



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI *PAPAVER* ALKALOİDLERİNİN SİTOTOKSİK  
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Recep DEMİRGAN  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman  
Yard. Doç. Dr. Ali KARAGÖZ**

**Şubat, 2009**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAZI *PAPAVER* ALKALOİDLERİNİN SİTOTOKSİK  
AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Recep DEMİRGAN  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman  
Yard. Doç. Dr. Ali KARAGÖZ  
Şubat, 2009**

**İSTANBUL**

Bu çalışma ..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman  
Yrd. Doç. Dr. Ali KARAGÖZ  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Jüri  
Prof.Dr. Güler TEMİZKAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Jüri  
Prof.Dr. Avni KURU  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Jüri  
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Jüri  
Prof.Dr. Nezhun GÖREN  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin T-41/05122006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Tez çalışmam boyunca, bilimsel görüşleri, manevi desteği ve büyük emeği ile beni aydınlatan değerli hocam, Sayın Yard. Doç. Dr. Ali KARAGÖZ'e en derin teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tezimde kullanılan alkaloidleri temin ettiğimiz İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilimdalı'ndan Prof.Dr. Günay SARIYAR, Prof.Dr. Afife MAT ve Araş. Gör. Çağlayan ÜNSAL' a en derin teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında her türlü destek ve yardımlarıyla katkıda bulunan Araş. Gör. Özlem EROL DAYI, Araş. Gör. Evren ÖNAY hocalarıma Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyelerine, bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen, laboratuvarımızda çalışan bütün araştırmacı arkadaşlarıma, ayrıca Araş. Gör. Murat PEKMEZ'e, en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan ve hep yanımda görmek istediğim Aysun ÖNER'e ve kadim dostum Çağlayan TOP'a teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek lisans öğrenimim süresince bana gösterdikleri anlayış, maddi ve manevi destekleri için sevgili annem Zehra DEMİRGAN'a, sevgili babam Galip DEMİRGAN'a ve tüm aileme en içten dileklerle teşekkür ederim.

**Şubat, 2009**

**Recep DEMİRGAN**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
ÖZET.....	viii
SUMMARY .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	4
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	18
3.1.BİTKİSEL MATERYAL.....	18
3.1.1. Alkaloidlerin Bitkilerden Saf Halde Elde Edilmesi .....	19
3.1.1.1. Tersiyer Alkaloidlerin Tüketilmesi ve Ayrılması.....	20
3.1.1.2. Katerner Alkaloidlerin Tüketilmesi ve Ayrılması.....	20
3.1.2. Saf alkaloidlerin stoklarının hazırlanması.....	21
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	21
3.2.1. Hücre Kültürlerinin Devamlılığının Sağlanması .....	22
3.3. ALKALOİDLERİN Vero ve HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	23
3.3.1. Hücre Çoğalma Eğrisi.....	23
3.3.2. Hücre Canlılık Testi.....	24
3.3.2.1. Tripa Blue Exclusion Yöntemi (TBE Yöntemi) .....	25
3.3.2.2. Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi (MTT Yöntemi).....	25

<b>4. BULGULAR</b> .....	27
<b>4.1. HÜCRE ÇOĞALMA EĞRİSİ</b> .....	27
<b>4.2. ALKALOİDLERİN Vero ve HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ</b> .....	29
<b>4.2.1. Sitotoksikite Testleri</b> .....	29
4.2.1.1. <i>Hücre Canlılık Testi</i> .....	29
4.2.1.2. <i>Tripan Blue Exclusion Yöntemi ve MTT Yönteminin Karşılaştırılması</i> .....	29
<b>4.3. SAF ALKALOİDLERİN <i>IN VITRO</i> SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN MTT YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ</b> ....	30
<b>4.4. ALKALOİDLERİN SD<sub>50</sub> DEĞERLERİ</b> .....	45
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	47
<b>KAYNAKLAR</b> .....	54
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	62

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1** : Friedrich Sertürner tarafından 1805 yılında ilk izole edilen alkaloid olan morfinin kimyasal yapısı.....**8**
- Şekil 2.2** : Antikanser ajan olarak kullanılan iki önemli alkaloidin (vinblastin ve vinkristin) kimyasal yapısı.....**11**
- Şekil 2.3** :*Papaver cinsi türlerinden izole edilen Papaverin alkaloidinin kimyasal yapısı* .....**13**
- Şekil 2.4** : *In vitro* sitotoksik aktivite potansiyelleri çalışılan 13 alkaloidin (a- amurin, b- armepavin, c- berberin, d- izokoridin, e- izotebain, f- makrantin g-mekambrin, h- mekambridin, ı- narkotin, j- orientalidin, k- oripavin, l- salutaridin, m- tebain) kimyasal yapısı .....**14**
- Şekil 3.1** :*Papaver somniferum* var. *Giganteum* (haşhaş) bitkisinin genel görünümü ....**19**
- Şekil 3.2** :Tek tabaka halinde çoğalma gösteren Vero hücrelerinin 3 günlük kültürü .....**22**
- Şekil 3.3** :Tek tabaka halinde çoğalma gösteren HeLa hücrelerinin 3 günlük kültürü .....**22**
- Şekil 3.4** :MTT yöntemi sonucu ortaya çıkan renk değişimleri .....**25**
- Şekil 4.1** : $10^5$  hücre/ml ile başlatılan kültürlerde canlı HeLa hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuş yarı-logaritmik çoğalma eğrisi.....**28**
- Şekil 4.2** : $5 \times 10^4$  hücre/ml ile başlatılan kültürlerde canlı Vero hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuş yarı-logaritmik çoğalma eğrisi.....**28**
- Şekil 4.3** :Vero hücrelerinde amurin alkaloidinin değişik konsantrasyonlarının MTT ve TBE yöntemi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.....**29**
- Şekil 4.4** :HeLa hücrelerinde amurin alkaloidinin değişik konsantrasyonlarının MTT ve TBE yöntemi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması .....**30**
- Şekil 4.5** :*In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine amurin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....**31**



<b>Şekil 4.6</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine arnepavin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....32
<b>Şekil 4.7</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine berberin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....33
<b>Şekil 4.8</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine izokoridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....34
<b>Şekil 4.9</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine izotebain alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....35
<b>Şekil 4.10</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine makrantin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....36
<b>Şekil 4.11</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine mekambrin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....37
<b>Şekil 4.12</b>	: <i>In vitro</i> Vero hücreleri üzerine mekambridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....38
<b>Şekil 4.13</b>	: <i>In vitro</i> HeLa hücreleri üzerine mekambridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....39
<b>Şekil 4.14</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine narkotin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....40
<b>Şekil 4.15</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine orientalidin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....41
<b>Şekil 4.16</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine oripavin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi .....42
<b>Şekil 4.17</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine salutaridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....43
<b>Şekil 4.18</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine tebain alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi.....44

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b>	:Endüstride kullanılan bitkisel kökenli doğal ürünlerden bazıları.....	<b>4</b>
<b>Tablo 2.2</b>	:Bitki hücre kültürleri tarafından üretilen bazı doğal bileşikler.....	<b>6</b>
<b>Tablo 2.3</b>	:Çalışmada kullanılan alkaloidlerin izole edilen <i>Papaver</i> türleri.....	<b>15</b>
<b>Tablo 4.1</b>	:Vero ve HeLa hücrelerinin zamana göre belirlenmiş hücre sayıları.....	<b>27</b>
<b>Tablo 4.2</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine amurin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>31</b>
<b>Tablo 4.3</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine arnepavin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>32</b>
<b>Tablo 4.4</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine berberin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>33</b>
<b>Tablo 4.5</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine izokoridin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>34</b>
<b>Tablo 4.6</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine izotebain alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>35</b>
<b>Tablo 4.7</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine makrantin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>36</b>
<b>Tablo 4.8</b>	: <i>In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine mekambrin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>37</b>

<b>Tablo 4.9</b>	<i>:In vitro</i> Vero hücreleri üzerine mekambridin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>38</b>
<b>Tablo 4.10</b>	<i>:In vitro</i> HeLa hücreleri üzerine mekambridin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.....	<b>39</b>
<b>Tablo 4.11</b>	<i>:In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine narkotin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.....	<b>40</b>
<b>Tablo 4.12</b>	<i>:In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine orientalidin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.....	<b>41</b>
<b>Tablo 4.13</b>	<i>:In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine oripavin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar .....	<b>42</b>
<b>Tablo 4.14</b>	<i>:In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine salutaridin alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.....	<b>43</b>
<b>Tablo 4.15</b>	<i>:In vitro</i> Vero ve HeLa hücreleri üzerine tebain alkalodinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.....	<b>44</b>
<b>Tablo 4.16</b>	:Alkaloidlerin Vero ve HeLa hücrelerindeki SD <sub>50</sub> değerleri .....	<b>45</b>

## ÖZET

### **BAZI *Papaver* ALKALOİDLERİNİN SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Papaver alkaloidlerinin (amurin, armepavin, izokoridin, izotebain, makrantin, mekambrin, mekambridin, narkotin, orientasidin, oripavin, salutaridin, tebain, berberin) Vero ve HeLa hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Vero ve HeLa hücre hatları alkaloidlerin 1-300 µg/ml'lik konsantrasyonlarında 48 saat süreyle inkübe edildiler. MTT yöntemi ile ölçülen sitotoksikite değerleri SD<sub>50</sub> (µg/ml) olarak ortaya kondu. Test edilen alkaloidlerden HeLa hücreleri için berberin, makrantin ve mekambrin, Vero hücreleri için tebain, mekambrin ve berberin en fazla sitotoksikite gösteren alkaloidler olarak ortaya çıkmaktadır. En aktif alkaloidler SD<sub>50</sub> değeri 12.08 µg/ml olan berberin ve SD<sub>50</sub> değeri 24.16 µg/ml olan makrantindir. Berberin ve makrantin en yüksek sitotoksik aktiviteyi bir kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerine karşı gösterirken, normal bir hücre hattı olan Vero hücrelerine karşı düşük sitotoksik aktivite göstermişlerdir. Salutaridin iki tip hücreye karşı da sitotoksik aktivite göstermemiştir. Mekambrin alkaloidinin Vero hücrelerinde 100 µg/ml konsantrasyonda, HeLa hücreleri için ise 150 µg/ml konsantrasyonda % 100 sitotoksikite gösterdiği yani hücrelerin tamamının ölümüne neden olduğu ortaya çıkmıştır.

## **SUMMARY**

### **EVALUATION OF CYTOTOXIC ACTIVITIES OF SOME *Papaver* ALKALOIDS**

The cytotoxic effect of papaver alkaloids (amurine, armepavine, isocorydine, isothebaine, macranthine, mecambaine, mecambidine, narkotine, orientacidine, oripavine, salutaridine, thebaine, berberine) on Vero and HeLa cell lines were evaluated using the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Vero and HeLa cell lines were treated with various concentrations of alkaloids (1-300 µg/ml ) for 48 h. Values for cytotoxicity measured by MTT assay were expressed as SD50 (µg/ml). From the tested alkaloids, berberine, macranthine, mecambaine for HeLa cells and thebaine, mecambaine, berberine for Vero cells showed potent cytotoxic activity. The most active alkaloids were berberine and macranthine with SD50 of 12.08 µg/ml and SD50 of 24.16 µg/ml respectively. Whereas berberine and macranthine showed the highest cytotoxic activity against HeLa cancer cell line but these alkaloids exhibited low cytotoxic activity against Vero normal cell line. Salutaridine exhibited no cytotoxic activity against two types of cell lines. Mecambaine alkloid showed 100 % cytotoxic activity on Vero cells at 100 µg/ml and HeLa cells at 150 µg/ml concentration.

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlu, bitkilerden tarihin en eski çağlarından beri ilaç, gıda, baharat, yakıt, katkı maddesi, mesken yapımı, boyar madde, gerektiğinde savaşta ve avlanmada zehir olarak faydalanmıştır (Baytop, 1999; Abu-Dahab ve Afifi, 2007). 19. yüzyılın ortalarında ilk sentetik renklendiricinin keşfine kadar geleneksel kullanımlarının yanı sıra kozmetik, zirai mücadele ve sanatta da bitkilerin kullanımına rastlanmaktadır. Tarihteki yazılı kaynaklarda, ilk insanların çeşitli hastalıkların ve enteritlerin tedavisi için bitkilerden yararlandıkları belirtilmektedir (Essawi ve Srour, 2000; Özer ve diğ., 2001).

Hastalık tedavilerinde bitki kullanımının ne zaman başladığı kesin olarak bilinmiyorsa da, kullanımın günümüze kadar gelebilmiş olması, dozu ve stabilitesi kolay ayarlanabilen sentetik ilaçların varlığına karşın günümüzde de gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda dahi tercihen kullanılmaları dolayısıyla, tıbbi bitkiler yüzyıllardır değerini korumaktadır (Bozan, 1994; Stevigny ve diğ., 2005). İlaç hammaddelerinin büyük bir kısmı ya doğrudan bitkilerden izole edilerek ya da doğal kökenli olup sentetik olarak değiştirilerek modern tıpta kullanılır (Tolonen, 2003). Günümüzde bitkisel kökenli ilaç kullanımları, dünya ilaç pazarının sadece % 20'sinden yararlanabilen gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. Gelişmekte olan ülkelere nüfusun % 80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin gelişmekte olan ülkelere yaşadığı düşünülürse, toplam dünya nüfusunun % 64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır. Gelişmiş ülkelere ise reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25'i bitkisel kökenli kimyasallardır. Bu ilaçların keşfedilmesinde halk arasında değişik hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerin araştırılması ve değerlendirilmesi büyük katkı sağlamıştır. Vinkristin, vinblastin, rezepin, kinin ve hatta aspirin bugünkü ekonomik ve sağlık

açısından sahip oldukları önemlerini bu araştırmalara borçludur (Tatlı ve Akdemir, 2006; Rosenkranz ve Wink, 2008).

1920'li yıllarda başlayan ve 1950'li yıllarda doruk noktasına ulaşan sentetik ilaçların geliştirilmesi ve mikroorganizmaların kullanılarak özellikle antibiyotiklerin fermentasyon yoluyla üretimi, tıbbi bitkilerin dünya ticaret hacmindeki payını önemli ölçüde azaltmış olmasına karşın son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar, tıbbi bitkilere olan ilgiyi tekrar üzerine toplamıştır (Sökmen ve Gürel, 2001). Bunun başlıca nedenleri arasında; bitkilerin kolay ve ucuz tedavi olanağı sağlaması, sentetik bileşiklerin bazılarında görülen ve kullanılmaya başlandıktan sonra anlaşılan yan etkilere göre bitkisel ilaçların yan etkilerinin iyi bilinmesi, sentetik bileşiklerin genellikle tek bir etkiye sahip olmasına karşın bitkisel ilaçların birkaç etkiye birden sahip olması sayılabilir. Doğal olmaları nedeniyle insan vücudu tarafından kolayca kabul edilen, arzu edilmeyen yan etkileri ya da zararları yılların deneyimiyle iyi bilinen, içermiş oldukları etken maddelerin yapılarının aydınlatılmasıyla, aynı etkiyi gösterebilecek birçok sentetik ilaç için model olarak kullanılabilen bitkisel materyaller halen modern tıbbın vazgeçilemez unsurlarındandır. Ayrıca iyi değerlendirildiklerinde ülkeler için büyük bir ekonomik potansiyel kaynaklarıdır (Baytop, 1999).

Bitkiler insanların tedavisinde kullanılabilen önemli terapötik özelliklere sahip pek çok kimyasal madde içerirler (Jiang ve diğ., 2005; Stevigny ve diğ., 2005). Bitkilerden izole edilen ve biyolojik aktivitesi saptanmış olan belli başlı molekül grupları; polisakkaritler, flavonoidler, terpenler, alkaloidler, fenoller ve amino asitlerdir (Zahran ve diğ., 2005).

Günümüzde aktif kullanımı olan pek çok farmasötik ajan, bitkiler, hayvanlar, deniz organizmaları ve çeşitli mikroorganizmaların araştırılması sonucu ortaya çıkmıştır (El-Baroty ve diğ., 2007; Yalçın, 2007; Song ve diğ., 2008). Çok çeşitli sentetik ilaçların varlığına karşın günümüzde bile bitkiler pek çok ülkede özellikle de gelişmekte olan ülkelerde hala hastalıkların tedavisinde aktif şekilde kullanılmaktadır. Gelişmiş ülkelerde bile artık bitkilerin ve bitkisel ürünlerin kullanımı her geçen gün artmaktadır. Günümüzde tıbbi bitkiler yeni ilaçların keşfinde de önemli bir role sahiptir. Pek çok modern ilaç farklı

toplumlarda geleneksel olarak kullanılan bitkilerin araştırılması sonucu ortaya çıkmıştır. 1981-2002 yılları arasında değişik amaçlar için kullanıma sokulan 877 molekülün % 49'unu doğal molekül, yarı sentetik doğal ürünler veya doğal ürünler model alınarak sentezlenen sentetik ürünler oluşturmaktadır. Özellikle kanser ve infeksiyon hastalıkları ilaç keşfinin bir kaynağı olarak tıbbi bitkilerin kullanımında önemli bir konuma sahiptir. Bu amaçla da dünya genelinde bitki türlerinin önemli bir kısmı taranmıştır. FDA (gıda ve ilaç dairesi) tarafından onaylanan doğal kaynaklı antikanser ve antiinfektif preparatların diğer preparatlara oranı % 60-75 gibi yüksek bir oranı oluşturmaktadır (Abu-Dahab ve Afifi, 2007).

Bu çalışmada *Papaver* cinsinin türlerinden elde edilen bitkisel kökenli 13 saf alkaloidin (amurin, armepavin, izokoridin, izotebain, makrantin, mekambrin, mekambridin, narkotin, orientalidin, oripavin, salutaridin, tebain ve berberin) (Sarı,1975; Sarıyar, 2002) normal hücre hattı olan Vero ve bir kanser hücre hattı olan HeLa hücre kültürlerinde *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL KISIMLAR

Doğal ürünler ilk çağlardan beri ilaç, pigment, tatlandırıcı ve değişik amaçlarla kullanılmıştır (Tablo 2.1). Ama insanoğlu 19. yüzyılın sonuna kadar bu doğal ürünlerin spesifik özelliklerinin ve kimyasal öneminin farkına varamamıştır. Geçen yüzyıl boyunca doğal ürünlerle ilgili çalışmalar birden hız kazanarak organik kimyanın güçlü bir dalı haline gelmiştir. Bu değişimde çok daha güçlü ve yeni spektroskopik ve kromatografik tekniklerin geliştirilmesi ayrıca toplumun kimyasallara karşı bakış açısının değişmesi gibi birçok faktör de rol oynamıştır (Sökmen ve Gürel, 2001).

Tablo 2.1: Endüstride kullanılan bitkisel kökenli doğal ürünlerden bazıları.

