

**A549, HeLa ve NIH3T3 HÜCRE**  
**KÜLTÜRLERİNDE *Hypericum perforatum*,**  
***Hypericum montbrettii* ve *Hypericum organifolium***  
**TÜRLERİNİN SİTOTOKSİK ve**  
**ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

**Gökçen GÜZEY**

Doktora Tezi

**A549, HeLa ve NIH3T3 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE**

*Hypericum perforatum, Hypericum montbrettii*

*ve Hypericum Origanifolium*

**TÜRLERİNİN SİTOTOKSİK ve  
ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

**Gökçen GÜZEY**

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Eylül 2007

**Tez Danışmanı:** Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Gökçen GÜZEY  
Doğum tarihi ve yeri : 1975, Eskişehir  
Uyruğu : TC  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresleri : Deliklitaş M. Hamamyolu Cd. No:103/10 26090 Eskişehir  
0 222 232 01 26  
gokcenguzey@yahoo.com

### Eğitim Durumu

İlköğretim : 1981–1989  
Lise : 1989–1992  
Üniversite : 1992–1996  
Yüksek lisans : 1997–2000  
Yabancı dil : İngilizce

### Mesleki Deneyim

Hastane eczacılığı : 1998–2005  
Sorumlu Eczacı : 2005-

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Türkiye Beyin Araştırmaları ve Sinir Bilimleri Derneği

### Yayımlar

“Comparison of the antiproliferative properties of antiestrogenic drugs (nafoxidine and clomiphene) on glioma cells *in vitro*”, American Journal of Clinical Oncology, 27 (4), 2004.

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasına çevremdeki herkesin katkısı oldu. Katkı oranları farklı olabilir, ancak katkı sahiplerinden bir tanesi bile payını alıp gitseydi, bu tez başka bir tez olurdu veya hiç olmazdı. Bu nedenle öncelikle danışmanım sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK hocama başvurduğum her zaman koşulsuz olarak bana yardımcı olduğu ve tezimi defalarca okuyup düzelttiği için teşekkür ederim. Eğer hala hatalar varsa bu hocamın bazı uyarılarını gözden kaçırdığım içindir.

Farmakoloji Ana Bilim Dalı ve BİBAM hocalarına/çalışanlarına yardımlarından ötürü, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü hocalarına/çalışanlarına katkılarından ötürü ve iş arkadaşlarıma desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen ve ellerinden geldiğince her konuda bana yardımcı olamaya çalışan aile üyelerinden dualarıyla annem Zehra YAZ'a, edebi bilgileriyle babam Nadir YAZ'a, akademik tecrübesiyle ablam Yrd. Doç. Dr. Nergiz YAZ VERRESEN'e, birlikteliğimizin başından beri bir sevgi abidesi gibi davranan eşim Mustafa GÜZEY'e sonsuz teşekkürler ederim. Son olarak beni yaşama bağlayan ve tezimi bitirmede güç kaynağı olan kızım Betül'e çok teşekkür ederim.

Tezimi vefat eden ilk kızım Begüm'e adıyorum.

**A549, HeLa ve NIH3T3 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE**  
***Hypericum perforatum, Hypericum montbrettii ve Hypericum organifolium***  
**TÜRLERİNİN SİTOTOKSİK ve ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

**ÖZET**

Ofisinal tür olan *Hypericum perforatum*'un çok sayıda çalışmada antikanser, apoptotik, antimetastatik, antianjiyojenik ve sitotoksik etkileri bildirilmiş olmasına karşın, diğer türlerden *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum organifolium*'un kanser ile ilişkili farmakolojik aktiviteleri üzerinde bugüne kadar bir araştırma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, *Hypericum perforatum, Hypericum montbrettii ve Hypericum organifolium* ekstrelerinin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, HeLa serviks adenokarsinomu ve normal hücrelere örnek olarak NIH3T3 fibroblast hücrelerinde test edilmiştir. Yöntem olarak MTT ölçümü, nötral kırmızısı ölçümü, yumuşak agar koloni formasyonu ve akridin turuncusu boyama testleri uygulanmıştır.

