinzoldin ve vinflunin (VFL)'in temel yapıları bilinmektedir. VCR ile VLB arasındaki tek fark formil veya metil grubunun varlığıdır. Tübüline bağlanma mekanizmasını değiştirmeyen yapılarındaki bu farklılıklar, antitümoral aktivitedeki etkinlik ve klinik toksisite bakımından göz önünde bulundurulması gereken özelliklerdir (Bast *et al.*, 2000).

Vinka alkaloidleri ve bunların vinflunin ve vinorelbin gibi bazı türevleri tübüline bağlanmak suretiyle tübülün polimerizasyonunu baskılayarak, mitoz bölünmeyi metafaz aşamasında durdurmaktadır (Okouneva *et al.*, 2003). *C. roseus*'dan izole

edilen vinblastin ve vinkristin 40 yılı aşkın bir süredir kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Podofillotoksin *Podophyllum peltatum* bitkisinin reçinesinden izole edilmiştir ancak farelerde test edildiğinde çok toksik olması nedeniyle, türevleri yapılmıştır. Podofillotoksin'in klinik amaçlı olarak kullanılan ve onaylanmış ilk türevi de etoposid'tir. Epipodofillotoksin tubuline bağlanarak polimerizasyonunu engeller; ayrıca DNA topoizomera II'yi geri dönüşümü olmayacak şekilde inhibe ederek hücre döngüsünün G2 evresinde kırık zincirlere sahip DNA'ların oluşmasına yol açmaktadır (Gordaliza *et al.*, 2004).

*Taxus brevifolia*'dan saf olarak izole edilen Paklitaksel ve türevlerini içeren taksanlar tübülün depolimerizasyona neden olmadan veya tubulin birikimini engellemeden, tubuline bağlanarak onları sabitlemekte ve mikrotübül etkinliğini azaltmaktadırlar (Xiao *et al.*, 2006).

Kamptotesin, *Camptotheca acuminata*'dan saflaştırılmıştır. Kamptotesin'e olan ilgi, DNA'nın kopup tekrar yapıştırılmasında gerekli olan topoizomera I'i seçici olarak inhibe ettiği ortaya konunca artmıştır. Taksanlar ve kamptotesinler birlikte dünyadaki antikanser pazar payı içerisinde 2002 yılında yaklaşık üçte birlik payları (2,75 milyar dolar) ile önemli bir yer bulmuşlardır (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Kanserin tedavisi amacı ile kullanılan antikanser ajanları içeren bu 4 madde sınıfı içerisinde klinik açıdan bazıları halen kullanılmakta olan çeşitli sayıda türevleri de sentezlenmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm bu doğal ürünler kendilerine özgü etki mekanizmaları ile çok önemli biyolojik keşiflerin yapılmasına yol açmışlardır (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Doğal ürünler yeni kimyasal yapılar (New Chemical Entities-NCEs) olarak endüstriyel açıdan önemli bir role sahiptirler. 1981–2002 yılları arasındaki mevcut tanımlanmış NCE'lerin yaklaşık %28'i doğal ürün veya türevidir. Diğer %20'lik kısmı ise doğal ürün taklidi (doğal ürün çalışılarak, elde edilen sentetik ürünler) olan ürünlerdir (Balunas ve Kinghorn, 2005). Doğal ürünler halen eczacılık açısından

büyük bir öneme sahiptir. 1983 ve 1994 yılları arasında onaylanmış yeni ilaçların %41'inin kaynağı, doğal ürünlerdir. Sadece antimikrobiyal ve antikanser özellik açısından incelendiğinde, bu oran daha da yükselmektedir. Her ikisi için de kullanılan doğal ürün kaynağı oranı %60'ları geçmektedir (Brian, 2002). 2001–2002 yılları arasında dünyada satılan ilaçların yaklaşık dörtte biri, doğal ürün veya doğal ürün türevidir (Balunas ve Kinghorn, 2005).

Tıbbi bitkilerin araştırılması sonucunda yeni kimyasal yapılar belirlenemese bile, bilinen maddelerin yeni biyolojik aktivitelerinin bulunmasının önemli yeni ilaçların gelişimini sağlayabileceği düşünülmektedir. İnsan genomu dizisinin çıkarıldığı 1990-2003 yıllarından bu yana değişik hastalıklar için, binlerce yeni moleküler hedef tanımlanmıştır. Bu hedeflere yönelik uygulanan yöntemler ile bilinen tıbbi bitkilere ait maddeler seçici aktivite gösterebilmektedirler. Geleneksel olarak tedavi amaçlı olarak kullanılan tıbbi bitkilerden elde edilen ve bilinen bazı maddelerin, yeni moleküler hedefler üzerinde de etkili oldukları gösterilmiştir. Örneğin İndirubinin seçici olarak sikline bağlı kinazları (cdk's) inhibe ettiği ve bilinen diğer başka bileşiklerin de bu yeni bulunan moleküler hedefler üzerinde etkili oldukları rapor edilmiştir (Balunas ve Kinghorn, 2005). Bu çalışmadan sonra bitkilerden daha önce izole edilmiş olan maddelere karşı olan ilgi de artmaya başlamıştır. Tıbbi bitkilerden farmakolojik olarak aktif bileşiklerin izolasyonu ve tanımlanması günümüzde de halen devam etmektedir (Brian, 2002, Balunas ve Kinghorn, 2005).

Yeni kanser ilaçlarının araştırılmasındaki hedef, özel etki mekanizmalarına sahip ilaçların bulunmasıdır. Bu anlamda hedef; hedef olmayan hücrelere çok az veya hiç zarar vermeden doğrudan doğruya kanser hücreleridir. Kanserli hücrelerin ve normal hücrelerin temelde birbirine benzer özellikler taşıyan hücreler olması nedeni ile genel sitotoksitenin azaltılması çok basit bir durum değildir.

Hücresel düzeyde kanser gelişimi nadir bir olaydır. Bir tümörün hücreleri genetik olarak araştırıldığında bunların tek bir hücreden geliştikleri görülmektedir. İnsan vücudu trilyonlarca hücre içermektedir ve bunların milyonlarcası bir günde hücre bölünmesi geçirmektedir. Çoğu zaman bu bölünen hücrelerin herhangi biri genetik kompozisyonunu değiştirme ve malignant (kötü huylu) tümör şeklinde gelişme

potansiyeline sahiptir. Çok sayıda hücrenin kansere dönüşmemesinin başlıca nedenlerinden biri malignant dönüşümün birden fazla genetik değişim gerektirmesidir. Bir malignant tümörün gelişimi, tek bir hücre hattında genetik değişimlerin ilerlemesi ile karakterize edilen çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç, hücrelerin vücudun normal düzenleme mekanizmalarına cevap vermemelerini ve normal dokuları istila etme eğilimlerini arttırmaktadır. Kanser hücreleri malignant özellik kazandıktan sonra kendilerini çok daha tehlikeli yapan ve yeni özellikler kazandıran mutasyonları biriktirmeye devam etmektedirler. Karsinogenesis (kansere gelişimi) sürecinde bulunan genler, genomun özel bir alt setini kapsamaktadır. Bu alt setin ürünleri hücre döngüsü boyunca ilerleme, komşu hücreler ile adhezyon, apoptozis ve DNA hasarı tamiri gibi aktiviteleri yerine getirmektedirler (Karp, 1999).

Normal fonksiyonu hücre bölünmesini teşvik etmek olan genler protoonkogenler olarak adlandırılmaktadırlar. Bu genler ifade edildiklerinde hücre bölünmesini teşvik etmektedirler. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için, bu genler veya bu genlerin ürünleri inaktifleştirilmiş olmalıdırlar. Eğer protoonkogenler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olmakta ve bu da tümör oluşumuna öncülük etmektedir. Protoonkogen mutasyonlarının bir sonucu olarak böyle bir durum oluştuğunda bu genlere artık onkogenler adı verilmektedir. Çünkü bu genler kanserle ilişkili olarak kontrolsüz hücre çoğalmasını uyarmaktadırlar. Bir diğer gen grubu da hücre döngüsü bölümlerinin birbirine geçişini baskılayarak ya da inaktive ederek hücre bölünmesini durdurmaktadır. Bunlara tümör baskılayıcı genler denilmektedir. Bu genler ya da onların ürünleri, hücre bölünmesi için ya inaktif olmalıdırlar ya da hücrede bulunmamalıdırlar. Eğer bu genler kalıcı olarak inaktive edilirlerse ya da mutasyonlarla ortadan kaldırılırlarsa, hücre bölünmesinin kontrolü kaybolmaktadır ve hücre kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaktadır (Öner, 2002).

Normal hücreler genelde çok iyi organize olmuş mikrotübül ağı, mikrofilamentler ve ara filamentlere sahip olmalarına rağmen kanser hücrelerinin hücre iskeleti genellikle küçülmektedir veya organizasyonu bozulmaktadır. Bazı kanser hücreleri tümörle ilişkili antijenler olarak adlandırılan yeni hücre yüzey proteinleri meydana getirebilmektedirler. Hücre yüzeylerindeki değişikliklerden dolayı kanser hücreleri diğer hücrelerden daha az yapışkan olmaktadır. Bu yapışkanlığın kaybı kanser



hücrelerinin bir tümör yığını oluşturmasına ve vücudun diğer kısımlarına gitmesine izin vermektedir (Karp, 1999).

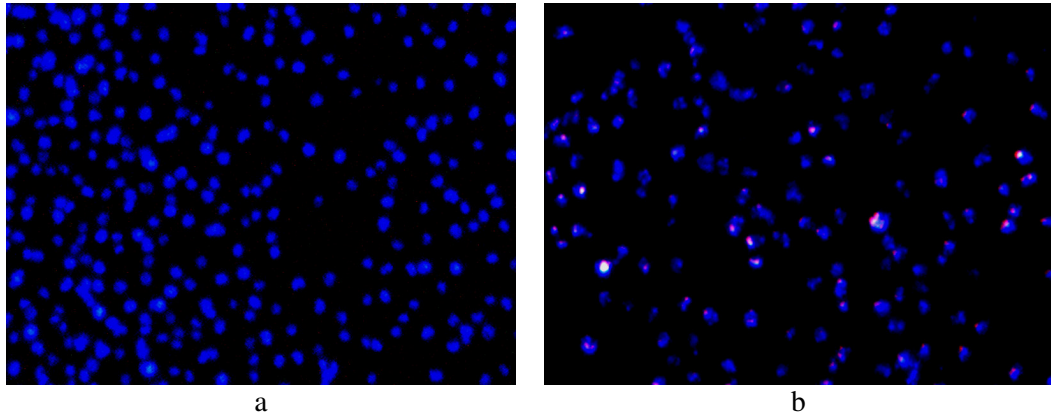
Kanser hücreleri normal hücrelerden kültürdeki hareketlilikleri ile de ayrılabilirler. Normal hücreler diğer hücrelerle tüm olarak sarıldıklarında hareketlilikleri bitmektedir. Biri diğerinin üzerine kaymamakta ve kültür kabının tabanında tek bir tabaka oluşturmaktadırlar. Buna karşın kanser hücreleri genellikle komşu hücrelerden gönderilen sinyalleri engelleyerek aktivitelerini sürdürmektedirler. Kanser hücreleri kendi normal benzerlerinden daha yüksek hücre yoğunluğuna ulaşmaya kadar hücre kültüründe büyümelerine devam etmektedirler (Karp, 1999).

Kültürde büyüyen kanser hücreleri epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin gibi büyüme faktörlerini sağlayan seruma çok az bağımlılık göstermektedirler. Kültürde büyüyen normal hücreler hücre bölünmesi için sınırlı bir kapasite göstermektedirler. Belirli sayıda mitotik bölünmeden sonra büyüme ve bölünmeyi imkânsız kılan bir yaşlanma sürecine girmektedirler. Kanser hücreleri ise sınırsız olarak bölünmeye devam etmelerinden dolayı ölümsüzdürler. Büyüme potansiyelindeki bu farklılık kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin varlığıyla ilişkilendirilmektedir (Karp, 1999).

Kanserleşmeyi karakterize eden kontrolsüz hücre bölünmesine genlerdeki kusurların yol açıyor olması nedeniyle genlerin hücre döngüsünü nasıl düzenlediği çok büyük merak konusu olmuştur. Günümüzde hücre döngüsünün kontrolü ile ilgili olarak birçok gene ait bilgi mevcuttur. Bu genlerin birçoğunun ürünü, cdc (cell division cycle) kinazlar adı verilen enzimlerdir. Söz konusu enzimler, diğer proteinlere fosfat eklemektedirler. Cdc kinazlar, ana kontrol molekülleri olarak hizmet görmekte ve siklin adı verilen proteinlerle birlikte çalışmaktadırlar. Bu kinazlar siklinleri fosforile ederek bunların hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki aktivitelerini etkilemektedirler. Dolayısıyla bu aktiviteler de hücre döngüsünü düzenlemektedir. Bir cdc kinaz, bir siklinle birlikte çalıştığında buna Cdk protein (Cyclin-dependent kinase protein=sikline bağlı kinaz protein) denilmektedir. İnsanlar da dâhil olmak

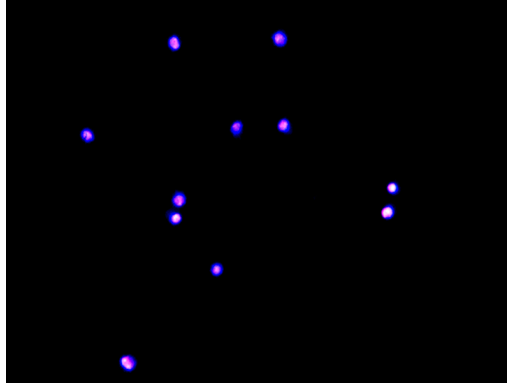
üzere bütün organizmalarda bulunan hücre döngüsü mutasyonları cdc mutasyonları olarak tanımlanmaktadır (Öner, 2002).

Programlı hücre ölümü olarak kabul edilen apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel veya çevresel uyarılarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Bir başka deyişle, hücrelerin, popülasyonun geri kalanının iyiliğini gerektirdiğinde kendilerinde var olan intihar programını devreye sokarak programlı bir şekilde, çevreye hiç zarar vermeden yaşamlarını sonlandırmalarına denilmektedir. Yunancada “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelen apoptozis, ilk kez biyomedikal literatürde 1972 yılında Kerr tarafından “mitozun karşıt anlamı” olarak kullanılmıştır.



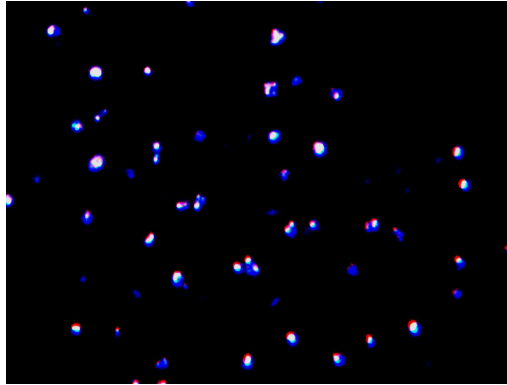
Şekil 1.1 a. Normal hücre b. Erken apoptotik hücre [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

Apoptozis, bugüne kadar bilinen tek tip hücre ölümü olan nekrozdan oldukça farklıdır. Nekrozda, akut hücre hasarını takiben hücre ve organellerinin şişip lizise uğradığı pasif ve patolojik bir hücre ölümü söz konusudur. Dış etki ile koruyucu mekanizmaların devreye girmesine fırsat vermeyecek şekilde gelişmektedir. Nekrozda zarar gören esas hedef organel, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondridir. Nekrozda hücrenin su alarak şişmesi ve patlaması sonucunda ortama hücre içeriğindeki moleküllerin çıkması, inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır.



Şekil 1.2 Nekrotik hücre [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

Apoptozis ise, nekrozdan farklı olarak aktif işlev gerektiren genetik kontrollü bir süreçtir. Apoptozis sırasında hücre büzülerek 1 saatten kısa bir sürede hacminin %30' nu kaybetmektedir. Mitokondri morfolojik olarak sağlamdır, ancak burada esas hasar alan organel, hücre çekirdeğidir. Nukleusta kromatin yoğunlaşmakta ve DNA parçalanmaktadır. Bu DNA parçaları hücre zarı ile kaplıdır (apoptotik cisimcikler) ve ortamdan çevredeki hücrelerin fagositoz etkinliği ile uzaklaştırılmaktadırlar. Apoptozis sırasında hücre içeriği ortama çıkmadığından inflamatuvar bir yanıt gelişmemektedir (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002).



Şekil 1.3 Geç apoptotik hücre [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

Programlanmış hücre ölümü, embriyogenezis, organ gelişimi, immünolojik reaksiyonlar ve farklılaşmış hücrelerin yaşam sürelerinin sonlanması gibi birçok fizyolojik olayda yer almaktadır. Ayrıca değişik hücre tiplerinde farklı çevresel uyarılar apoptozisi başlatabilmektedir. Apoptozis fetusta normal doku gelişiminin temel özelliğidir. Normal erişkin dokularında ise hücre büyümesi ve apoptozis bir

denge içerisinde. Evrim sürecinde, programlanmış hücre ölümünün korunmuş olan genlerle ve ortak bir yolla düzenlendiği belirlenmiştir. Apoptozis, aktif enerji gerektiren bir süreçtir. Apoptozis sırasında çeşitli genlerin kodladığı bazı proteinler hücre içinde aktif veya inaktif halde bulunmaktadır. Bugüne kadar saptanmış en az 30 protein ve bir o kadar da apoptoziste olası rolü olduğu düşünülen proteinler vardır. Apoptozis Bcl-2 grubu dimerize proteinler tarafından kontrol edilmektedir. *Bcl-2* geni, bir protoonkogendir. Bazı antiapoptotik (*bcl-2*, *bcl-xl*) ve proapoptotik (*bax*, *bad*) proteinler bu grupta yer almaktadır. Çalışmalarda “Bcl 2/Bax” oranı “ölüm anahtarı” (death switch) olarak değerlendirilmektedir. Apoptozisle ilgili diğer önemli bir protein de *p53* geni ile ilişkilidir. İnsan *p53* tümör baskılayıcı geninin sentezlettiği fosfoprotein, doğrudan DNA’ya bağlanabilmekte ve değişik hücrel veya viral proteinlerle ilişkiye girebilmektedir. *p53* geni, insan kanserlerinde mutasyonu en sık gösterilmiş genidir. Hücre bölünmesini azaltıcı önemli görevleri olan bu tümör baskılayıcı gen, DNA hasarı ile aktive olup apoptozisi başlatabilmektedir (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002).

Ölüm reseptörü (death receptor) olarak adlandırılan bir membran proteini olan Fas antijeni, apoptozisin diğer bir kilit noktasını oluşturmaktadır. Apoptozis sırasında hücre parçalanmasını sağlayan proteolitik enzim ailesine kaspazlar (Caspases) adı verilmektedir. Yapılarında sistein içeren bu enzimler tüm hücrelerde inaktif proenzim halinde bulunmaktadır (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002).

Kanser, AIDS, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarda apoptotik mekanizmada bozukluklar tespit edilmesi, apoptozisle ilgili yapılan çalışmaları hızla arttırmıştır. Araştırmalar bu hastalıkların oluşmasının engellenebilmesi ve apoptozisin tedavide kullanılabilmesi alanlarında yoğunlaşmaktadır (Öztürk, 2002).

## II-KAYNAK ÖZETLERİ

### A- GENEL KAYNAK ÖZETLERİ

*Withania somnifera* bitkisinin yaprağından elde edilen metanol ekstraktının hücre bölünmesini engelleyici etkisi HL-60 hücreleri ile araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre *W. somnifera*'dan elde edilen bitkisel ekstraktın etki mekanizmasının, zamana bağımlı bir biçimde Bcl-2/Bax (Bcl-2: Mitokondrinin dış zar geçirgenliğini yöneten gen ailesine verilen isimdir ve açık adı *B-cell lymphoma 2*'dir) dengesinin Bax'a [Bax (Bcl-2-associated X protein): *Bcl-2* gen ailesine ait bir gendir ve ürünü Bcl-2 ile ilişkili X proteindir] doğru düzenlenmesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bitkinin hem ham ekstraktının hem de aktif bileşeninin (witanolit) mitokondriden sitokrom c salınması aracılığıyla apoptozisi uyardığı, kaspaz 9, kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün aktive edildiği, böylece HL-60 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü sağladığı belirtilmiştir (Senthil *et al.*, 2007).

*Citrus sinensis*'den elde edilen 15 metoksiflavon ve türevlerinin HL-60 hücre hattında denendiği çalışmada 15 metoksiflavondan bazılarının orta düzeyde antikanser aktivite gösterdiği ve 2 tanesinin (5-hidroksi-6,7,8,3',4'-pentametoksiflavon ve 5-hidroksi-3,6,7,8,3',4'-heksametoksiflavon) HL-60 hücrelerinde hücre bölünmesini engellediği ve apoptozisin uyarılması bakımından kuvvetli etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Li *et al.*, 2007).

Çeşitli Tunus zeytin varyetelerinden elde edilen zeytin yapraklarının %70'lik etanolik ekstraktlarının antikanser aktivitesi HL-60 hücre hattında araştırılmıştır. Elde edilen ekstraktın doza bağımlı bir şekilde kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği rapor edilmiştir (Abaza *et al.*, 2007).

*Lactuca indica* L. Asya kıtasında halk arasında tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bu bitkinin etanol ekstraktının içeriğinin araştırıldığı çalışmada bitkinin %5 oranında kuersetin, kafeik asit, rutin ve klorojenik asit gibi fenolik

bileşikler içerdiği ve bu fenolik bileşikler içerisinde HL-60 hücrelerine karşı en etkili olanın ise kuersetin olduğu bulunmuştur (Chen *et al.*, 2007).

$\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) bir transkripsiyon faktörüdür. Yangı, hücre bölünmesi, apoptozis ve ökaryotlardaki savunma sisteminde önemli bir role sahiptir. Bu faktör kanser hücrelerinde bölünmeyi artırıcı ve apoptozisi engelleyici etkisi ile çeşitli kemoteraplere karşı dirençlilik sağlamaktadır. Çeşitli bitki kimyasallarının bu faktörü inhibe edici etkilerinin ortaya konduğu bir çalışmada elma ekstraktı ve curcuminin, MCF-7 meme kanseri hücre hattında bu transkripsiyon faktörünü inhibe ettikleri bulunmuştur (Yoon ve Liu, 2007).

*Ledum groenlandicum*'un (labrador çayı) yaprak ve sürgünlerinden elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan, antiinflamasyon ve antikanser etkileri araştırılmıştır. Sürgünlerden elde edilen ekstraktın DLD-1 kolon kanseri ve A459 akciğer kanseri hücrelerine karşı aktif olduğu ortaya konmuştur (Dufour *et al.*, 2007).