Ürün- Besin	İşlevi	Elde Edildiği Bitki
Kinin	Acılaştırıcı	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Monellin	Renklendirici	<i>Dioscorephyllum cumminsii</i>
Mirakulin	Tatlandırıcı	<i>Synsepalum dulcifulum</i>
Glisirrizin (Meyan)	Tatlandırıcı	<i>Crocus sativa</i>
Krosetin	Tatlandırıcı	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
Betalain	Renklendirici	<i>Beta vulgaris</i>
Likopein	Koku verici	<i>Vanilla plenifolia</i>
Humulon, Lupuon	Acı ve koku verici	<i>Humulus lupulus</i>
Vanillin	Renklendirici	<i>Lycopersicum esculentum</i>
<b>Parfüm ve Kozmetik</b>		
Lavanta yağı	Parfüm ve kozmetik	<i>Lavandula officinalis</i>
Gül yağı	Parfüm	<i>Rosa damascena</i>
Yasemin yağı	Parfüm	<i>Jasminum spp.</i>
<b>Zirai Mücadele</b>		
Anakardik asit	İnsektisit	<i>Anacardicum occidentale</i>
Nikotin	Molluskusit	<i>Nicotiana tabacum</i>
Piretrin, Sinerin, Yasmolin	İnsektisit	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>

Tarih boyunca bitkiler tıbbi amaçla kullanıldığı gibi ayrıca zehir olarak da kullanılmıştır. Bitkilerden elde edilen bazı bileşikler ise halüsünasyona neden verici özellikleri ile de kullanılmıştır. Buradan da anlaşıldığı gibi tarih boyunca insanoğlu bitkileri biyoaktif bileşiklerin kaynağı olarak çok değişik amaçlar için kullanmışlardır (Macías ve Galindo, 2007). Yaşamın sürdürülebilmesi için gereksinim duyulan besinler bitkilerden karşılanır. Çünkü bitkiler, temel besin gereksinimlerini sağlamak için gereken karbonhidrat, protein ve yağları içerirler yani primer metabolitlerin kaynağını oluştururlar. Bununla birlikte ayrıca yüksek yapılı bitkiler düşük molekül ağırlıklı ve başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin, kozmetik, zirai mücadele vb. sektörlerde ekonomik açıdan değerli birçok sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasal molekülleri de sentezlerler (Sökmen ve Gürel, 2001; Namdeo, 2007). Biyosentetik kaynak, genel oluşum ve metabolizmada üretilen bileşiğin biyokimyasal görevine bağlı olarak primer ve sekonder metabolitler olarak isimlendirilir. Primer ve sekonder metabolizmayı tanımlamak gerekirse primer metabolik yollar bütün yaşam formları için gerekli olan primer metabolitleri üretirler. Bu bileşikler yaşamın oluşması ve sürdürülebilmesi için ihtiyaç duyulan karbonhidratlar, amino asitler, yağlar, proteinler ve nükleik asitleri içerirler.

Bitkiler virüslere, mikroorganizmalara, herbivorlara ve bitki rakiplerine karşı koymak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Hidrofobik dış epidermis yapısı fiziksel bir bariyer olarak görev alır. Bitkiler ayrıca dikenleri, çengelleri ve trikomları gibi bazı fiziksel silahlarının yanı sıra ayrıca sindirilemeyen hücre duvarı bileşenleri, geniş çeşitlilikte ürettikleri kimyasal savunma molekülleri ve toksik proteinler gibi diğer savunma yöntemlerine de sahiptirler. Bitkiler çevresel stresin üstesinden gelmek ve doğal düşmanlarına karşı kendilerini savunmak amaçlı sekonder metabolitler olarak isimlendirilen ve 200.000'nin üzerinde çeşitliliğe sahip olan düşük moleküler ağırlıklı doğal ürünler üretirler. Sekonder metabolitler primer metabolitlerden farklıdır ve bitkiler için genellikle temel metabolik süreçlerde rol oynamazlar. Sekonder metabolitlerin büyük çoğunluğu izoprenoid, fenilpropanoid, alkaloid ve yağ asitleri metabolik yollarından türevlenirler. Bu zengin çeşitliliğin sonucu olarak mikrobiyal saldırılara veya hayvan saldırılarına karşı savunma yeteneğini geliştirerek evrim sürecinde doğal seçilimi sağlarlar (Dixon, 2001). Sekonder metabolitler türün yaşamsal fonksiyonları için gerekli değildir ve primer metabolitlerden

sonra diğ er metabolik yollar kullanılarak üretilirler. Bu metabolik yollar de ğ iş ik familya ve türler için türlerin evrimsel mekanizmaları ile ilgili olup çok özgündürler. Aslında, bazı türlerdeki spesifik bileş enler türlerin sistematik tanımlanmasına (kemotaksonomi) yardım ederler yani sekonder metabolit gruplar botanik sınıflandırma için belirteç olarak kullanılmaktadırlar. Sekonder metabolitler bitkilerde çok daha sınırlı miktarlarda oluş urlar. Bazılarının organizmada kanıtlanmış herhangi bir fonksiyonu yokken, bazıları hayati rollere sahiptirler (Dewick, 1997; Bratt, 2000; Bourgaud ve diğ ., 2001).

Sekonder metabolitlerin, diğ er bir deyiş le do ğ al ürünlerin, sayı ve yapı itibarı ile çok büyük çeş itlilikte üretilmeleri yüksek bitkilere has özelliklerden birisidir. Önceleri bu ürünler, bitkiler tarafından oluşturulan ve hiç bir iş levi olmayan atık maddeler olarak kabul edilmekteydi. Ancak daha sonra bu metabolitlerin; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaş ık mekanizmaların ürünleri oldu ğ u anlaşılmıştır. Daha sonra bu do ğ al ürünlerden bazıları bitki doku kültürlerinde üretilmeye baş lanmıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Bitki hücre kültürleri tarafından üretilen bazı do ğ al bileş ikler.

Alkaloidler	Flavanoidler	Lignin	Steroidler ve türevleri
Antrakınonlar	Kalkonlar	Naftokinonlar	Taninler
Benzokinonlar	Kinonlar	Nükleik asitler	Terpenler
Diantronlar	Ksantonlar	Organik asitler	Terpenoidler
Fenoller	Lateks	Peptidler	Vitaminler

Bitkiler çok de ğ erli ve çok çeş itli sekonder metabolitleri üretirler. Bu de ğ erli sekonder metabolitlerin kültür ortamındaki veya do ğ ada büyümekte olan bitkilerden eldeleri her zaman çok tatmin edici düzeylerde de ğ ildir. Ç o ğ u zaman bu sekonder metabolitler türe veya cinse özgüdür ve sınırlı üretilirler veya büyüme ve geliş me evrelerinin bazı belirli

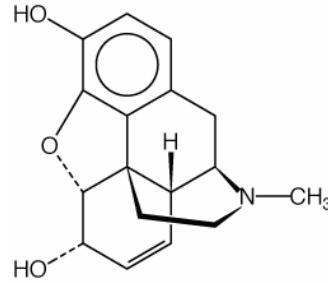
dönemlerinde, stres veya bazı besin maddelerinin varlığında aktive olup üretilebilirler. Son yıllarda bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretilme yöntemleri üzerine çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Fakat ilgilenilen sekonder metabolitlerin çoğunun üretimi büyümenin optimizasyonu üzerinde yapılan kapsamlı çalışmalar ve yüksek üretim sağlayan hücre suşlarının seçimine karşın çok düşük miktarlarda kalmıştır. Bunların başlıca nedenleri arasında türe özgü yolların kontrolü ve doku farklılaşması gibi nedenler sayılabilir. Bu yüzden sekonder metabolitlerin üretimine alternatif olarak kök, embriyo ve sürgün kültürleri üzerine de yoğunlaşmıştır (Murthy ve diğ., 2008).

1805 yılında Friedrich Sertürner'in haşhaştan morfini izole etmesi ile bitki sekonder bileşikleri üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. Sertürner'in bu çalışması ile bitkiden aktif bir maddenin izole edilebileceği ve bu saf kimyasal maddenin aktif reaksiyonlara neden olabileceği gösterilmiştir. Daha sonra bir aktif maddenin izolasyonunu bir diğeri izlemiştir. Aktif madde izolasyonundaki bu hızlı gelişme özellikle organik kimyanın temel dalları olan sentetik, analitik ve farmasötik kimyaya doğrudan etki etmiştir (Hartmann ve diğ., 2005).

Bitki sekonder metabolitleri arasında alkaloidlerin yeri ve önemi farklıdır. Alkaloidlerin tarihçesi insanlık kadar eskidir. İnsanoğlu alkaloid ihtiva eden preparatları tıbbi olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde ve değişik amaçlar için zehir olarak yaklaşık 4000 yıl boyunca kullanmıştır. Alkaloidler dünya medeniyetlerinin başlangıcından beri biyolojik aktiviteleri iyi bilenen maddelerdir. Hastalıkları iyileştirmek için geleneksel tıpta, kabile savaşları sırasında toksik özellikleri sebebi ile silah olarak ve avlanmada kullanılmıştır (Wink, 2003; El-Desouky ve diğ., 2007).

Alkaloidler yaşayan organizmalarda bulunan ve çok çeşitlilik gösteren sekonder metabolit gruplarındandır. Yapıları, metabolik yolları, ekolojik ve farmakolojik olarak aktiviteleri çok farklılık gösterir. Alkaloidlerin birçoğu yüzyıllar boyunca tıpta kullanılmıştır ve halen önemli ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. İnsanoğlu alkaloidleri zaman içerisinde zehir, ilaç, çay, merhem olarak kullanmışlardır. Alkaloidler çok kullanışlı ve çok da tehlikeli olan doğal ürünler olarak karakterize edilirler. Aynı zamanda bu moleküller kolay ekstre edilebilir ve saflaştırılabilir özelliktedirler (Wink, 2003; El-Desouky ve diğ., 2007).

Friedrich Sertürner (1805) tarafından morfinin (Şekil 2.1) keşfi kimyada ve farmakolojide ilerleme sağlanmasında önemli bir katkı yapmıştır. Morfin gerek analjezik (ağrı kesici) ve gerekse narkotik (uyuşturucu) özelliklerinden dolayı yüzyıllardır ilaç olarak kullanılmıştır. Sertürner'in geliştirdiği metodu kullanarak eczacı olan Pelletier ve Caventou 1817-1820 yılları arasında brusin, kafein, kolşisin, emetin, kinkonin, piperin vb. gibi farmasötik olarak aktif alkaloidleri izole etmişlerdir. İzole edilen bu alkaloidler geçmiş 180 yılda diğer alkaloidlerin kimyalarının anlaşılması için de temel oluşturmuştur. Pelletier ve Caventou 1826 yılında ayrıca tarihi açıdan önemli olan koniin alkaloidini izole etmeyi başarmışlardır. Bu alkaloid Sokrates'in ölümüne neden olan baldıran zehrinin aktif maddesi olmasının yanı sıra 1870 yılında ilk kez yapısı tanımlanmış olan ve 1886 yılında da ilk sentezlenmiş alkaloid olması sebebiyle de önemli bir alkaloiddir (Cordell, 1946; Roberts ve Wink, 1998; Aniszewski, 2007).



Şekil 2.1: Friedrich Sertürner tarafından 1805 yılında ilk izole edilen alkaloid olan morfinin kimyasal yapısı.

Alkaloidler yüksek yapılı bitkilerde çok bol miktarlarda bulunurlar. Yüksek yapılı bitkilerin en az % 25'i bu molekülleri içerirler. Bu, her dört bitkiden birinin en az bir alkaloid içerdiği anlamına gelir. Fakat son yıllarda hayvanlardan, böceklerden, deniz canlılarından, mikroorganizmalardan ve düşük yapılı bitkilerden de alkaloidler izole edilmiştir (Pelletier, 1998; Roberts ve Wink, 1998).

Alkaloidlerin adlandırılmalarına bakıldığında bazı sorunlarla karşılaşılmaktadır. Çok farklı çeşitte alkaloid tipi olduğu için tek bir adlandırma yapılamamaktadır. Buna bir örnek indol

alkaloidleridir. İndol alkaloidlerinin birçok farklı iskeleti bulunur. Bu yüzden birçok araştırmacı bütün alkaloidler için biyogenezize dayanmış bir isimlendirme sistemi kullanmışlardır. Yaygın olarak kullanılan isimlendirme sisteminde alkaloid isimleri 'ine' ile olarak sonlandırılır. Ayrıca diğer doğal ürünlerde de olduğu gibi sistematik olmayan isimlendirme de kullanılır. Cins isimden (atropine, *Atropa belladonna*), tür isminden (kokain, *Erythroxylon coca*), drug isminden (ergotamine, ergot (ilaç yapımında kullanılan hastalıklı çavdar mahmuzu)), bileşiğin fiziksel işlevinden (emetin, emetik (kusturucu)), ünlü alkaloid kimyagerlerinin isminden (pelletierine) türevlenebilir.

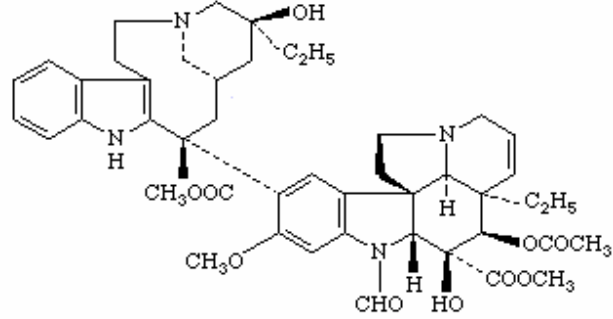
Biyologlara göre alkaloidler, saf ve mükemmel doğal ürünlerdir ve herhangi bir biyolojik ve farmasötik aktiviteye sahip, tıbbi ve ekolojik kullanımı olabilen, yapısında azot içeren heterosiklik kimyasal bileşiklerdir. Biyologlar açısından alkaloidler için en önemli nokta farklı hücresel organizmalarda aktif olan özel bir kimyasal grup olmaları ve bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda biyolojik süreçlerde yer almalarıdır. Alkaloidler için uzun bir istisna listesi hazırlamadan kesin bir tanımlama yapmak mümkün değildir. Çoğu zaman bu istisna listesinden bahsetmekten kaçınılır ve alkaloidlerin temel karakterlerini belirterek bir tanım ortaya konur. Bu bileşiklerin (1) öncelikle merkezi sinir sistemini üzerinde düşük veya çok miktarda toksik etkileri, (2) kimyasal yapılarının temel karakteri, (3) heterosiklik azot bileşeni, (4) amino asit veya türevlerinden sentezlenmeleri, (5) doğada dağılımlarının sınırlı olması gibi bazı karakteristik özellikleri üzerinde durulmuştur (Aniszewski, 2007).

Tıp için en önemli özellikleri arasında alkaloidlerin kuvvetli fizyolojik etkilerinin olduğu ve geniş olarak tıbbi uygulamalarda iyileştirici ilaç olarak kullanılabilmesidir. Bazı alkaloidlerin çok düşük dozlarda dahi yüksek toksik etkileri olabilir. Tıbbi açıdan alkaloidler üzerine bazı farklı tanımlamalar da vardır. Bu tanımlamalardan biri alkaloidleri, azot esaslı, bitki ve hayvanlar aleminde oluşan bileşikler olarak tanımlamıştır. Tanımlardan bir diğeri ise 'insanlar ve diğer hayvanlar üzerinde farmakolojik etkileri olan, alkalin kelimesinden türevlenmiş ve organik azot bileşikleridir' şeklindedir.

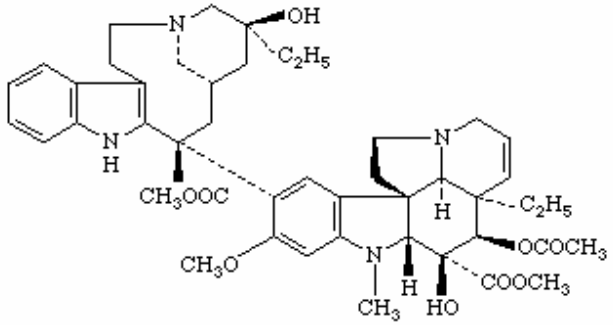
Kimyacılar alkaloidleri güçlü fizyolojik aktiviteleri olan, genellikle toksik ve kimyasal özelliklerini kaybetmeyen kompleks heterosiklik azotlu bileşik grupları olarak tanımlarlar. Fakat bu tanımlamada bazı istisnalar vardır. Diğer bir kimyasal tanımlama, alkaloidleri bitki ve hayvanlardan elde edilen azot içeren bileşikler olarak belirtmektedir. Daha sonra kimyacılar alkaloidlerin biyogenik, azot içeren ve N-heterosiklik bileşikler olduğu üzerinde durmuşlardır.

Tıp, kimya ve biyolojinin çalışma alanlarının farklı olmasına karşın tanımların bazıları hemen hemen aynıdır. Bilim adamları bu ürünlerin tıp, biyoloji ve kimya açısından çok önemli oldukları konusunda hemfikirdirler. Özetle alkaloidler diğer kimyasal ürünlerin sentezinde kullanılabilen ve canlı organizmalar tarafından üretilen kimyasal ürünlerdir. Alkaloidler biyolojik, farmokolojik, fizyolojik ve kimyasal olarak aktif geniş bir bileşik grubudur. Alkaloidlerin bu özelliklerini gösteren anti-malaryal ajanlar (kinin ve klorokinin), antikanser ajanlar (taksol, vinblastin, vinkristin) ve beyinde kan dolaşımını destekleyici ajanlar (vinkamin), çalışmalar sonucu izole edilmiş ve insanlığın kullanımına sunulmuştur (Aniszewski, 2007).

a)



b)



Şekil 2.2: Antikanser ajan olarak kullanılan iki önemli alkaloidin (a- vinkristin, b- vinblastin) kimyasal yapısı.

Alkaloidlerin ayrıca yukarıda sayılan özelliklerinden başka canlıların ekolojik olarak buldukları ortama adaptasyonlarında ve herbivorlara karşı bitkilerin mücadelesinde çok önemli rollere sahip oldukları da bilinmektedir. Ekolojik açıdan bakıldığında doğal ürünleri üreten canlı organizmalar ortama maksimum adaptasyon için bunu yaparlar. Çimlenmeyi ve tohum gelişimini engelleyen en az 50 alkaloid bulunmuştur. Ayrıca herbivorları uzaklaştırmanın yanı sıra antibakteriyal ve antifungal özelliklere de sahip çok sayıda alkaloid bulunmuştur (Blum, 2004).

Alkaloidler allelopatik aktivite için de önemlidirler. Alkaloidlerin yüzyıllardır tıbbi kullanımları üzerine çalışıldığından allelopatik aktiviteleri üzerinde pek çalışılmamış fakat son yıllarda alkaloidlerin allelopatik aktivitelerini belirlemek amacıyla fitotoksisiteleri

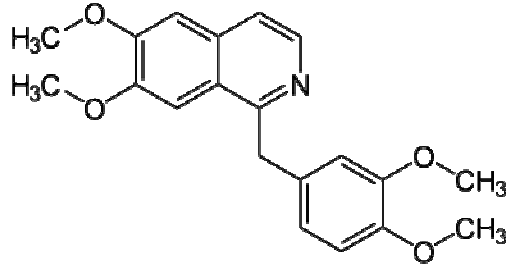


üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Yapılan bir çalışmada kafeinin allelopatik aktiviteleri ve herbivorlara karşı olan etkileri ortaya konmuştur (Anaya ve diğ., 2006).