Uygulanan tüm bitki ekstrelerinin incelenen bütün hücrelerde sitotoksik ve antiproliferatif etkisi gözlenmiştir. *Hypericum montbrettii ve Hypericum organifolium*'un bu etkileri ilk kez bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Bitki ekstrelerinde bazı apoptotik özellikler olduğu bulunmasına rağmen, gözlenen antiproliferatif etkilerin pek fazla apoptotik etkinliğe bağımlı olmadığı saptanmıştır. Tez deneylerinde gözlenen etkilerden sorumlu tüm mekanizmalar literatür bilgileri ışığında tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Hypericum perforatum, Hypericum montbrettii, Hypericum organifolium*, kanser, proliferasyon, apoptoz

**CYTOTOXIC and ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS of**  
*Hypericum perforatum, Hypericum montbrettii and Hypericum organifolium*  
**SPECIES on A549, HeLa and NIH3T3 CELL CULTURES**

**ABSTRACT**

Although antineoplastic, apoptotic, antimetastatic, antiangiogenic and cytotoxic activities of *Hypericum perforatum*, official species, have been reported in many previous studies, related to cancer, in relation to cancer, there are no studies on the pharmacological activities *Hypericum montbrettii* and *Hypericum organifolium*, among the other species.

In this thesis, effects of *Hypericum perforatum*, *Hypericum montbrettii* and *Hypericum organifolium* were tested on A549 non-small cell lung cancer, HeLa cervix adenocarcinoma, and, as an example of normal cells, NIH3T3 fibroblast cells. Measurements of MTT, neutral red, soft agar colony formation and acridine orange staining assays were applied as methods.

Cytotoxic and antiproliferative effects of all herbal extracts were observed in all cells examined. The effects of *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum organifolium* was demonstrated with this study for the first time. Although plant extracts were found to possess some apoptotic properties, it was determined that the antiproliferative effects observed are not mainly due to the apoptotic activity. All the mechanisms for the effects observed in this thesis experiments were discussed under the light of literature data.

**Key Words:** *Hypericum perforatum, Hypericum montbrettii, Hypericum organifolium*, cancer, proliferation, apoptosis

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
NORMAL VE KANSERLİ DOKULAR	3
Normal Hücreler ve Dokular	3
Kanserli Hücreler ve Dokular	3
<i>Kanserin tanımı</i>	3
<i>Kanserin biyolojisi</i>	4
<i>Hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptozis</i>	4
<i>Proto-onkogenler, onkogenler ve tümör-baskılayıcı genler</i>	6
<i>İnvazyon, metastaz ve anjiojenez</i>	7
<i>Karsinojenler</i>	8
<i>Kanserden Korunma Yolları</i>	9
<i>Kanserin Tedavisi</i>	9
<b>HYPERICUM</b>	10
Tanımlı ve Botanik Özellikleri	10
<i>Hypericum Türlerinin Kimyasal Bileşenleri ve</i>	
<i>Bu Bileşenlerin Farmakolojik Özellikleri</i>	10
<i>Naftodiantronlar</i>	10
<i>Flavonoidler</i>	11
<i>Floroglusinoller ve türevleri</i>	11
<i>Proanthosianidinler ve prosianidinler</i>	12
<i>Tanenler</i>	12
<i>Kumarinler</i>	12
<i>Epoksantrofiller</i>	12
<i>Uçucu yağlar</i>	12

## İÇİNDEKİLER (Devam)

	SAYFA
<i>Aminoasitler</i>	12
<i>Fitoöstrojenler</i>	12
<i>Ksanton</i>	12
<i>Diğer maddeler</i>	13
<b>Farmakolojik Etkileri ve Fitoterapide Kullanımı</b>	13
<i>Antidepresan etkisi</i>	13
<i>Mevsimsel duyum bozukluğu üzerine etkisi</i>	14
<i>Alkolizm ve diğer bağımlılıklar üzerine etkileri</i>	14
<i>Uyku bozuklukları ve insomnia üzerine etkisi</i>	14
<i>Antikonvülzan etki</i>	15
<i>Antiviral etkisi</i>	15
<i>Antibakteriyel ve antifungal etkisi</i>	15
<i>Analjezik etkisi</i>	16
<i>Antiinflamatuvar etkisi ve immünolojik etkisi</i>	16
<i>Antioksidan etkisi</i>	17
<i>Hepatoprotektif etkisi</i>	17
<i>Yara iyi edici etkisi</i>	17
<i>Fototoksik etkisi</i>	17
<i>Antikanser etkisi</i>	18
<i>Yan etkisi ve kontrendikasyonları</i>	20
<i>İlaç Etkileşimleri</i>	20
<b>GEREÇLER</b>	21
<b>Kullanılan Hücreler</b>	21
<i>A549 Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu</i>	21
<i>HeLa Serviks adenokarsinomu</i>	21
<i>NIH3T3 Fibroblast hücreleri</i>	22
<b>Kullanılan Testler</b>	22
<i>Mitokondriyal aktiviteye dayalı testler ve MTT ölçümü</i>	22
<i>Lizozomal aktiviteye dayanan testler ve nötral kırmızısı boyama yöntemi (NR)</i>	22
<i>Hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin ölçülmesi ve yumuşak agar koloni formasyonu</i>	23