*Oplopanax horridus* bitkisi Alaska ve Kolombiya'da halk arasında çeşitli hastalıkların iyileştirilmesinde kullanılan tıbbi bir bitkidir. Bu bitkinin kurutulmuş kök kabuklarından elde edilen etanol ekstraktının %50 inhibisyon değerleri (IC<sub>50</sub>), K562 (lösemi), HL-60 (lösemi), MCF7 (meme kanseri) ve MDA-MB-468 (meme kanseri) hücre hatları kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra sitotoksik olmayan konsantrasyonlar (<IC<sub>50</sub>), kamptotesin ve paklitakselin sitotoksik olmayan konsantrasyonlarıyla (<IC<sub>50</sub>) birlikte denenmiştir. Test edilen 19 kombinasyondan 9'unun uygulandıkları hücre hatları üzerinde sinerjistik olarak etkili oldukları bulunmuştur (Tai *et al.*, 2006).

İnsanlar tarafından tüketilen *Rubus*, *Vaccinium* ve *Fragaria* cinslerine ait 6 adet böğürtlen tipi meyve içeriklerinin belirlendiği çalışmada bu meyvelerin başlıca fenolik bileşikler; antosiyaninleri, flavonoller, ellagitanninleri, gallotaninleri, proantosiyanidinleri ve fenolik asitleri içerdikleri belirlenmiştir. Bu fenolik bileşiklerin büyümeyi durdurucu etkileri insan oral (KB, CAL-27 hücre hatları), meme (MCF-7 hücre hattı), kolon (HT-29, HCT116 hücre hatları) ve prostat (LNCaP) tümörü hücre hatlarında çalışılmıştır. Çalışma sonunda böğürtlen

meyvelerinden elde edilen ekstraktların artan konsantrasyonlarının hücre hatlarının tamamını çeşitli seviyelerde inhibe ettikleri rapor edilmiştir (Seeram *et al.*, 2006).

3 adet böğürtlen bitkisinin (*Fragaria xananassa*, *Rubus ideus* ve *Vaccinium corymbosum*) yapraklarından elde edilen ekstraktların, HL-60 hücre hattına ve HL-60'ın iki adet ilaç dirençliliği gösteren alt hatlarına (HL-60/VINC, HL-60/DOX) karşı denendiği bir başka çalışmada ise; ekstraktların hem HL-60 hücre hattı hem de bunların ilaç dirençliliği gösteren alt hatları üzerinde çeşitli seviyelerde sitotoksik etki gösterdikleri ortaya konmuştur (Skupien *et al.*, 2006).

Malezya ve Tayland'da halk arasında kanser tedavisi için kullanılan 7 adet bitkiden elde edilen ekstraktların ve saflaştırılmış bileşiklerin sitotoksik etkileri COR L23 akciğer kanseri ve MCF7 meme kanseri hücre hatlarında, ayrıca MCF5 normal hücre hattı üzerinde araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan 7 adet bitkiden 5'i (*Alpinia galanga*, *Alpinia officinarum*, *Cayratia japonica*, *Physalis minima*, *Tabernaemontana divaricata*) hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite göstermiştir. (Lee ve Houghton, 2005).

*Aegiceras corniculatum* L. bitkisinin içeriğinde bulunan aktif bileşen embelinin, 1,4-benzokuinon türevlerinin HL-60 hücrelerinin çoğalmasını engellemekle birlikte apoptotik etki de gösterdikleri ortaya konmuştur (Xu *et al.*, 2005).

Güney Afrika'ya endemik olan ve kanser çalısı olarak bilinen *Sutherlandia frutescens* bitkisinin ekstraktlarının neoplastik hücreler (rahim kanseri hücreleri) ve CHO (Chinese Hamster Ovary) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada bitki ekstraktlarının kültür ortamındaki kanser hücrelerinde apoptozise yol açabileceği staurosporin ve seramit ile karşılaştırılarak ortaya konmuştur (Chinkwo, 2005).

Bangladeş'de halk arasında ilaç olarak kullanılan bitkilerin antikanser potansiyellerinin araştırıldığı çalışmada, 11 bitki incelenmiştir. Bu 11 bitkiden 3'ünün (*Oroxylum indicum*, *Moringa oleifera* ve *Aegles marmelos*) antikanser bileşiklerinin kaynağı olabileceği rapor edilmiştir (Lotufo *et al.*, 2005).

*Epiremnum pinnatum*'un hekzan ekstraktının T-47D meme tümörü hücrelerinde apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümüne yol açtığı bulunmuştur. Burada kullanılan ekstrakt *c-myc* mRNA'nın ekspresyonunu artırarak, programlanmış hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiş, ancak *c-myc* mRNA'nın buradaki rolü tam olarak açıklanamamıştır (Tan *et al.*, 2005).

*Vitex agnus-castus* (hayıt) meyve ekstraktının etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, meyve ekstraktının KATO III (mide kanseri) kanser hücrelerinde apoptozisi teşvik ettiği rapor edilmiştir (Ohyama *et al.*, 2005).

Çin'de geleneksel tedavide kullanılan *Buplerum scrozonrifolium*'un akciğer kanserinde hücre çoğalmasına karşı aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışma sonucunda bu bitkiden elde edilen aseton ekstraktının insan akciğer kanseri hücrelerinde, hücre çoğalmasını inhibe ederek apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir (Cheng *et al.*, 2005).

Kurkumin'in insan akciğer kanseri hücrelerinde apoptozisi uyardığı ve hücre döngüsünü durdurarak etkide bulunduğu ortaya konmuştur (Pillai, 2004).

Tayland'da geleneksel olarak kanser tedavisinde kullanılan tıbbi bitkilerden 11 adedinin sitotoksik aktivitesi akciğer kanseri hücre hattı (COR-L23), meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve kolon kanseri hücre hattı (LS-174T) olmak üzere 3 farklı insan kanseri hücre hattı üzerinde araştırılmıştır. Bu çalışmada araştırılan 11 adet bitki içerisinde 3 bitkinin (*Dioscorea membranaceae*, *Dioscorea birmanica* ve *Siphonodon celastrineus*) çok yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Itharat *et al.*, 2004).

Gastrointestinal ülserlerin tedavisi, kanser hastalıklarının tedavisi ve yara iyileştirmede kullanılmakta olan *Croton palonstigma* denilen bir kırmızı ağacın özsuynun mide-bağırsak kanserlerinde apoptozisi teşvik ettiği ortaya konmuştur. Bu kırmızı ağacın özsuynun insan kanser hücreleri üzerindeki etki mekanizması, mide ve kolon kanserlerinde belirlenmiştir. Bu özsuynun apoptozisi uyarıcı etkisi ile birlikte



mikrotübül hasarlarının da ortaya çıkmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Sandoval *et al.*, 2002).

Geleneksel Çin halk tedavisinde kivi (*Actinidia delicosa*) meyvesi ekstraktı da tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Kivi meyvesinin çeşitli ekstraktlarının insan oral tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Motohashi *et al.*, 2002).

Hindistan'ın çeşitli yerlerinde kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta olan *Barringtona racemosa* Roxb.'un tohum ekstraktının, farelerdeki toksisitesi ve antitümör özellikleri olduğu ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre bu bitki ekstraktının pozitif kontrol olarak kullanılan vinkristin'den daha etkili olduğu ortaya konmuştur (Thomas *et al.*, 2002).

Bir Türkiye endemiği olan *Salvia hypergeia* (Adaçayı) diterpenoidlerinin insan kanseri hücre hatları üzerindeki sitotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada ise; bitki ekstraktının denenen tüm hücre hatları üzerinde aktif olduğu rapor edilmiştir (Ulubelen ve ark., 1999).

## **B- CROCUS GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ**

Yunanistan endemiği olan üç adet Crocus türünün ( *C. boryi* ssp. *tournefortii*, *C. boryi* ssp. *boryi* and *C. niveus*) gövde ekstraktlarının MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerini doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir (Chryssanthi *et al.*, 2007).

*C. sativus*'un ekstraktının 50-400 µg/ml aralığındaki farklı konsantrasyonlarının insan malignan kanser hücre hatlarının (HeLa-serviks kanseri, A-204-kas dokusu tümörü, HepG2-karaciğer kanseri) büyümelerini doza bağımlı bir şekilde engellediği rapor edilmiştir (Abdullaev *et al.*, 2003).

Safran (*C. sativus*) kormları insan kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösteren bir proteoglikan (yapısal olarak arabinogalaktan proteinlere benzemektedir)

içermektedir. Bu proteoglikanın 7-20µg/ml'lik uygulama aralığı hücrelerin %50'sinin büyümesini inhibe etmiştir (Escribano *et al.*, 1999 a).

Yine safran (*C. sativus*) kormlarından malignant hücelere (HeLa, serviks kanseri) karşı sitotoksik etkiye sahip olan yeni bir glikokonjugat (%36.4 ramnoz içermektedir) izole edilmiştir. Uygulanan ham korm ekstraktı 100 µg/ml düzeyinde hücrelerin %50'sini inhibe ederken izole edilen bu glikokonjugat 9 µg/ml düzeyinde hücrelerin % 50'sini inhibe etmiştir (Escribano *et al.*, 1999 b).

### **C- SCUTELLARIA GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ**

*Scutellaria baicalensis* Çin'de tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bitkinin antitümör aktivitesi incelenmiş ve çeşitli hücre hatlarını (akut lösemi, lenfoma ve miyeloma hücre hatları) inhibe ettiği bulunmuştur. Hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozis şeklinde etki göstermektedir. Bölünmeyi engelleyici etkisi; mitokondriyal hasar, *Bcl* gen ailesinin düzenlenmesi, CDK inhibitörü olan p27'nin seviyesinin artışı ve *c-myc* onkogeninin seviyesinin azaltılması ile ilişkilidir. Bu bitkinin en etkili antikanser bileşeninin %21 ile baikalin olduğu bulunmuştur (Kumagai *et al.*, 2007).

*Scutellaria baicalensis* iki adet prostat kanseri hücre hattına (LNCaP ve PC-3) karşı denenmiş ve siklooksijenaz-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2) ve siklinler ile sikline bağlı kinazların metabolik yolları üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu bitkinin prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni bir antikanser ajan olabileceği bildirilmiştir (Ye *et al.*, 2007).

*Scutellaria barbata*'nın HL-60 hücre hattında siklinler ve sikline bağlı kinazlar düzeyinde etkili olduğu ve apoptozise yol açtığı belirlenmiştir (Kim *et al.*, 2007).

*Scutellaria barbata*'dan elde edilen 5 yeni diterpenoid alkaloidin (scutebarbatine G, 6,7-di-O-nicotinoylscutebarbatine G, 6-O-nicotinoyl-7-O-acetylscutebarbatine G, scutebarbatine H ve 7-O-nicotinoylscutebarbatine H) üç adet insan kanser hücre hattı

(HONE-1, KB, HT29) üzerinde bölünmeyi inhibe edici etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Dai *et al.*, 2007).

*Scutellaria barbata*'dan izole edilen neo-klerodan diterpenoidler de HONE-1 (epitelyal tümör), KB (deri kanseri) ve HT29 (kolon kanseri) kanser hücre hatları üzerinde önemli sitotoksik aktiviteler göstermişlerdir (Dai *et al.*, 2006).

*Scutellaria barbata*'nın insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) ve ovaryum kanseri hücre hattında apoptozise neden olduğu ve hücrede toksik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Powell *et al.*, 2003, Yin *et al.*, 2004).

Çin geleneksel tedavisinde kullanılan ve flavonoid içeriği bakımından zengin olan iki adet *Scutellaria* türünden (*S. baicalensis* ve *S. rivularis*) elde edilen 17 flavanoidden baikalein, viskidulin, wogonin ve skutellarein gibi 10 tanesinin HL-60 hücre hattının büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Sonoda *et al.*, 2004).

## **D- SCROPHULARIA GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ**

*Scrophularia ningpoensis* Hemsl. türünün köklerinden elde edilen oleanonik asit ve ursolonik asitin, MCF7 (meme kanseri), K562 (lösemi) ve A549 (akciğer kanseri) gibi insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik olduğu bulunmuştur (Nguyen *et al.*, 2005).

*Scrophularia* türleri çok uzun zamandır halk arasında tümörlerin ve yangı'nın (inflamasyon) tedavisinde kullanılmaktadır. Bu türlerden iridoid ve fenilpropanoid gibi bu tarz etkili maddeler izole edilmiştir (Galindez *et al.*, 2002).

## **E- *HYPERICUM* GENUSUNA AİT KAYNAK ÖZETLERİ**

*Hypericum* türlerinden elde edilen hiperforinin, matriks metalloproteinazların aktivasyonunu önleyerek tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını önlediği rapor edilmiştir (Dell'Aica *et al.*, 2007).

*Hypericum perforatum*'un T24 ve NBT-II mesane kanseri hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Skalkos *et al.*, 2005).

Güney Brezilya'da yetişen 6 *Hypericum* türünün (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* ve *H. ternum*) antikanser aktivitesi HT-29 kolon kanseri ve H-460 akciğer kanseri hücre hatlarında çalışılmıştır ve bunlardan 3 adedinin (*H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* ve *H. ternum*) hekzan ekstraktlarının etkili olduğu bulunmuştur (Ferraz *et al.*, 2005).

Ratlarla yapılan bir çalışmada, öncelikle ratlara tümör oluşturma özelliğine sahip MT-450 meme kanseri hücreleri enjekte edilmiştir. Daha sonra hiperforin enjeksiyon yoluyla verilmiştir ve bu maddenin tümör büyümesini inhibe ettiği, tümör hücrelerini apoptozise yönlendirdiği ve damarlanmayı önlediği bulunmuştur (Schempp *et al.*, 2005).

*Hypericum hookerianum*'dan elde edilen bileşikler üç insan kanser hücre hattı; MCF-7 (meme kanser), NCI-H460 (akciğer kanseri) ve SF-268 (glioblastoma) üzerinde araştırılmıştır. İki adet bileşik (4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate ve 3 $\beta$ -O-caffeoylbetulinic acid) tüm hücre hatlarında etkili bulunmuştur (Wilairat *et al.*, 2005).

Hiperforin ile birlikte hiperisinin sinerjistik etkisi K562 ve U937 lösemi hücre hatlarında araştırılmıştır. Apototik etki doza bağlı bir şekilde izlenmiştir. Bunun dışında hiperforin; U937 hücre hattında kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün; K562 hücre hattında ise kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün aktivitelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Hostanska *et al.*, 2003).

*H. perforatum*'dan elde edilen hiperisinin ışığa duyarlı olması özelliğinden dolayı fotodinamik terapi kapsamında kanser hücreleri ile savaşta kullanılabileceği bildirilmiştir (Schempp *et al.*, 2001, Agostinis *et al.*, 2002).

İlgili çalışmalardan da izleneceği gibi bitkisel kökenli maddelerin anti-kanser özelliklerinin araştırılması, günümüzde halen devam etmekte olan önemli bir konudur. Kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bitkisel kökenli bileşiklerin elde edilmesi güncel bir yaklaşım olup insanların yaşam kalitelerini desteklemek açısından önem taşımaktadır.

Tez çalışmamız kapsamında sadece endemik bitkiler kullanılmıştır. Endemik bitkilerin yayılış alanlarının sınırlı olması ve sadece belirli çevresel koşullar altında yetişebiliyor olmaları nedeniyle fizyolojilerinin farklı olabileceği düşünülmüştür. Bu koşullar altında endemik bitkilerin sentezleyecekleri metabolitlerin de, aynı genusta yer alan diğer taksonlardan farklı olabileceği göz önünde bulundurularak bu bitkiler tez kapsamında araştırılmıştır. Aydın ilinde 23 familyaya dağılmış olan toplam 64 endemik bitki taksonundan birçoğunun familyalarının genel özelliklerine bakıldığında, sitotoksik aktivite gösterebilecek bileşikler içerebilecekleri düşünülmüştür. Ancak yapılan literatür taramaları neticesinde bu bitkilerin antikanser özellik veya sitotoksik aktivite bakımından ele alınıp araştırılmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Kanser ile mücadelede yeni tedavi edici yaklaşımların gerekliliği göz önüne alındığında bu endemik bitkilerin sitotoksik etkinliklerinin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu nedenle bu tez çalışmasında, Aydın yöresinden sitotoksik aktivite gösterebileceği düşünülen ve toplanabilirliği de göz önünde bulundurulmuş 4 ayrı endemik bitki türü seçilmiştir. Seçilen bu 4 ayrı endemik bitki türünün tüm kısımları kullanılarak (tüm bitki) elde edilen 4 farklı ekstrakt tipinin (petrol eteri, diklormetan, etil asetat ve metanol) HL-60 lösemi hücre hattı üzerindeki sitotoksik (bölünmeyi engelleyici) aktiviteleri ile apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

### **III-MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **A-AYDIN İLİ SINIRLARINDA BULUNAN ENDEMİK BİTKİLER**

Ülkemiz zengin bir biyolojik çeşitliliğe sahiptir. Tüm Avrupa kıtasında 12.000 bitki türü bulunmasına karşın, ülkemizde tür ve tür altı kategorilerde bulunan takson sayısı 11.500'ü aşmıştır. Bunların içerisindeki endemik tür sayısı ise, 3000'e yakındır. Bitki türlerinin %33'ü endemik olan Türkiye bu konuda önde gelen ülkelerden biridir. Bunların dışında sadece Türkiye endemiği olan 10 cins bulunmaktadır. Endemizim oranının oldukça yüksek olduğu Türkiye florası, tıbbi ve aromatik bitkiler açısından da oldukça zengindir (T.C. Çevre Ve Orman Bakanlığı "Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri" Kitapçığı - 2005, Ankara).

Aydın ili sınırları içerisinde yayılış gösteren endemik bitkiler, Türkiye Bitkileri Veri Servisi (TÜBİVES-TÜBİTAK) taranarak belirlenmiştir. Buna göre Aydın'da 23 Familya'ya dağılmış olarak toplam 64 endemik bitki taksonu bulunmaktadır. Bu bitkilerin Familya ve Cins özellikleri incelenmiştir:

Aydın İli Sınırlarında Bulunan Endemik Bitkiler:

Familya	:23
Cins	:48
Tür	:64

## 1-Toplanan Taksonlara İlişkin Familya ve Cins Düzeyinde Bilgiler

### a-Familya: Iridaceae (Süsengiller)

Rizomları parfüm sanayisinde kullanılan türleri vardır (Zeybek N. ve Zeybek U., 1994-İZMİR ve Baytop, 1999- İSTANBUL).

Genus: *Crocus* L. (Safran)

Ülkemiz *Crocus* türleri bakımından oldukça zengindir. *C. sativus* (Safran) en iyi bilinendir. Safranda renk maddeleri krosin ve krosetin ile birlikte bunlara yakın karotin, likopin ve zeaksantin pigmentleri de bulunmaktadır. Sinir sistemi uyarıcı, iştah açıcı, adet söktürücü, koku ve renk verici olarak kullanılmaktadır (Zeybek N. ve Zeybek U., 1994-İZMİR ve Baytop, 1999- İSTANBUL). Literatüre bakıldığında çeşitli *Crocus* türlerinin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir (Nair *et al.*, 1991, Escribano *et al.*,1996, Escribano *et al.*,1999 a ve b, Abdullaev *et al.*, 2003, Chryssanthi *et al.*, 2007,)

Takson: *Crocus olivieri* Gay subsp. *balansae* (Gay ex Baker) Mathew



Şekil 3.1 *Crocus olivieri* Gay subsp. *balansae* (Gay ex Baker) Mathew  
(Foto: Ali ÖZMEN-2007)

Dolayısı ile üzerinde çalışılmayan ve endemik bir tür olan *Crocus olivieri* ssp. *balansae* antikanser aktivite bakımından etkili bileşikler içerebileceği düşüncesi ile tez çalışması kapsamına alınmıştır (Şekil 3.1).

### **b-Familya: Lamiaceae, Labiatae (Ballıbabagiller)**

Familya üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı farmakolojide ve parfümeri sanayisinde önemli yer tutmaktadırlar. Eterik yağ elde edilmekte, baharat olarak kullanılmakta ve süs bitkisi olarak yetiştirilmektedirler (Zeybek N. ve Zeybek U., 1994-İZMİR ve Baytop, 1999- İSTANBUL). Lamiaceae familyasına ait bitkiler ile yapılan kimyasal analizler sonucunda bu bitkilerin eterik yağlar, acı maddeler, polifenoller, tanenler ve diğer başka bazı maddeler içerdikleri belirlenmiştir (Zeybek N. ve Zeybek U., 1994-İZMİR).

Salgıladıkları uçucu yağlar eczacılık, parfümeri ve kozmetik sanayisinde kullanılmaktadır. Bu yağlarda monoterpenler, sesquiterpenler, fenilpropan türevleri bulunmaktadır. Familya üyelerinde acı maddelere de sık rastlanmaktadır. Bunlar *Salvia* türlerinin salgı pullarında biriken andorn veya karnosol (pikrosalvin)'dur. Bunların dışında flavonoidler ve iridoid türü maddeler Labiatae tanenleri olarak isimlendirilmektedir. Bu maddelere familyanın üyelerinin çoğunda rastlanmaktadır. Bu maddeler kahve asiti, rosmarin asit ve kahve asiti esterinin türevleridir. Familyanın bazı üyelerinde silisyum asiti ve nitratlar depo edilmektedir. Bu özelliği nedeniyle eski yıllarda *Herba galopsidis* – silisyum asit drogu olarak kullanılmıştır. Bazı bitkilerin tohumlarında ve toprak altı organlarında Plantaginaceae'de olduğu gibi trisakkaritler ve tetrasakkaritler de bulunmaktadır (Baytop, 1999- İSTANBUL).

Genus: *Scutellaria* L. (Kaside)

Ülkemizde de *S. orientalis* kabız ve kan kesici, yara iyi edici ve kuvvet verici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999- İSTANBUL). Literatüre bakıldığında aynı genusa ait *S. baicalensis*, *S. barbata* ve *S. rivularis* gibi türlerin kanser hücreleri üzerinde çeşitli düzeylerde etkilere sahip oldukları görülmektedir (Powell *et al.*, 2003, Sonoda



*et al.*, 2004, Yin *et al.*, 2004, Dai *et al.*, 2006, Dai *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2007, Kumagai *et al.*, 2007, Ye *et al.*, 2007,).

Takson: *Scutellaria orientalis* L. subsp. *carica* Edmondson



Şekil 3.2 *Scutellaria orientalis* L. subsp. *carica* Edmondson (Foto: Ali ÖZMEN-2007)

Dolayısı ile üzerinde çalışılmayan ve endemik bir tür olan *Scutellaria orientalis* ssp. *carica* da antikanser aktivite bakımından etkili bileşikler içerebileceği düşüncesi ile tez çalışması kapsamına alınmıştır (Şekil 3.2).

### **c-Familya: Scrophulariaceae (Sıracaotugiller, Aslanagzıgiller)**

Familya üyelerinden, kalp ilaçları yapımında kullanılan hammadde elde edilmektedir. *Digitalis* türlerinde kardiyotonik glikozitler bulunmaktadır. Bu glikozitler kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Verbascum* türlerinde triterpenoid yapıda saponinler bulunmaktadır. Çiçeklerinden ekspektoran preparatlar yapılmaktadır (Zeybek N. ve Zeybek U., 1994-İZMİR ve Baytop, 1999-İSTANBUL).