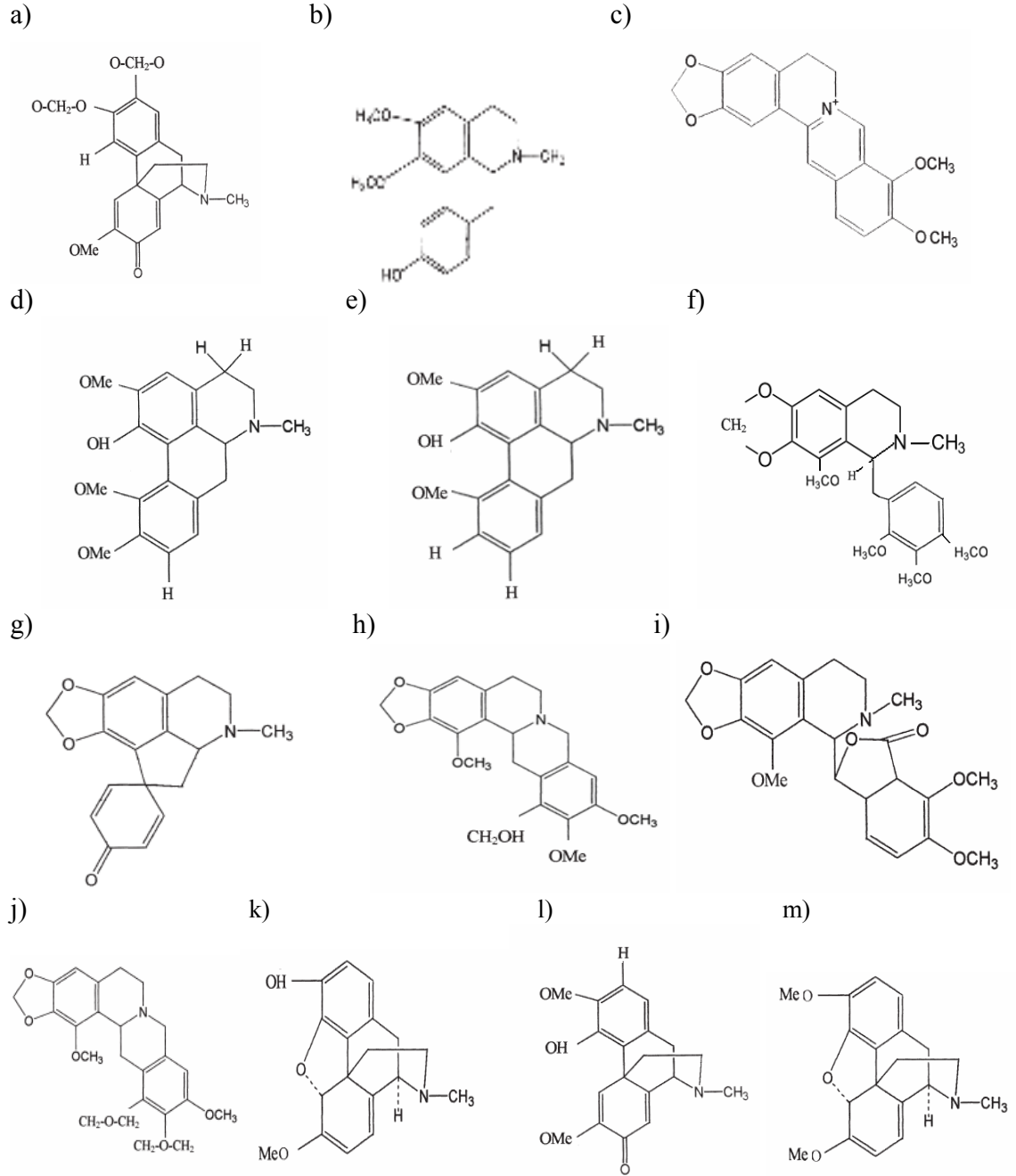
Alkaloidlerin *in vitro* ve *in vivo* aktivite potansiyellerini ortaya koymak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda değişik aktivitelere sahip (antiviral, antitümöral, antimikrobiyal, sitotoksik, antioksidan, fizyolojik stimulant, antihelmintik, antimalarial) moleküller izole edilmiştir (Alexandrova ve diğ., 2000; Duncan ve diğ., 2003; Parkin, 2004; Letasiova ve diğ., 2005; Stevigny ve diğ., 2005; El-Desouky ve diğ., 2007; Şener ve diğ., 2007; Rosenkranz ve Wink, 2008). Yapılan bir çalışmada (El-Desouky ve diğ., 2007) *Arum palaestinum*'dan izole edilen ve pirrol alkaloidleri içeren bitkinin etil asetat fraksiyonunun güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Şener ve diğerlerinin (2007) yaptığı bir çalışmada ise *Consolida* türlerinden izole edilen diterpenoid alkaloidlerinin antibakteriyal, antifungal ve antiviral aktivite potansiyelleri *in vitro* değerlendirilmiş ve 5 alkaloidin (likoktonin, 18-metillikoktonin, delkozoin, 14-aetildelkozoin ve 14-asetilbrovnin) antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bu alkaloidlerin 1-32 µg/ml konsantrasyonlar arasında, bir DNA virüsü olan Herpes simpleks virüslerine karşı aktivite göstermezken bir RNA virüsü olan Parainfluenza virüs 3'e karşı değişik derecelerde antiviral aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Rosenkranz ve Wink (2008), yaptıkları çalışmada kinolin, kinolizidin, izokinolin, indol, terpen, tropan, steroid ve piperidin tipi 55 alkaloidin *Trypanosoma b. brucei*'de apoptoz indüksiyonuna etkisini mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikler ve DNA fragmentasyonunun ölçülmesi ile değerlendirmişlerdir. Çalışılan alkaloidlerin bazılarının apoptozu etkin bir şekilde indüklediği ortaya konmuştur. Stevigny ve diğerleri (2005) 50 aporfinoid alkaloidinin *in vitro* sitotoksik ve *in vivo* antitümöral aktivite potansiyellerini değerlendirmişler ve çalışılan alkaloidlerden bazılarının güçlü sitotoksik ve antitümöral aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuşlardır.

Tanımlanmış olan 21,000 alkaloid karşın sadece 600'ü bütün biyokimyasal özellikleri ve çok daha azının ekofizyolojik rolleri araştırılmıştır. Günümüzde 8000'den fazla alkaloidden türevlenmiş doğal bileşik vardır. Her yıl ortalama 100 yeni molekül araştırmacılar tarafından keşfedilmektedir (Wink, 1998; Blum, 2004). Günümüzde de hem yeni alkaloidlerin

izolasyonları hem de aktivitelerinin ortaya konmasına yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu çalışmalarda kullanılan önemli bitki gruplarından biri de *Papaver* cinsine ait türlerdir. *Papaver* cinsi türlerinden izole edilen en yaygın alkaloid olan papaverin alkaloidinin kimyasal yapısı Şekil 2.3’de verilmiştir. Biz de bu çalışmada *Papaver* cinsinin türlerinden elde edilen alkaloidlerin (Tablo 2.3) biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla *in vitro* sitotoksik aktivite potansiyellerini ortaya koymayı hedefledik. *In vitro* sitotoksik aktivite potansiyelleri çalışılan 13 alkaloidin kimyasal yapıları Şekil 2.4’de verilmiştir (Sarı,1975; Sarıyar, 2002).



Şekil 2.3: *Papaver* cinsi türlerinden izole edilen papaverin alkaloidinin kimyasal yapısı.



Şekil 2.4: *In vitro* sitotoksik aktivite potansiyelleri çalışılan 13 alkaloidin (a- amurin, b- armepavin, c- berberin, d- izokoridin, e- izotebain, f- makrantin g-mekambrin, h- mekambridin, i- narkotin, j- orientalidin, k- oripavin, l- salutaridin, m- tebain) kimyasal yapısı.

Tablo 2.3: Çalışmada kullanılan alkaloidlerin izole edildiği *Papaver* türleri.

<b>Alkaloidler</b>	<b>İzole Edildiği <i>Papaver</i> türleri</b>
Amurin	<i>P. apokrinomenon</i> <i>P. pilosum</i> <i>P. strictum</i>
Arnepavin	<i>P. fugax</i> <i>P. persicum</i>
Berberin	<i>P. curviscapum</i> <i>P. polychaetum</i> <i>P. dubium ssp. dubium</i> <i>P. dubium ssp. laevigatum</i> <i>P. dubium ssp. lecoqii</i>
İzokoridin	<i>P. commutatum ssp. euxinum</i> <i>P. rhopalotheca</i> <i>P. macrostomum</i>
İzotebain	<i>P. pseudo-orientale</i>
Mekambrin	<i>P. armeniacum</i> <i>P. fugax</i> <i>P. triniifolium</i>
Mekambridin	<i>P. lasiothrix</i> <i>P. pseudo-orientale</i>
Makrantin	<i>P. pseudo-orientale</i>
Narkotin	<i>P. cylindricum</i> <i>P. fugax</i>
Orientalidin	<i>P. pseudo-orientale</i>
Oripavin	<i>P. orientale</i> <i>P. cylindricum</i>
Salutaridin	<i>P. bracteatum</i> <i>P. lasiothrix</i> <i>P. pseudo-orientale</i> <i>P. fugax</i> <i>P. persicum</i>
Tebain	<i>P. bracteatum</i> <i>P. cylindricum</i> <i>P. triniifolium</i>

Genel olarak sitotoksosite testlerinin önemine bakacak olursak; bir ajanın konak hücre sistemi üzerinde toksik etkisini araştırmak, ajanın etkinliği ve diğer biyolojik aktivite testlerinin güvenilirliği bakımından çok önemlidir. Hücre kültürlerinde sitotoksosite tayinleri genellikle, hücre canlılık testi, hücre çoğalma hızı testi, mikroskopik incelemeyle ortaya çıkan hücre morfolojisindeki değişikliklerin belirlenmesi, hücredeki toplam protein miktar tayini, enzim aktivite tayini ve hücresel nükleik asit sentezinin ölçülmesi temeline göre yapılır (Saetung ve diğer., 2005). Sitotoksosite, kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksitenin karsinogenez ve iltihaplanmanın da içinde bulunduğu patolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığı düşünölmektedir (Putnam, 2002).

Kimyasalların sitotoksitesi hücre ölümünün, canlılığının, hücre yapısının, morfolojisinin, enerji metabolizmasının ve hücre çoğalmasının ölçülmesi gibi çeşitli parametrelerle belirlenebilir. Bir bileşimin sitotoksik etkisi test edilirken hücrelerin genel mekanizması ve hücre tiplerine özgü mekanizmalar göz önünde tutulmalıdır (Putnam, 2002). Hücre canlılığının belirlenmesi mutagenез, malignant transformasyon, apoptoz, hücresel patoloji ve farmosötik toksisiteyi değerlendirmede oldukça önemlidir. Çünkü bu tip süreçlere yol açan mekanizmalar sadece canlı hücrelerin değişimiyle meydana gelir (Komissarova ve diğer., 2004).

Sitotoksitenin *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası söz konusudur. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısını en aza indirmesidir. *In vitro* testlerin diğer bir üstünlüğu hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle erken evrelerinde belirlenebilmesi, harcanan para, zaman ve deney hayvanlarından kazanç sağlayabilir (Putnam, 2002). *In vitro* sitotoksosite testleri hücre canlılığı, hücre çoğalması, membran bütünlüğu, DNA sentezi ya da hücresel metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesini de belirler. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksosite deneyleri vardır. En çok kullanılan yöntemler “Neutral Red Uptake” ve “Tripan Blue Exclusion” yöntemi (hücre canlılığı için), “Lowry Coomassie Blue”, “Sulforodamin B (SRB)” yöntemi ve “Kenacid Blue” yöntemi (toplam hücre proteini ve hücre çoğalmasını belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite

ve hücrel metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz aktivite yöntemleridir (hücre lizisini belirlemek için) (Gad, 2002; Saetung ve diğ., 2005). Laktat dehidrogenaz (LDH) yöntemi, hücre dışı ortamdaki laktat dehidrogenaz aktivitesinin ölçümüne dayanır ve Membran bütünlüğünü tayin etmeye yarayan bir yöntemdir. “Neutral red” yönteminde ise boya canlı hücrelerin içine girer ve canlı hücrelerin lizozomlarında toplanırlar (Fotakis ve diğ., 2005).

Günümüze kadar hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu kültür kaplarının kullanıldığı modern tekniklerdir. Böylece birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Canlı hücreler tripan blue, nigrosin, eritrosin, etidium bromid ve propodium iyodid gibi boyalara karşı geçirgen değildir (Zahran ve diğ., 2005). “Tripan Blue Exclusion” (TBE) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksosite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerdir (Fent, 2001; Fotakis ve diğ., 2005; Weyermann ve diğ., 2005).

Deney gruplarının çoğalma hızları ve canlılıkları, hücre canlılığını tayin eden MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromid) yöntemi (Mosmann,1983; Liu ve diğ., 2003; El-Desouky ve diğ., 2007; Val’Ko ve diğ., 2007) ile tayin edildi. Bu yöntemin temel prensibi, pembe renkli tetrazolyum tuzunun mitokondriyal solunum zincirinde yer alan ve sadece canlı hücrelerde aktif olan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığıyla koyu kırmızı renkli, suda çözünmeyen formazan boyaya dönüşmesine dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi, canlı hücrelerin sayısı arttıkça artmaktadır. Bu nedenle, enzim aktivitesi arttıkça formazan boyanın üretimi de artmaktadır. Formazan boyanın kantitesi, direkt olarak ortamdaki metabolik olarak aktif hücre sayısı ile ilişkilidir. Dolayısıyla spektrofotometre ile ölçülen formazan boyanın absorbansı, canlı hücre sayısı ile direkt olarak orantılı olmaktadır. MTT yöntemi hücrenin metabolik aktivitesini ölçtüğünden dolayı, hücre sayısındaki azalma ya hücre ölümünün bir sonucu ya da hücre çoğalmasındaki azalmadan kaynaklanabilir (Shime ve diğ., 2001; Liu ve diğ., 2003; Kobayashi ve diğ., 2004).

### **3. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **3.1. BİTKİSEL MATERYAL**

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak Rhodales takımına ve *Papaveraceae* familyasına ait olan ve Türkiye’de farklı coğrafyalarda yetişen *Papaver* cinsinin türlerinden elde edilen 13 saf alkaloid (amurin, armepavin, izokoridin, izotebain, makrantin, mekambrin, mekambridin, narkotin, orientalidin, oripavin, salutaridin, tebain, berberin) kullanıldı (Sarı,1975; Sarıyar, 2002). Bu alkaloidler saf bir şekilde İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı’ndan temin edildi.



Şekil 3.1: *Papaver somniferum* var. *giganteum* (haşhaş) bitkisinin genel görünümü.

Rhoedales takımına ve Papaveraceae familyasına ait *Papaver* cinsinin türlerinden elde edilen alkaloidlerden bazıları Şekil 2.4-12' de görülmektedir.

### 3.1.1. Alkaloidlerin Bitkilerden Saf Halde Elde Edilmesi

Alkaloidlerin saflaştırma işlemleri İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı araştırmacıları tarafından yürütülmüş ve çalışmamızda bu saf alkaloidler kullanılmıştır.

Bitkiler toplandıktan sonra, kökler ve toprak üstü kısımları birbirinden ayrılmıştır, laboratuvar şartlarında kurutulmuş ve orta incelikte toz haline getirilmiştir. Toz haline



getirilmiş bitki kısımlarından kimyasal araştırmalar kapsamında fitokimyasal ön denemeler yapılarak flavon türevleri, antrasen türevleri, saponin, tanen bileşikleri ve alkaloid taraması yapılmıştır. Alkaloid taraması kapsamında 1g. toz haline getirilmiş örnek, 10 ml % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisiyle bir müddet ısıtılarak tüketilmiştir. Soğuduktan sonra süzölmüştür. Süzöntü 5 ml % 10'luk amonyak çözeltisiyle kalevilendirilmiş (bazik ortama alındı) ve ayırma hunisinde 10 ml eterle tüketilmiştir. Eterli çözelti su banyosu üzerinde yoğunlaştırılmış ve bakiye 10 ml % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çözülmüştür. Bu asitli çözeltide alkaloid tayini özel reaktiflerle yapılmıştır:

- 1- Bouchardat belirteci: Esmer-kırmızı çökelti
- 2- Dragendorff belirteci: Turuncu-kırmızı çökelti
- 3- Mayer belirteci: Süt rengi çökelti

#### *3.1.1.1. Tersiyer Alkaloidlerin Tüketilmesi ve Ayrılması*

Toz haline getirilmiş materyal oda ısısında, etanol ile tüketme sıvısı Dragendorff belirtecine karşı pozitif reaksiyon vermeyinceye kadar perkolatörde tüketilmiştir. Etanollü kısımlar düşük basınçta şurup kıvamına kadar yoğunlaştırılmış ve bakiye % 3'lük hidroklorik asit çözeltisi ile alınmıştır. Klorofil, yağ vb. maddelerin uzaklaştırılması için önce petrol eteri daha sonra dietileter ile tüketilmiştir. Asitli kısım % 10'luk amonyak çözeltisi ile kalevilendirilmiş ve kloroform ile Dragendorff belirtecine karşı pozitif reaksiyon vermeyinceye kadar tüketilmiştir. Kloroformlu kısımlar birleştirilmiş, susuz sodyum sülfat ile suyu alınmış, süzölmüş ve alçak basınçta kuruyana kadar uçurularak tersiyer alkaloidler elde edilmiştir.

#### *3.1.1.2. Katerner Alkaloidlerin Tüketilmesi ve Ayrılması*

Kloroform ile tüketmeden sonra geriye kalan sulu kısmın pH'ı sulandırılmış hidroklorik asit çözeltisi ile 6-7'ye ayarlanmış, hacminin ¼'ü oranında potasyum iyodürün sudaki doymuş çözeltisi ilave edilmiştir. Kloroform ile tüketilmiştir. Susuz sodyum sülfat ile suyu alınmış, süzölmüş, alçak basınçta kuruluğa kadar uçurularak katerner alkaloid ekstresi elde

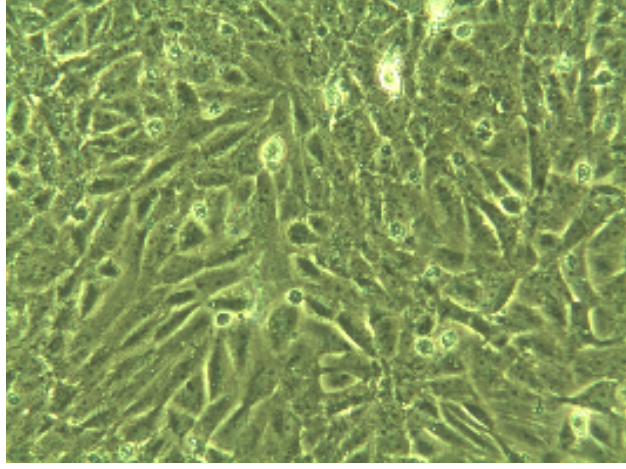
edilmiştir. Dragendorff'a karşı çok soluk renk verdiği için katerner alkaloid ekstresi çalışılmamıştır.

### 3.1.2. Saf alkaloidlerin stoklarının hazırlanması

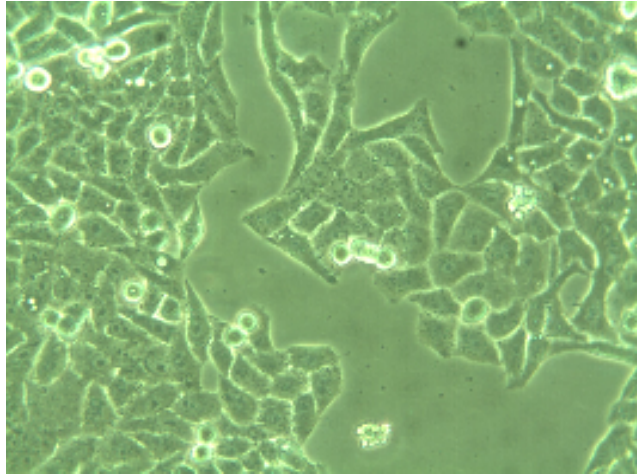
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'ndan saf olarak temin edilen amurin, armepavin, izokoridin, izotebain, makrantin, mekambrin, mekambridin, narkotin, orientalidin, oripavin, salutaridin, tebain 100 µl kloroform (CHCl<sub>3</sub>), berberin 300 µl kloroform içinde çözdürüldü. Daha sonra her alkaloidin son hacmi 500 µg/ml olacak şekilde EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) içine alınarak ultrasonikasyon su banyosu ve vorteks ile çözümleri sağlandı. Tam olarak çözüldüğünden emin olunan 500 µg/ml'lik ana stoğun sterilizasyonu için 45 µm çapında milipor filtreler kullanıldı. Steril şekilde hazırlanan bu ana stoktan her denemeden önce değişik konsantrasyonlarda EMEM içerisinde seyreltilen alkaloidler deneylerde kullanıldı.