## İÇİNDEKİLER (Devam)

	SAYFA
<i>Hücrelerdeki DNA ve RNA miktarları ve akridin turuncusu ile boyama</i>	23
<b>Kullanılan Maddeler</b>	24
<b>Kullanılan Malzemeler</b>	24
<b>Kullanılan Cihazlar</b>	24
<b>YÖNTEMLER</b>	25
<b>Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması</b>	25
<b>MTT Ölçümü</b>	25
<b>Nötral Kırmızısı Boyama Yöntemi ile Sitotoksosite Ölçümü</b>	26
<b>Yumuşak Agar Koloni Formasyonu</b>	26
<b>Akridin Turuncusu ile Floresan DNA ve RNA Boyaması</b>	26
<b>İstatiksel Değerlendirmeler</b>	27
<b>BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	28
<i>Hypericum montbrettii Çiçeği Ekstresi</i>	28
<i>HMCE'nin MTT sonuçları</i>	28
<i>HMCE'nin NR sonuçları</i>	29
<i>HMCE'nin koloni formasyonu sonuçları</i>	31
<i>HMCE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları</i>	32
<i>Hypericum montbrettii Yaprağı Ekstresi</i>	36
<i>HMYE'nin MTT sonuçları</i>	36
<i>HMYE'nin NR sonuçları</i>	37
<i>HMYE'nin koloni formasyonu sonuçları</i>	39
<i>HMYE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları</i>	40
<i>Hypericum origanifolium Çiçeği Ekstresi</i>	43
<i>HOCE'nin MTT sonuçları</i>	43
<i>HOCE'nin NR sonuçları</i>	44
<i>HOCE'nin koloni formasyonu sonuçları</i>	46
<i>HOCE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları</i>	47
<i>Hypericum origanifolium Yaprağı Ekstresi</i>	50
<i>HOYE'nin MTT sonuçları</i>	50
<i>HOYE'nin NR sonuçları</i>	51
<i>HOYE'nin koloni formasyonu sonuçları</i>	53

## İÇİNDEKİLER (Devam)

	SAYFA
<i>HOYE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları</i>	54
<i>Hypericum perforatum Ekstresi</i>	57
<i>HP'nin MTT sonuçları</i>	57
<i>HP'nin NR sonuçları</i>	58
<i>HP'nin koloni formasyonu sonuçları</i>	60
<i>HP'nin akridin turuncusu boyama sonuçları</i>	61
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	64
<b>KAYNAKLAR</b>	67
<b>EK 1</b>	81
<b>EK 2</b>	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 Fotodinamik tedavinin şematik gösterimi	19
Şekil 2 HMCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	28
Şekil 3 HMCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	28
Şekil 4 HMCE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	29
Şekil 5 HMCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	30
Şekil 6 HMCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	30
Şekil 7 HMCE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	31
Şekil 8 HMCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	31
Şekil 9 HMCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	32
Şekil 10 HMCE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	33
Şekil 11 HMCE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	34
Şekil 12 HMCE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	35
Şekil 13 HMYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 14 HMYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	36
Şekil 15 HMYE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	37
Şekil 16 HMYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	37
Şekil 17 HMYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	38
Şekil 18 HMYE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	38
Şekil 19 HMYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	39
Şekil 20 HMYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	39
Şekil 21 HMYE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	40
Şekil 22 HMYE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	41
Şekil 23 HMYE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	42
Şekil 24 HOCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	43
Şekil 25 HOCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	43

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 26 HOCE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	44
Şekil 27 HOCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	44
Şekil 28 HOCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	45
Şekil 29 HOCE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	45
Şekil 30 HOCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	46
Şekil 31 HOCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	46
Şekil 32 HOCE'nin uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	47
Şekil 33 HOCE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	48
Şekil 34 HOCE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	49
Şekil 35 HOYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	50
Şekil 36 HOYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	50
Şekil 37 HOYE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	51