Genus: *Scrophularia* L. (Sıraca otu)

*S. nodosa* L. idrar arttırıcı, yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999-İSTANBUL). *S. libanotica*, *S. striata* ve *S. umbrosa* 'nın dekoksasyonları Türkiye'de

de halk arasında derideki bezeler için kullanılmaktadır (Sezik ve ark., 2001). Ayrıca *Scrophularia* türlerinin kanser hücre hatları üzerinde etkili olduklarını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Galindez *et al.*, 2002, Nguyen *et al.*, 2005).

Takson: *Scrophularia floribunda* Boiss. & Bal.



Sekil 3.3 *Scrophularia floribunda* Boiss. & Bal. (Foto: Ali ÖZMEN-2007)

Dolayısıyla ile üzerinde çalışılmayan ve endemik bir tür olan *Scrophularia floribunda* da antikanser aktivite bakımından etkili bileşikler içerebileceği düşüncesi ile tez çalışması kapsamına alınmıştır (Şekil 3.3).

**d-Familya: Guttiferae, Clusiaceae, Hypericaceae (Binbirdelikotugiller)**

İlaç, zambak ve parfümeri sanayisinde kullanılmaktadır. Organlarında ve özellikle yaprakları ile çiçeklerinde balsam ve eterik yağ salgılayan şizogenik salgı ceplerinin bulunuşu önemli anatomik özelliklerdendir (Zeybek N. ve Zeybek U., 1994-İZMİR ve Baytop, 1999- İSTANBUL).

Genus: *Hypericum* L. (Binbirdelik otu, kantaron, yara otu)

*H. perforatum* L. dâhilen antispazmotik, kabız, yatıştırıcı ve kurt düşürücü, haricen ise antiseptik ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır. Bilhassa yanık yaralarının tedavisinde çok etkilidir. Çıbanların iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır (Baytop,

1999- İSTANBUL). Literatüre bakıldığında *Hypericum* türlerinin antikanser etkisi belirgin bir şekilde görülmektedir (Schempp *et al.*, 2001, Agostinis *et al.*, 2002, Hostanska *et al.*, 2003, Martarelli *et al.*, 2004, Ferraz *et al.*, 2005, Poveda *et al.*, 2005, Schempp *et al.*, 2005, Skalkos *et al.*, 2005, Wilairat *et al.*, 2005, Dell'Aica *et al.*, 2007).

Takson: *Hypericum adenotrichum* Spach.



Şekil 3.4 *Hypericum adenotrichum* Spach. (Foto: Ali ÖZMEN-2007)

Bu taksonun ekstraktının kimyasal analizi yapılmıştır. %38 oranında germakren D ve bunun dışında 45 bileşik içerdiği bulunmuştur (Erken ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada *Hypericum adenotrichum*'un ekstraktının içerik olarak *Hypericum perforatum*' a çok benzediği bulunmuştur (Crockett *et al.*, 2005). Genusun genel özellikleri göz önünde bulundurulduğunda üzerinde çalışılmayan ve endemik bir tür olan *Hypericum adenotrichum* da antikanser aktivite bakımından etkili bileşikler içerebileceği düşüncesi ile tez çalışması kapsamına alınmıştır (Şekil 3.4).

## B-BİTKİLERİN TOPLANMASI, SAKLANMASI ve EKSTRAKSİYONU

### 1-Bitkilerin Toplanması

Tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilen bitkiler, çiçeklenme dönemlerinde konuya ilişkin bilgisi ve deneyimi olan bir Sistematik Botanikçi ile birlikte toplanmıştır. Bitkilerin toplanma tarihleri, lokaliteleri ve tehlike kategorileri Çizelge 3.1’de yer almaktadır. Tehlike kategorileri Ekim ve ark. (2000) tarafından hazırlanan Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı’ndan alınmıştır. Toplanan bitki örnekleri araziden geldikten hemen sonra Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Elemanları Yard. Doç. Dr. Özkan EREN ve Dr. Mesut KIRMACI tarafından tayin edilmiştir. Daha sonra bitkiler çeşme suyu ile yıkanarak paketlenmiş ve denemeler yapıncaya kadar -80 °C’de saklanmıştır. Ayrıca herbaryum örnekleri de hazırlanmış, bitkilere numara verilerek etiketlenmiş ve kayıt altına alınarak, Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü AYDN kodlu herbaryumunda saklanmıştır.

Çizelge 3.1 Toplanan bitkiler, toplanma tarihleri ve lokaliteleri

Familya	Genus	Takson	Tehlike Kategorisi	Tarih ve Lokalite
Iridaceae (Süsengiller)	<i>Crocus</i> L.	<i>Crocus olivieri</i> Gay subsp. <i>balansae</i> (Gay ex Baker) Mathew	LR (nt) Az Tehdit Altında	22.02.2007, Bornova- Çiçekli köyü 350-400 m.
Labiatae (Ballıbabagiller)	<i>Scutellaria</i> L.	<i>Scutellaria</i> <i>orientalis</i> L. subsp. <i>carica</i> Edmondson	EN Tehlikede	04.04.2007, Güzelköy- Karacasu, 368 m.
Scrophulariaceae (Aslanağzıgiller)	<i>Scrophularia</i> L.	<i>Scrophularia</i> <i>floribunda</i> Boiss. & Bal.	LR (nt) Az Tehdit Altında	03.05.2007, Tralleisin arkası Alatepe- Horozköy yol ayrımı, 369 m.
Guttiferae (Binbirdelikotugiller)	<i>Hypericum</i> L.	<i>Hypericum</i> <i>adenotrichum</i> Spach.	LR (lc) Az Tehdit Altında	17.05.2007, Karıncalı dağı, Karacasu 1422 m.

*Scrophularia floribunda* Boiss. & Bal. taksonu için Aydın ili sınırları içerisinde Tübes veritabanı tarafından yayılış alanı belirtilmemesine rağmen yapılan arazi çalışmalarında bu bitki Aydın ili sınırları içerisinde toplanarak tayin edilmiştir. Aydın ili sınırları içerisinde bulunan endemik bir tür olması nedeni ile tez çalışmasına da dâhil edilmiştir.

## 2-Bitkisel Ekstraktların Elde Edilmesi

### a- Kimyasallar

Ekstraksiyon için kullanılan çözücüler; Petrol eteri, Etil asetat, Diklormetan ve Metanol, “Merck KGaA (Almanya)” firmasından alınmıştır.

### b- Bitkilerin Ekstraksiyonu ve Çözücülerin Uzaklaştırılması

- 80 °C’de dondurulmuş olan bitkisel materyalin kök, gövde, yaprak, rizom, korm veya soğan gibi tüm kısımları (tüm bitki) liyofilizatör yardımı ile kurutulmuştur. Bitkilerin liyofilizasyon öncesi yaş ağırlıkları ve liyofilizasyon sonrası kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Daha sonra soksalet, çalkalayıcı ve evaporatör kullanılarak; Petrol eteri, Etil asetat, Diklormetan ve Metanol ekstraktları hazırlanmıştır. Ekstraksiyon için kullanılan bu çözücüler polarite özellikleri göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan bitkilerin yaş ve kuru ağırlıkları

Bitki adı	Yaş ağırlık (g)	Kuru ağırlık (g)
<i>Crocus olivieri</i> ssp. <i>balansae</i>	165.11	79.74
<i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i>	614.00	204.00
<i>Scrophularia floribunda</i>	502.00	274.00
<i>Hypericum adenotrichum</i>	957.00	335.00

### - Petrol Eteri Ekstraktı

Kaynama noktası: 30-40 °C

Dielektrik sabitesi: 2-2.2

Kurutulmuş örneğin ekstraksiyonu soksalet cihazında 10 ml/g olacak şekilde Petrol eteri ile yıkanarak yapılmıştır. Ekstraksiyona örnek haznesindeki eter renksiz oluncaya kadar devam edilmiştir. Örnekleri güneş ışığının etkisinden korumak için, soksalet alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Ekstraksiyon tamamlandıktan sonra eter, evaporatör ile 40 °C'de uzaklaştırılmıştır.

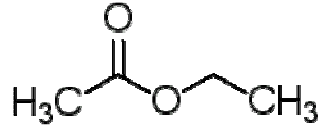
### - Etil Asetat Ekstraktı

Kaynama noktası: 76,5-77,5 °C

Dielektrik sabitesi: 6

Formül:  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$

Molekül:



Soksalet kartuşunda kalan bitki kalıntısı kurutulmuştur ve 10 ml/g olacak şekilde etil asetat ile karanlıkta muamele edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi ağzı kapaklı erlenlerde, oda sıcaklığında ve çalkalanarak yapılmıştır. Bitki kalıntısı, ekstraler renksizleşinceye kadar tekrar tekrar etil asetat ile muamele edilmiştir ve elde edilen ekstraler, filtre kâğıdından süzülerek birleştirilmiştir. Etil asetat, evaporatörde 75 °C'de uzaklaştırılmıştır.

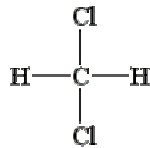
### - Diklormetan Ekstraktı

Kaynama noktası: 39.8-40 °C

Dielektrik sabitesi: 9.1

Formül:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Molekül:



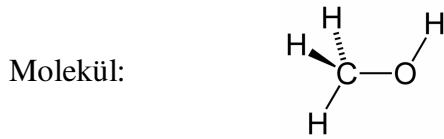
Kurutulmuş örneğin ekstraksiyonu; 10 ml/g çözücü olacak şekilde soksalet yardımı ile yapılmıştır ve çözücü evaporatörde 40 °C’de uzaklaştırılmıştır.

#### - Metanol Ekstraktı

Kaynama noktası: 64.7 °C

Dielektrik sabitesi: 32.6

Formül: CH<sub>3</sub>OH



Diklormetan ekstraksiyonundan çıkan bitki kalıntısı kurutulmuştur ve 10 ml/g olacak şekilde metanol ile karanlıkta muamele edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi ağzı kapaklı erlenlerde, oda sıcaklığında ve çalkalanarak yapılmıştır. Bitki kalıntısı ekstrater renksizleşinceye kadar tekrar tekrar metanol ile muamele edilmiştir ve elde edilen ekstrater, filtre kâğıdından süzülerek birleştirilmiştir. Metanol, evaporatörde 65 °C’de uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen ekstrater tartımları yapılarak (Çizelge 3.3) kapaklı tüplerin içerisine alınmıştır. Üzerine bitki türü, kullanılan çözücü ve tarih bilgileri yazılarak aktivite kaybına engel olmak amacıyla –80 °C’de saklanmıştır.

#### c- Elde Edilen Ekstraterların Çözünmesi

Bitkisel ekstrater sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere etanol içerisinde çözülmüştür. Kurutulan bitki örneklerinden 50’şer g tartılarak ekstrater hazırlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Elde edilen ekstrakt miktarları

Bitki adı	Petrol eter (g)	Etil asetat (g)	Diklormetan (g)	Metanol (g)
<i>Crocus olivieri</i> ssp. <i>balansae</i>	0.056	0.125	0.106	4.138
<i>Scutellaria orientalis</i> ssp. <i>carica</i>	0.412	0.324	1.090	1.649
<i>Scrophularia floribunda</i>	0.257	0.356	0.381	3.237
<i>Hypericum adenotrichum</i>	0.288	0.267	0.527	1.407

Bu aşamadaki çalışmalar; -80 °C'den çıkarılan ekstraktların aktivitelerinin kaybolmasını engellemek amacıyla buz üzerinde yapılmıştır. Ekstraktların üzerine bir defada 500 µl olmak üzere etanol ilavesi yapılmıştır ve her ilaveden sonra sonikatör yardımı ile ekstraktlar çözülmüştür. Ekstraktları çözmek için kullanılacak olan maksimum etanol miktarı HL-60 hücreleri ile bir ön deneme yapılarak belirlenmiştir. Bu ön denemeye ilişkin sonuçlara göre esas denemede kullanılacak alkol konsantrasyonunun maksimum %0,12 - %0,46 değerleri arasında kalması gerektiği belirlenmiştir. Daha yüksek miktarlarda alkol kullanıldığında hücrelerin normal çoğalmaları etkilenmektedir.

Kullanılan çözücü miktarlarına bağlı olarak elde edilen çözülmüş bitki ekstraktlarının yoğunluğu, kuru ağırlık göz önünde bulundurularak g/ml cinsinden stok değer olarak hesaplanmıştır. Yine bitkilerin etkileri arasında karşılaştırma sağlayabilmek amacıyla kullanılan çözücü miktarlarının da eşit olmasına dikkat edilmiştir ve bu düşünceyle tüm ekstraktlar 2 ml etanol içerisinde çözülmüşlerdir. Kuru ağırlıklarının da 50 g olmak üzere eşit düzeyde ayarlanmış olması nedeniyle tüm ekstraktların stok yoğunlukları 25 g/ml olarak elde edilmiştir.

Elde edilen çözülmüş bitkisel ekstraktlar, bir tüpe 1 ml olmak üzere 2 tüpe bölünmüştür ve bu tüplerden bir tanesi sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere ayrılmıştır. Diğeri stok olarak -80 °C'de saklanmıştır. Sitotoksik değerlendirmede kullanılmak üzere ayrılan ekstraktlar soğutuculu santrifüjde +4 °C'de, 12.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Buradan elde edilen süpernatantlar başka bir tüpe aktarılmıştır ve geriye kalan pelletler de -80 °C'de saklanmıştır. Sitotoksik



değerlendirmede süpernatantlar kullanılmıştır. Süpernatantlar da denemelerde kullanılana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

## **C-SİTOTOKSİK DEĞERLENDİRME**

### **1-HL-60 Hücreleri ile Denemeler**

#### **a-Hücrelerin ve Kültür Ortamlarının Temini**

HL-60 hücreleri ATCC (American Type Culture Collection; ATCC: CCL-240)'den alınmıştır ve GIBCO (Invitrogen Co.)'nun standart hücre kültürü ortamlarında (RPMI 1640) büyütülmüştür. Kültür ortamına yapılan ilaveler de (Fetal Calf Serum, L-Glutamin, Streptomisin-Pensilin) GIBCO, Hoechst 33258 ve Propidium Iodide SIGMA (Sigma-Aldrich Co.)'dan alınmıştır.

#### **b-Hücrelerin Çoğaltılması ve Ekstrakt Uygulamaları**

Sıvı azot içerisinde dondurulmuş olarak bulunan HL-60 hücre hattı denemelerde kullanılmak üzere çıkartılmış ve tüpün  $\frac{3}{4}$  ü suyun içine gelecek şekilde  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda 1-2 dakikada yavaşça çalkalayarak hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Son buz parçası eridiğinde su banyosundan alınmıştır ve daha sonra içerisinde hücreler bulunan bu tüp %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Tüp içeriği 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve üzerine 3-4 ml ılık ortam ilave edilmiş ve 800 rpm' de oda sıcaklığında 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet yeni ılık kültür ortamında resüspanse edilmiş ve hücreler kültür şişelerine aktarılmıştır. Bu hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  ve %96 nem içeren atmosferde çoğaltılmışlardır.

Çeşitli hücre tipleri farklı çoğalmalar gösterebilmektedirler. Bazıları tutunarak çoğalmaktadırlar. Bazıları ise ortam içerisinde serbest çoğalmaktadırlar. Serbest çoğalabilenler kültür ortamından pipetlenerek direk alınabilmektedir ancak tutunan hücreler için öncelikle hücreleri zeminden kaldırmak gerekmektedir. HL-60 hücreleri serbest olarak çoğalırlar ve ortam olarak RPMI 1640 (L-glutamine) kullanırlar. Bu ortam  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır. Ortam kullanılmadan yarım saat önce  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki su

banyosuna alınmış ve daha sonra üzerine %10 oranına karşılık gelecek miktarda yani 50 ml Fetal Calf Serum (FCS) eklenmiştir. Toplam hacim 550 ml'ye tamamlanmıştır. Ortam içerisine %1 Glutamin (5.5 ml) ve kontaminasyonu önlemek için %1 Streptomisin-Penisilin (5.5 ml) antibiyotik karışımı eklenmiştir. HL-60 hücreleri ml'de 100.000 ( $0,1 \times 10^6$ ) hücre olacak şekilde kültür şişesinde çoğaltılmıştır ve bitkisel ekstraktlar artan konsantrasyonlarda ( 0.5, 1, 4, 20 ve 40 mg/ml ) 24, 48 ve 72 saat olmak üzere uygulanmıştır. Daha sonra hücreler bir hücre sayacında (CC-108 microcellcounter, Sysmex Co.) sayılarak hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon ( $I_pC_{50}$ ) belirlenmiştir.

Bütün bitkisel ekstrakt denemeleri 3 tekrarlı yapılmıştır. Steril kültür şişeleri üzerine numara, uygulama grubu, kullanılan çözücü, hücre hattı tipi ve tarih bilgileri yazılmıştır. Her deneme için iki adet kontrol grubu kullanılmıştır. Bir kontrol grubu sadece ortamı (RPMI-1640) ve kullanılan hücreyi (HL-60) içermektedir. Diğer kontrol grubu ise ilave olarak ekstraktın uygulama esnasında içerisinde çözündüğü çözücünün (Etanol) maksimum konsantrasyonunu içermektedir. Ekstraktın içerisinde çözündüğü çözücünün miktarı göz önünde bulundurularak stok çözeltilerin yoğunluğu daha önce g/ml (25 g/ml) olarak hesaplanmıştır. Bitkisel ekstraktların uygulama konsantrasyonları 500 µg/ml, 1mg/ml, 4 mg/ml, 20 mg/ml ve 40 mg/ml olarak belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonu elde etmek üzere stok çözeltilerden alınacak miktarlar kullanılacak hücre kültürü ortamının miktarı da (5 ml veya 10 ml) göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Bunlar Çizelge 3.4'de yer amaktadır. Mikropipet ile çekilemeyecek kadar küçük miktarlar taze kültür ortamı ile seyreltilerek eklenecek miktarlar tekrar hesaplanmıştır. Öncelikle gerekli miktar 10 veya 100 ile çarpılmıştır ve çıkan rakamdan gerekli ekstrakt miktarı düşülerek belirlenmiştir. Bu rakam, alınması gereken taze besi yeri miktarını vermektedir. Bunun içine gerekli ekstrakt ilave edilmiş ve hesaplanan miktarlarda kültürlerle uygulanmıştır.

Bütün çalışmalar steril kabin içerisinde yürütülmüştür ve steril tek kullanımlık pipetler kullanılmıştır. Eldivenler ve steril kabin içerisine sokulacak diğer malzemeler de %70'lik alkol ile steril edilmiştir.

Kültür şişesi hazırlarken öncelikle kullanılacak olan hücre hattının hücre yoğunluğu hücre sayacı ile belirlenmiştir. Hazırlanacak olan kültürün miktarı da (5 ml veya 10 ml ) göz önünde bulundurularak son konsantrasyon ml’de 100.000 hücre ( $0,1 \times 10^6$ ) olacak şekilde ayarlanmıştır ve bu hesaplamalara göre stok şişeden gerekli miktar alınıp yeni kültür şişesine eklenmiştir.

İlgili ekstraktlar ve kontrol grubu kimyasalları bu aşamada eklenmiştir. Eklemekten sonra pipetleme ile resüspanسیون sağlanmıştır. Her bir ekstrakt için yapılan uygulamalar Çizelge 3.4’de yer almaktadır. Hücre kültürüne ekstrakt uygulamasında da şartlar eşit olarak sağlanmıştır. Tüm bitkiler için eşit konsantrasyonlar hesaplanmış ve kültür ortamlarına uygulanmıştır.

Çizelge 3.4 Uygulama grupları ve uygulanan ekstrakt miktarları

Ekstrakt tipi	Uygulama grubu (3 tekrarlı)	Kullanılan ortam miktarı	Başlangıçtaki HL-60 hücre sayısı	Stoktan alınan bitki ekstresi (b.e.) veya alkol miktarı
Petrol Eteri	Kontrol	5 ml	$0,1 \times 10^6$	X
	Kontrol+EtOH	5 ml	$0,1 \times 10^6$	8 µl alkol
Etil Asetat	500 µg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,1 µl (b.e.)
Diklormetan	1 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,2 µl (b.e.)
	4 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,8 µl (b.e.)
Metanol	20 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl (b.e.)
	40 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	8 µl (b.e.)

## 2-Hücre Sayımı

Hücre sayımı için öncelikle tampon çözelti (PBS: Phosphate Buffered Saline) hazırlanmıştır. Pipetleme ile resüspanسیون edilen ortamdaki alınan 200 µl hücre kültürü 9,8 ml tampon çözelti içerisine ilave edilerek, tampon çözelti pipetleme ile resüspanسیون edilmiştir. Resüspanسیون iyi yapılmadığı durumda 3’lü tekrarlardaki değerler arasında farklılıklar meydana gelecektir ve standart sapma artacaktır. Dolayısı ile resüspanسیونun dikkatli ve iyi yapılması gerekmektedir. 24, 48 ve 72 saatlik hücre sayımları CC-108 microcellcounter hücre sayacında yapılmıştır.

### 3-Bölünen Hücre Oranının Hesaplanması

$$[(C_{72h+ekstrakt} - C_{24h+ekstrakt}) / (C_{72h-ekstrakt} - C_{24h-ekstrakt})] \times 100 = \% \text{ bölünen hücre}$$

$C_{72h+ekstrakt}$ : uygulamadan 72 saat sonraki hücre sayısı

$C_{24h+ekstrakt}$ : uygulamadan 24 saat sonraki hücre sayısı

$C_{72h-ekstrakt}$ : ekstrakt uygulaması olmadan 72 saat sonraki hücre sayısı

$C_{24h-ekstrakt}$ : ekstrakt uygulaması olmadan 24 saat sonraki hücre sayısı

Ham veriler ilgili çizelgeden exel dosyasına aktarılmıştır ve bölünen hücre oranının hesaplanması yukarıdaki formüller ile yapılmıştır. Bütün denemeler 3 tekrarlı yapılmıştır.