### 3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

*In vitro* sitotoksik aktivite potansiyelini belirlemek amacıyla deneylerimizde normal transforme hücre hattı olan Vero (Afrika Yeşil Maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek fibroblast hücre hattı) ve kanser hücre hattı olan HeLa (1951 yılında insan serviks karsinomundan elde edilmiş epitel hücre hattı) hücreleri kullanıldı. Hücrelerin devamlılığı haftada iki kez pasajlarla sağlandı.



Şekil 3.2: Tek tabaka halinde çoğalma gösteren Vero hücrelerinin 3 günlük kültürü.



Şekil 3.3: Tek tabaka halinde çoğalma gösteren HeLa hücrelerinin 3 günlük kültürü.

### 3.2.1. Hücre Kültürlerinin Devamlılığının Sağlanması

Vero ve HeLa tam tabaka oluşturmuş hücrelerin (monolayer), yeni kültür ortamına aktarılması (pasajı) için, öncelikle hücre tabakası Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ile üç kez yıkandı ve Tripsin/EDTA enzim çözeltisi ( $\text{Ca}^{++}$  ve  $\text{Mg}^{++}$  içermeyen DPBS içerisinde hazırlanmış % 0.1 Tripsin ve % 0.04 EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik

asit) çözeltisi) ile 10-15 dakika süreyle 37 °C’de inkübe edildi. Tutunduğu yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine antibiyotik-antimikotik karışımı [penisilin (100 U/ml); streptomisin (100 µg/ml); amphoteresin B (0.25 µg/ml)] ve %10 fetal calf serum (FCS) içeren taze EMEM eklendi ve hücreler 1000 devir/dakikada, 5 dakika süreyle santrifüj edilerek toplandılar ve daha sonra taze EMEM ile yeniden süspanse edildiler. Hücreler hemositometrede sayılarak, yaklaşık  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarıldılar. Daha sonra kültür kapları % 90’ dan fazla bağıl nem ve % 5 CO<sub>2</sub> sağlayan 37 °C’lik etüve (Heraus B-5060 EK/CO<sub>2</sub>) kaldırıldılar. Aynı işlemler ortalama haftada iki kez tekrarlanarak hücrelerin devamlılıkları sağlandı.

Ayrıca kültürde meydana gelebilecek risklere karşı hücreler belli aralıklarla dondurularak saklandılar. Bu amaçla logaritmik fazdaki hücreler tripsin uygulandıktan sonra santrifüjlenerek toplandılar. % 50 FCS, % 10 DMSO (dimetil sülfoksit) ve EMEM içeren saklama ortamında yaklaşık  $1 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde hazırlanan hücre stokları donduruldular (- 80 °C ve -196 °C).

### **3.3. ALKALOİDLERİN Vero ve HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

#### **3.3.1. Hücre Çoğalma Eğrisi**

Vero ve HeLa hücreleri ile MTT ve TBE yöntemlerini uygulamadan önce her iki hücrenin de hücre çoğalma eğrisini oluşturmak, hücrelerin kaçınıcı saatte hangi fazda olduklarını anlamak ve uygulanacak alkaloidin hücre hatları ile en az kaç saat muamele edilmesi gerektiğinin anlaşılmasında önemli rol oynar. Bu amaçla ilk olarak Vero ve HeLa hücreleri için ayrı ayrı 13 günlük çoğalma eğrisi grafiği çıkartılmıştır ve ikilenme zamanı “(doubling time)” her iki hücre hattı için de elde edilmiştir.

Vero ve HeLa hücrelerinin çoğalma eğrilerini oluşturmak üzere 24 kuyucuklu kültür kaplarına hemositometrede sayılarak  $5 \times 10^4$  hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve

hücreler % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik etüve kaldırıldı. 24 saatin sonunda etüvdeki kültür kaplarının üç kuyusu üçer kez DPBS ile yıkandı ve daha sonra 100 µl Tripsin/EDTA ilave edilerek etüve kaldırıldı. 15 dakika sonra etüvden alınan kültür kaplarının tripsin uygulanan kuyularına 900 µl EMEM ilave edilerek hücreler süspanse edildi (aynı zamanda hücrelerin uzun süre tripsin uygulanması ile görebileceği zarar engellenmiş oldu). Tripsin uygulanan her üç kuyudan 100 µl ve tripan mavisinden de 100 µl alınarak 1:1 oranında süspanse edildi ve 5-10 dakika bekletilip hücrelerin hemositometrede sayımları yapıldı. Bu işlem her 24 saatte bir üç kuyudaki hücreler sayılacak şekilde Vero ve HeLa hücreleri için ayrı ayrı toplam 13 gün boyunca tekrarlandı. Hücrelerin birbirlerinin çoğalmalarını engelleyici maddeleri besiyerine bırakmaları (kontakt inhibisyon) ve kuyularda fazla miktarda olan hücrelerin besiyerinin pH'sını değiştirmesi sebebiyle üçüncü günün sonunda her gün olmak koşulu ile besiyerleri taze EMEM ile değiştirildi. Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek her iki hücre hattı için de çoğalma eğrisi oluşturuldu. İnküleme zamanı (doubling time, DT) aşağıdaki formüle (Ebato ve diğ., 1988) göre hesaplandı:

$$DT = (t - t_0) \log 2 / \log N - \log N_0$$

### 3.3.2. Hücre Canlılık Testi

Vero ve HeLa hücreleri 24 ve 96 kuyucuklu kültür kaplarına (Grainer, 662160) yaklaşık  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde ekildiler. Hücrelerin % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyonundan sonra ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelere alkaloid içermeyen (Kontrol) ve değişik konsantrasyonlarda alkaloid içeren taze EMEM besiyerleri eklendi. Hücreler tekrar % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik etüvde 48 saat süreyle inkübe edildiler. İnkübasyon periyodundan sonra canlı hücre sayısı TBE ve MTT yöntemlerine göre belirlendi.

### 3.3.2.1 *Tripan Blue Exclusion Yöntemi (TBE yöntemi)*

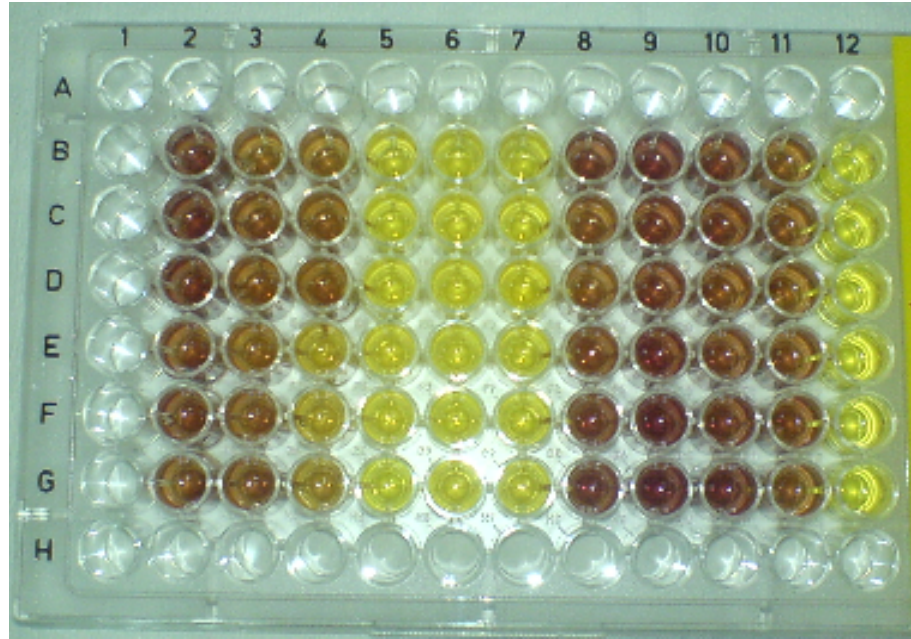
TBE yöntemi için öncelikle hücreler tripsin uygulanarak buldukları yüzeyden kaldırıldılar ve daha sonra 1000 devir/dakika hızda, 5 dakika santrifüj ile çökelti olarak ayrıldılar. Çökelti süspansiyon edilerek hücre süspansiyonu elde edildi ve daha sonra hücre süspansiyonu eşit hacimde DPBS'de hazırlanmış % 0.5 tripan mavisi ile karıştırıldı ve 5-10 dakika bekletildikten sonra hemositometrede hücre sayımı yapıldı. Canlı hücreler boyaya karşı geçirgen olmadığı ve sadece ölü hücreler boyandığı için total hücre sayısından, boyanan hücre sayısı çıkarılarak canlı hücre sayısı bulundu (Fent, 2001; Fotakis ve diğ., 2005; Weyermann ve diğ., 2005).

### 3.3.2.2. *Mitokondriyal Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Yöntemi (MTT Yöntemi)*

MTT yöntemini uygulamak amacıyla mililitresinde  $1 \times 10^5$  hücre bulunacak şekilde EMEM içerisinde hazırlanmış olan hücre süspansiyonundan her bir kuyucuğa 200  $\mu$ l olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapıldı. Hücre ekimi yapılan kültür kapları % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda yüzeye tutunmuş olan hücrelerin üzerindeki EMEM besiyeri uzaklaştırıldı, 200  $\mu$ l DPBS ile bir kez yıkandı ve kontrol grubuna 200  $\mu$ l taze EMEM, diğer kuyulara ise alkaloidlerin önceden belirlenen EMEM içerisinde hazırlanan konsantrasyonları kuyu başına 200  $\mu$ l olacak şekilde eklendi ve tekrar % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik etüvde 48 saat inkübe edildi. 48. saatin sonunda kültür kaplarındaki besiyerleri uzaklaştırılıp üç kez 200  $\mu$ l DPBS ile yıkandı. Daha sonra yıkanan kuyucuklara 35  $\mu$ l MTT [5 mg MTT/ml DPBS] eklenerek tekrar 2-4 saat süreyle etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 200  $\mu$ l DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi için 37 °C'ye ayarlanmış çalkalayıcı etüvde 15 dakika süreyle 180 devir/dakika'da çalkalamaya alındı. Çalkalama sonucunda çözünen ve homojen dağılım gösteren formazan boyanın optik yoğunlukları 540 nm dalga boyunda ve referans dalga boyu 690 nm olacak şekilde spektrofotometrede ölçüldü (Mosmann,1983; Liu ve diğ., 2003; El-Desouky ve diğ., 2007; Val'Ko ve diğ., 2007). Alkaloidlerle muamele edilmeyen (Kontrol) hücre canlılığı % 100 olarak kabul edildi. Deney ve Kontrol

gruplarının ortalama absorbans (OA) değerleri karşılaştırılarak, aşağıdaki formül ile % canlılık değeri hesaplandı. Deneyler en az 3 kez tekrarlandı.

$$\% \text{ Canlılık} = [ \text{OA ( Deney )} / \text{OA ( Kontrol )} ] \times 100$$



şekil 3.4: MTT yöntemi sonucu ortaya çıkan renk değişimleri (2. kolon B-G arasındaki kuyucuklarda % 100 canlılık sonucu oluşan renk değişimi, 12. kolon kör (blank), diğer kolonlarda ise canlılıktaki değişime göre ortaya çıkan renk değişimini yansıtmaktadır).

Ayrıca başlangıç aşamasında alkaloidlerin çözüdüğü kloroformun en yüksek final konsantrasyon değeri de, sitotoksik açıdan her iki hücre hattında da değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

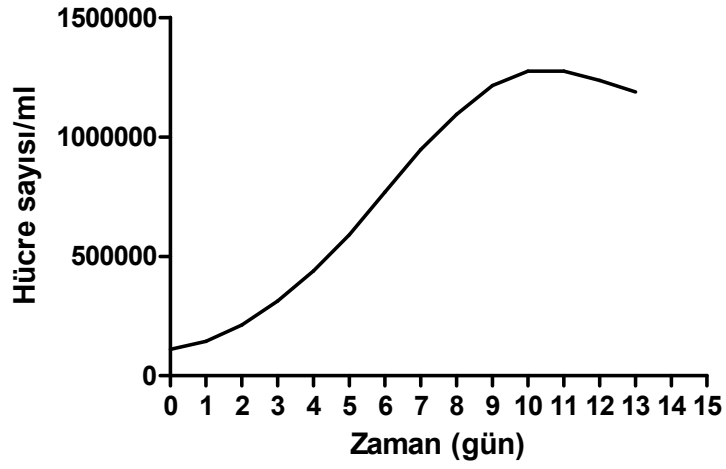
### 4.1. HÜCRE ÇOĞALMA EĞRİSİ

Vero ve HeLa hücreleri ile MTT ve TBE yöntemi uygulamadan önce her iki hücrenin de hücre çoğalma eğrisini çıkarmak, hücrelerin kaçınıcı saatte hangi fazda olduklarını anlamak ve uygulanacak alkaloidin hücre hatları ile en az kaç saat muamele edilmesi gerektiğinin anlaşılmasında önemli rol oynar. Bu amaçla ilk olarak Vero ve HeLa hücreleri için ayrı ayrı 13 günlük çoğalma eğrisi grafiği çıkartılmıştır ve ikilenme zamanı “(doubling time)” her iki hücre hattı içinde elde edilmiştir. Absise zaman (gün), ordinata hücre sayıları yerleştirilerek çoğalma eğrisi oluşturuldu (Tablo 4.1) (Şekil 4.1, 4.2).

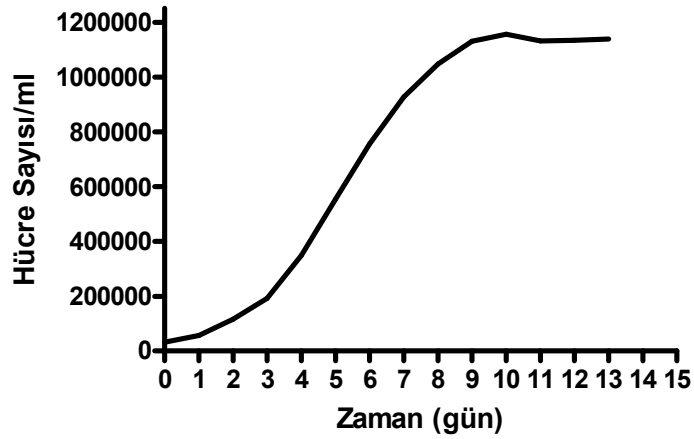
Tablo 4.1: Vero ve HeLa hücrelerinin zamana göre belirlenmiş hücre sayıları.

<b>Zaman (Gün)</b>	<b>Vero (Hücre sayısı/ml)</b>	<b>HeLa (Hücre sayısı/ml)</b>
0	50000±0	100000±0
1	43330±5774	142100±8879
2	90000±26460	213000±15570
3	170000±51960	295800±1973
4	390000±164600	437200±7141
5	510000±36060	606700±48900
6	670000±156200	748500±73790
7	1057000±148400	919700±100300
8	1107000±92380	1115000±59600
9	1087000±187700	1260000±55930
10	1127000±64290	1273000±7215
11	1137000±101200	1277000±10370
12	1140000±103900	1277000±10750
13	1133000±90740	1276000±6062





Şekil 4.1:  $10^5$  hücre/ml ile başlatılan kültürlerde canlı HeLa hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuş yarı-logaritmik çoğalma eğrisi (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlenmiştir) ( $P < 0.0001$ ,  $R^2$ : 0.9923).



Şekil 4.2:  $5 \times 10^4$  hücre/ml ile başlatılan kültürlerde canlı Vero hücre sayısı belirlenerek oluşturulmuş yarı-logaritmik çoğalma eğrisi (Grup içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek-yönlü ANOVA testi ile belirlenmiştir) ( $P < 0.0001$ ,  $R^2$ : 0.9647).

İkilenme zamanı HeLa hücreleri için 39 saat, Vero hücreleri için 46 saat olarak hesaplanmıştır.

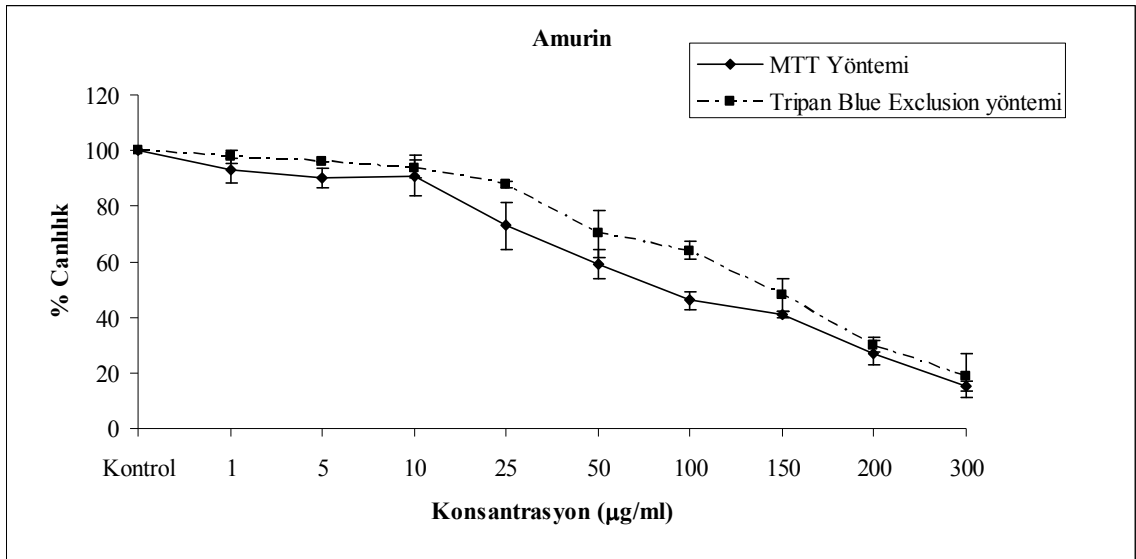
## 4.2. ALKALOİDLERİN Vero ve HeLa HÜCRELERİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

### 4.2.1. Sitotoksisite Testleri

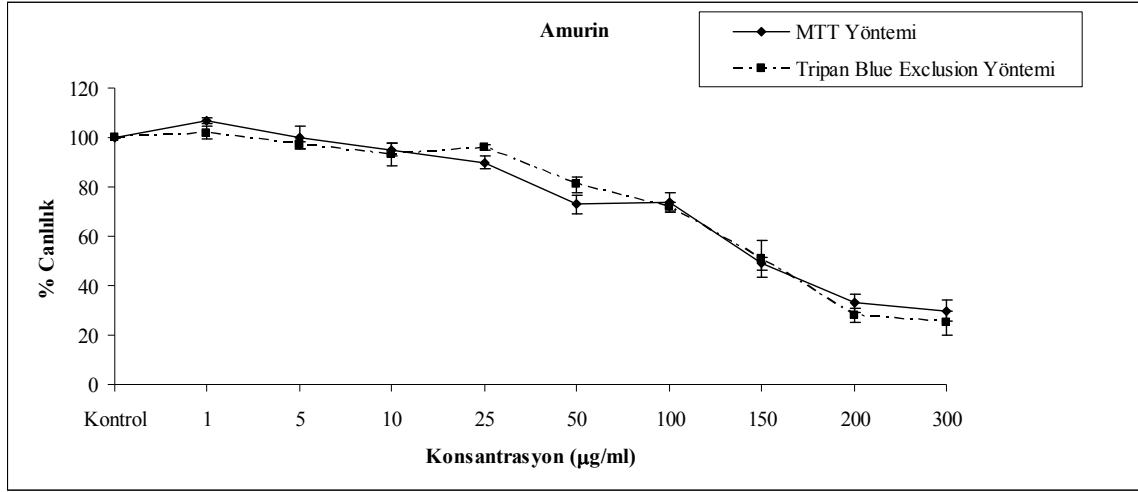
#### 4.2.1.1. Hücre Canlılık Testi

13 saf alkaloidlerin Vero ve HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerini değerlendirmek için iki yöntem uygulandı. Alkaloidlerle 48 saatlik inkübasyon periyodundan sonra canlı hücre sayısı TBE ve MTT yöntemine göre belirlendi. Her iki yöntemde elde edilen sonuçlara göre hazırlanan grafik Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 'de verilmektedir.