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 38 HOYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	51
Şekil 39 HOYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	52
Şekil 40 HOYE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	52
Şekil 41 HOYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	53
Şekil 42 HOYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	53
Şekil 43 HOYE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	54
Şekil 44 HOYE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	55
Şekil 45 HOYE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	56
Şekil 46 HPE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	57
Şekil 47 HPE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	57
Şekil 48 HPE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri	58
Şekil 49 HPE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	58

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 50 HPE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	59
Şekil 51 HPE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri	59
Şekil 52 HPE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	60
Şekil 53 HPE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri	60
Şekil 54 HPE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	61
Şekil 55 HPE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	62
Şekil 56 HPE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri	63

## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

A549	: Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu
ANOVA	: Varyans analizi (Analysis of Variance)
AO	: Akridin Turuncusu (Acridine Oranj)
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
APO-1/Fas Antijeni:	Apoptotik protein
AÜBİBAM	: Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi
Bcl-2	: Antiapoptotik protein
CDK	: Siklin bağımlı kinazlar
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CYP	: Sitokrom enzimleri
CYP3A4	: Sitokrom enzimi 3A4
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleotitlerden oluşan polimer
EDTA	: Etilen-diamintetra asetik asit
ELISA	: Enzyme – Like Immuno – Sorbent Assay
Erk ½ kinaz	: Ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz
F-12 HAM	: Besin karışımı (Nutrient mixture)
FCS	: Fötal dana serumu (Fetal Calf Serum)
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GABA-A	: Gama-aminobütirik asit reseptörü A
HBSS	: Hank'in tuz tampon solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution)
HeLa	: Serviks adenokarsinom hücresi
HIV	: Bağışıklık sisteminin çökmesine neden olan virüs (Human Immunodeficiency Virus)
HMCE	: <i>Hypericum montbrettii</i> çiçeği ekstresi
HMYE	: <i>Hypericum montbrettii</i> yaprağı ekstresi
HOCE	: <i>Hypericum origanifolium</i> çiçeği ekstresi
HOYE	: <i>Hypericum origanifolium</i> yaprağı ekstresi
HPE	: <i>Hypericum perforatum</i> ekstresi
HPV-18	: İnsan papilloma virüs 18
HTLV-1	: İnsan T hücreli lösemi virüsü (Human T Cell Leukemia Virus)



## SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

L-NAME	: N sup omega Nitro-L-Arjinin Metil Ester
MAO	: Mono amin oksidaz
MAO-A	: Mono amin oksidaz A
MAO-B	: Mono amin oksidaz B
MAP	: Mitojen aktive eden protein
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NIH3T3	: NIH Swiss fare embriyosundan elde edilen fibroblast hücresi
NK	: Doğal öldürücü hücre (Natural killer)
NR	: Nötral kırmızısı (Neutral Red)
OP1	: Opioid reseptör 1
p53	: Tümör baskılayıcı gen
pH	: Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
PBS	: Fosfat tuz tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
PDT	: Fotodinamik tedavi
PGE <sub>2</sub>	: Protaglandin E-2
PI-TP $\alpha$	: Fosfotidilinositol transfer proteini $\alpha$
PI-TP $\beta$	: Fosfotidilinositol transfer proteini $\beta$
pRB	: Retinoblastoma baskılayıcı gen
PSA	: Puck'ın tuz tamponu (Puck's Saline A)
Ras	: Öncül onkogen proteini
RB	: Retinoblastoma geni
REM	: Hızlı göz hareketli uyku
RNA	: Ribonükleotitlerden oluşan polimer
ROS	: Reaktif oksijen parçaları
SPSS	: Sosyal bilimler için istatistik programı (Statistical Package for Social Sciences)
TNF	: Tümör nekroze edici faktör
UV	: Ultraviyole
UVA	: Ultraviyole A
UVB	: Ultraviyole B
UVC	: Ultraviyole C

## GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücre ve dokuları etkileyen karmaşık bir hastalıktır (Klug ve Cummings, 2002). Günümüzde kanser birçok toplumda kalp ve damar hastalıklarından sonra en fazla ölüme yol açan hastalık grubudur. Kalp ve damar hastalıklarında giderek azalma eğilimi gösteren ölüm oranlarına karşılık kanser ölümleri hemen tüm toplumlarda artmaya devam etmektedir (Ruacan, 2003). Dünya Sağlık Örgütü'nün çalışmalarında, dünyada 2000 yılında 10 milyon yeni vakada kanser hastalığı tespit edilmiştir. Bu rakamın giderek artarak 2020 yılında 15 milyon kişiye çıkacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de ise her yıl yaklaşık 100 binin üzerinde yeni kanser olgusuna rastlanmaktadır. 2020 yılında kanser hastalıklarından ölümden %75 ile %100 oranında artış beklenmektedir (http-1). Kadınlarda meme, akciğer, gastrointestinal ve ürogenital kanserlere daha çok rastlanırken, erkeklerde akciğer, gastrointestinal ve ürogenital kanserler en sık rastlanılan kanserlerdir (Ruacan, 2003). Ölümcül bir hastalık olarak bilinen kanser, hastaları ve çevresini moral olarak da etkilemektedir. Bu nedenle günümüzün en önemli mediko-sosyal sorunlarından biridir (Kayaalp, 2000).

Kanser hastalarının küçük bir bölümünde kanserin tipi nedeniyle kimyasal tedavi ile tam şifa veya uzun bir iyileşme dönemi sağlanabilmektedir. Bu nedenle erken teşhis ve erkenden ilaç tedavisine başlanması çok önemlidir. Ancak hastaların çoğunda ilaç tedavisi hastalığı baskılamakta ve/veya yan etkilerle ölüme sonuçlanmaktadır. Kimyasal tedavinin amacı tam şifa sağlanmasıdır. Yani uzun dönemde hastalığın tekrarlamaması istenir. Şifa için tüm kanser hücrelerinin vücuttan temizlenmesi gerekir. Eğer şifa sağlanamazsa tedavi hastalığa bağlı şikâyetlerin giderilmesine ve yaşamı tehdit eden toksisiteden korunmasına yöneliktir. Hastanın mümkün olduğu kadar normale yakın yaşaması sağlanmaya çalışılmaktadır (Mycek, 2001). Kimyasal tedavideki başarının düşük olması veya tam şifanın sağlanamamasının en önemli nedeni kanser hücreleri ile normal hücreler arasında niteleyici açıdan fark olmaması ve sadece niceleyici farkların bulunmasıdır. Bu nedenle, kullanılan antineoplastik ilaçların kanser hücresine seçiciliği düşüktür. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik bir şekilde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı bir biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok edebilirler. Bu duruma göre halen kullanılmakta olan ilaçlar antineoplastik olmaktan çok antiproliferatiftir (Kayaalp, 2000).

*Hypericum perforatum* antidepresan etkisi bilinen ve bu etkisi sebebiyle dünyanın çeşitli bölgelerinde ilaç olarak kullanılan bir bitkidir. Bitki, antikanser özelliği açısından son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır. Ancak çalışmalarımızda kullanılan dozları, kullanılan hücre ve yöntem birleşimleri çalışılmamıştır. Bu sebeple bitki ekstresinin antikanser etkinliğinin çalışması amaçlanmıştır. *Hypericum origanifolium* ve *Hypericum montbrettii* bitkileri üzerinde ise antikanser etkinlikleri üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu türlerin de antikanser etkinliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmalarda kullanılan bitki ekstreleri hücre kültürü için uygun dozlarda kullanılmıştır. Uygulanan gün sayısı uzun tutularak etki sürelerinin ne olabileceği saptanmaya çalışılmıştır.

Kanserin mediko-sosyal boyutu ve antineoplastik ilaçların normal hücreler üzerine olan olumsuz etkileri kanser tedavisinde yeni ilaçlar bulma ve kanser hakkındaki bilinmeyenleri ortaya çıkarma çabalarının daha da artırılmasını

gerektirmektedir. Kanser üzerine yapılacak araştırmalardaki amaç; tam şifanın sağlanabilmesi için kanserli hücreye seçici olarak sitotoksik etki gösterecek ilaçların bulunması ve bunun için de kanser hakkında bilinmeyenlerin ortaya çıkarılmasıdır.

Çalışmalarımızda kullandığımız akciğer ve serviks kanser hücreleri, günümüzde kanserden olan ölüm oranlarında ilk sıralarda yer almaktadırlar. Bu hücreler birçok araştırmada kullanıldığı için özellikleri iyi bilinmektedir. Böylece çalışmalarda elde ettiğimiz sonuçları daha güvenilir bir şekilde değerlendirme olanağımız olacaktır.