### D-APOPTOZİS VE NEKROZİS YÖNTEMİ

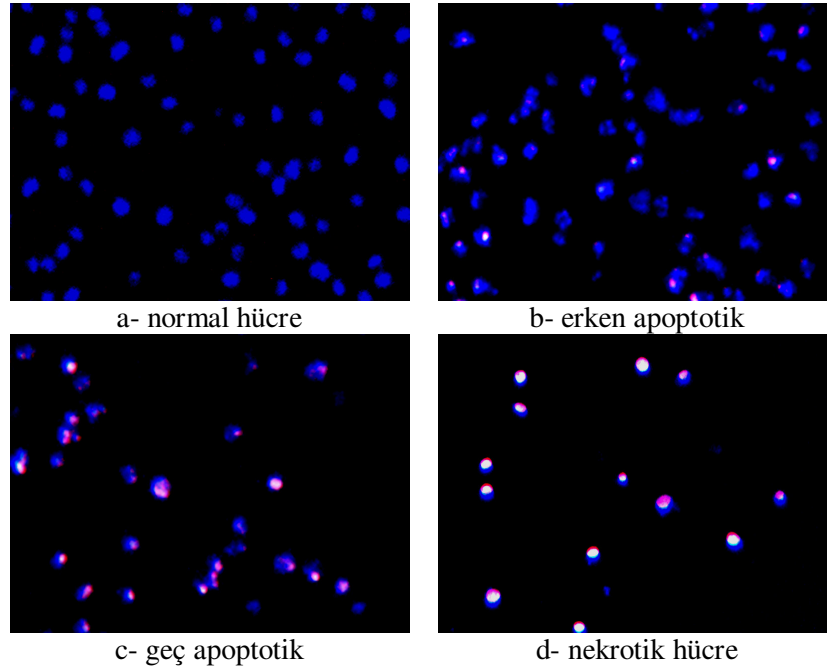
Apoptotik ve nekrotik etkiyi belirlemek için; HL-60 hücreleri kültür şişelerinde düşük yoğunlukta çoğaltılmıştır ve seçilmiş bitki ekstraktlarının ilgili konsantrasyonları (1, 4 ve 20 mg/ml) ile muamele edilmiştir (Çizelge 3.5). HL-60 hücreleri HO/PI (Hoechst 33258 / Propidium Iodide) yöntemiyle boyanarak apoptotik ve nekrotik etki gösteren ekstraktlar belirlenmiştir (Grusch *et al.*, 2002, Huettenbrenner *et al.*, 2003).

Çizelge 3.5 Apoptozis için seçilen bitkiler, ekstraktlar ve konsantrasyonları

Bitki Adı	Ekstrakt Tipi	Uygulama grubu (3 tekrarlı)	Ortam miktarı	Başlangıç HL-60 hücre sayısı	Stoktan alınan bitki ekstresi (b.e.) veya alkol miktarı
<i>Scrophularia floribunda</i>	Metanol	Kontrol+EtOH	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl alkol
		1 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,2 µl (b.e.)
		4 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,8 µl (b.e.)
		20 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl (b.e.)
<i>Scutellaria orientalis ssp. carica</i>	Metanol	Kontrol+EtOH	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl alkol
		1 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,2 µl (b.e.)
		4 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,8 µl (b.e.)
		20 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl (b.e.)
<i>Hypericum adenotrichum</i>	Petrol Eteri	Kontrol+EtOH	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl alkol
		1 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,2 µl (b.e.)
		4 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,8 µl (b.e.)
		20 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl (b.e.)
	Etil Asetat	Kontrol+EtOH	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl alkol
		1 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,2 µl (b.e.)
		4 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,8 µl (b.e.)
		20 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl (b.e.)
	Diklormetan	Kontrol+EtOH	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl alkol
		1 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,2 µl (b.e.)
		4 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	0,8 µl (b.e.)
		20 mg/ml	5 ml	$0,1 \times 10^6$	4 µl (b.e.)

Hoechst 33258 / Propidium Iodide (HO/PI) boyama ile hücre ölümünün tespiti yöntemin avantajı canlı, apoptotik ve nekrotik hücreleri ayırt etmeye olanak sağlamasıdır. Bu amaçla, HL-60 hücreleri 100.000/ml yoğunlukta şişelere aktarılmıştır. Daha sonra ekstraktlar artan konsantrasyonlarda (1, 4 ve 20 mg/ml) 24 ve 48 sürelerde hücre kültürü ortamına uygulanmıştır. HO/PI boya karışımı 200 µl/200 µl (1:1) olmak üzere karıştırılmıştır ve üzerine 600 µl steril su ilavesi 1000 µl'ye tamamlanmıştır. Pipetleme ile resüspansiyon yapılmıştır ve boya kullanıncaya kadar karanlıkta saklanmıştır. Ekstrakt uygulaması süresi sonunda hücre kültürü ortamından 50 µl alınmıştır ve üzerine 5 µl HO/PI boyası ilave edilmiştir. Boyanın floresan özelliğini ışıkta kaybetmesi nedeni ile boyama işlemi direkt ışık almayacak şekilde steril kabin içerisinde yapılmıştır. Daha sonra 1 saat  $37^{\circ}\text{C}$ ' de %5  $\text{CO}_2$  ve %96 nem içeren ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda bir lam üzerine 30'ar µl

örnek alınıp damlatılmış ve floresan mikroskop (Zeiss Axiovert) altında UV ışığı ve DAPI filtresi ile incelenip mikroskopik fotoğraflar çekilmiştir (MB:10x10). Çekilen fotoğraflardan canlı hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler sayılıp oranları belirlenmiştir (Grusch *et al.*, 2002, Huettenbrenner *et al.*,2003). Bu hücre tiplerine ait mikroskopik fotoğraflar Şekil 3.5’de yer almaktadır. Burada yer alan fotoğraflarda; mavi renkli ve tam boyanmış hücreler normal hücreleri (a), mavi renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler erken apoptotik hücreleri (b), mavi-pembe renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler geç apoptotik hücreleri (c) ve pembe renkli tam boyanmış hücreler de nekrotik hücreleri (d) temsil etmektedir.



Şekil 3.5 HO/PI Boyama: normal hücre (a), erken apoptotik (b), geç apoptotik (c) ve nekrotik hücre (d) ayrımı [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

## E-İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRME

GraphPad 4.0 analiz programı ile kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar (ANOVA testi ile tek yönlü olarak) hesaplanmıştır. Standart hataları içeren grafikler hazırlanmıştır.

## IV-BULGULAR

### A- HL-60 HÜCRE HATTINDAN ELDE EDİLEN SİTOTOKSİK AKTİVİTE VERİLERİ

*Crocus olivieri* ssp. *balansae*, *Scutellaria orientalis* ssp. *carica*, *Scrophularia floribunda* ve *Hypericum adenotrichum* bitkilerinden farklı yöntemlerle (petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol) elde edilmiş ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen sitotoksik aktivite verileri her bir bitki için değerlendirilmiştir.

#### 1-*Crocus olivieri* ssp. *balansae* Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri

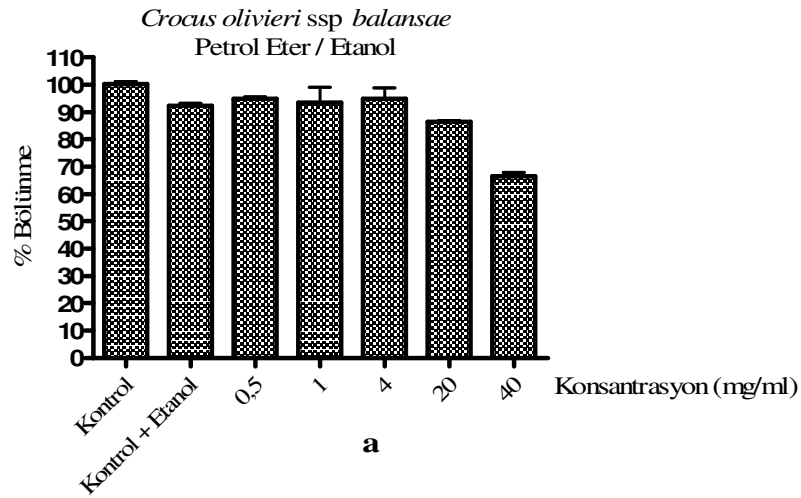
*Crocus olivieri* ssp. *balansae* bitkisine ait farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 4, 20 ve 40 mg/ml) ve farklı yöntemlerle (petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol) ekstraktlar elde edilmiştir. HL-60 hücre hattına uygulanan ekstraktlar, muamele öncesi etanolde çözülmüştür (Örneğin: petrol eter / etanol). Ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen sitotoksik (hücre bölünmesini engelleyici) aktivite verileri karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.1'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1 Kontrol ve *Crocus olivieri* ssp. *balansae* bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri

Ekstrakt	Kontrol grupları % bölünme değerleri		Uygulama grupları (mg/ml) % bölünme değerleri					*p
	Kontrol	Kontrol + Etanol	0,5	1	4	20	40	
Petrol Eter	100.00	92.26 ±0,8	94.89 ±0,7	93.34 ±5,7	94.89 ±3,9	86.53 ±0,4	66.41 ±1,5	0,0001
Etil Asetat	100.00	95.09 ±3,2	100.00 ±3,1	102.80 ±2,4	95.79 ±5,8	55.69 ±3,7	8.23 ±2,4	0,0001
Diklormetan	100.00	95.09 ±3,2	95.79 ±2,7	97.54 ±3,5	99.82 ±2,8	92.29 ±3,3	43.78 ±5,8	0,0001
Metanol	100.00	95.91 ±1,2	98.63 ±2,3	101.53 ±2,4	79.72 ±1,0	52.13 ±3,9	41.73 ±4,6	0,0001
<sup>x</sup> p	-	-	0,4348	0,3404	0,0257	0,0001	0,0001	-

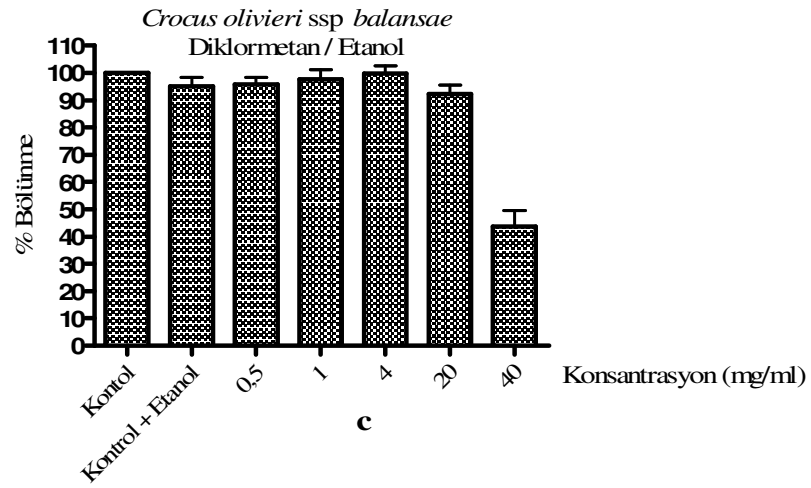
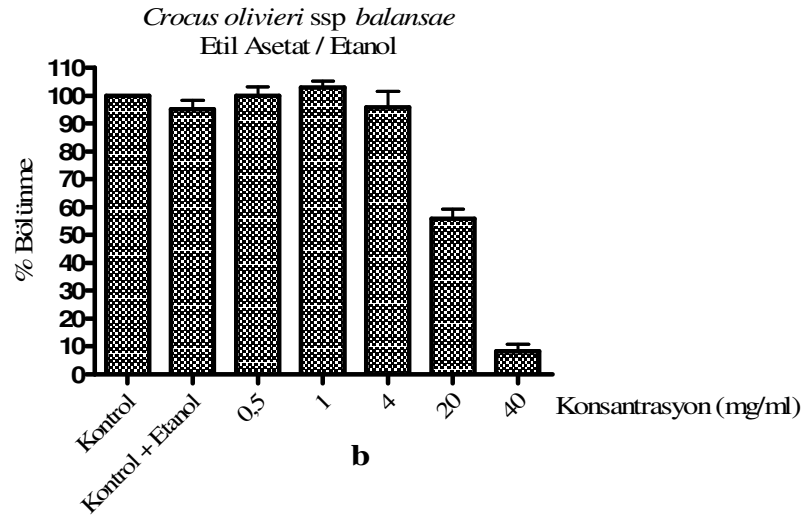
\*p<0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (\*ekstrakt içi)

<sup>x</sup>p<0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (<sup>x</sup>ekstraktlar arası)

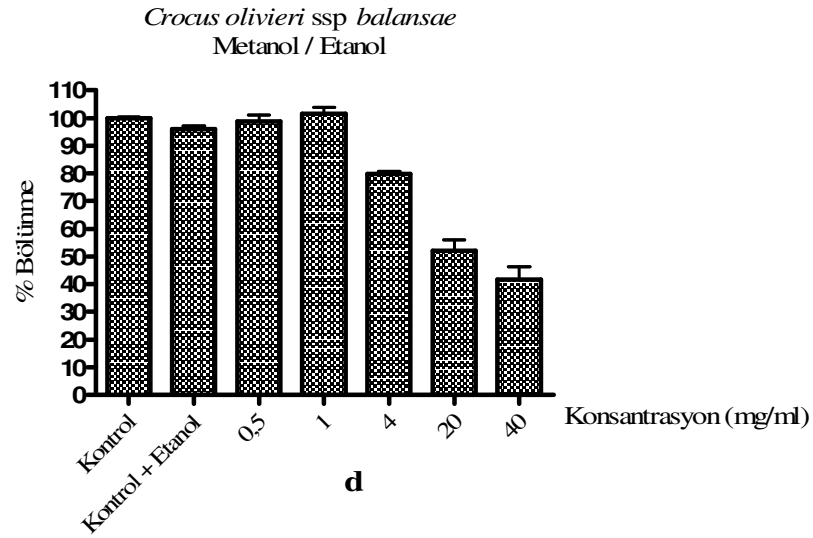


Şekil 4.1 a. *Crocus olivieri* ssp. *balansae* bitkisine ait petrol eteri (a) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri





Şekil 4.1 b,c. *Crocus olivieri* ssp. *balansae* bitkisine ait etil asetat (b) ve diklormetan (c) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri



Şekil 4.1 d. *Crocus olivieri* ssp. *balansae* bitkisine ait metanol (d) ekstraktının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri

Çalışma sonucunda yapılan değerlendirmeler tez çalışması kapsamında kullanılan *C. olivieri* ssp. *balansae* bitkisinden elde edilen özellikle etil asetat ve metanol ekstraktlarının doz artışı ile birlikte HL-60 hücreleri üzerinde bölünmeleri azaltma yönünde etki ettiği görülmektedir (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). Petrol eteri ekstraktı uygulamasında; kontrolde %100 olan hücre bölünmesi değeri kontrol + etanol uygulamasında, kontrole göre az bir azalma gösterirken diğer uygulamalarda (0.5, 1 ve 4 mg/ml) bölünme yeniden artışa geçmiştir. Özellikle 40 mg/ml'lik ekstraktın 72 saatlik uygulanması sonucunda bölünme oranında kontrole göre oldukça bir azalma (%66.41) olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiki analiz sonucunda ekstrakt içi gözlenen farklılıkların, kontrol ile karşılaştırıldıklarında  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. Etil asetat uygulamasında da petrol eteri ekstraktı sonuçlarına benzer sonuçların ortaya çıktığı görülmektedir. Gerek etil asetat uygulamalarında gerekse petrol eter uygulamalarında hücre bölünmelerinin konsantrasyon artışına bağlı olarak değişim gösterdiğini söylemek pek mümkün olmasa da, 20 ve 40 mg/ml'lik ekstrakt uygulamalarının diğer konsantrasyonlardan daha etkili olduğu söylenebilir (Şekil 4.1). 20 mg/ml'lik uygulama konsantrasyonunda etkili olan ekstraktları metanol > etil asetat > petrol eteri > diklormetan şeklinde sıralamak mümkündür (Şekil 4.1 d, b, a, c).

## 2-*Scutellaria orientalis* ssp. *carica* Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri

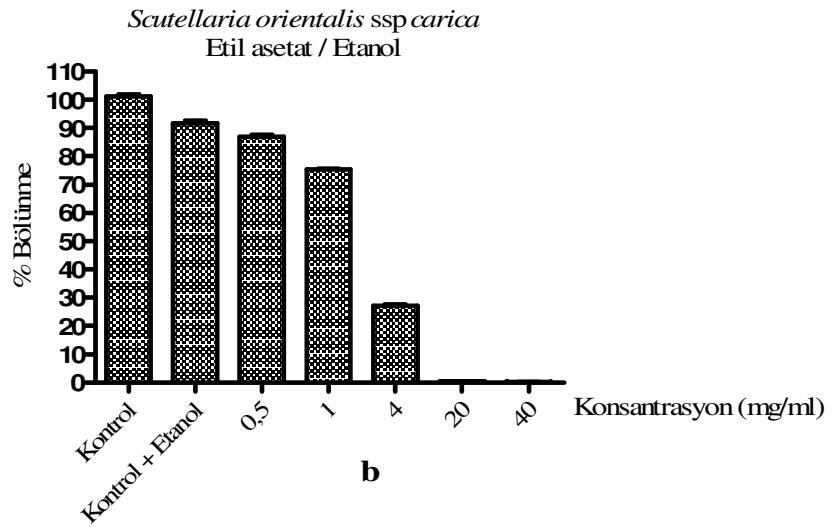
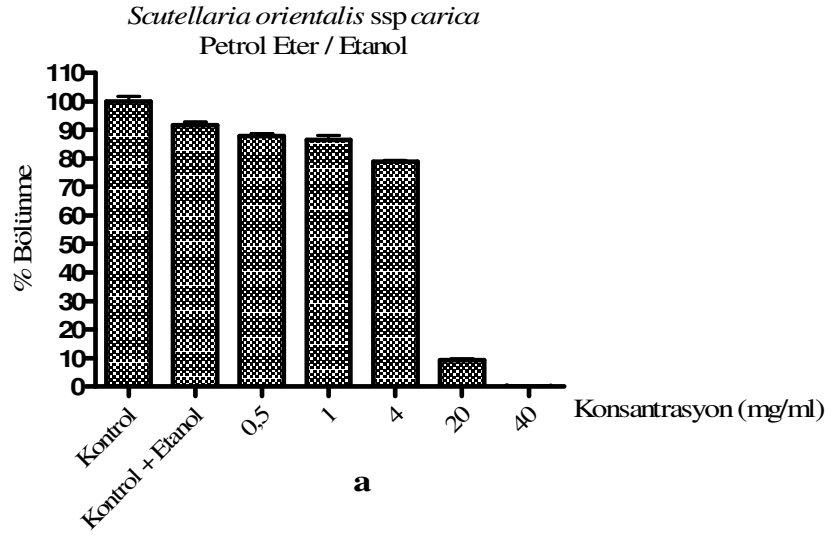
*Scutellaria orientalis* ssp. *carica* bitkisine ait farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 4, 20 ve 40 mg/ml) ve farklı yöntemlerle (petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol) ekstraktlar elde edilmiştir. HL-60 hücre hattına uygulanan ekstraktlar, muamele öncesi etanolde çözülmüştür (Örneğin: petrol eter / etanol). Ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen sitotoksik (bölünmeyi engelleyici) aktivite verileri karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Kontrol ve *Scutellaria orientalis* ssp. *carica* bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri

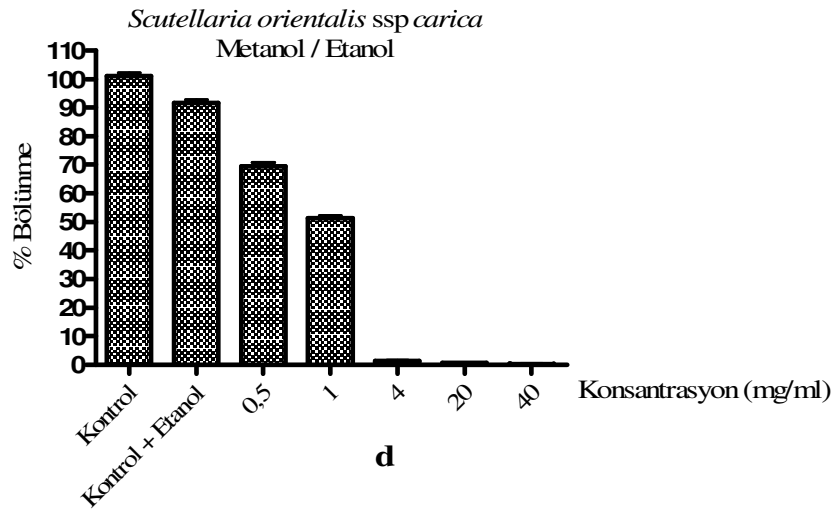
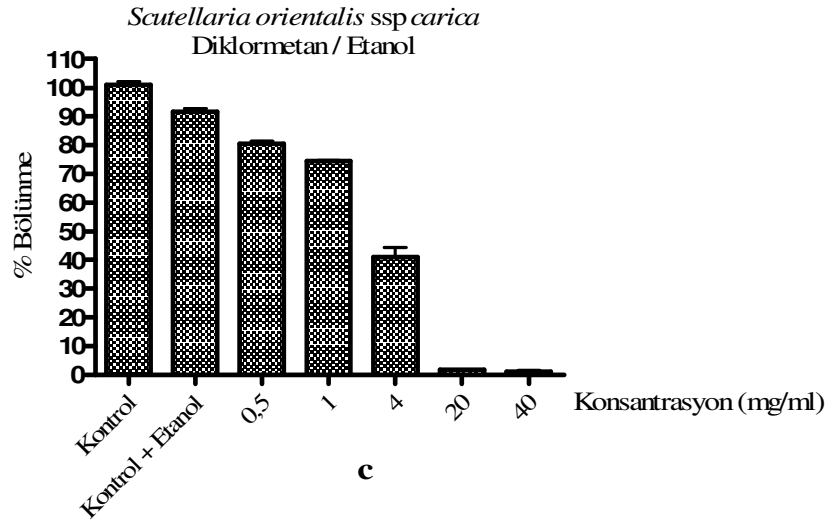
Ekstrakt	Kontrol grupları % bölünme değerleri		Uygulama grupları (mg/ml) % bölünme değerleri					*p
	Kontrol	Kontrol + Etanol	0,5	1	4	20	40	
Petrol Eter	100.00	91.61 ±1,1	87.68 ±1,0	86.36 ±1,6	78.90 ±0,3	9.30 ±0,5	0.13 ±0,1	0,0001
Etil Asetat	100.00	91.61 ±1,1	86.76 ±1,0	75.23 ±0,5	27.13 ±0,8	0.52 ±0,1	0.26 ±0,2	0,0001
Diklormetan	100.00	91.61 ±1,1	80.47 ±0,8	74.44 ±0,1	41.02 ±3,4	1.70 ±0,1	1.18 ±0,4	0,0001
Metanol	100.00	91.61 ±1,1	69.46 ±1,4	51.37 ±0,7	1.31 ±0,3	0.65 ±0,1	0.13 ±0,2	0,0001
<sup>x</sup> p	-	-	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0779	-

\*p<0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (\*ekstrakt içi)

<sup>x</sup>p<0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (<sup>x</sup>ekstraktlar arası)



Şekil 4.2 a,b. *Scutellaria orientalis ssp. carica* bitkisine ait petrol eteri (a) ve etil asetat (b) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri



Şekil 4.2 c,d. *Scutellaria orientalis ssp. carica* bitkisine ait diklormetan (c) ve metanol (d) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri

*S.orientalis ssp. carica* bitkisinden elde edilen ekstraktlar, petrol eter ekstraktı haricinde HL-60 hücre hattı üzerinde yüksek oranda hücre bölünmesini engelleyici aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.2 ve Çizelge 4.2). En etkili ekstrakt tipinin, hücrelerin yaklaşık %50'sini (%48,63) öldüren ( $I_pC_{50}$ ) 1 mg/ml'lik uygulama konsantrasyonu ile metanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Metanol ekstraktının yanı sıra etil asetat ve diklormetan ekstraktları da 4 mg/ml'lik uygulama konsantrasyonları ile HL-60 hücre hattı üzerinde bölünmeyi engelleyici aktivite

göstermişlerdir. Yapılan istatistiki analiz sonucunda ekstrakt içi gözlenen farklılıkların, kontrol ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. Bu açıdan duruma bakılırsa 4 mg/ml'lik uygulama konsantrasyonunda etkili olan ekstraktları metanol > etil asetat > diklormetan > petrol eteri şeklinde sıralamak mümkündür (Şekil 4.2 d, b, c, a).