#### 4.2.1.2. TBE ve MTT Yöntemlerinin Karşılaştırılması



Şekil 4.3: Vero hücrelerinde amurin alkaloidinin değişik konsantrasyonlarının MTT ve TBE yöntemi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.



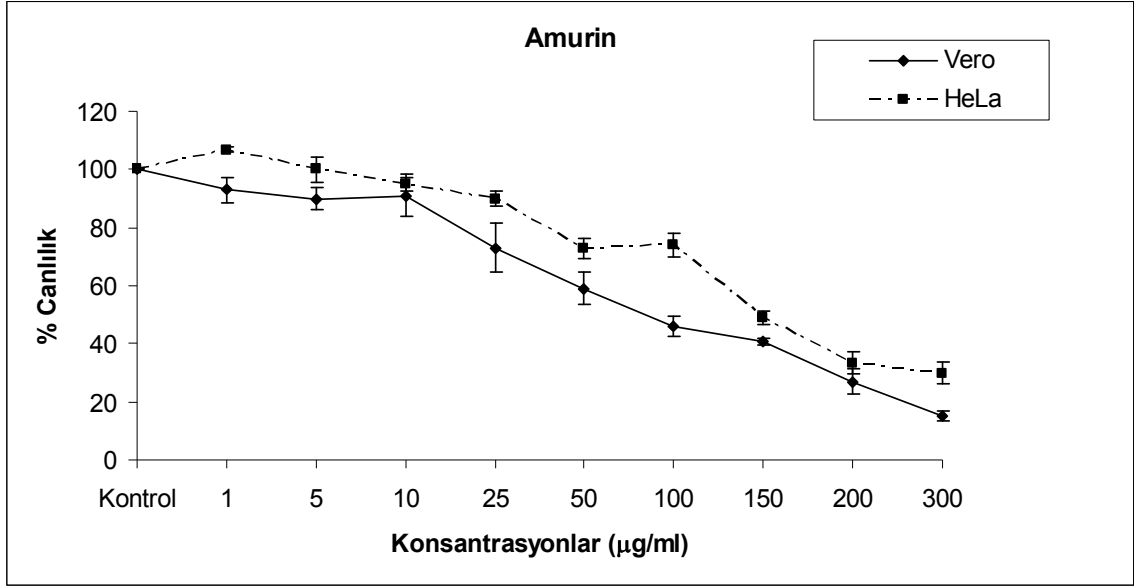
Şekil 4.4: HeLa hücrelerinde amurin alkaloidinin değişik konsantrasyonlarının MTT ve TBE yöntemi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de görüldüğü gibi amurin alkaloidinin Vero ve HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin MTT ve TBE yöntemleri ile değerlendirilmesi sonucu ortaya çıkan grafiğin her iki yöntemde de paralellik gösterdiği ortaya çıkmaktadır.

Her iki yöntemin diğer bütün alkaloidlerde de benzer etki göstermesi nedeniyle sitotoksik aktivite değerlendirmesinde bundan sonra sadece MTT yöntemi sonuçları verilecektir.

#### 4.3. SAF ALKALOİDLERİN *IN VITRO* SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN MTT YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

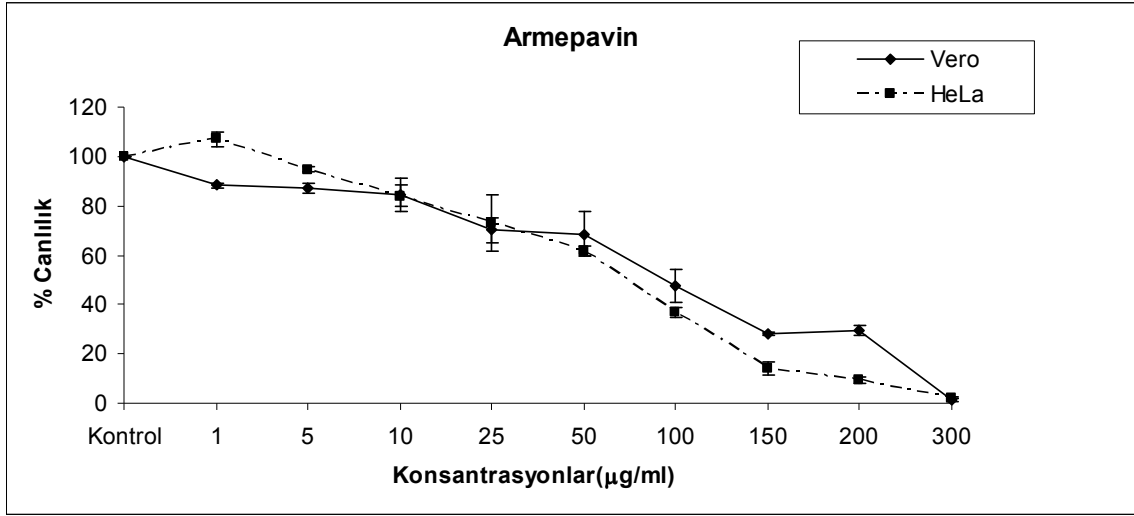
Çalışmamızda 13 saf alkaloidin ön denemeler sonucunda belirlenen konsantrasyon değerlerine göre Vero ve HeLa hücre kültürlerinde sitotoksik aktivite değerleri ortaya konmuştur. Bu değerlere göre hazırlanan sonuçlar Tablo 4.2-15’te ve grafikler Şekil 4.5-18’de gösterilmektedir. Ayrıca 13 alkaloidin her iki hücre hattı için de elde edilen  $SD_{50}$  değerlerine göre ( $SD_{50}$ ; hücrelerin % 50’sinin ölümüne neden olan  $\mu\text{g/ml}$  cinsinden ekstre konsantrasyonu) hazırlanan tablo ise Tablo 4.16’da verilmektedir.



Şekil 4.5: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine amurin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9784 ve HeLa için n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9894).

Tablo 4.2: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine amurin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

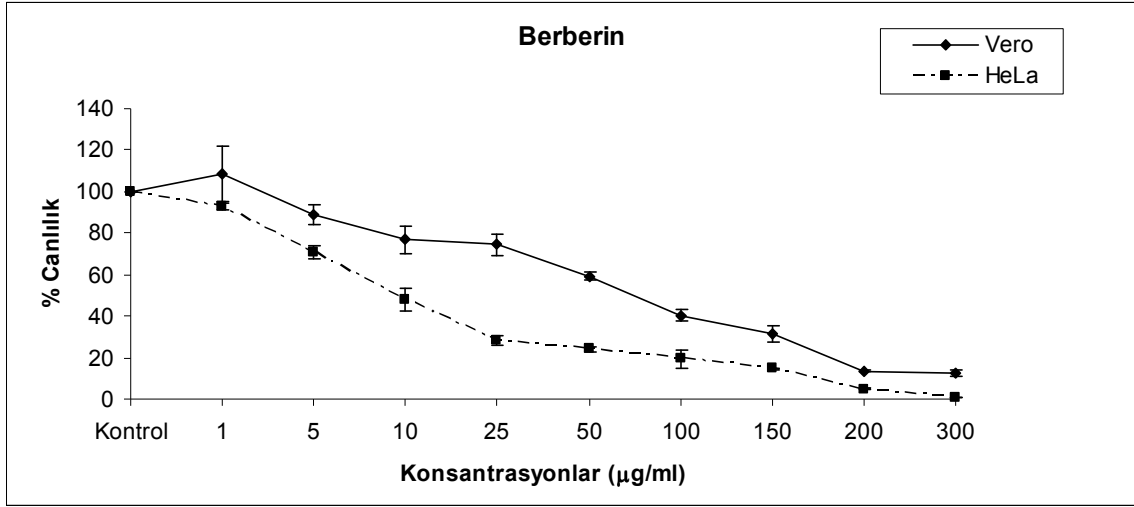
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	93± 4.35	90.33± 3.51	91.3± 7.37	72.83± 8.37	59.46± 5.42	45.94± 3.31	40.83± 1.19	27± 4.35	14.74± 1.73
<b>HeLa</b>	100± 0	106± 1.04	100± 4.54	95± 2.44	90± 2.34	72.88± 3.57	74± 4	48.87± 2.5	33.3± 3.78	30± 4.35



Şekil 4.6: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine armepavin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=6,  $P<0.0001$ ,  $R^2: 0.9892$  ve HeLa için n=5,  $P<0.0001$ ,  $R^2: 0.9901$ ).

Tablo 4.3: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine armepavin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

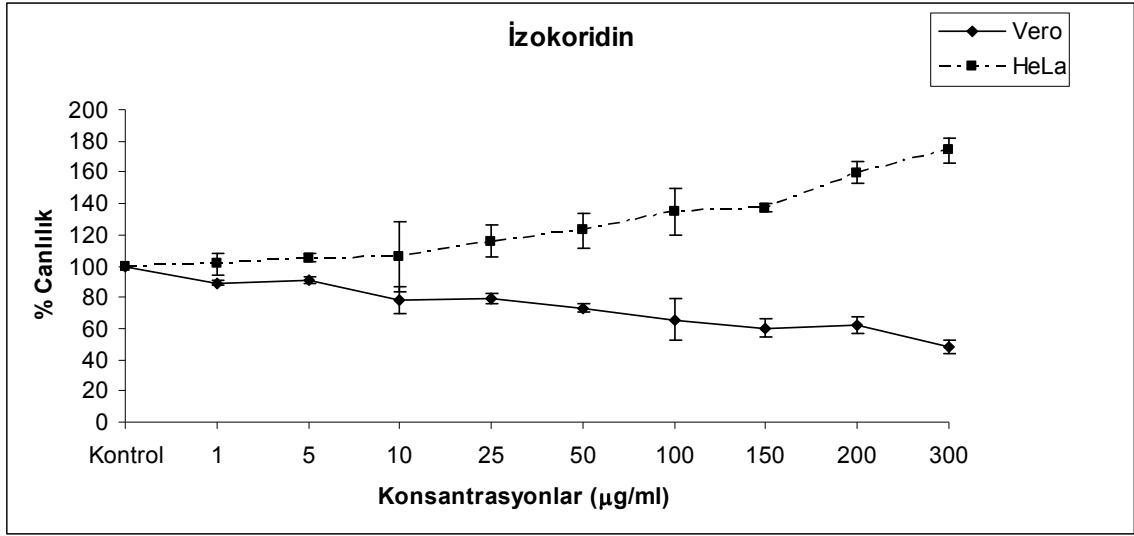
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	88.33± 1.15	87.2± 2.03	84.7± 6.67	70.3± 5.03	68.7± 9.28	47.7± 6.88	28.1± 0.7	29.6± 1.97	1.3± 0.51
<b>HeLa</b>	100± 0	107± 3	94.75± 0.95	84± 4.32	73± 11.22	61.67± 2.082	37± 2	14± 2.64	9.44± 1.5	2.13± 0.25



Şekil 4.7: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine berberin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=7, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9804 ve HeLa için n=8, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9944).

Tablo 4.4: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine berberin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

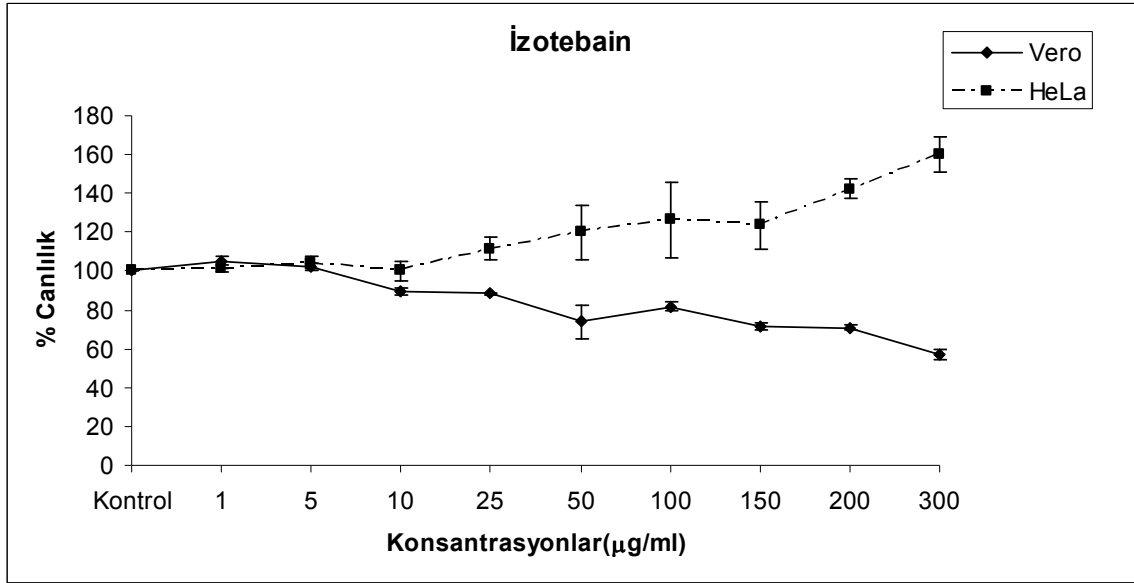
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	108.2± 14.10	88.72± 4.71	76.71± 6.75	74.39± 5.34	59.24± 2	40.49± 2.8	31.67± 4.04	13.57± 0.36	12.35± 1.52
<b>HeLa</b>	100± 0	93.2± 1.78	70.67± 2.94	48.17± 5.56	28.33± 2.08	24± 1	19.33± 4.59	14.7± 0.54	5± 0.17	0.99± 0.01



Şekil 4.8. *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine izokoridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9073 ve HeLa için n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.8906).

Tablo 4.5: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine izokoridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	89.2 ± 1.6	90.67± 2.08	78.16± 8.41	79± 3	72.9± 2.68	65.57± 13.38	60.33± 5.68	62± 5.19	48± 4.54
<b>HeLa</b>	100± 0	101 ± 6.95	105.3± 2.51	106.3± 22.52	116± 9.84	122.7± 11.06	134.6± 14.99	137.3± 2.51	159.5± 6.98	174± 7.81

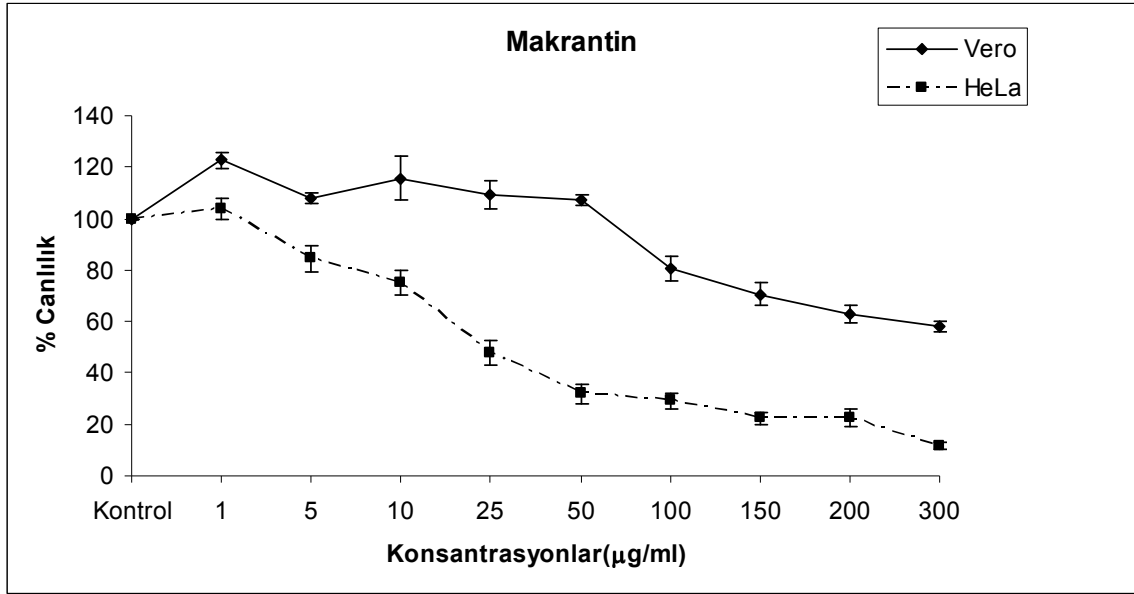


Şekil 4.9: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine izotebain alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=6,  $P < 0.0001$ ,  $R^2$ : 0.9682 ve HeLa için n=7,  $P < 0.0001$ ,  $R^2$ : 0.8611).

Tablo 4.6: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine izotebain alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	104± 3.05	102± 2	89.67± 2.08	88.33± 0.57	73.98± 8.67	81.67± 2.08	71.51± 1.5	70.77± 1.57	56.93± 2.75
<b>HeLa</b>	100± 0	101± 2.08	104.3± 3.05	100.3± 4.93	111.7± 5.68	120± 13.75	126.3± 19.6	123.7± 12.34	142.4± 5.16	160.3± 9.07

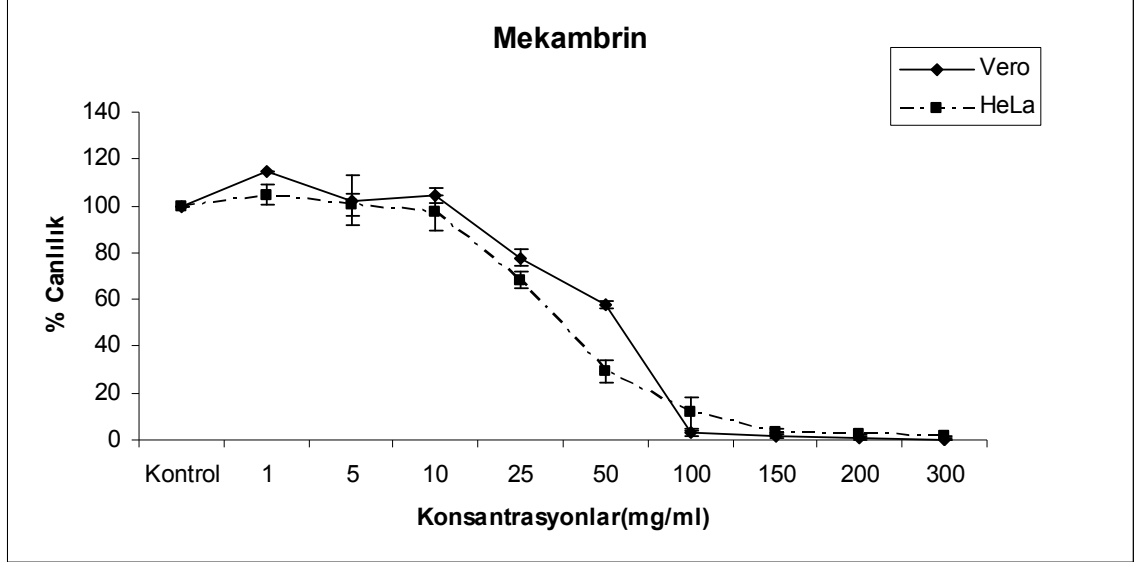




Şekil 4.10: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine makrantin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=4,  $P<0.0001$ ,  $R^2: 0.9760$  ve HeLa için n=5,  $P<0.0001$ ,  $R^2: 0.9863$ ).