### **3-Scrophularia floribunda Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri**

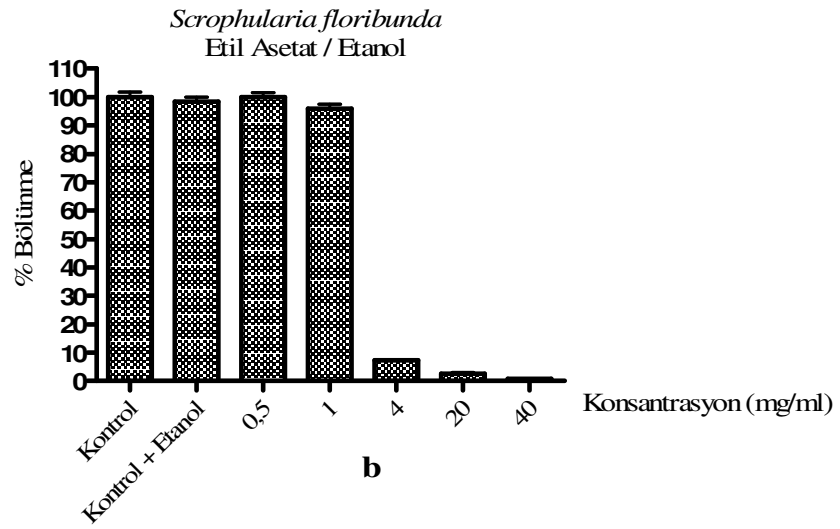
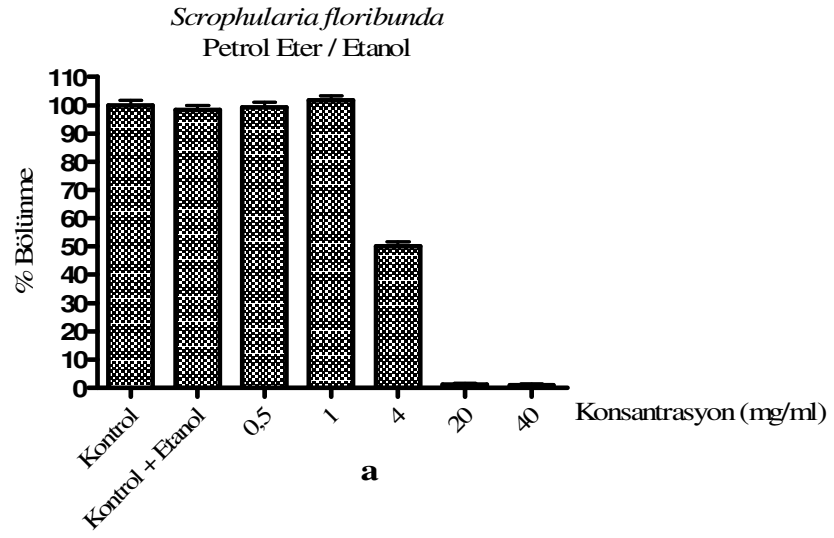
*Scrophularia floribunda* bitkisine ait farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 4, 20 ve 40 mg/ml) ve farklı yöntemlerle (petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol) ekstraktlar elde edilmiştir. HL-60 hücre hattına uygulanan ekstraktlar, muamele öncesi etanolde çözülmüştür (Örneğin: petrol eter / etanol). Ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen sitotoksik (bölünmeyi engelleyici) aktivite verileri karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Kontrol ve *Scrophularia floribunda* bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri

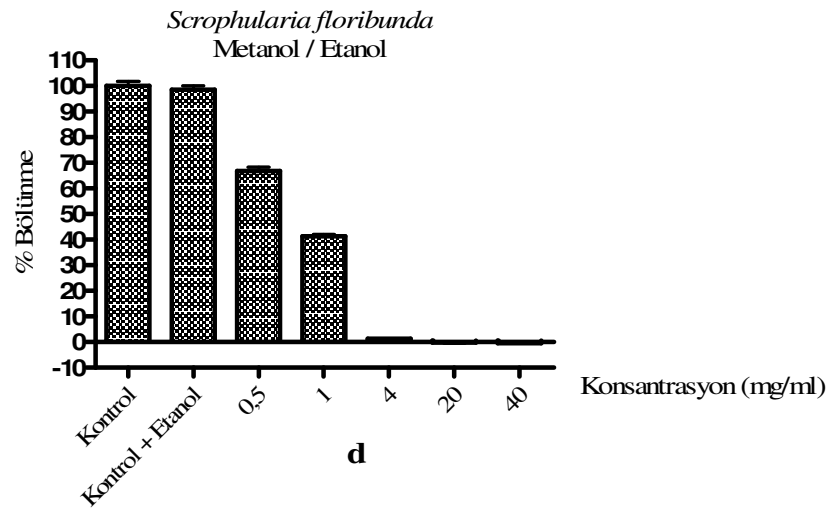
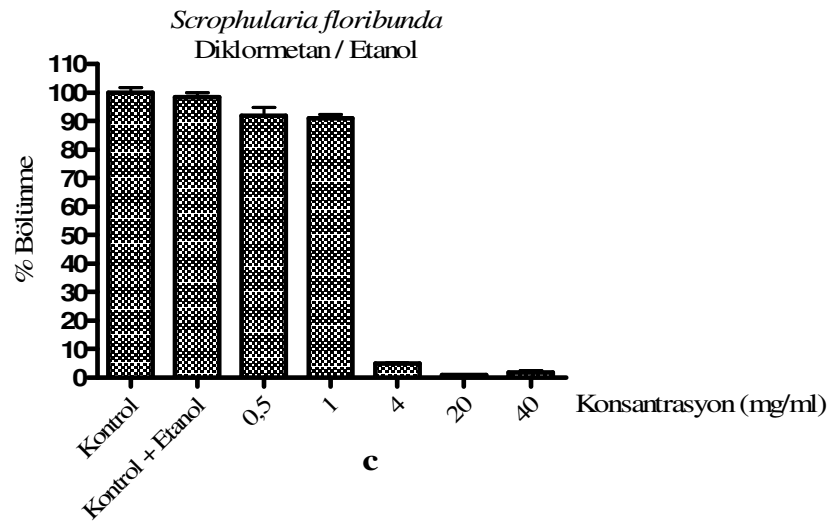
Ekstrakt	Kontrol grupları % bölünme değerleri		Uygulama grupları (mg/ml) % bölünme değerleri					*p
	Kontrol	Kontrol + Etanol	0,5	1	4	20	40	
Petrol Eter	100.00	98.33 ±1,5	99.09 ±2,0	101.66 ±1,7	50.07 ±1,6	1.21 ±0,4	0.90 ±0,4	0,0001
Etil Asetat	100.00	98.33 ±1,5	100.00 ±1,5	95.91 ±1,6	7.26 ±0,0	2.57 ±0,5	0.90 ±0,0	0,0001
Diklormetan	100.00	98.93 ±1,5	91.83 ±3,0	90.92 ±1,2	4.84 ±0,3	0.76 ±0,2	1.81 ±0,5	0,0001
Metanol	100.00	98.93 ±1,5	66.71 ±1,4	41.15 ±0,8	1.21 ±0,2	-0.15 ±0,4	-0.45 ±0,0	0,0001
<sup>x</sup> p	-	-	0,0001	0,0001	0,0001	0,0085	0,0112	-

\* $p < 0,05$  olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (\*ekstrakt içi)

<sup>x</sup> $p < 0,05$  olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (<sup>x</sup>ekstraktlar arası)



Şekil 4.3 a,b. *Scrophularia floribunda* bitkisine ait petrol eteri (a) ve etil asetat (b) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri



Şekil 4.3 c,d. *Scrophularia floribunda* bitkisine ait diklormetan (c) ve metanol (d) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri

Tez kapsamında çalışılan *S. floribunda* bitkisinden elde edilen tüm ekstrakt tiplerinin HL-60 hücre hattı üzerinde bölünmeyi engelleyici aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3). Ancak bunların etki düzeyleri değişiklik göstermektedir. En etkili ekstrakt tipinin, 1 mg/ml' lik konsantrasyonuyla hücrelerin %50'den fazlasını (%58,85) öldüren metanol ekstraktının olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3d). Yapılan istatistiki analiz sonucunda ekstrakt içi gözlenen farklılıkların, kontrol ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. Diğer



ekstraktlar benzer etkiyi ancak 4 mg/ml'lik konsantrasyona ulaşıldığında gösterebilmişlerdir. Bu açıdan duruma bakılırsa 4 mg/ml'lik uygulama konsantrasyonunda etkili olan ekstraktları metanol > diklormetan > etil asetat > petrol eteri şeklinde sıralamak mümkündür (Şekil 4.3 d, c, b, a)

#### **4-*Hypericum adenotrichum* Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Sitotoksik Aktivite Verileri**

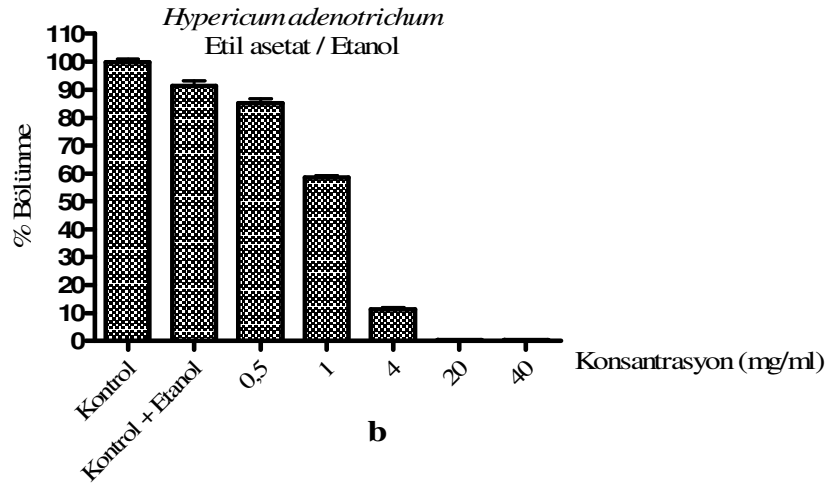
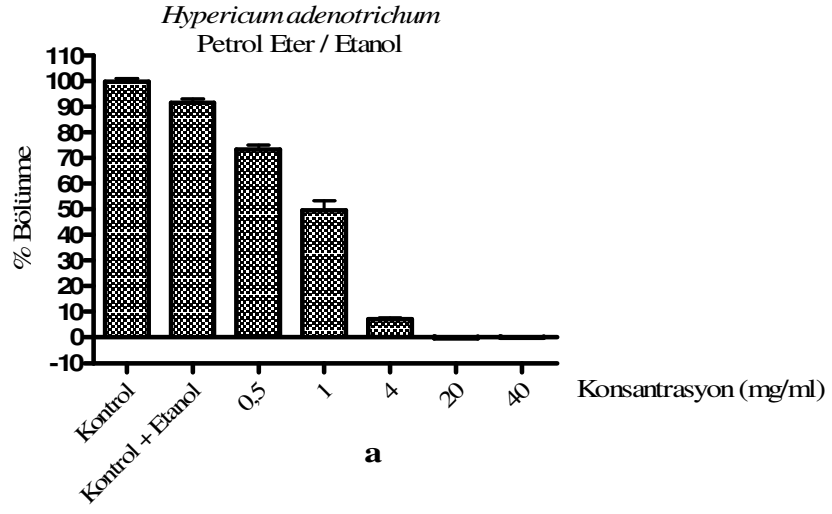
*Hypericum adenotrichum* bitkisine ait farklı konsantrasyonlarda (0,5, 1, 4, 20 ve 40 mg/ml) ve farklı yöntemlerle (petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol) ekstraktlar elde edilmiştir. HL-60 hücre hattına uygulanan ekstraktlar, muamele öncesi etanolde çözülmüştür (Örneğin: petrol eter / etanol). Ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen sitotoksik (bölünmeyi engelleyici) aktivite verileri karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 Kontrol ve *Hypericum adenotrichum* bitkisinin uygulama gruplarına ait sitotoksik aktivite değerleri

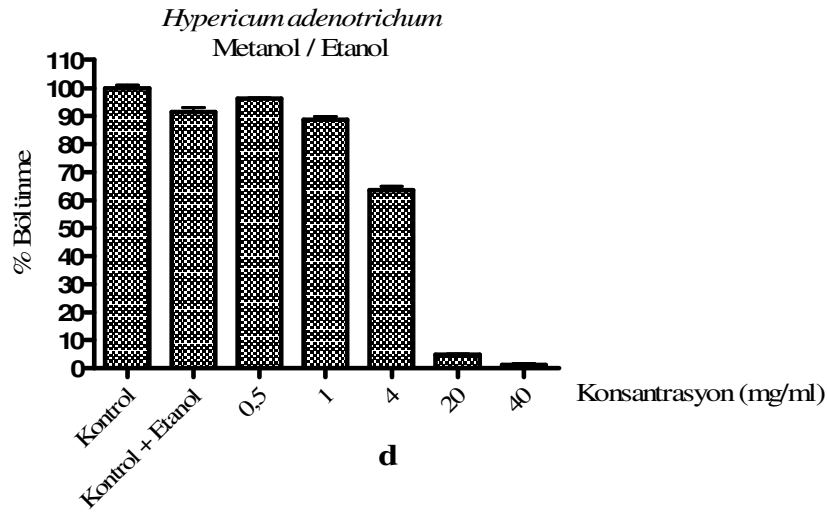
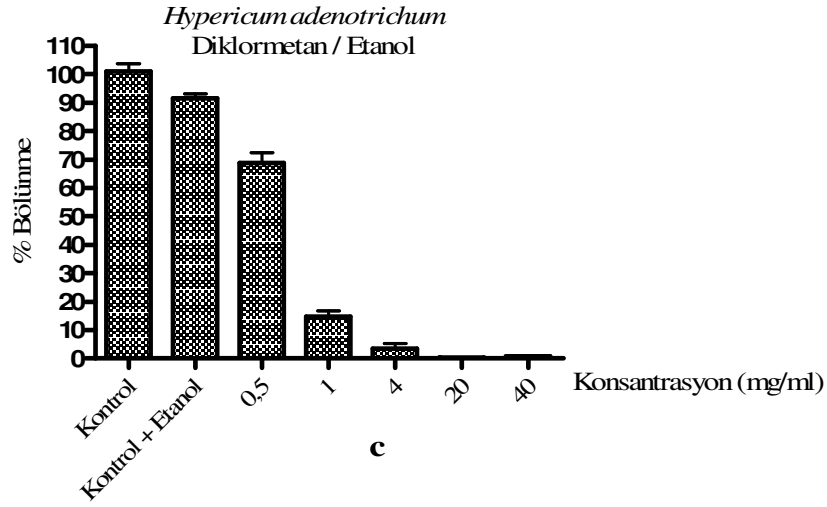
Ekstrakt	Kontrol grupları % bölünme değerleri		Uygulama grupları (mg/ml) % bölünme değerleri					*p
	Kontrol	Kontrol + Etanol	0,5	1	4	20	40	
Petrol Eter	100.00	91.48 ±1,6	73.24 ±1,7	49.62 ±3,7	7.17 ±0,5	0.00 ±0,3	0.15 ±0,1	0,0001
Etil Asetat	100.00	91.48 ±1,6	85.20 ±1,4	58.60 ±0,7	11.36 ±0,7	0.00 ±0,3	0.30 ±0,1	0,0001
Diklormetan	100.00	91.48 ±1,6	68.80 ±3,6	14.78 ±2,0	3.43 ±1,9	0.30 ±0,1	0.75 ±0,3	0,0001
Metanol	100.00	91.48 ±1,6	96.11 ±0,4	88.79 ±0,9	63.53 ±1,3	4.78 ±0,3	1.19 ±0,4	0,0001
<sup>x</sup> p	-	-	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0905	-

\*p<0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (\*ekstrakt içi)

<sup>x</sup>p<0,05 olan durumlarda aradaki fark önem taşımaktadır (<sup>x</sup>ekstraktlar arası)



Şekil 4.4 a,b. *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait petrol eteri (a) ve etil asetat (b) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri



Şekil 4.4 c,d. *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait diklormetan (c) ve metanol (d) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının ve kontrol gruplarının bölünmeyi engelleyici aktiviteleri

Bu bitkiye ait ekstraktlar yüksek oranda sitotoksik aktivite göstermişlerdir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4). Çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde en etkili ekstraktın 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonu ile hücrelerin %31,2'sini öldüren diklormetan ekstraktı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4c). Yapılan istatistiki analiz sonucunda ekstrakt içi gözlenen farklılıkların, kontrol ile karşılaştırıldığında  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu görülmüştür. Diğer ekstraktlar aynı konsantrasyonda daha düşük sitotoksik aktivite göstermişlerdir. Aynı etkiyi ancak konsantrasyon 1

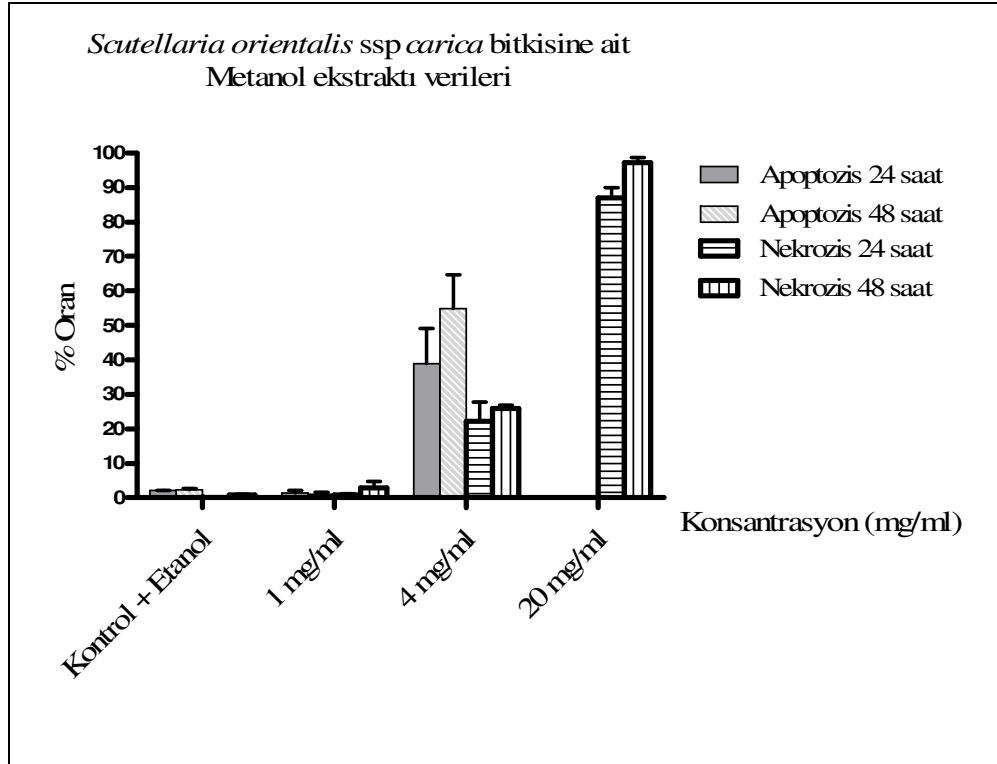
mg/ml'ye çıktığında gösterebilmişlerdir. 1 mg/ml'lik ekstrakt uygulamasında sitotoksik aktivite bakımından en etkili ekstraktlar sırası ile diklormetan > petrol eter > etil asetat > metanol olarak sıralanabilir (Şekil 4.4 c, a, b, d).

## **B- HOECHST 33258 / PROPIDIUM IODIDE (HOPI) BOYAMA SONUCUNDA ELDE EDİLEN APOPTOTİK VE NEKROTİK ETKİ VERİLERİ**

Çalışmamızda sitotoksik aktivitenin yanı sıra, ekstrakt uygulamaları ile HL-60 hücre hattındaki apoptotik ve nekrotik etkiler de Hoechst 33258 / Propidium Iodide boyama yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Denemeden elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

### **1-*Scutellaria orientalis* ssp. *carica* Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Apoptotik ve Nekrotik Etkiler**

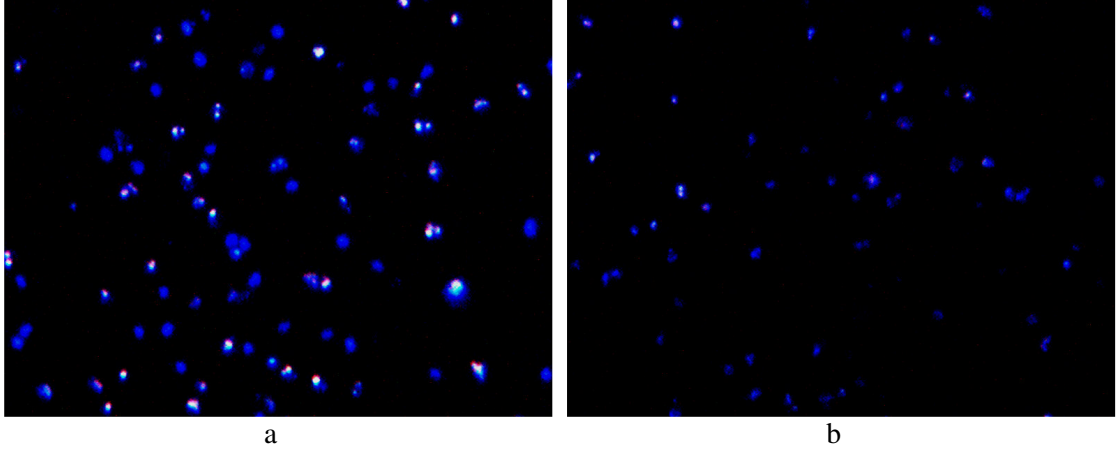
*Scutellaria orientalis* ssp. *carica* bitkisine ait ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen apoptotik ve nekrotik etkiler kontrol ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.5'de yer almaktadır.