Tablo 4.7: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine makrantin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

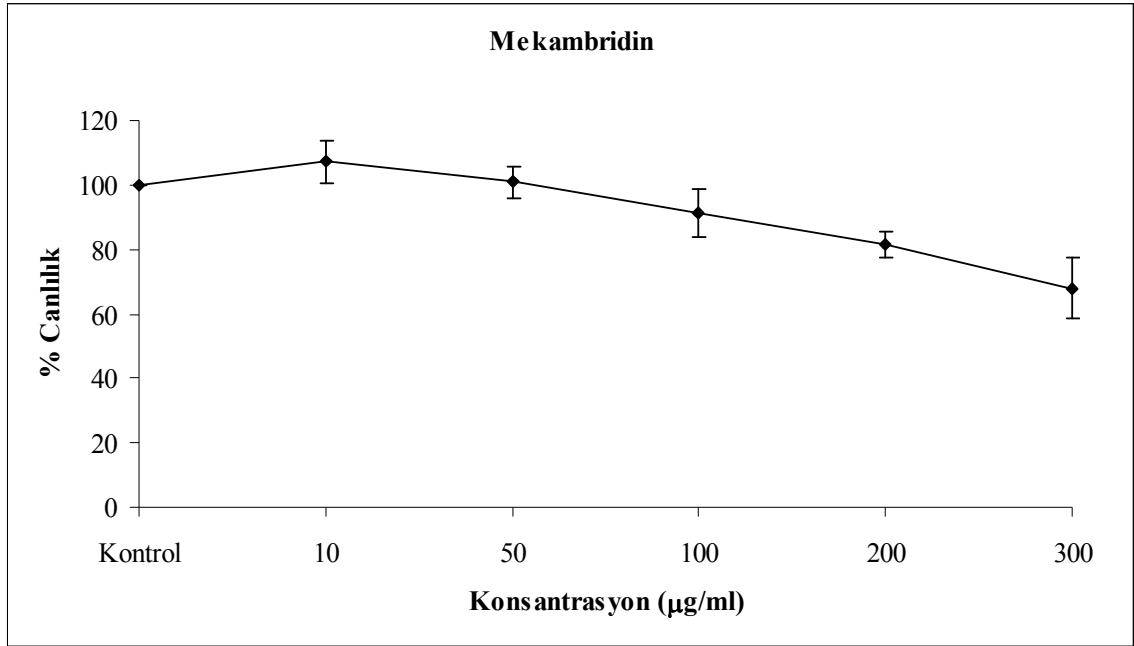
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	122 ± 3.05	107.7± 2.08	115.7± 8.65	109.3± 5.68	107.2± 2.28	80.65± 4.51	70.67± 4.16	62.83± 3.53	58.33± 2.08
<b>HeLa</b>	100± 0	103 ± 4.01	84.53± 5.03	75.17± 4.95	48.13± 4.78	31.96± 3.82	29.33± 3.05	22.3± 2.56	22.67± 3.51	11.48± 1.3



Şekil 4.11: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine mekambrin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=9, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9961 ve HeLa için n=9, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9870).

Tablo 4.8: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine mekambrin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

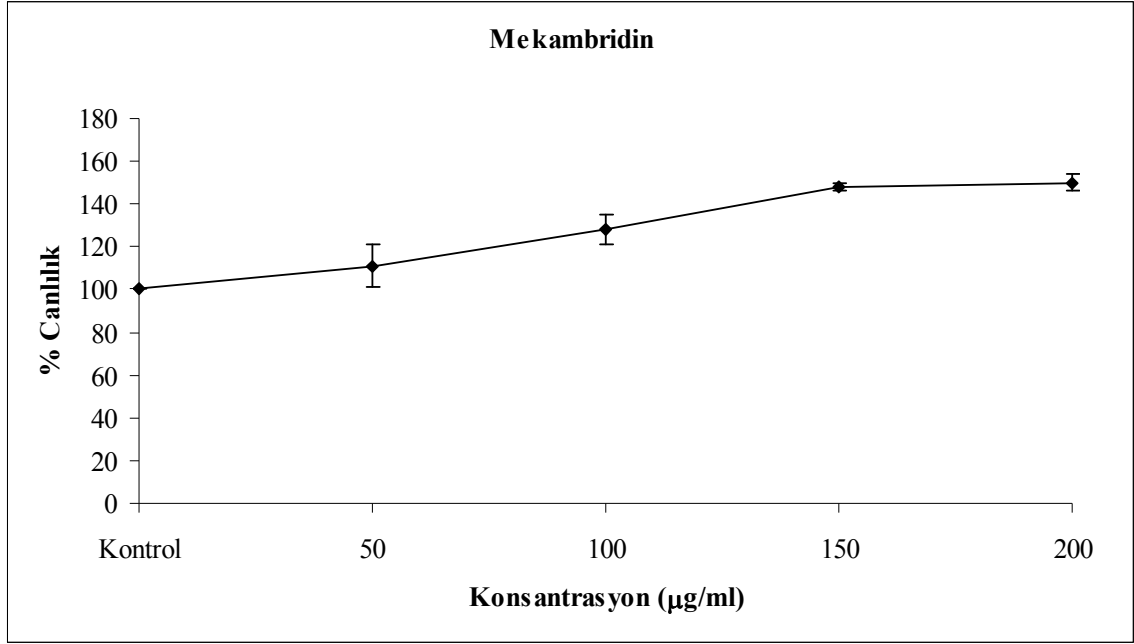
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	114 ± 0.47	102.4± 10.85	104.4± 3.39	77.74± 3.38	57.86± 1.39	2.93± 1.07	1.75± 1.08	0.41± 0.51	0.19± 0.07
<b>HeLa</b>	100± 0	104 ± 4.56	100.3± 4.89	96.97± 7.57	68.2± 3.61	29.28± 4.91	11.59± 6.82	3.53± 0.93	2.08± 0.35	1.4± 0.55



Şekil 4.12: *In vitro* Vero hücreleri üzerine mekambridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.8736).

Tablo 4.9: *In vitro* Vero hücreleri üzerine mekambridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

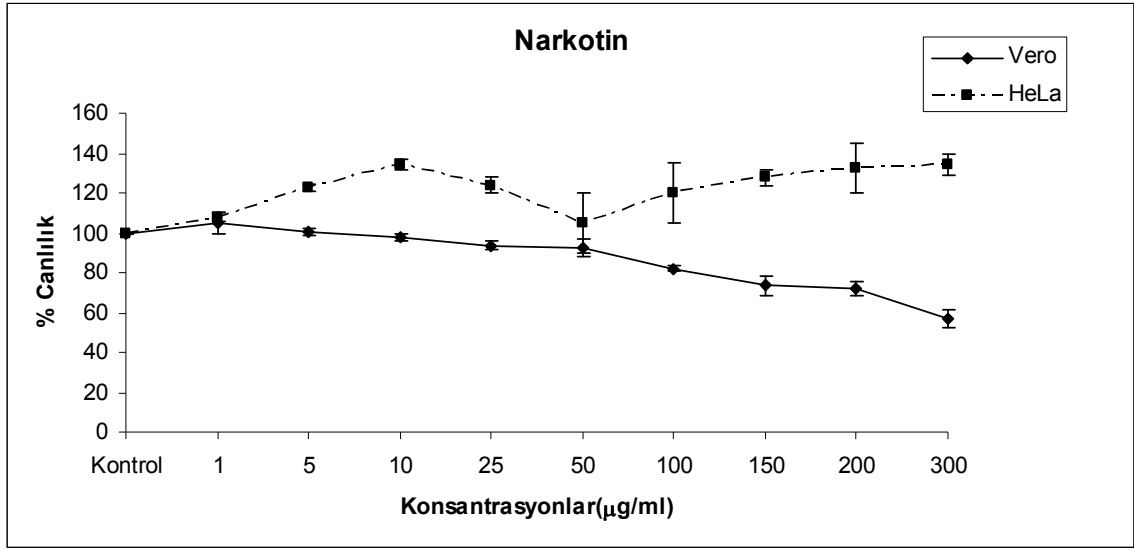
	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)					
	Kontrol	10	50	100	200	300
% Canlılık	100± 0	107.3± 6.65	100.8± 4.9	91.73± 7.44	81.57± 3.89	68± 9.53



Şekil 4.13: *In vitro* HeLa hücreleri üzerine mekambridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9627).

Tablo 4.10: *In vitro* HeLa hücreleri üzerine mekambridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

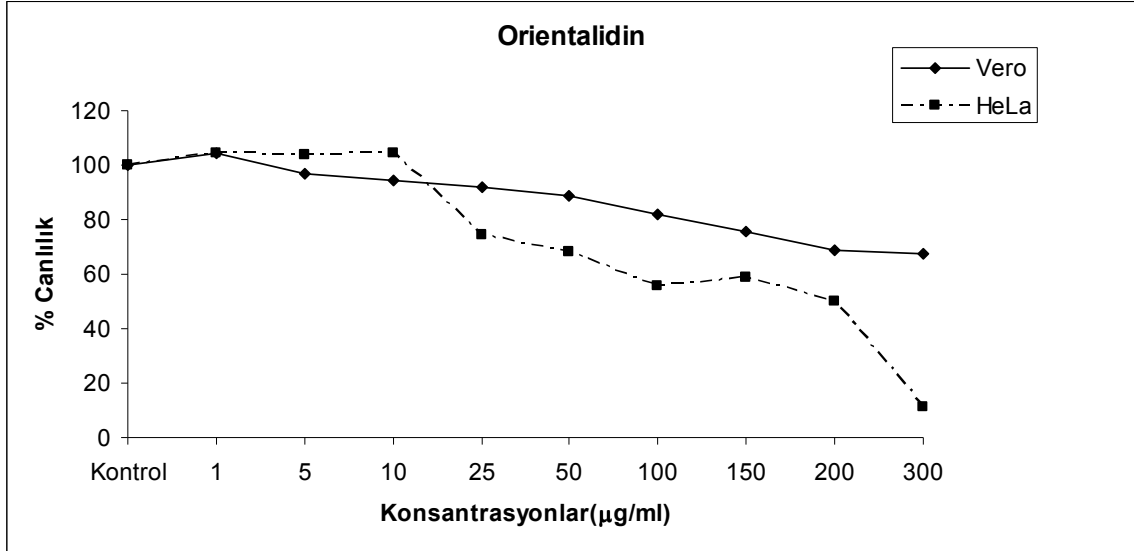
	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)				
	Kontrol	50	100	150	200
% Canlılık	100± 0	111± 9.89	127.9± 7.1	148± 1.41	150± 3.6



Şekil 4.14: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine narkotin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=7, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9665 ve HeLa için n=6, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.7743).

Tablo 4.11: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine narkotin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

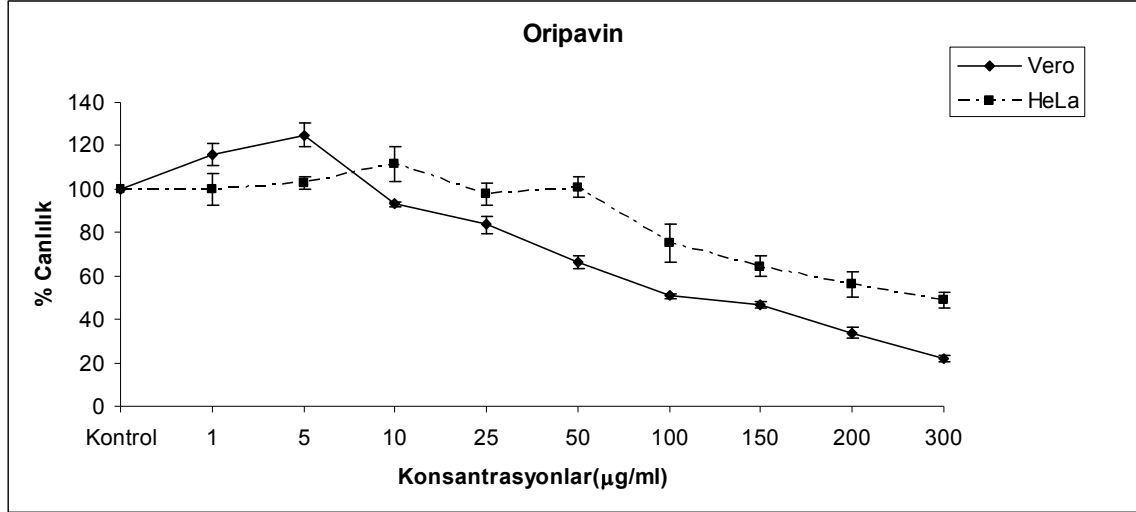
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	104 ± 5.5	100.3± 1.52	97.67± 1.52	93.67± 2.08	92.77± 4.36	82.22± 1.2	73.6± 4.99	71.97± 3.21	56.83± 4.31
<b>HeLa</b>	100± 0	108 ± 2.64	123± 1.73	134.3± 2.51	123.7± 4.04	104.7± 14.98	120± 15	128± 4	132.7± 12.5	134± 5.29



Şekil 4.15: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine orientalidin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=9, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9196 ve HeLa için n=9, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9884).

Tablo 4.12: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine orientalidin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

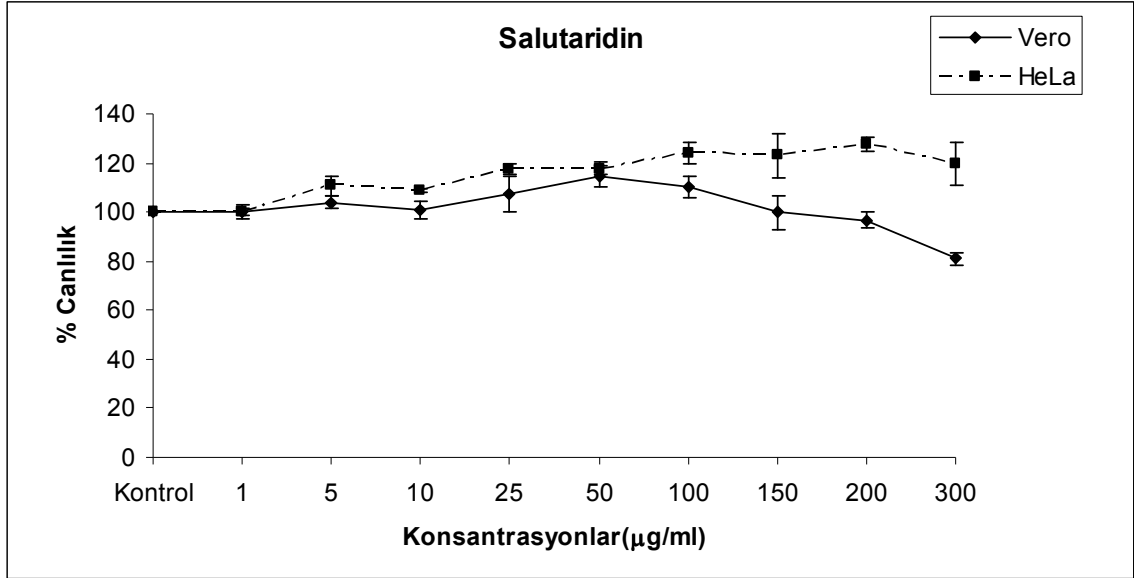
% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	104.3± 6.02	96.67± 2.08	94.13± 5.06	92± 3.6	88.45± 2.19	82.07± 5.47	75.86± 5.21	68.6± 5.17	67.67± 5.5
<b>HeLa</b>	100± 0	104.3± 3.21	103.7± 1.52	104.3± 1.15	74.33± 3.05	68.33± 5.68	55.33± 1.52	58.67± 2.3	50± 2.64	11.5± 4.79



Şekil 4.16: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine oripavin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=8, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9939 ve HeLa için n=8, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9562).

Tablo 4.13: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine oripavin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	115.7± 5.13	125± 5.56	93.12± 1.15	83.67± 4.04	66.33± 2.88	50.78± 1.12	46.47± 1.55	33.9± 2.74	21.96± 1.55
<b>HeLa</b>	100± 0	100.1± 7.17	103± 2.9	111.8± 8.12	97.53± 5.02	100.9± 4.57	75.08± 8.44	64.5± 4.82	56.19± 5.9	48.67± 3.51

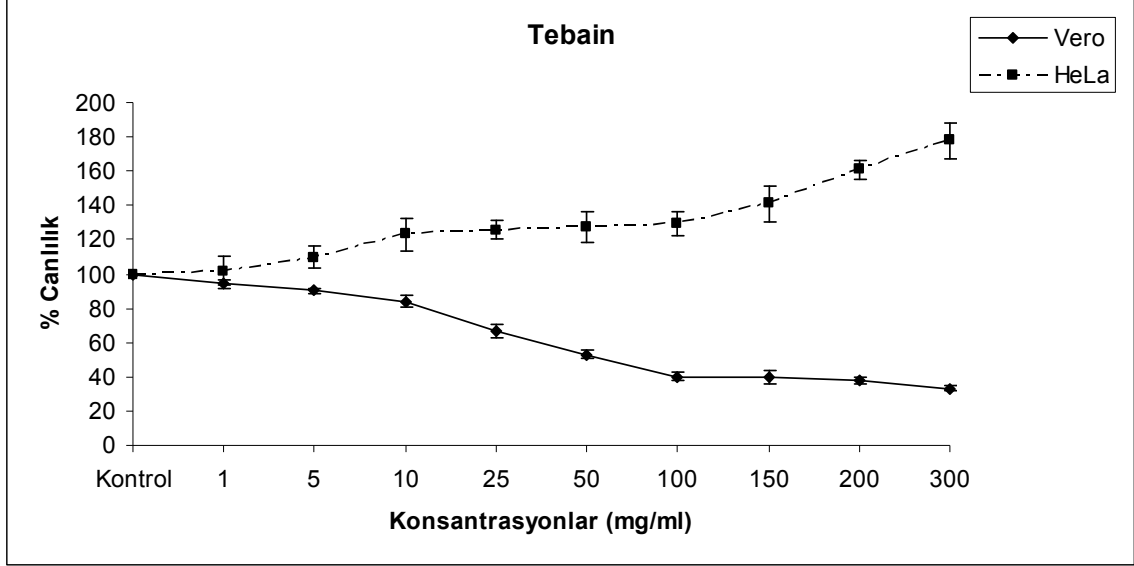


Şekil 4.17: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine salutaridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=7, P: 0.0162, R<sup>2</sup>: 0.6736 ve HeLa için n=6, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.8517).