Şekil 4.5 *Scutellaria orientalis* ssp. *carica* bitkisine ait metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri

*S.orientalis* ssp. *carica* bitkisinden elde edilen apoptotik ve nekrotik etkinin belirlenebilmesi amacıyla HL-60 hücre hattı üzerinde en kuvvetli sitotoksik aktiviteyi gösteren metanol ekstraktı seçilmiştir. Diğer ekstraktlar metanol ekstraktına göre daha zayıf sitotoksik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle apoptotik etki bakımından denenmemişlerdir. Denenen metanol ekstraktının farklı konsantrasyonları uygulandığında 4 mg/ml'lik ekstrakt 24 ve 48 saatlik uygulamalarda yaklaşık %50 düzeyinde bir apoptotik etki ortaya çıkarmıştır. Aynı konsantrasyonun aynı sürelerde uygulanması ile ortaya çıkan nekrotik etki de yaklaşık %25 düzeyinde olmuştur. 1 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 ve 48 saatlik uygulamaları incelendiğinde hücre ölümünün çok düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Buna karşın 20 mg/ml'lik konsantrasyonun hem 24 saatlik hem de 48 saatlik uygulaması neredeyse hücrelerin tamamının nekrozis ile ölümüne yol açmıştır (Şekil 4.5).

En iyi apoptotik etkinin gözlemlendiği 4 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ilişkin mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.6'da yer almaktadır.

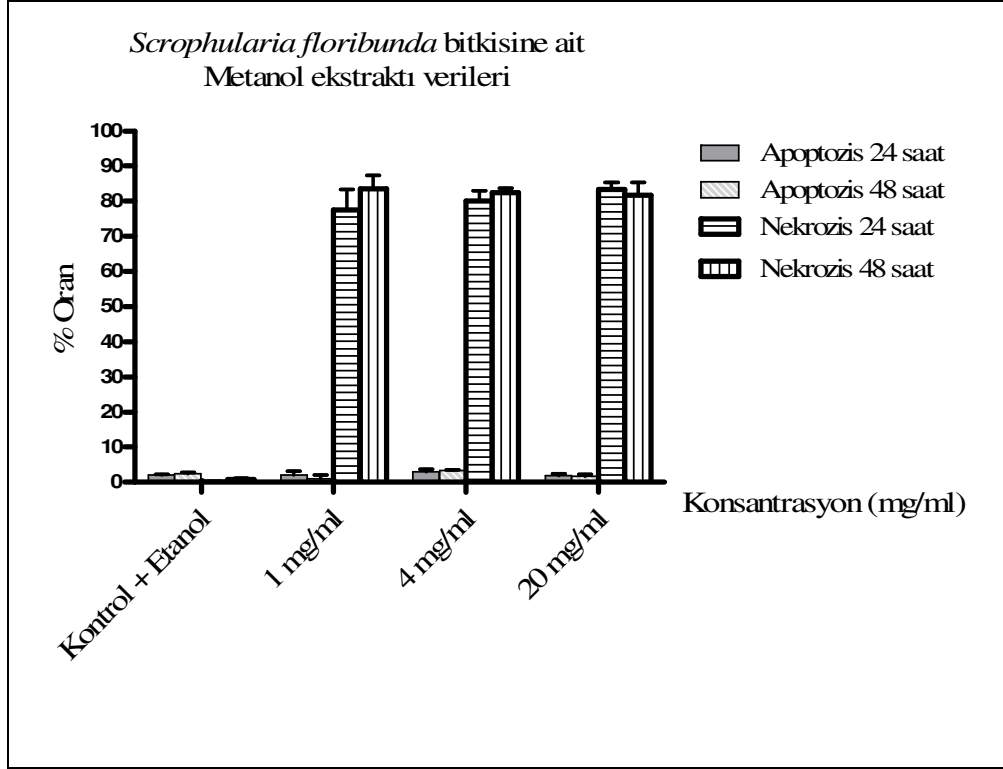


Şekil 4.6 *S.orientalis* ssp. *carica* metanol ekstraktının 4 mg/ml'lik konsantrasyonunun 24 (a) ve 48 (b) saatlik süreler sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

Şekil 4.6'da yer alan fotoğraflarda; mavi renkli ve tam boyanmış hücreler, normal hücreleri; mavi renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler, erken apoptotik hücreleri; mavi-pembe renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler, geç apoptotik hücreleri ve pembe renkli tam boyanmış hücreler de nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

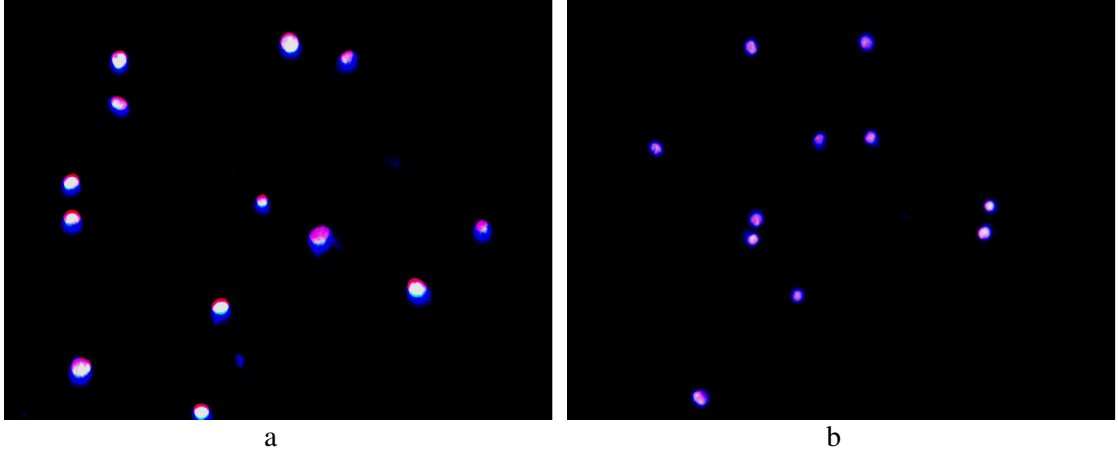
## **2-*Scrophularia floribunda* Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Apoptotik ve Nekrotik Etkiler**

*Scrophularia floribunda* bitkisine ait ekstraktların HL-60 hücre hattına uygulanması sonucu elde edilen apoptotik ve nekrotik etki verileri kontrol ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.7'de yer almaktadır.



Şekil 4.7 *Scrophularia floribunda* bitkisine ait metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri

*S. floribunda* bitkisinden elde edilen veriler incelendiğinde (Şekil 4.7) uygulanan metanol ekstraktının tüm konsantrasyonlarında daha 24'üncü saatte yüksek oranda nekrozisin ortaya çıktığı (%75-80); buna karşın apoptozisin çok düşük kaldığı (%2-4) görülmüştür. 48 saatlik uygulama sonucunda da sonuç değişmemiştir. Nekrotik hücreler yine tüm konsantrasyonlarda yüksek oranda görülmüştür (Şekil 4.7). *S. floribunda'* nın nekrotik etkilerine ait mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.8'de yer almaktadır.



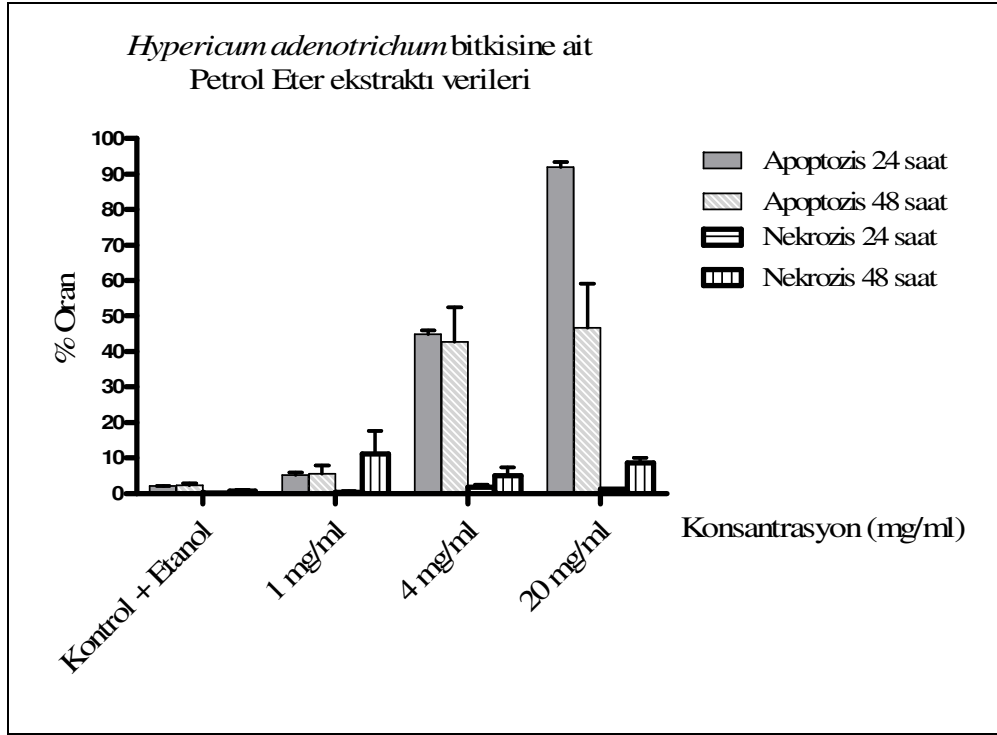
Şekil 4.8 *S. floribunda* metanol ekstraktının 4 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 (a) ve 48 (b) saatlik süreler sonucunda oluşturduğu nekrotik etkiler (Foto:Ali ÖZMEN-2007)

Şekil 4.8'de yer alan fotoğraflarda pembe renkli tam boyanmış hücreler, nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

### **3-*Hypericum adenotrichum* Bitkisine Ait Ekstrakt Uygulamaları Sonucunda HL-60 Hücre Hattından Elde Edilen Apoptotik ve Nekrotik Etkiler**

*H. adenotrichum* bitkisine ait ekstraktların (petrol eter, etil asetat ve diklormetan) HL-60 hücre hattına uygulanması sonucunda elde edilen apoptotik ve nekrotik etki verileri kontrol ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.9, Şekil 4.11 ve 4.13'te yer almaktadır.

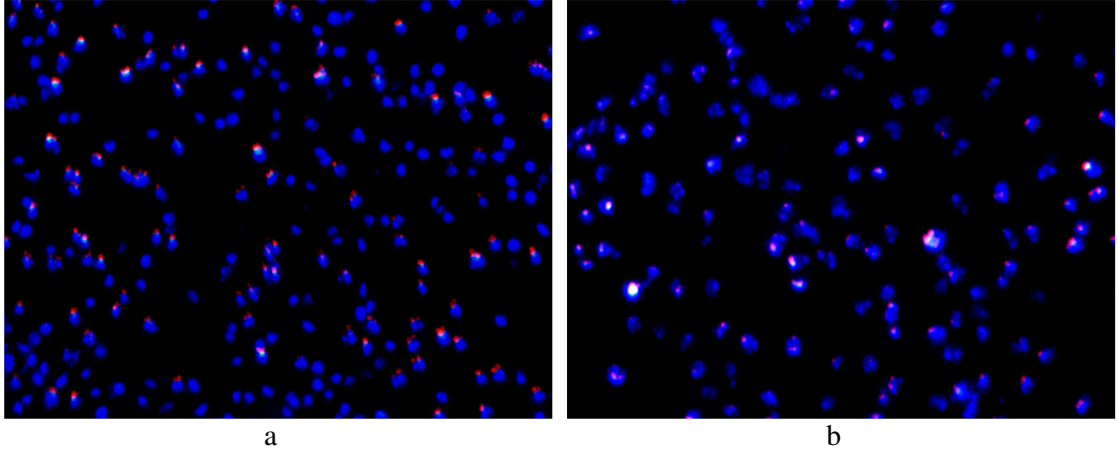




Şekil 4.9 *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait petrol eteri ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri

En iyi apoptotik etki petrol eteri ekstraktına aittir (Şekil 4.9). 20 mg/ml konsantrasyonundaki ekstraktın 24 saatlik uygulaması sonucunda %100'e yakın apoptotik etki gözlenmiştir. Bu apoptotik etkinin yanında nekrotik etki neredeyse hiç gözlenmemiştir. 20 mg/ml'lik konsantrasyonun 48 saat uygulanması sonucunda ise apoptotik etki yaklaşık yarı yarıya düşüş göstermiştir ve bunun yanında nekrotik hücrelerde görülmüştür. 1 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 ve 48 saatlik uygulanması sonucunda çok düşük oranda hücre ölümleri görülmüştür. Buna karşın 4 mg/ml'lik konsantrasyonun hem 24 saat hem de 48 saat uygulanması sonucunda yaklaşık %50 oranında apoptotik etki gözlenmiştir (Şekil 4.9).

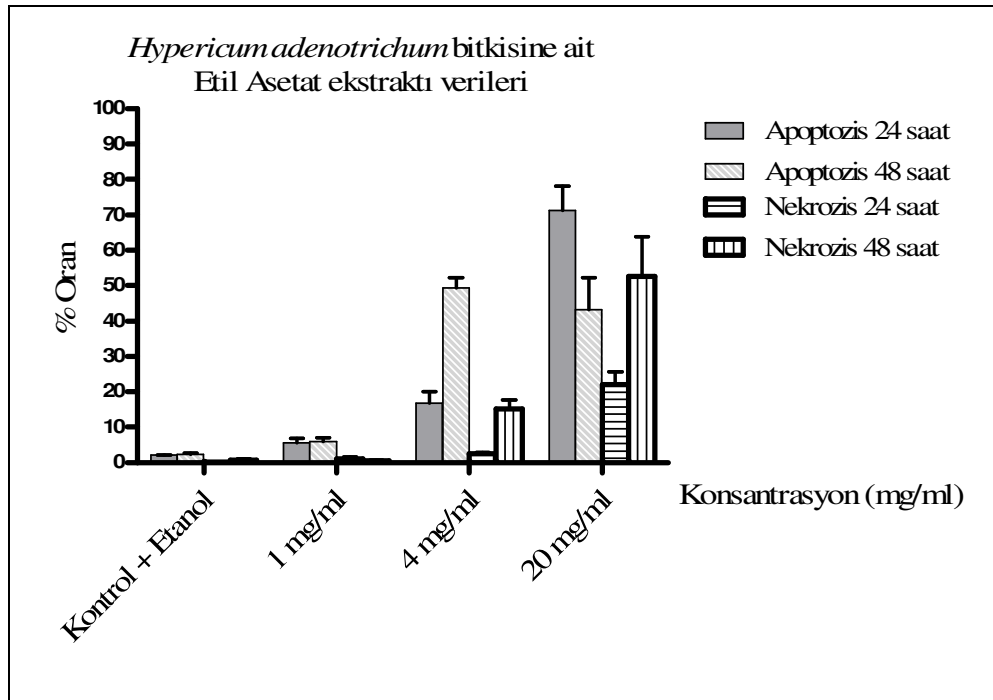
Petrol eteri ekstraktında en iyi apoptotik etkinin gözlendiği 20 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasına ilişkin (b) ve karşılaştırmak amacıyla 4 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasına ilişkin (a) mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.10 a ve b'de yer almaktadır.



Şekil 4.10 *H. adenotrichum* petrol eteri ekstraktının 4 mg/ml (a) ve 20 mg/ml'lik (b) konsantrasyonlarının 24 saatlik süreler sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

Şekil 4.10'da yer alan fotoğraflarda; mavi renkli ve tam boyanmış hücreler normal hücreleri; mavi renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler erken apoptotik hücreleri ve mavi-pembe renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler geç apoptotik hücreleri temsil etmektedir.

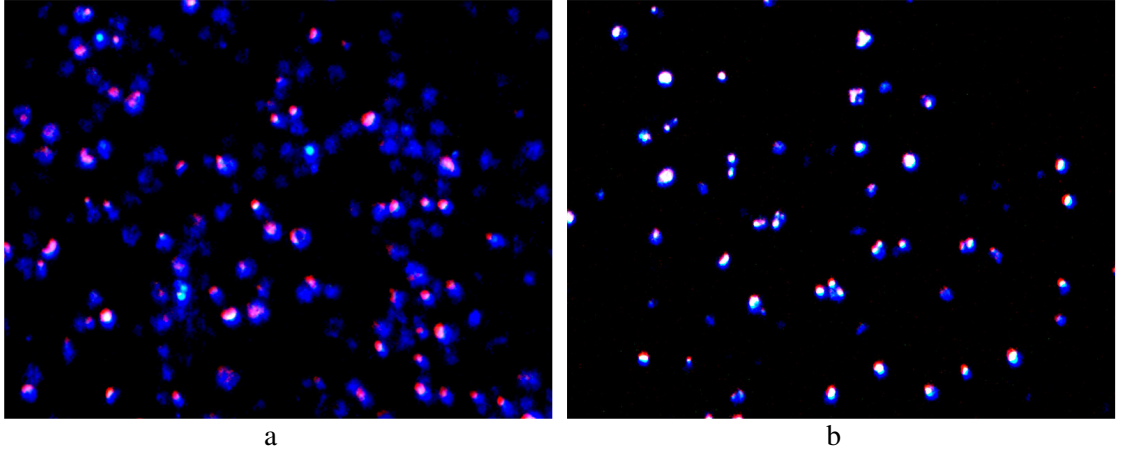
Petrol eteri uygulaması ile oldukça yüksek oranda apoptotik etki gözlenmesine karşın, nekrotik etkinin neredeyse hiç ortaya çıkmamış olması önemlidir.



Şekil 4.11 *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait etil asetat ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri

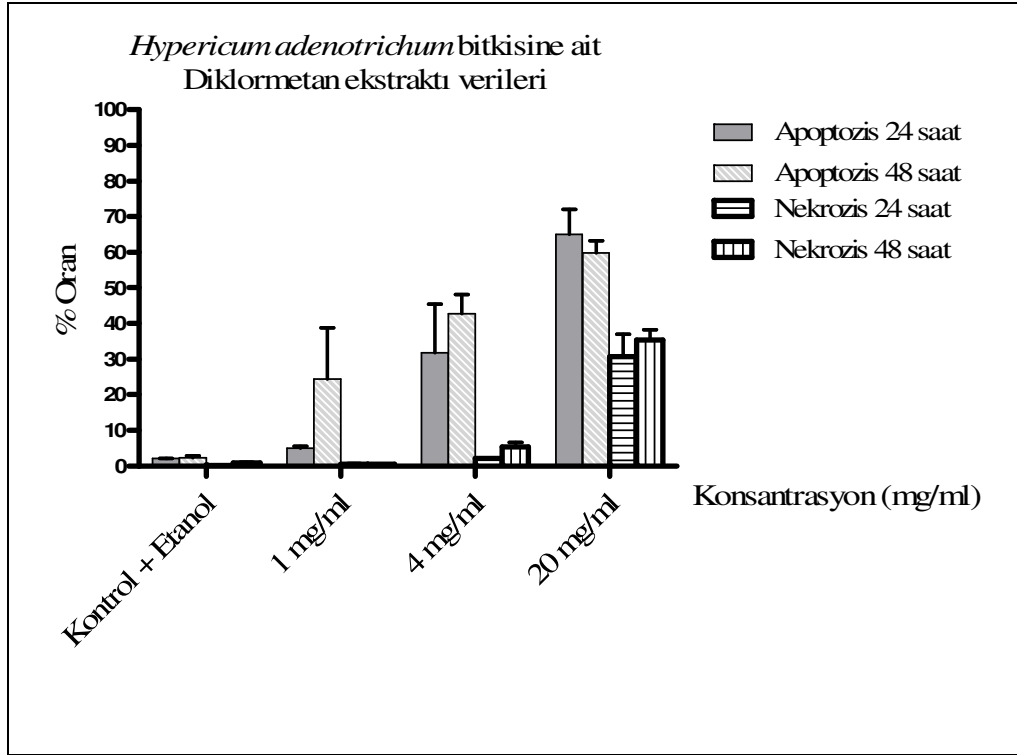
Denemede kullanılan bir başka ekstrakt olan etil asetat ekstraktının HL-60 hücrelerine uygulanması sonucunda konsantrasyon ve uygulama süresi artışına bağlı olarak farklı oranlarda apoptotik ve nekrotik etkinin ortaya çıktığı görülmüştür. 1 mg/ml'lik uygulama konsantrasyonunda hem apoptotik hem de nekrotik etki neredeyse hiç gözlenmemişken, 4 mg/ml'lik uygulamada süre artışı daha fazla nekrotik etkinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. 20 mg/ml'lik uygulamada ise konsantrasyon ve süre artışı apoptotik ve nekrotik etki bakımından yine farklı etkiler yapmıştır. 20 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 saat uygulanması durumunda apoptotik etki artarken, 48 saatlik uygulama sonucunda ise nekrotik etki, apoptotik etkiden daha yüksek oranda ortaya çıkmıştır.

Etil asetat ekstraktında apoptotik etkinin en iyi gözlemlendiği 20 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 saatlik (a) ve 48 saatlik (b) uygulamasına ilişkin mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.12'de yer almaktadır.



Şekil 4.12 *H. adenotrichum* etil asetat ekstraktının 20 mg/ml'lik konsantrasyonunun 24 (a) ve 48 (b) saatlik süreler sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

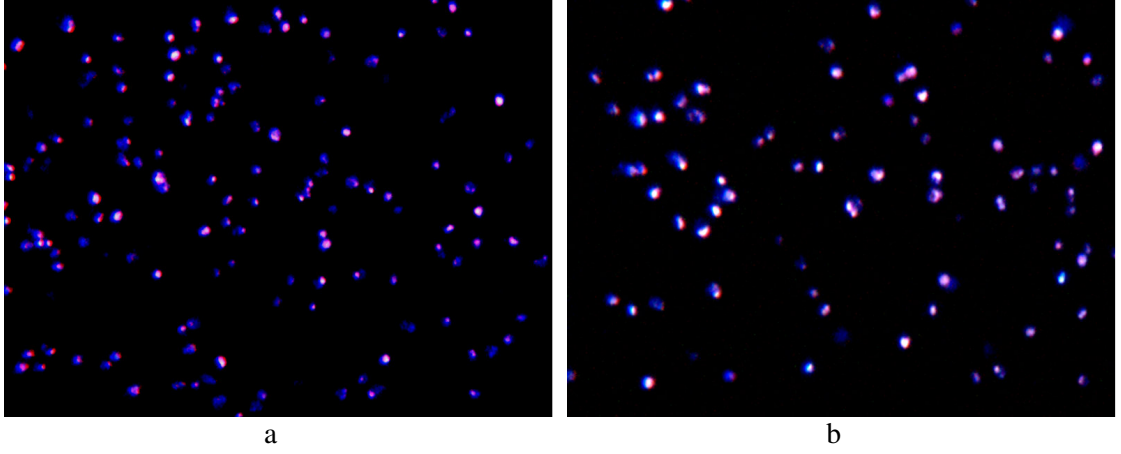
Şekil 4.12'de yer alan fotoğraflarda; mavi renkli ve tam boyanmış hücreler normal hücreleri; mavi renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler erken apoptotik hücreleri; mavi-pembe renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler, geç apoptotik hücreleri ve pembe renkli tam boyanmış hücreler de nekrotik hücreleri temsil etmektedir.