Tablo 4.14: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine salutaridin alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	100.3± 1.52	104± 2.64	101± 3.6	107.3± 7.37	114.7± 4.55	110.2± 4.55	100± 6.85	96.76± 3.4	81± 2.64
<b>HeLa</b>	100± 0	100± 2.64	110.7± 3.78	109± 0.81	117.5± 2.08	117.8± 2.63	124± 4.35	123± 8.88	127.6± 2.61	119.7± 8.96





Şekil 4.18: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine tebain alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisi (Vero için n=5, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9924 ve HeLa için n=6, P<0.0001, R<sup>2</sup>: 0.9247).

Tablo 4.15: *In vitro* Vero ve HeLa hücreleri üzerine tebain alkaloidinin MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik etkisini gösteren sonuçlar.

% Canlılık	Alkaloid Konsantrasyonu (µg/ml)									
	Kontrol	1	5	10	25	50	100	150	200	300
<b>Vero</b>	100± 0	94.33± 2.3	90.15± 1.23	83.67± 3.51	66.67± 4.04	53± 2.64	40± 2.64	39.67± 3.78	37.67± 2.309	33.33± 1.52
<b>HeLa</b>	100± 0	101.8± 8.28	109.8± 6.3	123.3± 9.45	125.8± 5.43	127.3± 9.07	129.2± 6.71	140.8± 10.94	160.8± 5.12	178± 10.36

#### 4.4. ALKALOİDLERİN SD<sub>50</sub> DEĞERLERİ

4.3.'teki tablo ve grafiklere göre oluşturulmuş tablo Tablo 4.16' da gösterilmiştir.

Tablo 4.16: Alkaloidlerin Vero ve HeLa hücrelerindeki SD<sub>50</sub> değerleri (SD<sub>50</sub>; hücrelerin % 50'sinin ölümüne neden olan alkaloid konsantrasyonu).

Alkaloidler	SD <sub>50</sub> (µg/ml)	
	Vero	HeLa
Amurin	86.58	151.51
Armepavin	95.30	66.44
Berberin	71.14	12.08
İzokoridin	>300	Saptanamadı
İzotebain	>300	Saptanamadı
Makrantin	>300	24.16
Mekambrin	58.39	36.91
Mekambridin	>300	Saptanamadı
Narkotin	>300	Saptanamadı
Orientalidin	>300	200
Oripavin	110.74	271.81
Salutaridin	Saptanamadı	Saptanamadı
Tebain	54.56	Saptanamadı

Alkaloidlerin Vero ve HeLa hücre kültürlerinde sitotoksik aktivite değerlerine göre hazırlanan şekil ve tablolar (Şekil 4.5-18, Tablo 4.2-15) incelendiğinde 13 alkaloidin 7 tanesinin HeLa hücrelerinde (amurin, armepavin, makrantin, mekambrin, orientalidin, oripavin, berberin) ve 12 tanesinin de (amurin, armepavin, isokoridin, izotebain, makrantin, mekambrin, mekambridin, narkotin, orientalidin, oripavin, tebain, berberin) Vero hücrelerinde konsantrasyon artışına paralel olarak sitotoksik aktivite gösterdiği ortaya çıkmaktadır.  $SD_{50}$  sonuçlarına göre değerlendirildiğinde HeLa hücreleri için sitotoksik aktivite gösteren alkaloidler içerisinde en aktif olanı berberin alkaloididir (  $SD_{50}$  : 12.08  $\mu\text{g/ml}$ ) ve bunu da makrantin ( $SD_{50}$  : 24.16  $\mu\text{g/ml}$ ) ve mekambrin ( $SD_{50}$  : 36.91  $\mu\text{g/ml}$ ) alkaloidleri takip etmektedir. En az aktiviteyi ise oripavin göstermektedir ( $SD_{50}$  : 271.81  $\mu\text{g/ml}$ ). HeLa hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermeyen 6 alkaloidin salutaridin haricinde 5 tanesinin anlamlı bir şekilde konsantrasyon artışına paralel olarak hücre çoğalmasını teşvik ettiği (proliferatif etki) ortaya çıkmaktadır. Özellikle tebain alkaloidinin 300  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonunda hücre sayısının kontrole göre % 78 oranında arttığı görülmektedir.  $SD_{50}$  sonuçlarına göre değerlendirildiğinde Vero hücreleri için sitotoksik aktivite gösteren alkaloidler içerisinde ise en aktif alkaloid tebain'dir ( $SD_{50}$  : 54.56  $\mu\text{g/ml}$ ). Bunu mekambrin ( $SD_{50}$  : 58.39  $\mu\text{g/ml}$ ) ve berberin ( $SD_{50}$  : 71.14  $\mu\text{g/ml}$ ) alkaloidleri izlemektedir. Aktivitesi araştırılan alkaloidler içerisinde sadece 1 tanesi (salutaridin) en fazla denenen konsantrasyon olan 300  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda bile her iki hücre tipi için de sitotoksik aktivite göstermemiştir. Aktivitesi araştırılan alkaloidler içerisinde ise en ilginç sonucu mekambrin alkaloidi göstermiştir. Mekambrin alkaloidinin Vero hücrelerinde 100  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda, HeLa hücreleri için ise 150  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda % 100 sitotoksikite gösterdiği yani hücrelerin tamamının ölümüne neden olduğu ortaya çıkmaktadır. Alkaloidlerin çözündürülmesinde kullanılan kloroformun en yüksek konsantrasyonununun sitotoksik değerlendirilmesi de yapılmış ve kloroformun final konsantrasyonununun sitotoksik etkisi saptanmamıştır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastalıkların tedavisinde ilaç olarak bitkilerin kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Günümüzde dahi gelişmekte olan hatta gelişmiş ülkelerde bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı sentetik ilaçların hızlı gelişimine karşın önemini hala korumaktadır. Bitkilerdeki biyosentetik yolların çeşitliliği günümüzde kullanılan ilaçların % 50'sinden fazlasında bitkisel ürünlerin kullanımının temel nedenini oluşturmaktadır. Günümüzde yine bitkiler muhtemel terapötik etkili yeni moleküllerin bulunmasında en önemli ve zengin kaynağı oluşturmaktadır (Stevigny ve diğ., 2005). Bu potansiyel kaynak günümüzde çok yoğun bir şekilde taranmakta ve yapılan çalışmalarda çok çeşitli bitkisel kökenli molekül gruplarının değişik aktiviteleri ortaya konmaktadır. Bitkilerden izole edilen, *in vitro* ve *in vivo* aktivitesi saptanmış olan çok çeşitli molekül grupları (polisakkaritler, flavonoidler, terpenler, alkaloidler, fenoller ve amino asitler) bulunmaktadır (Stevigny ve diğ., 2005; Zahran ve diğ., 2005; Akinpelu ve diğ. 2008).

Bitkisel kaynaklı molekül grupları içerisinde çeşit ve etkinlik bakımından en önemli gruplardan birisi alkaloidlerdir. Alkaloidlerin değişik biyolojik aktiviteleri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda da bir kısmının aktif klinik kullanıma sokulması mümkün olabilmiştir. Yapılan çalışmalarda alkaloidlerin antiviral, antitümoral, antimikrobiyal ve çeşitli immünolojik aktiviteleri içeren çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri ortaya konmuştur (Alexandrova ve diğ., 2000; Stevigny ve diğ., 2005). Bitkilerde bulunan 21000'den fazla alkaloid türünden pek çoğu nöroreseptör veya iyon kanallarına etkili olan nörotoksinlerdir. Alkaloidlerin önemli bir kısmı da sitotoksik etkiye sahiptirler.

Sitotoksisite bir molekülün bir hücredeki bir veya daha çok önemli hedefle moleküler etkileşiminin bir sonucu ortaya çıkar. Dolayısıyla sitotoksisitede belli başlı temel hedefler DNA, RNA ve bu moleküllerle ilgili enzimler ve reaksiyon kademeleri (replikasyon, onarım, transkripsiyon, DNA polimeraz, RNA polimeraz, topoizomeraz, telomeraz), protein biyosentezi ve membran fonksiyonu ve proteinleri olarak açıklanabilir (Wink, 2007).

Çeşitli hücre hatlarının günümüzde moleküler biyolojik tekniklerle birlikte kullanımının yaygınlaşması ile ortaya çıkan *in vitro* yöntemler, hem klinik hem de temel araştırma çalışmalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle bu tip *in vitro* teknikler çeşitli ajanlar tarafından indüklenen transformasyon, hücre çoğalması ve sitotoksikite mekanizmalarının çalışılmasında faydalıdır (Ishihara, 2001). Yapılan bir çalışmada S-disentrin, neolitsin, aktinodafnin ve kassitin alkaloidlerinin HeLa, Mel-5 ve HL60 kanser hücre hatlarında ve NIH3T3 kanser olmayan hücre hattında *in vitro* sitotoksik özellikleri ortaya konmuştur (Stevigny ve diğ., 2005). Bu moleküller, diğer sitotoksik ajanların çoğunluğunda olduğu gibi spesifik bir etki göstermemiş fakat hızla çoğalan hücrelerin çoğalmasını önemli oranda inhibe etmişlerdir. Daha sonraki çalışmalarda S-disentrin alkaloidinin DNA topoizomera II enziminin katalitik aktivitesini inhibe ettiği ortaya konmuştur.

Yapılan bir çalışmada *Consolida* türlerinden izole edilen diterpenoid alkaloidlerinden likoktonin ve 14-asetilbrovnin alkaloidlerinin MDBK ve Vero hücrelerinde sitotoksik aktivite gösterdikleri ortaya konmuştur (Şener ve diğ., 2007). Taksonomik bir çalışmada, *Delphinium* türlerinden izole edilen likoktonin tipi alkaloidler toksisite derecelerine göre üç gruba ayrılmıştır. Bunlar, yüksek toksisiteye sahip N-(metilsüksinil)-antranoyillikoktonin tip, orta derece toksisiteye sahip likoktonin tip ve düşük toksisiteli 7,8-metilendioksilikoktonin tip olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmada moleküle bağlı C14 bakiyesinin bu tip alkaloidlerin toksisitesi için önemli olduğu ortaya konmuştur. N-(metilsüksinil)-antranoyillikoktonin tip alkaloidin metil süksinil grubu uzaklaştırıldığında toksisitesinin 93 kez daha az olduğunun ortaya çıkması da bu görüşü desteklemektedir (Panter ve diğ., 2002).

Yapılan bir çalışmada *Solanum pseudocapsicum*'dan elde edilen alkaloidlerin *in vitro* sitotoksik ve *in vivo* antitümör etkileri olduğu ortaya konmuştur (Badami ve diğ., 2003; Vijayan ve diğ., 2004). Başka bir çalışmada da *Solanum pseudocapsicum*'dan izole edilen O-metilsolanokapsinin kanser hücre hattı (HeLa) ve normal hücre hattına (Vero) karşı *in vitro* sitotoksik aktivitesi MTT ve SRB (sülforodamin B) yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Alkaloidin her iki hücre hattına karşı sitotoksik aktivite gösterdiği,  $SD_{50}$  değerlerinin (MTT ile belirlenen) HeLa için 39  $\mu\text{g/ml}$  ve Vero için 59  $\mu\text{g/ml}$  olduğu ve HeLa hücrelerine karşı daha fazla toksisite gösterdiği ortaya konmuştur (Dongre ve diğ., 2007).

Biz de çalışmamızda alkaloidlerin *in vitro* sitotoksik aktivitelerini değerlendirmek için bir insan kanser hücre hattı olan HeLa ve kanser olmayan bir hücre hattı olan maymun kökenli Vero hücrelerini kullandık. Alkaloidlerin Vero ve HeLa hücre kültürlerinde MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksik aktivite değerlerine göre (Şekil 4.5-18, Tablo 4.2-15) 13 alkaloidin 7 tanesinin HeLa hücrelerinde (amurin, armepavin, makrantin, mekambrin, orientalidin, oripavin, berberin) ve 12 tanesinin de (amurin, armepavin, isokoridin, izotobain, makrantin, mekambrin, mekambridin, narkotin, orientalidin, oripavin, tebain, berberin) Vero hücrelerinde konsantrasyon artışına paralel olarak sitotoksik aktivite gösterdiği ortaya çıkmaktadır.  $SD_{50}$  sonuçlarına göre değerlendirildiğinde ise HeLa hücreleri için sitotoksik aktivite gösteren alkaloidler içerisinde en aktif olanı berberin alkaloididir ( $SD_{50}$  : 12.08  $\mu\text{g/ml}$ ) ve bunu da makrantin ( $SD_{50}$  : 24.16  $\mu\text{g/ml}$ ) ve mekambrin ( $SD_{50}$  : 36.91  $\mu\text{g/ml}$ ) alkaloidleri takip etmektedir. En az aktiviteyi ise oripavin göstermektedir ( $SD_{50}$  : 271.81  $\mu\text{g/ml}$ ). HeLa hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermeyen 6 alkaloidin salutaridin haricinde 5 tanesinin anlamlı bir şekilde konsantrasyon artışına paralel olarak hücre çoğalmasını teşvik ettiği (proliferatif etki) ortaya çıkmaktadır. Özellikle tebain alkaloidinin 300  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonunda hücre sayısının Kontrole göre % 78 oranında arttığı görülmektedir.  $SD_{50}$  sonuçlarına göre değerlendirildiğinde Vero hücreleri için sitotoksik aktivite gösteren alkaloidler içerisinde ise en aktif alkaloid tebaindir ( $SD_{50}$  : 54.56  $\mu\text{g/ml}$ ). Bunu mekambrin ( $SD_{50}$  : 58.39  $\mu\text{g/ml}$ ) ve berberin ( $SD_{50}$  : 71.14  $\mu\text{g/ml}$ ) alkaloidleri takip etmektedir. Aktivitesi araştırılan alkaloidler içerisinde sadece 1 tanesi (salutaridin) en fazla denenen konsantrasyon olan 300  $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda bile her iki hücre tipi için de sitotoksik aktivite göstermemiştir. Alkaloidlerin Vero ve HeLa hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri farklılık göstermektedir. Denenen 13 alkaloidin 12 tanesi değişik derecelerde Vero hücrelerinde sitotoksik etki gösterirken, 7 tanesi HeLa hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir.  $SD_{50}$  değerlerine göre her iki hücrede de sitotoksik etki gösteren 7 alkaloidin 5 tanesinin HeLa hücrelerinde daha fazla sitotoksik etkiye sahip olduğu ortaya çıkmaktadır. En ilginç sonuç alkaloidlerin HeLa hücrelerinde 7 tanesinin

sitotoksik etkiye sahipken 6 tanesinin ise değişik derecelerde hücre çoğalmasını teşvik edici (proliferatif) etki göstermesidir. HeLa hücrelerinde proliferatif etkiye sahip 6 alkaloidin 5 tanesinin Vero hücrelerinde değişik derecelerde sitotoksik etki göstermesi de dikkat çekici bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır.

Hücre ölümü iki farklı mekanizmadan biri ile gerçekleşebilir; ya nekroz (hücrenin kaza veya travma ile ölümü) ya da apoptoz (programlı hücre ölümü). Nekroz iltihaplanmalara neden olurken, apoptoz bu tür reaksiyonlara neden olmaz. Günümüzde kullanılan sitotoksik antitümör ilaçlarının pek çoğunun duyarlı hücrelerde apoptozu uyardığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin zararsız bir şekilde ortadan kaldırılması kemoterapideki en temel yaklaşımlardan biridir ve sonuçta da apoptozun uyarılması antikanser ilaç araştırması ve geliştirilmesinde önemli bir stratejidir (Tian ve diğ., 2006).

Hücre biyologları nekrotik ve apoptotik hücre ölümü arasındaki farkı ortaya koyma amacıyla çok fazla sayıda çalışma yürütmüşlerdir. Eğer bir hücre saponin veya diğer deterjanlarla işleme sokulursa veya fiziksel strese maruz bırakılırsa (ısıtma, dondurma, hipoksi) nekrozla hızlı bir şekilde ölür. İlk defa 1972 yılında keşfedilen programlı hücre ölümü veya apoptoz, pek çok organizmanın gelişiminde temel bir mekanizmadır. Apoptoz iltihaplanmaya neden olmaz ve hücreler makrofaj ve diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılırlar. Apoptoz, DNA, mikrotübüller, biyomembran ve reseptörler gibi önemli moleküler hedeflerle etkileşime giren alkaloidler, polifenoller, terpenler veya saponinler gibi bazı doğal ürünlerle de indüklenebilir. Günümüzde kanser terapisinde kullanılan antikanser ilaçların pek çoğu apoptozu uyararak etkilerini gösterirler (Wink, 2007).

Yapılan bir çalışmada 14 farklı apoptotik alkaloidin değişik kademelerde moleküler hedeflerle etkileşime girerek apoptozu uyardığı ortaya konmuştur. Çalışılan 14 tip alkaloidin hepsi de değişik derecelerde nörotoksik etki göstermiş, vinblastin ve vinkristinin etkin bir şekilde mikrotübül inhibisyonuna, önemli bir kısmının da protein sentezinin inhibisyonuna, membran ve DNA etkileşimine neden olduğu ortaya konmuştur (Rosenkranz ve Wink, 2008).

Değişik biyolojik aktivitelere sahip olan bir izokinolin alkaloidi olan berberin ile yapılan bir çalışmada berberinin *in vitro* antitümör aktivitesi gösterilmiştir. Hücre siklus analizi S fazında azalma ve hücrelerin G0/G1 fazında bloke olduğunu göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmada berberinin HL-60 ve 3T3 hücrelerinde apoptozu indüklediği de gösterilmiştir (Lizuka ve diğ., 2000). Letasiova ve diğ., 2005 yılında berberin alkaloidinin *in vitro* ve *in vivo* antiproliferatif aktivitesi ile ilgili yaptıkları çalışmada berberinin 0.001-25 µg/ml konsantrasyonlarını kullanmışlar ve doz artışına paralel olarak berberinin B16 tümör hücre hattına karşı *in vitro* sitotoksik ve *in vivo* antitümöral aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmada doz artışının yanında uygulama zamanının artışına paralel olarak sitotoksik aktivitenin arttığı da ortaya konmuştur. Berberinin 1 µg/ml'lik konsantrasyonunda 24 saatlik uygulamada B16 hücrelerinde anlamlı bir sitotoksik aktivite görülmezken 48. saatte % 65 hücre dejenerasyonunun olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde berberinin 25 µg/ml'lik konsantrasyonunda *in vitro* şartlarda B16 hücrelerinin % 100'ünün ölümüne neden olduğu ortaya konmuştur. Berberinin *in vivo* antikanser aktivitesinin belirlenmesine yönelik çalışmada ise B16 kanser hücreleri transplante edilmiş farede 1-10 mg/kg arası dozlar uygulanmıştır. 5 ve 10 mg/kg'lik dozlarda 16. günde tümör hacminde önemli oranda azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışmadaki en ilginç sonuç ise 1 mg/kg'lık dozun tümör hacminin artışına neden olmasıdır.