Şekil 4.13 *Hypericum adenotrichum* bitkisine ait diklormetan ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1, 4 ve 20 mg/ml) ve alkol içeren kontrol grubunun apoptotik ve nekrotik etkileri

Denemede kullanılan bir diğer ekstrakt olan diklormetan ekstraktının HL-60 hücrelerine uygulanması sonucunda konsantrasyon ve uygulama süresi artışına bağlı olarak farklı oranlarda apoptotik ve nekrotik etkinin ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 4.13). Apoptotik etki konsantrasyon artışına paralel olarak artış göstermiştir. 1 mg/ml'lik konsantrasyonun uygulanması sonucunda ancak 48'inci saatin sonunda yaklaşık %30 oranında apoptotik etki görülmüştür. 4 mg/ml'lik konsantrasyonun uygulanması sonucunda ise apoptotik etki artmıştır ve düşük oranda da olsa nekrotik etki gözlenmiştir. Diklormetan ekstraktında en iyi apoptotik etki 20 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 saatlik uygulanması sonucunda gözlenmiştir (yaklaşık %70). Yine aynı konsantrasyonun aynı sürede uygulanması sonucunda yaklaşık %30 oranında nekrotik etki de ortaya çıkmıştır.

Diklormetan ekstraktında apoptotik etkinin en iyi gözlendiği 20 mg/ml'lik konsantrasyonun 24 (a) ve 48 (b) saatlik uygulamasına ilişkin mikroskopik fotoğraflar Şekil 4.14'de yer almaktadır.



Şekil 4.14 *H. adenotrichum* diklormetan ekstraktının 20 mg/ml'lik konsantrasyonunun 24 (a) ve 48 (b) saatlik süreler sonucunda oluşturduğu apoptotik ve nekrotik etkiler [ M.B. 10x10 (Foto: Ali ÖZMEN-2007)]

Şekil 4.14'de yer alan fotoğraflarda; mavi renkli ve tam boyanmış hücreler, normal hücreleri; mavi renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler, erken apoptotik hücreleri; mavi-pembe renkli ve parçalı (apoptotik cisimcikler) boyanmış hücreler, geç apoptotik hücreleri ve pembe renkli tam boyanmış hücreler de nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

## V-TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki kimyasalları, kronik birçok hastalığın riskini azaltan ve bitkinin çeşitli kısımlarından elde edilebilen biyolojik olarak aktif bitki bileşikleri olarak tanımlanmaktadır. Bitki kimyasalları farklı yönlerde etkilerde bulunarak anti-kanser veya anti-tümör aktivite gösterebilmektedirler. Bitkilerde bulunan fitokimyasallardan özellikle alkaloidler ve fenolik bileşikler anti-kanser veya anti-tümör aktivite açısından ön plana çıkmaktadır. Bitki kimyasallarının etki mekanizmaları, hücre kültürleri ve moleküler hedefler düzeyinde (reseptörler, reseptör proteinleri, matriks proteinleri, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri vb. gibi) araştırılabilmektedir. Özellikle sitotoksikite görüntüleme modelleri (kanser hücre kültürleri gibi), anti-kanser ve sitotoksik özelliklere sahip olan bitkisel ekstraktların seçimi için başlangıç verilerini sağlamaktadırlar (Itharat *et al.*, 2004).

Bu çalışmada toplam 4 adet endemik bitki türünün (*Crocus olivieri* ssp. *balansae*, *Scutellaria orientalis* ssp. *carica*, *Scrophularia floribunda*, *Hypericum adenotrichum*) petrol eteri, etil asetat, diklormetan ve metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonları (0.5, 1, 4, 20 ve 40 mg/ml) bir lösemi hücre hattı olan HL-60 hücreleri üzerindeki bölünmeyi engelleyici (sitotoksik) aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca, deneme sonucunda HL-60 hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite gösteren ekstraktların apoptotik ve nekrotik etkileri de araştırılmıştır. Kullanılan bitkiler taksonomik veya kimyasal olarak herhangi bir ortak özellik taşımamaktadırlar. Çalışma materyali olarak seçilen bitkilerin endemik olması ve bu endemiklere ait yapılan çalışma olmaması ayrıca, yapılan literatür araştırmaları sonucunda bu taksonların içerdikleri kimyasal bileşikler nedeni ile sitotoksik etki gösterebilecekleri düşünüldüğü için, tez materyali olarak seçilmişlerdir.

*Crocus* türleri bakımından ülkemiz oldukça zengindir ve *Crocus sativus* (Safran) en iyi bilinenidir. Safran karakteristik olarak krosin, safranal, pikrokrosin ve krosetin içermektedir (Escribano *et al.*, 1996, Abdullaev *et al.*, 2003). Safranın sahip olduğu bu maddelerin çeşitli kanserlere ait hücrelerin bölünmelerini inhibe ettiği ve crocetin farklı insan kanseri hücre hatlarında DNA, RNA ve protein düzeyinde inhibe edici etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Abdullaev *et al.*, 2003). Ayrıca,

safran kormlarından elde edilen yeni bir glukokonjugatın tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Uygulanan ham korm ekstraktı 100 µg/ml düzeyinde hücrelerin %50'sini inhibe ederken izole edilen bu glukokonjugat 9 µg/ml düzeyinde hücrelerin %50'sini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Escribano *et al.*, 1999 a).

*Crocus* genusuna ait Aydın yöresinde endemik tür olarak bulunan *C. olivieri* ssp. *balansae* bitkisinden farklı yöntemlerle elde edilen ekstraktlar, HL-60 hücre hattı üzerinde zayıf sitotoksik aktivite göstermiştir (Şekil 4.1). *C. olivieri* ssp. *balansae* bitkisinin özellikle etil asetat ve metanol ekstraktlarında doz artışı ile birlikte HL-60 hücrelerinin bölünmelerinde azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Bu her iki ekstrakt tipinde de hücrelerin yaklaşık %50'sini öldüren konsantrasyon ( $I_pC_{50}$ ) 20 mg/ml olmuştur. Yapılan istatistik analiz sonucunda ekstrakt içi ve ekstraktlar arası gözlenen farklılıkların  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu bulunmuştur. Ancak bu verilere rağmen tez kapsamında kullanılan diğer bitkiler ile karşılaştırıldığında, bu bitkiye ait ekstraktların sitotoksik aktivitesinin zayıf kaldığı gözlenmiştir. Safran (*C. sativus*) ekstraktının bazı çalışmalarda kanser hücrelerine karşı sitotoksik olduğu bulunmuştur (Nair ve ark., 1991, Escribano *et al.*, 1996, Abdullaev *et al.*, 2003). Diğer taraftan, Yunanistan endemiği olan üç adet *Crocus* türünün (*C. boryi* ssp. *tournefortii*, *C. boryi* ssp. *boryi* and *C. niveus*) gövde ekstraktları ile yapılmış olan bir çalışmada bu ekstraktların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin bölünmesini doz artışı ile birlikte inhibe ettiği rapor edilmiştir (Chryssanthi *et al.*, 2007). Bizim çalışmamız sonucunda *Crocus*'un HL-60 hücrelerine karşı düşük dozlarda zayıf sitotoksik göstermesine karşın; sitotoksik doz artışı ile paralel artış göstermiştir. Farklı hücre hattı kullanmamıza ve farklı ekstraktlar denememize rağmen bulgularımız literatür bulguları ile paralellik taşımaktadır. Çalışmamızda *C. olivieri* ssp. *balansae*' nin ham ekstraktları kullanılmıştır. Dolayısı ile bitkiden elde edilen ekstraktların kimyasal içerik analizinin yapılmamış olması nedeniyle bu bitkinin içerdiği hangi etken madde nedeni ile bu sitotoksik etkiyi ortaya çıkardığına ilişkin değerlendirme yapılamamıştır.

Ülkemizde halk arasında kaside olarak bilinen *Scutellaria orientalis* kabızlığı önleyici ve kan kesici, yara iyi edici ve kuvvet verici olarak kullanılmaktadır



(Baytop, 1999). Aynı cins içerisinde yer alan *Scutellaria baicalensis* Çin'de tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bitkinin antitümör aktivitesi incelenmiş ve çeşitli hücre hatlarını (akut lösemi, lenfoma ve miyeloma hücre hatları) inhibe ettiği bulunmuştur. Bitkiden elde edilen ekstraktların hücre döngüsünü durdurma ve apoptozise yol açma şeklinde etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bölünmeyi engelleyici etkisinin; mitokondriyal hasar, *Bcl* gen ailesinin düzenlenmesi, CDK inhibitörü olan p27'nin seviyesinin artışı ve *c-myc* onkogeninin seviyesinin azaltılması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bitkinin en etkili antikanser bileşeninin %21 ile baikalin olduğu bulunmuştur (Kumagai *et al.*, 2007). Yapılan bir çalışmada *S. baicalensis* ve *S. rivularis*'den baikalein, viskidulin, wogonin ve skutellarein gibi 17 farklı flavanoid elde edilmiştir (Sonoda *et al.*, 2004).

Bu genusa ait yine Aydın yöresinde endemik bir alttür olan *S. orientalis* ssp. *carica* bitkisinden elde edilen farklı ekstraktlar kullanılmıştır. *S. orientalis* ssp. *carica* bitkisinden elde edilmiş olan ekstraktlar HL-60 hücre hattı üzerinde yüksek oranda bölünmeyi engelleyici aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.2). En etkili ekstrakt tipi, hücrelerin yaklaşık %50'sini (%48,63) öldüren 1 mg/ml'lik konsantrasyonuyla metanol ekstraktı olmuştur (Şekil 4.2). Yapılan istatistik analiz sonucunda ekstrakt içi ve ekstraktlar arası gözlenen farklılıkların  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu bulunmuştur. Metanol ekstraktının yanı sıra etil asetat ve diklormetan ekstraktları da 4 mg/ml'lik  $I_pC_{50}$  değerleri ile HL-60 hücre hattı üzerinde bölünmeyi engelleyici aktivite göstermişlerdir. Bu bitkiden elde edilen farklı ekstrakt tipleri etki düzeylerine göre metanol > etil asetat > diklormetan > petrol eter ekstraktı olarak sıralanabilir. Kullanılan çözücülerin polariteleri göz önünde bulundurulduğunda, bu bitkiden elde edilen ekstraktlar içerisinde sitotoksik aktiviteden sorumlu olan molekülün polar olabileceği düşünülmektedir. Metanol polar bir çözücü olduğu için, bitkide bulunan etkili bileşiklerin de polar özellik taşıması gerektiği ortaya çıkmaktadır; çünkü polar bileşikler polar çözücüler içerisinde çözünürken, apolar bileşikler apolar çözücüler içerisinde çözünmektedir (Hanson, 2005). Bu cinse ait başka bir tür olan *S. barbata*'nın HL-60 hücre hattında siklinler (cyclin A, D1, D2, D3 ve E) ve sikline bağlı kinazlar düzeyinde etkili olduğu ve apoptozise yol açtığı bildirilmiştir (Kim *et al.*, 2007). Yapılan bir çalışmada, *S. baicalensis*'den elde edilen ekstraktlar iki adet

prostat kanseri hücre hattına (LNCaP ve PC-3) karşı denenmiş ve siklooksijenaz-2 (COX-2), prostaglandin E2 (PGE2) ve siklinler ile sikline bağlı kinazların metabolik yolları üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Sonuçta, bu bitkinin prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni bir antikanser ajan olabileceği bildirilmiştir (Ye *et al.*, 2007). Bunun dışında *S. baicalensis* ve *S. rivularis*'den elde edilen 17 flavanoidden baikalein, viskidulin, wogonin ve skutellarein gibi 10 tanesinin HL-60 hücre hattının büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Sonoda *et al.*, 2004). *S. orientalis* ssp. *carica* bitkisinin ekstraktlarından elde edilen sonuçlar *Scutellaria* cinsinde sınıflandırılan başka bitkilere ait daha önceden rapor edilmiş ve HL-60 hücre hattı üzerinde görülen sitotoksik etkiler ile örtüşmektedir. Bitkiden elde edilen ekstraktların kimyasal içerik analizinin yapılmamış olması nedeniyle bu bitkinin içerdiği hangi etken madde nedeni ile bu sitotoksik etkiyi ortaya çıkardığına ilişkin değerlendirme yapılmamıştır.

Tez çalışması kapsamında araştırılan bir diğer bitki yine Aydın yöresinde endemik olarak yayılış gösteren *Scrophularia floribunda*'dır. *Scrophularia* türleri çok uzun zamandır özellikle Çin'de halk arasında tümörlerin ve yangı'nın (inflamasyon) tedavisinde kullanılmaktadır (Galindez *et al.*, 2002 ). *Scrophularia* türlerinin iridoid, fenilpropanoid, fenolik asitler, flavonoidler ve saponinler gibi sekonder metabolitleri içerdiği bilinmektedir. Bu bitkinin tıbbi etkinliğini içerdiği iridoidlerin sağladığı düşünülmektedir. Bu türlerden iridoid, fenilpropanoid ve iridoid glikozit gibi etkili maddeler izole edilmiştir (Galindez *et al.*, 2002, Nguyen *et al.*, 2005 ). Bu bileşiklerin koleretik (safra akımını sağlama), damar açıcı, antiviral ve antimikrobiyal gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu daha önce belirlenmiştir (Galindez *et al.*, 2002). *S. floribunda* bitkisinden elde edilen bütün ekstrakt tiplerinin HL-60 hücre hattı üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Şekil 4.3). Ancak ekstraktların etki düzeyleri değişiklik göstermektedir. En etkili ekstrakt tipinin 1 mg/ml'lik konsantrasyonu ile hücrelerin %50'den fazlasını (%58,85) öldüren metanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Yapılan istatistik analiz sonucunda ekstrakt içi ve ekstraktlar arası gözlenen farklılıkların  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu bulunmuştur. Bu bitkiden elde edilen farklı ekstrakt tiplerinin sitotoksik aktivite için en etkili olanlar metanol > diklormetan > etil asetat > petrol

eter ekstraktı olarak sıralanabilir. Metanol polar bir çözücü olduğu için, bitkide bulunan etkili bileşiklerin de polar özellik taşıması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Çalışmada elde ettiğimiz sitotoksikite verileri Nguyen *et al.*(2005) çalışmasından elde edilen veriler ile desteklenmektedir. Farklı hücre hattı ve farklı ekstraktlar olmasına rağmen bulgularımız, literatür bulguları ile paralellik taşımaktadır. Nguyen *et al.*(2005) tarafından yapılan çalışmada *S. ningpoensis* Hemsl. türünün köklerinden elde edilen oleanonik asit ve ursolonik asitin, MCF7 (meme kanseri), K562 (lösemi) ve A549 (akciğer kanseri) gibi insan kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (Nguyen *et al.*, 2005). Tez kapsamında *S. floribunda* ekstraktlarının kimyasal içerik analizinin yapılmamış olması nedeniyle bu bitkinin içerdiği hangi etken madde nedeni ile bu sitotoksik etkiyi ortaya çıkardığına ilişkin değerlendirme yapılmamıştır.

Yine Aydın yöresinde endemik olarak yayılış gösteren *Hypericum adenotrichum*' a ait ekstraktların da HL-60 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. *Hypericum* cinsi dünyanın çeşitli yerlerinde geleneksel tedavide kullanılan türler içermektedir. Bu türlerden antifungal, antibakteriyel ve antikanser bileşikler elde edilmiştir. Bunlar polisiklik kuinonlar (hiperisin gibi), flavonoidler, floroglukinol türevleri ve ksantonlar gibi fenolik bileşiklerdir. Bunların içerisinde hiperisin gibi polisiklik kuinonlar tümörler ve virüsler üzerindeki kuvvetli etkilerinden dolayı önemli maddeler olarak değerlendirilmişlerdir (Ferraz *et al.*, 2005). *Hypericum adenotrichum*'un kimyasal analizi yapıldığında %38 oranında germakren D ve bunun dışında 45 bileşik içerdiği bulunmuştur (Erken ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada *Hypericum adenotrichum*'un ekstraktının içerik olarak *Hypericum perforatum*'a çok benzediği bulunmuştur. *Hypericum* ait 74 taksonun fitokimyasal profilinin çıkarıldığı çalışmada; analizler rutin, hiperosid, isoquersetin, quersitrin, quersetin, amentoflavon, hiperisin, psödohiperisin ve hiperforin gibi standart bileşikler kullanılarak yapılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda *Hypericum adenotrichum*'un hiperisin içermediği ancak psödohiperisin ve amentoflavon içerdiği ortaya konmuştur (Crockett *et al.*, 2005).

Tez çalışması sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde *Hypericum adenotrichum*'dan elde edilen ekstraktların çalışılan bitkilerin arasında HL-60

hücrelerinin bölünmesi üzerinde en kuvvetli engelleyici etkiye sahip ekstraktlar olduğu belirlenmiştir. Bitkiden elde edilen bütün ekstraktlar yüksek oranda sitotoksik aktivite göstermişlerdir (Şekil 4.4). En etkili ekstrakt tipi, 0.5 mg/ml'lik konsantrasyonunda hücrelerin %31,2'sini öldüren diklormetan ekstraktı olmuştur (Şekil 4.4). Yapılan istatistik analiz sonucunda ekstrakt içi ve ekstraktlar arası gözlenen farklılıkların  $p < 0,05$  seviyesinde önemli olduğu bulunmuştur. Diklormetan ekstraktının yanı sıra petrol eteri ve etil asetat ekstraktları da 1 mg/ml'lik  $I_pC_{50}$  değerleri ile HL-60 hücre hattı üzerinde yüksek oranda sitotoksik aktivite göstermişlerdir. Bu bitkiden elde edilen farklı ekstrakt tipleri sitotoksik aktivitede etki düzeylerine göre diklormetan > petrol eter > etil asetat > metanol olarak sıralanabilir. Diklormetan polaritesi düşük bir çözücü olduğu için, bitkide bulunan etkili bileşiklerin apolar özellik taşıması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Tez kapsamında *H. adenotrichum*' un kimyasal içerik analizinin yapılmamış olması nedeniyle bu bitkinin içerdiği hangi etken madde nedeni ile bu sitotoksik etkiyi ortaya çıkardığına ilişkin değerlendirme yapılmamıştır.

Çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler cinsin başka türleri ile farklı hücre hatları üzerinde yapılmış çalışmalardan elde edilen sitotoksik bulguları ile uygunluk göstermektedir. *H. perforatum*'undan elde edilen hiperisinlerin (hiperisin, psödohiperisin) T24 ve NBT-II mesane kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Skalkos *et al.*, 2005). Güney Brezilya'da yetişen 6 *Hypericum* türünün antikanser aktivitesi HT-29 kolon kanseri ve H-460 akciğer kanseri hücre hatlarında çalışılmıştır ve bunlardan 3 türün (*H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* ve *H. ternum*) etkili olduğu bulunmuştur (Ferraz *et al.*, 2005). *H. hookerianum*'dan elde edilen bileşikler üç insan kanser hücre hattı; MCF-7 (meme kanser), NCI-H460 (akciğer kanseri) ve SF-268 (glioblastoma) üzerinde denenmiştir. Bitkiden elde edilen iki adet bileşiğin (4-hidroksi-3-metoksifenil ferulat ve 3 $\beta$ -O-caffeolbetulinik asit) tüm hücre hatlarında etkili bulunduğu rapor edilmiştir (Wilairat *et al.*, 2005).

Sitotoksik aktiviteye sahip bitkisel ekstrakt veya etkili maddelerin en önemli özelliklerinden birisi kanserli hücrelerin ölümüne yol açmasıdır. Bir hücrenin ölümüne sebep olan iki yol bulunmaktadır. Bunlar apoptozis ve nekrozistir (Şekil 3.5).

Apoptozis, bugüne kadar bilinen tek tip hücre ölümü olan nekrozdan oldukça farklıdır. Nekrozda, akut hücre hasarını takiben hücre ve organellerinin şişip lize uğradığı pasif ve patolojik bir hücre ölümü söz konusudur. Nekroz, dış etki ile koruyucu mekanizmaların devreye girmesine fırsat vermeyecek şekilde gelişmektedir. Nekrozda zarar gören esas hedef organel, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondridir. Hücresel ATP dengesi ve enerji birikiminin bozulması gibi durumlarda hücre artık membran geçirgenliğini muhafaza edememekte ve nekrozis ile ölmektedir (Huettenbrenner *et al.*, 2003). Nekroz sırasında hücrenin su alarak şişmesi ve patlaması sonucunda ortama hücre içeriğindeki moleküllerin çıkması, inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. Apoptozis ise nekrozdan farklı olarak aktif işlev gerektiren genetik kontrollü bir süreçtir. Apoptozis sırasında hücre büzülerek 1 saatten kısa bir sürede hacminin %30'unu kaybetmektedir. Mitokondri morfolojik olarak sağlamdır, ancak burada esas hasar alan organel, hücre çekirdeğidir. Nukleusta kromatin yoğunlaşmakta ve DNA parçalanmaktadır. Bu DNA parçaları hücre zarı ile kaplıdır (apoptotik cisimcikler) ve ortamdaki çevredeki hücrelerin fagositoz etkinliği ile uzaklaştırılmaktadırlar. Apoptozis sırasında hücre içeriği ortama çıkmadığından inflamatuvar bir yanıt gelişmemektedir (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu, 2002). Bu nedenle kanser tedavilerinde apoptotik etki gösteren bileşikler dikkate alınmaktadır. Kansere karşı kullanılan ilaçların çoğu doza bağımlı bir şekilde apoptotik etki göstermektedirler. Böylece hastalarda herhangi bir patolojik etkiye yol açmadan kanserli hücrelerin ölümüne neden olmaktadır.

Çalışmamızda sitotoksik aktivite gösteren bitkisel ekstraktların HL-60 hücre hattındaki apoptotik ve nekrotik etkileri de araştırılmıştır. Bu amaçla, HL-60 hücreleri üzerinde en fazla sitotoksik etki gösteren bitkilerin, en etkili ekstraktları ve konsantrasyonları seçilmiştir (Çizelge 3.5). Apoptotik ve nekrotik etkinin belirlenmesinde Hoechst 33258 / Propidium Iodide boyama yöntemi kullanılmıştır. *Crocus olivieri* ssp *balansae* bitkisinden elde edilen ekstraktlar zayıf sitotoksik etki göstermeleri nedeniyle apoptotik ve nekrotik etki bakımından deneme dışı bırakılmıştır.

HL-60 hücre hattı üzerinde güçlü sitotoksik aktivite gösteren *S. orientalis* ssp. *carica*'dan elde edilen metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki (1, 4 ve 20

mg/ml) apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır. Denenen konsantrasyonlar içerisinde 4 mg/ml'lik metanol ekstraktının 24 ve 48 saatlik uygulamalarında apoptotik etki (yaklaşık %50) yanı sıra nekrotik etki de (yaklaşık %25) gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Kumagai *et al.* (2007) tarafından, *S. baicalensis*'den elde edilen etkili bileşiklerin (%21 baicalin) hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozise yol açmak şeklinde etkisini gösterdiği rapor edilmiştir. Hücre bölünmesini engelleyici etkisinin; mitokondriyal hasar, *Bcl* gen ailesinin düzenlenmesi, CDK inhibitörü olan p27'nin seviyesinin artışı ve *c-myc* onkogeninin seviyesinin azaltılması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kumagai *et al.*, 2007). Diğer taraftan *S. barbata*'nın insan akciğer kanseri hücre hattı (A549) ve ovaryum kanseri hücre hattında apoptozise neden olduğu ve hücrede toksik etkiler gösterdiği de rapor edilmiştir (Powell *et al.*, 2003, Yin *et al.*, 2004). Bizim bulgularımızda *Scutellaria* cinsine ait başka türlere ilişkin çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. Kanser tedavilerinde apoptotik etki gösteren bileşiklerin dikkate alınması nedeniyle bu bitkinin metanol ekstraktından elde edilen yaklaşık %50 oranındaki apoptotik etkinin önemli olduğu ve bitkinin antikanser bileşik bakımından araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Çalışmamızda, endemik bitkinin ham ekstraktları kullanılmıştır. Bitkiden elde edilen ekstraktların kimyasal içerik analizinin yapılmamış olması nedeniyle bu bitkinin içerdiği hangi etken madde nedeni ile bu apoptotik etkiyi ortaya çıkardığına ilişkin değerlendirme yapılamamıştır.

*S. floribunda* bitkisinden elde edilen ekstraktların da HL-60 hücre hattı üzerinde apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde (Şekil 4.7) uygulanan tüm ekstrakt konsantrasyonlarının daha 24'üncü saatte yüksek oranlarda (%75-80) nekrozise yol açtığı buna karşın çok düşük düzeylerde apoptotik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kanser tedavilerinde apoptotik etki gösteren bileşikler dikkate alınmaktadır ve nekroz sırasında hücrenin su alarak şişmesi ve patlaması sonucunda ortama hücre içeriğindeki moleküllerin çıkması, inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. *S. floribunda* iyi düzeyde sitotoksik etki göstermiştir ancak, bu sitotoksik etkiye yüksek oranlarda nekrozis ile sebep olmuştur. Bu nedenle tez kapsamında çalışılmış olan bu endemik bitki antikanser ajan olarak dikkate alınmamıştır.

*H. adenotrichum* bitkisi ile yapılan sitotoksik aktivite değerlendirmesi sonucunda 3 farklı ekstrakt tipinin (petrol eteri, diklormetan ve etil asetat) sitotoksik aktivitelerinin birbirlerine çok yakın olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle her 3 ekstrakt tipinin de ayrı ayrı apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır (Şekiller 4.9, 4.11, 4.13). Deneme sonucunda en iyi apoptotik etkinin petrol eter ekstraktına ait olduğu bulunmuştur. Petrol eteri ekstraktının 4 mg/ml konsantrasyonunun 24 ve 48 saatlik uygulamaları sonucunda yaklaşık %50 oranında apoptotik etkiye yol açtığı gözlenmiştir. 20 mg/ml konsantrasyonunda ise 24 saatlik uygulama %100'e yakın oranda apoptotik etkinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu apoptotik etkinin yanı sıra nekrotik etki ise neredeyse hiç gözlenmemiştir (Şekil 4.9). Buna karşın etil asetat (Şekil 4.11) ve diklormetan (Şekil 4.13) ekstraktlarında düşük apoptotik etki yanında nekrotik etkinin de ortaya çıktığı gözlenmiştir. *Hypericum* türlerinden elde edilen çeşitli maddelerin apoptotik etkiler gösterebileceği, hyperforin ile birlikte hiperisinin sinerjistik etkilerinin K562 ve U937 lösemi hücre hatlarında araştırıldığı Hostanska *et al.* (2003) tarafından bildirilmiştir. Çalışmada apoptotik etki doz artışına bağlı olarak artış göstermiştir. Bunun dışında hyperforinin; U937 hücre hattında kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün; K562 hücre hattında ise kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün aktivitelerini arttırdığı rapor edilmiştir (Hostanska *et al.*, 2003). Bizim bulgularımızda *Hypericum* cinsine ait başka türlere ilişkin çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. Kanser tedavilerinde apoptotik etki gösteren bileşiklerin dikkate alınması nedeniyle bu bitkinin petrol eteri ekstraktından elde edilen yaklaşık %100 oranındaki apoptotik etkinin çok önemli olduğu ve bitkinin antikanser bileşik bakımından mutlaka araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Çalışmamızda, endemik bitkinin ham ekstraktlarının kullanılması nedeni ile bitkiden elde edilen ekstraktların kimyasal içerik analizi yapılmamıştır. Bu nedenle bu bitkinin içerdiği hangi etken madde nedeni ile bu apoptotik etkiyi ortaya çıkardığına ilişkin değerlendirme yapılamamıştır.

Sonuç olarak; sitotoksik aktivitelerinin yanı sıra apoptotik ve nekrotik etkilerinin de belirlenmesi bakımından araştırılmış olan ve Aydın yöresinde yayılış gösteren 4 ayrı endemik bitkiden farklı yöntemlerle elde edilmiş ekstraktlara ilişkin sonuçlar incelendiğinde; *C. olivieri* ssp *balansae* hariç diğer 3 taksonun (*S. orientalis* ssp

*carica*, *S. floribunda* ve *H. adenotrichum* ) hücre bölünmesini engelleyici aktivite bakımından iyi sonuçlar verdiği ortaya konmuştur. Ayrıca, yapılan apoptozis ve nekrozis çalışmaları sonucunda da sadece bir bitkiye ait tek bir ekstrakt tipinin ön plana çıktığı belirlenmiştir. *Hypericum adenotrichum*'dan elde edilen petrol eter ekstraktı (Şekil 4.9) %100'e yakın apoptotik etki göstermiştir. Bitkinin endemik olması ve yüksek oranda apoptotik etki gösteren bileşikler içeriyor olması olasılığı nedeniyle bu bitkinin antikanser ajan açısından araştırılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Bunun yanı sıra *Scutellaria orientalis* ssp. *carica* bitkisinin metanol ekstraktı da iyi düzeyde hem sitotoksik hem de apoptotik (%50) etki göstermiştir. Dolayısı ile bu bitkinin de endemik olması ve apoptotik etki gösteren bileşikler içeriyor olması olasılığı nedeniyle antikanser ajan açısından araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. *Scrophularia floribunda* bitkisine ait metanol ekstraktı ise yüksek oranda nekrotik etki göstermiştir. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere apoptotik etki gösteren bileşiklerin tercih ediliyor olması sebebiyle bu bitkinin antikanser ajan çalışmaları açısından uygun olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak, yinede bu konuda daha ayrıntılı çalışmalar sonucunda kesin bir yargıya varmak gerekmektedir.

Tez kapsamında seçilen endemik bitkiler sitotoksik aktivite bakımından ilk kez bu tez kapsamında araştırılmıştır. Kanser tedavisinde kullanılacak yeni bitkisel kökenli bileşiklerin araştırılmasına ışık tutması bakımından, bu tezden elde edilen veriler sitotoksikite ve antikanser özellik taşıyan bitkilerin belirlenmesine katkıda bulunması nedeniyle önem taşımaktadır. Daha ileri çalışmalarla bitkilerden elde edilen etkili ekstraktlar içerisindeki etken madde grupları veya bileşikler belirlenerek hücre içerisinde hangi mekanizmalarla ve hangi düzeylerde etkinlik gösterdikleri ortaya konmalıdır.



## KAYNAKLAR

Abaza L., Talorete T.P.N., Yamada P. and Kurita Y. 2007. Induction of growth inhibition of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian Gerboi olive leaf extract. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **71** (5); 1306-1312.

Abdullaev F.I., Riveron-Negrete L., Caballero-Ortega H., Hernandez J.M., Perez-Lopez I., Pereda-Miranda R. and Espinosa-Aguirre J.J. 2003. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). **Toxicology in Vitro**, **17**; 731-736.

Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W. and de Witte P.A.M. 2002. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **34**; 221-241.

Balunas M.J. and Kinghorn A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, **78**; 431-441.

Bast R., Kufe D., Pollack R., Weichselbaum R., Holland J. and Frei A. 2000. Cancer Medicine. BC Decker Inc., FifthEdition-Canada.

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=cmed.section.11875>] Erişim tarihi: 23.05.2008

Baytop T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul Üniversitesi Basımevi, No: 3255.

Brian W.R. 2002. Isolation and Structure Elucidation of Cytotoxic Natural Products from Suriname and Madagascar. Virginia polytechnic institute and state university Master tezi. [<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-11182002-213441/unrestricted/Chapter1.pdf>] Erişim tarihi: 23.05.2008

Chen Y.H., Chen H.Y., Hsu C.L. and Yen G.C. 2007. Induction of apoptosis by the *Lactuca indica L.* in human leukemia cell line and its active components. **J. Agric. Food Chem.**, **55**; 1743-1749.

Cheng Y.L., Lee S.C., Lin S.Z., Chang W.L., Chen Y.L., Tsai N.M., Liu Y.C., Tzao C., Yu D.S. and Harn H.J. 2005. Anti-proliferative activity of *Bupleurum scrozonrifolium* in A549 human lung cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, **222** (2); 183-193.

Chinkwo K.A. 2005. *Sutherlandia frutescens* extracts can induce apoptosis in cultured carcinoma cells. **Journal of Ethnopharmacology**, **98**; 163-170.

Chryssanthi D.G., Lamari F.N., Iatrou G., Pylara A., Karamanos N.K. and Cordopatis P. 2007. Inhibition of breast cancer cell proliferation by style constituents of different *Crocus* species. **Anticancer Res.**, **27** (1A); 357-362.

Crockett S.L., Schaneberg B. and Khan I.A. 2005. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. **Phytochemical Analysis**, **16**; 479-485.

Dai S.J., Tao J.Y., Liu K., Jiang Y.T. and Shen L. 2006. *neo*- Clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. **Phytochemistry**, **67**; 1326-1330.

Dai S.J., Wang G.F., Chen M., Liu K. and Shen L. 2007. Five New *neo*-Clerodane Diterpenoid Alkaloids from *Scutellaria barbata* with Cytotoxic Activities. **Chem. Pharm. Bull.**, **55** (8); 1218-1221.

Dell Aica I., Caniato R., Biggin S. and Garbisa S. 2007. Matrix proteases, green tea and St. John's wort: Biomedical research catches up with folk medicine. **Clinica Chimica Acta**, **381**; 69-77.

Dufour D., Pichette A., Mshvildadze V., Bredatte-Hebert M.E., Lavoie S., Longtin A., Laprise C. and Legault J. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer

activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. **Journal of Ethnopharmacology**, **111**; 22-28.

Ekim T., Koyuncu M., Vural M., Duman H., Aytaç Z., Adıgüzel N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Barışcan Ofset-ANKARA.

Erken S., Malyer H., Demirci F., Demirci B. and Baser K.H.C. 2001. Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey-I. **Chemistry of Natural Compounds**, **37** (5); 434-438.

Escribano J., Alonso G.L., Prados M.C. and Fernandez J.A. 1996. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. **Cancer Letters**, **100** (1-2); 23-30.

Escribano J., Diaz-Guerra M.J.M., Riese H.H., Ontanon J., Garcia-Olmo D., Garcia-Olmo D.C., Rubio A. and Fernandez J.A. 1999 a. In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L. **Cancer Letters**, **144**; 107-114.

Escribano J., Rios I. and Fernandez J.A. 1999 b. Isolation and cytotoxic properties of a novel glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). **Biochimica et Biophysica Acta**, **1426**; 217-222.

Ferraz A., Faria D.H., Benneti M.N., da Rocha A.B., Schwartzmann G., Henriques A. and von Poser G.L. 2005. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, **12**; 112-115.

Galindez J. de S., Diaz Lanza A.M. and Fernandez Metallano L. 2002. Biologically Active Substances from the Genus *Scrophularia*. **Pharmaceutical Biology**, **40** (1); 45-59.

Gordaliza M., Garcia J.M., Corral M.D., Castro M.A. and Zurita G. 2004. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicon**, **44**; 441-459.

Graham J.G., Quinn M.L., Fabricant D.S. and Farnsworth N.R. 2000. Plants used against cancer- an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, **73**; 347-377.

Grusch M., Polgar D., Gfatter S., Leuhuber K., Huettenbrenner S., Leisser C., Fuhrmann G., Kassie F., Steinkellner H., Smid K., Peters G.J., Jayaram H.N., Klepal W., Szekeres T., Knasmüller S., and Krupitza G. 2002. Maintenance of ATP favours apoptosis over necrosis triggered by benzamide riboside. **Cell Death and Differentiation**, **9**;169-78.

Hanson B.A. 2005. Understanding medicinal plants: their chemistry and therapeutic action. Haworth Press, USA.

Hostanska K., Reichling J., Bommer S., Weber M. and Saller R. 2003. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, **56**;121-132.

Huettnerbrenner S., Maier S., Leisser C., Polgar D., Strasser S., Grusch M., and Krupitza G. 2003. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. **Mutation Research**, **543**(3); 235-49.

Itharat A., Houghton P.J., Eno-Amooquaye E., Burke P.J., Sampson J.H. and Raman A. 2004. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, **90**; 33-38.

Karp G. 1999. Cell and Molecular Biology. John Wiley, New York-USA.

Kim E.K., Kwon K.B., Han M.J., Song M.Y., Lee J.H., Ko Y.S., Shin B.C., Yu J., Lee Y.R., Ryu D.G., Park J.W. and Park B.H. 2007. Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. **Int. J. Mol.Med.**, **20**(1); 123-8.

Kumagai T., Müller C.I., Desmond J.D., Imai Y., Heber D. and Koeffler H.P. 2007. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: Anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. **Leukemia Research**, **31**; 523-530.

Kültürsay H. ve Kayıkçıoğlu M. 2002. Apotosis ve Kardiyovasküler Hastalıklar. **Anadolu Kardiyoloji Dergisi**, **4**; 323-329.

Lee C.C. and Houghton P. 2005. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**; 237-243.

Li S., Pan M.H., Lai C.S., Lo C.Y., Dushenkov S and Ho C.T. 2007. Isolation and synthesis of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **15**; 3381-3389.

Liu R.H., 2004; "Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action", **J.Nutr.**, **134**; 3479-3485.

Lotufó L.V.C., Khan M.T.H., Ather A., Wilke D.V., Jimenez P.C., Pessoa C., Amaral de Moraes M.E. and Odorico de Moraes M. 2005. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, **99**; 21-30.

Martarelli D., Martarelli B., Pediconi D., Nabissi M.I., Perfumi M. and Pompei P. 2004. *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. **Cancer Letters**, **210**; 27-33.

Motohashi N., Shirataki Y., Kawase M., Tani S., Sakagami H., Satoh K., Kurihara T., Nakashima H., Mucsi I., Varga A. and Molnar J. 2002. Cancer prevention and therapy with kiwifruit in Chinese folklore medicine: a study of kiwifruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, **81**; 357-364.

Nair S.C., Pannikar B. and Pannikar K.R. 1991. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). **Cancer Letters**, (**57**) 2; 109-114.

Nguyen A.T., Fontaine J., Malonne H., Claeys M., Luhmer M. and Duez P. 2005. A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis*. **Phytochemistry**, **66**; 1186-1191.

Ohyama K., Akaike T., Imai M., Toyoda H., Hirobe C. and Bessho T. 2005. Human gastric signet ring carcinoma (KATO-III) cell apoptosis induced by *Vitex agnus-castus* fruit extract through intracellular oxidative stress. **IJBCB**, **37**; 1496-1510.

Okouneva T., Hill B.T., Wilson L. and Jordan M.A. 2003. The Effects of Vinflunine, Vinerolbine, and Vinblastine on Centromere Dynamics. **Molecular Cancer Therapeutics**, **2** (5); 427-436.

Öner C. 2002. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık, Ankara-TÜRKİYE.

Öztürk F. 2002. Apoptoz. **İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, **9**(2); 143-148.

Pillai G.R., Srivastava A.S., Hassanein T.I., Chauhan D.P. and Carrier E. 2004. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. **Cancer Letters**, **208**; 163-170.

Poveda B.M., Quesada A.R., Medina M.A. 2005. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. **European Journal of Pharmacology**, **516**; 97-103.

Powell C.B., Fung P., Jackson J., Dall'Era J., Lewkowicz D., Cohen I. And Smith-McCune K. 2003. Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a chinese herb used for ovarian cancer, induces apoptosis of ovarian cancer cell lines. **Gynecologic Oncology**, **91**; 332-340.

Sandoval M., Okuhama N.N., Clark M., Angeles F.M., Lao J., Bustamante S. and Miller M.J.S. 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, **80**; 121-129.

Schempp C.M., Haarhaus B.S., Termeer C.C. and Simon J.C. 2001. Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. **FEBS Letters**, **493**; 26-30.

Schempp C.M., Kiss J., Kirkin V., Averbek M., Haarhaus B.S., Kremer B., Termeer C.C., Sleeman J. and Simon J.C. 2005. Hyperforin acts as an Angiogenesis Inhibitor in vitro and in vivo. **Planta Med.**, **71**; 999-1004.

Seeram N.P., Adams L.S., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller H.S. and Heber D. 2006. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry and Strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **J. Agric. Food Chem.**, **54**; 9329-9339.

Senthil V., Ramadevi S., Venkatakrishnan V., Giridharan P., Lakshmi B.S., Vishwakarma R.A. and Balakrishnan A. 2007. Withanolide induces apoptosis in HL-60 leukemia cells via mitochondria mediated cytochrome c release and caspase activation. **Chemico-Biological Interactions**, **167**; 19-30.

Sezik E., Yeşilada E., Honda G., Tkaishi Y., Takeda Y. and Tanaka T. 2001. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, **75**; 95-115.

Skalkos D., Stavropoulos N.E., Tsimaris I., Gioti E., Stalikas C.D., Nseyo U.O., Ioachim E. and Agnantis N.J. 2005. The lipophilic extract of *Hypericum perforatum*

exerts significant cytotoxic activity against T24 and NBT-II urinary bladder tumor cells. **Planta Med.**,**71**; 1030-1035.

Skupien K., Oszmianski J., Kostrzewa-Nowak D. and Tarasiuk J. 2006. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL-60 cells. **Cancer Letters**, **236**; 282-291.

Sonoda M., Nishiyama T., Matsukawa Y. and Moriyasu M. 2004. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, **91**; 65-68.

Tai J., Cheung S., Cheah S., Chan E. and Hasman D. 2006. In vitro anti-proliferative and antioxidant studies on Devil's Club *Oplopanax horridus*. **Journal of Ethnopharmacology**, **108**; 228-235.

Tan M.L., Muhammed T., Najimudin N. and Sulaiman S.F. 2005. Growth arrest and non-apoptotic programmed cell death associated with the up-regulation of c-myc mRNA expression in T-47D breast tumor cells following exposure to *Epipremnum pinnatum* (L.) Engl. Hexane extract. **Journal of Ethnopharmacology**, **96**; 375-383.

Thomas T.J., Panikkar B., Subramoniam A., Nair M.K. and Panikkar K.R. 2002. Antitumour property and toxicity of *Barringtonia racemosa* Roxb seed extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, **82**; 223-227.

Türkiye'nin Biyolojik Zenginlikleri. 2005. T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü Kitapçığı, Ankara.

Ulubelen A., Topçu G., Chai H.B. and Pezzuto J.M. 1999. Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from *Salvia hypergeia*. **Pharmaceutical Biology**, **37** (2); 148-151.



Wilairat R., Manosroi J., Manosroi A., Kijjoa A., Nascimento M.S.J., Pinto M., Silva A.M.S., Eaton G. and Herz W. 2005. Cytotoxicities of Xhantones and Cinnamate Esters from *Hypericum hookerianum*. **Planta Med.**, **71**; 680-682.

Xiao H., Pinard P.V., Fuentes N.F., Burd B., Angeletti R., Fiser A., Horwitz S.B. and Orr G.A. 2006. Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. **PNAS**, **27** (103); 10166-10173.

Xu M., Cui J., Fu H., Porksch P., Lin W. and Li M. 2005. Embelin derivatives and their anticancer activity through microtubule disassembly. **Planta Med.**, **71**; 944-948.

Ye F., Jiang S., Volshonok H., Wu J. and Zhang D.Y. 2007. Molecular mechanism of anti-prostate cancer activity of *Scutellaria baicalensis* extract. **Nutr. Cancer**, **57**(1); 100-110.

Yin X., Zhou J., Jie C., Xing D. and Zhang Y. 2004. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549. **Life Sciences**, **75**; 2233-2244.

Yoon H. and Liu R.H. 2007. Effect of selected phytochemicals and apple extracts on NF- $\kappa$ B activation in human breast cancer MCF-7 cells. **J. Agric. Food Chem.**, **55**; 3167-3173.

Zeybek N. ve Zeybek U. 1994. Farmasötik Botanik. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 2. Bornova-İZMİR.

<http://www.turkcancer.org> , Erişim tarihi: 25.05.2008

<http://www.tubitak.gov.tr/tubives/> , Erişim tarihi: 25.05.2008

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı : Ali ÖZMEN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Linz-AVUSTURYA / 20.06.1977

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Balıkesir Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri  
Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı  
Bildiği Yabancı Diller : Almanca, İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Yayınlar

-SCI

- 1- Özmen A. and Sümer Ş. 2004. Cytogenetic effects of kernel extracts from *Melia azedarach* L. **Caryologia**, **57** (3); 290-293.
- 2- Özmen A. and Çelik T.A. 2007. Cytotoxic effects of peel extracts from *Citrus limon* and *Citrus sinensis*. **Caryologia**, **60** (1); 48-51.
- 3- Özmen A., Başbülbul G. and Aydın T. 2007. Antimitotic and antibacterial effects of the *Nigella sativa* L. seed. **Caryologia**, **60** (3); 270-272.

-Diğer

#### b) Bildiriler

-Uluslar arası

-Ulusal

- 1- Azadirachtin'in *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Mitotik Bölünme Üzerine Etkileri. 17.Ulusal Biyoloji Kongresi, Çukurova Üniversitesi, 21-24 Haziran 2004, Adana. Poster bildiri.
- 2- Limonoidlerin Antimitotik Aktivitesinin *Allium Test* ile Belirlenmesi. 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası-AYDIN. Poster bildiri.
- 3- Elektromanyetik Alanın Canlı Sistemler Üzerindeki Etkilerinin *Allium Test* Sistemi ile Araştırılması. 18.Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan

Menderes ÜNİVERSİTESİ, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası-AYDIN.  
Poster bildiri.

c) Katıldığı Projeler

1- Azadirachtin'in *Allium cepa* L. Kök Ucu Meristem Hücrelerinde Mitotik Bölünme Üzerine Etkileri (Yüksek Lisans Tez Projesi)- ADÜ-BAP.

2- Aydın Yöresi'nde Yetişen Bazı Endemik Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi (Doktora Tez Projesi)- ADÜ-BAP.

**İŞ DENEYİMİ**

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Araştırma Görevlisi, 1999-2008  
Adnan Menderes Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

**İLETİŞİM**

E-posta Adresi : aozmen@adu.edu.tr  
Tarih : 26.05.2008