Bizim de çalıştığımız alkaloidlerden biri olan berberinin MTT yöntemiyle Vero ve HeLa hücre hatlarında SD<sub>50</sub> değerlerine göre en fazla sitotoksik aktivite gösteren alkaloid olduğu ortaya çıkmıştır. Berberinin özellikle bir kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde çok daha etkin olması (benzer şekilde makrantin ve mekambrinin de benzer etkinlik göstermesi) ümit verici bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle mekambrin alkaloidi Vero ve HeLa hücrelerinde aktivitesi araştırılan alkaloidler içerisinde en ilginç sonucu göstermiştir. Mekambrin alkaloidinin Vero hücrelerinde 100 µg/ml konsantrasyonda, HeLa hücreleri için ise 150 µg/ml konsantrasyonda % 100 sitotoksikite gösterdiği yani hücrelerin tamamının ölümüne neden olduğu ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.11). En fazla aktivite gösteren bu alkaloidlerin yapılacak çalışmalarla özellikle apoptoz sürecindeki muhtemel etkinlikleri ve *in vivo* antitümöral etkileri ortaya konabilir. Yapılan çalışmalarda berberinin benzer bir etkinlik göstermesi bizi de ümitlendiren bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır.



Yapılan bir çalışmada aporfinoid alkaloidlerinin sitotoksik ve antitümöral potansiyelleri (*in vitro* (sitotoksik) ve *in vivo* (antitümör)) değerlendirilmiş ve S-disentrin alkaloidinin HuH-7 ve MS-G2 gibi insan kanser hücre hatlarının çoğalmasını önemli oranda inhibe ettiği ve hücrelerin doku kültüründe ikilenme zamanını artırdığı ortaya konmuştur (Stevigny ve diğ., 2005). S-disentrinin 14.7 µM konsantrasyonunun her iki hücrenin koloni oluşumunu azalttığı ve DNA ve RNA'nın biyosentezini de doza paralel olarak inhibe ettiği ortaya konmuştur. S-disentrin alkaloidinin *in vivo* antitümöral aktivitesinin değerlendirilmesinde, maddenin haftada iki kez toplam 4 hafta karın boşluğuna uygulanması (100 µg/fare) sonucunda farede K562 kanser hücre hattının çoğalmasını önemli oranda inhibe ettiği ortaya konmuştur. Bütün bu bulgular bu bileşiğin sitostatik etki gösterdiğinin ve potansiyel antitümör uygulamalar için kullanımının mümkün olabileceğini göstermektedir (Stevigny ve diğ., 2005).

*In vitro* sitotoksik aktivite çalışmalarımızda ortaya çıkan aktif alkaloidlerin (özellikle berberin, makrantin ve mekambrin) antitümöral potansiyellerinin değerlendirilmesi için *in vivo* modellerde yapılacak ilave çalışmalara gereksinim olduğu ortaya çıkmaktadır.

Ulusal Kanser Enstitüsü'ne göre IC<sub>50</sub> değeri (SD<sub>50</sub>) 20 µg/ml'den küçük olan (hücre canlılığını %50 oranında azaltmak için gerekli konsantrasyon) ekstreler aktif olarak kabul edilmektedir. Kanser hücrelerine karşı aktif ekstrelerin SD<sub>50</sub> değerleri, normal hücrelere karşı SD<sub>50</sub> değerleriyle karşılaştırılarak gerçek etkinlik ortaya konmalıdır (Saetung ve diğ., 2005). Bizim çalışmamızda bu kriterlere uygun iki sonuç (berberin ve makrantin) ortaya çıkmaktadır. Mekambrin de bu kriterlere yakın bir değer ortaya koymuştur. Özellikle bu alkaloidlerin normal hücre hattı olan Vero hücrelerine göre kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde çok daha fazla sitotoksik etkinlik göstermesi antitümöral ajanların geliştirilmesi alanında ümit vaat etmektedir.

Günümüzde kanser patobiyolojisi, teşhisi ve tedavisi alanındaki büyük ilerlemelere karşın, kullanılan kemoterapötik ajana karşı direncin gelişmesi, kanserlerin farklı tiplerinin tedavisinde karşılaşılan en yaygın problemi oluşturmaktadır (Rasoul-Amini ve diğ., 2006).

Farklı yapı ve farklı antitümör aktivite mekanizmasına sahip adriamisin, vinkristin ve etoposid gibi bazı önemli ilaçların etkinliği maalesef ilaç direnci nedeniyle azalmaktadır. Bir antrasiklin antitümör ilaç olan Adriamisin klinik olarak pek çok kansere karşı etkilidir. Adriamisinin antitümör aktivitesi topoizomerez II'nin inhibisyonu, serbest oksijen radikallerinin oluşturulması ve membranla interaksiyon gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır. Bir vinka alkaloidi olan vinkristin antitümör ajanı, tubiline bağlanarak dolayısıyla mitoz esnasında mikrotübül oluşumunu inhibe ederek etkisini gösterir (Tian ve diğ., 2006).

Pek çok ülkede kanser, kalp hastalıklarından sonra en fazla ölüme neden olan hastalık grubunu oluşturmaktadır. ABD'deki kanser hastaları arasında alternatif tıbbı başvuranların oranı % 30-75 arasında değişebilmektedir. Bu durum farklı ülkelerin floralarından muhtemel antikanser ajanların ortaya çıkarılması alanındaki yoğun çabalar için itici güç oluşturmaktadır (Abu-Dahab ve Afifi, 2007). Günümüzde aktif olarak kullanılan antikanser ilaçlarının sınırlı tipte kansere karşı etki gösterebilmeleri ve benzer nedenlerle, bütün dünyada kanser araştırma laboratuvarları yoğun bir şekilde sentetik ve doğal kaynaklardan yeni kemoterapötik madde arama çalışmaları yürütmektedirler (Rasoul-Amini ve diğ., 2006). Kansere karşı sitotoksik tarama yöntemleri bitki ekstraktları ve saf moleküller için ilk aşamayı oluşturmaktadır (Saetung ve diğ., 2005). Sitotoksik antitümör aktivitesinin en önemli kemoterapötik işaretlerinden biridir. Kansere hücre hatlarına karşı sitotoksik tarama belirlenmesinde kullanılan en iyi yöntemlerden biri olan MTT yöntemi, potansiyel antitümör özelliğe sahip bileşiklerin araştırılmasında kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir (Song ve diğ., 2008). Sitotoksik bir bileşik farklı hücre hatlarında farklı etki gösterebildiğinden dolayı biz de çalışmamızda farklı kökenli iki hücre hattı (Vero ve HeLa) kullandık. Çalışmamızda değişik bitkisel kaynaklardan izole edilmiş alkaloidlerin *in vitro* potansiyel antitümör aktivitelerini değerlendirmek için MTT yöntemi ile sitotoksik potansiyellerini değerlendirdik. Bu değerlendirme sonucunda 13 alkaloidin sitotoksik taraması yapılmış (berberin dışındakilerin sitotoksik aktivite potansiyellerinin değerlendirilmesine ilişkin çalışmalara daha önce rastlanmamıştır) ve bunlardan bazılarının etkin sitotoksik aktivite gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar muhtemel antitümör aktivite ve diğer farmakolojik aktivitelerin değerlendirilmesi için itici güç oluşturmaktadır.

**KAYNAKLAR**

- ABU-DAHAB, R., AFIFI, F., 2007, Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7), *Sc. Pharm.* 75, 121-136.
- AKINPELU, D.A., AIYEGORO, O.A., OKOH, A.I., 2008, *In vitro* antimicrobial and phytochemical properties of crude extract of stem bark of *Afzelia africana*, *Afr. J. Biotechnol.*, 7(20), 3665-3670.
- ALEXANDROVA, R., VARADINOVA, T., VELCHEVA, M., GENOVA, P., SAINOVA, I., 2000, Cytotoxic effect of isoquinoline alkaloids on tumor cell lines, *Exp. Pathol. Parasit.*, 4, 8-14.
- ANAYA, A.L., ORTEGA, R.C., WALLER, G.R., 2006, Metabolism and Ecology of Purine Alkaloids, *Front. Biosci.*, 11, 2354-2370.
- ANISZEWSKI, T., 2007, *Alkaloids- Secrets of life*, Elsevier Science Ltd, Finland, 978-0-444-52736-3
- BADAMI, S., MANOHARA REDDY, S.A., KUMAR, E.P., VIJAYAN, P., SURESH, B., 2003, Antitumor activity of total alkaloid fraction of *Solanum pseudocapsicum* leaves, *Phytother. Res.*, 17, 1001-1004.
- BAYTOP, T 1999, *Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul, 978-9-754-20021-8.

BLUM, M.S., 2004, *The importance of alkaloidal functions*, CRC Press, Boca Raton, FL., 978-1-587-13217-9.

BOZAN, B., 1994, *Arnebia densiflora (Nordm.) Lebed. Bitkisinden Elde Edilen Naftakinonların Gıda, Kozmetik ve İlaç Endüstrisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., GONTIER, E., 2001, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Sci.*, 161: 839-851.

BRATT, K., 2000, *Secondary Plant Metabolites as Defense against Herbivores and Oxidative Stress*, University of Uppsala, Sweden, 91-554-4807-0.

CORDELL, G.A., 1946, *Introduction to Alkaloids*, John Wiley & Sons Inc., NY, 978-0471034780.

DEWICK, P.M., 1997, *Medicinal natural products*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 978-0-471-49641-0.

DIXON, R.A., 2001, Natural products and plant disease resistance, *Nature*, 411, 843-847.

DONGRE, S.H., BADAMI, S., ASHOK, G., RAVI, S., KOTTANI, R., 2007, *In vitro* cytotoxic properties of O-methylsolanocapsine isolated from *Solanum pseudocapsicum* leaves, *Indian J. Pharmacol.*, 39, 208-209.

DUNCAN, A., PHIPPS, W.R., KURZER, M.S., 2003, Phyto-oestrogenes, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 17, 253-271.

EBATO, B., FRIEND, J., THOFT, R.A., 1998, Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture, *Inves. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29, 1533-1537.

EL-BAROTY, G.S., MOUSSA, M.Y., SHALLAN, M.A., ALI, M.A., SABH, A.Z., SHALABY, E.A., 2007, Contribution to the aroma, biological activities, minerals, protein, pigments and lipid contents of the red alga: *Asparagopsis taxiformis*, *J. Appl. Sci. Res.*, 3(12), 1825-1834.

EL-DESOUKY, S.K., KIM, K.H., RYU, S.Y., EWEAS, A.F., GAMAL-ELDEEN, A.M., KIM, Y.K., 2007, A new pyrrole alkaloid isolated from *Arum palaestinum* Boiss. and its biological activities, *Arch. Pharm. Res.*, 30(8), 927-931.

ESSAWI, T., SROUR, M. 2000, Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, *J. Ethnopharmacol.*, 70, 343-349.

FENT, K., 2001, Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples, *Toxicol. In Vitro*, 15(4), 477-488.

FOTAKIS, G., CEMELI, E., ANDERSON, D., J.A., 2005, Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line, *Toxicol In Vitro*, 19(4), 481-489.

GAD, S.C., 2002, Fifth triennial toxicology salary survey, *Int J Toxicol.*, 21(4), 323-328.

HARTMANN, T., KUTCHAN, T. M., STRACK, D., 2005, Evolution of metabolic diversity, *Phytochemistry*, 66, 1193-1194.

ISHIHARA, Y., 2001, *In Vitro* studies on biological effects of fibrous minerals, *Ind. Health*, 39, 94-105.

JIANG, R.W., LAU, K.M., HON, P.M., MAK, T.C.W., WOO, K.S., FUNG, K.P., 2005, Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*, *Curr. Med. Chem.*, 12, 237-246.

KOBAYASHI, H., KAERN, M., CHUNG, K., GARDNER, T.S., CANTOR, C.R., COLLINS, J.J., 2004, Programmable cells: interfacing natural and engineered gene networks, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(22), 8414-8419.

KOMISSAROVA, E.V., SAHA, S.K., ROSSMAN, T.G., 2004, Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202(1), 99-107.

LETAŠIOVÁ, S., JANTOVÁ, S., MÚČKOVÁ, M., THEISZOVÁ, M., 2005, Antiproliferative activity of berberine *in vitro* and *in vivo*, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 149(2), 461-463.

LIU, J.H., BAO, Y.M., SONG, J.J., AN, L.J., 2003, *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf total alkaloids potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells, *Acta. Pharmacol. Sin.*, 24(9), 913-917.

LIZUKA, N., MIYAMOTO, K., HAZAMA, S., OKA, M., 2000, Inhibitory effect of *Coptidis rhizoma* and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines, *Cancer Lett.*, 148, 19-25.

MACÍAS, F. A., GALINDO, J.L.G., 2007, Evolution and current status of ecological phytochemistry, *Phytochemistry*, 68(22), 2917-2936.

MOSMANN, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65,55-63.

MURTHY, H.N., HAHN, E.J., PAEK, K.Y., 2008, Adventitious roots and secondary metabolism, *Chin. J. Biotechnol.*, 24(5), 711-716

NAMDEO, A. G. 2007, Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites, *Pharmacognasy Reviews*,1(1), 69-79.

ÖZER, Z., TURSUN, N., ÖNEN, H., 2001, *Yabancı Otlarla Sağlıklı Yaşam (Gıda ve Tedavi)*, 4Renk Yayınları, Ankara, 975-8205-08-0.

PANTER, K.E., MANNERS, G.D., STEGELMEIER, B.L., LEE, S., GARDNER, D.R., RALPHS, M.H., PFISTER, J.A., JAMES, L.F., 2002, Larkspur poisoning: toxicology and alkaloid structure–activity relationships, *Biochem. System. Ecol.*, 30, 113.

PARKIN, D.M., 2004, *Cancer in Africa* [online], The International Network for Treatment and Resarch, <http://www.inctr.org/publications> [Ziyaret Tarihi:18 Eylül 2008].

PELLETIER, S.W., 1998, *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Elsevier, NY, 978-0-080-42805-5.

PUTNAM, J.B., 2002, New and evolving treatment methods for pulmonary metastases, *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 14(1):49-56.

RASOUL-AMINI, S., KHALAJ, A., SHAFIEE, A., DANESHTALAB, M., MADADKAR-SOBHANI, A., FOULADDEL, S., AZIZI, E., 2006, Anti-tumor activity of new quinoline derivatives in human Breast Cancer T47D Cells, *Int. J. Cancer Res.*, 2(2), 102-108.

ROSENKRANZ, V., WINK, M., 2008, Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of Trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*), *Molecules*, 13, 2462-2473.

ROBERTS, M. F., WINK M., 1998, *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*, Plenum Press, NY and London, 0-306-45465-3.

SARI, A.,1975, *Türkiye’de Yetişen Macrantha Seksiyoundaki Bazı Papaver Türlerinin Alkaloidleri*, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

SARIYAR, G., 2002, Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* species, *Pure Appl. Chem.*, 74(4), 557-574.

SAETUNG, A., ITHARAT, A., DECHSUKUM, C., WATTANAPIROMSAKUL, C., KEAWPRADUB N., RATANASUWAN, P., 2005, Cytotoxic activity of Thai medicinal plants for cancer treatment, *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, 27, 469-478.

SHIME, H., KARIYA, M., ORII, A., MOMMA, C., KANAMORI, T., FUKUHARA, K., KUSAKARI, T., TSURUTA, Y., TAKAKURA, K., NIKAIDO, T., FUJII, S., 2001, Tranilast inhibits the proliferation of uterine leiomyoma cells *in vitro* through G1 arrest associated with the induction of p21waf1 and p53, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(12), 5610-5617.

SONG, L., REN, S., YU, R., YAN, C., LI, T., ZHAO, Y., 2008, Purification, characterization and *in vitro* anti-tumor activity of proteins from *Arca subcrenata* lischke, *Mar. Drugs*, 6, 418-430.

SÖKMEN, A., GÜREL, E., 2001, *Bitki Biyoteknolojisi*, S.Ü. Vakfi Yayınları, 975-6652-04-7, pp 211-261.

STÉVIGNY, C., BAILLY C., QUENTIN-LECLERCQ, J., 2005, Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids, *Curr. Med. Chem.- Anti-Cancer Agents*, 5, 173-182.

ŞENER, B., ORHAN, I., ÖZÇELİK, B., 2007, Diterpenoid alkaloids from some Turkish *Consolida* species and their antiviral activities, *Arkivoc*, 7, 265-272.

TATLI, İ.İ., AKDEMİR, Z.S., 2006, Cytotoxic activity on some *Verbascum* species growing in Turkey, *H. U. Journal of the Faculty of Pharmacy*, 26(2), 77-85.

TIAN, Z., LIU, Y.M., CHEN, S.B., YANG, J.S., XIAO, P.G., WANG, L., WU, E., 2006, Cytotoxicity of two triterpenoids from *Nigella glandulifera*, *Molecules*, 11, 693-699.



- TOLONEN, A., 2003, *Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of Hypericum perforatum L. and Rhodiola rosea L.*, Oulu University Press, Oulu, 951-42-7160-0.
- VAL'KO, V., PRAVDOVÁ, E., NAGY, M., GRANČAI, D., FICKOVÁ, M., 2007, Antiproliferative activity of plant extracts from genus *Philadelphus L.*, *Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana*, 57, 209-214.
- VIJAYAN, P., PREETHI, V., PRASHANTH, S.H., RAGHU CHANDRASHEKHAR, H., ASHOK, G., SHRISHAILAPPA, B., 2004, Cytotoxic activity of the total alkaloids isolated from different parts of *Solanum pseudocapsicum*, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 528-530.
- WEYERMANN, J., LOCHMANN, D., ZIMMER, A., 2005, A practical note on the use of cytotoxicity assays, *Int. J. Pharm.*, 288, 369-376.
- WINK, M., 1998, *Chemical Ecology of Alkaloids*, Plenum Press, NY and London, 978-0-306-64546-53.
- WINK, H., 2003, Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective, *Phytochemistry*, 65, 3-19.
- WINK, M., 2007, *Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids- From DNA intercalation, spindle poisoning, topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance*, In: *The Alkaloids*, 64, pp 1-48, (CORDELL, G., Ed.), Elsevier, Amsterdam, New York, 978-0-12-373911-7.
- YALÇIN, F.N., 2007, Biological activities of the marine sponge *Axinella*, *Hacattepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 27 (1), 47-60.

ZAHARAN, M.M., ABOUL-ENEIN, A.M., ABOL-ELLA, F.M., 2005, Molecular changes on cancer cells as affected by Willow extracts, *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 1(3), 284-287.

## ÖZGEÇMİŞ

15.05.1982 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi İbrahim Alettin Gövsa İlköğretim Okulu'nda ortaöğrenimimi Çapa Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladım. Çapa Anadolu Öğretmen Lisesi'nden mezun olarak, 2000 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2004 yılında tamamladığım lisans eğitiminin ardından, aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı'nda yüksek lisans eğitime hak kazandım. 2008 yılı Mayıs ayından itibaren TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hibridoma Laboratuvarı'nda Hepatit B Enfeksiyonunun Tanısında Serolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanı Kitlerinin Geliştirilmesi Projesi'nde bursiyer öğrenci olarak yer almaktayım.

## YAYINLAR

- KARAGÖZ, A., TURGUT-KARA, N., ÇAKIR, Ö., DEMİRGAN, R., ARI, Ş., 2007, Cytotoxic activity of crude extracts from *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae), *Biotechnol. & Biotechnol. EQ.*, 21, 220-222

## KURS VE SERTİFİKALAR

- Hücre Füzyonu Yöntemi İle Monoklonal Antikor Üretimi, TÜBİTAK Gen Mühendisliği Biyoteknoloji ve Araştırma Enstitüsü, (2-6 Haziran 2008)

## **ARAŞTIRMA PROJELERİ**

### ***Yürütölen Proje***

Proje adı: “Bazı *Papaver* Alkaloidlerinin Sitotoksik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi”

Projedeki görevi: Yürütöcü

Destekleyen kuruluş: İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütöcü Sekreterliği

Proje no: T-41/05122006