## **KAYNAK BİLGİSİ**

### **NORMAL VE KANSERLİ DOKULAR**

#### **Normal Hücreler ve Dokular**

Vücudun temel canlı birimi hücredir. Vücutta birbirinden belirgin biçimde farklı birçok hücre vardır (Guyton,1996). Bu hücreler vücudun gelişmesi sürecinde özelleşmiş fonksiyonları yerine getirmek için farklılaşarak kendi aralarında gruplar meydana getirirler. Birçok durumda, hepsi aynı DNA'yı taşıırken, farklı genlerin transkripsiyonunu sağlarlar (Turner ve ark., 2004). Aynı yapıya sahip ve aynı işi görmek üzere bir araya gelen bu hücre grupları ile hücrelerarası matriks tarafından oluşturulan yapıya doku adı verilmektedir (Akay, 2001).

Vücuttaki dokular dört ana gruba ayrılır: epitel dokusu, destek dokusu, kas dokusu ve sinir dokusu. Epitel doku vücudun tüm yüzeylerini döşer. Destek dokusu vücudun bütününe ya da herhangi bir bölümünün biçimini koruyup, tüm vücut bölümlerini bir arada tutar. Destek dokusu; bağ dokusu, kan dokusu, kıkırdak dokusu ve kemik dokusu olmak üzere dört çeşittir. Kas dokusu kimyasal enerjiyi kasılma ve gevşeme yoluyla mekanik işe dönüştüren özelleşmiş bir dokudur (Akay, 2001). Sinir dokusu vücudu boylu boyunca saran bir haberleşme ağıdır (Junqueira, 2003).

Farklılaşmış hücrelerden oluşan dokular destek dokusuyla bir araya gelerek organları oluşturur. Kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler bu organların içine geçerek özellikli doku hücreleri için besin, hormonal ve sinirsel kontrolü sağlarlar (Franks ve Teich, 1996).

#### **Kanserli Hücreler ve Dokular**

##### ***Kanserin tanımı***

Kanser, tüm yüksek canlıların yakalanabildiği bir hastalık grubudur. Doğal ve laboratuvar hayvanlarında her yönden insan kanserlerine benzeyen hastalıklar vardır. İnsan kanserleri ise biyolojik ve klinik bakımlardan birbirlerinden çok farklı özellikleri olan ortalama 100 değişik hastalıktan oluşmaktadır. Bunlardan bazıları çok yavaş ilerleyen, tedavi edilmediklerinde bile uzun yıllar boyu yaşama olanak veren durumlardır. Diğer yandan tedavi edilmediklerinde genelde aylar içinde yayılarak ölüme yol açabilen saldırgan kanserler de bilinmektedir. Bu niteliklerinden dolayı bir hastalık olarak kanseri tüm özellikleri ile tanımlayacak bir ifade bulunamamıştır. İngiliz onkolog Willis'in tanımını, yeni görüşler ışığında bazı eksiklikler içermekle birlikte, en yaygın kabul gören tanımdır:

“Kanser anormal bir doku kitlesidir. Büyümesi normal hücrelerden hızlıdır ve onlarla eşgüdüm içinde değildir. Bu büyüme hızı onu başlatan uyarının ortadan kalkmasından sonra da aynı aşırı biçimde devam eder” (Ruacan, 2003).

Kanser, genetik bir hastalıktır. Hücresel gelişimi kontrol eden genlerdeki bozukluklar kontrolsüz hücre büyümelerine yol açmaktadır. Bu genetik bozukluk birçok olguda kalıtsal değildir (Karp, 2005). Ancak, kanser olgularının %1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Klug ve Cummings, 2002).

Kanserli dokuları (tümörleri) üç grup altında inceleyebiliriz; beniyin, premaliyn ve maliyn. Beniyin (iyi huylu) tümörler: herhangi bir dokudan oluşabilir, bölgesel olarak büyür, kenarları düzenlidir, genelde bir bağ dokusu kapsülü ile etrafındaki dokudan ayrılır, tek zararı büyüdüğü bölgede basınç oluşturmasıdır. İyi huylu tümörler etraflarındaki dokuları istila etmezler ve vücudun diğer bölümlerine metastaz yapmazlar. Bazı iyi huylu tümörler değişime uğrayıp maliyn (kötü huylu) tümörlere dönüşme kapasitesine sahiptir. Bunlara da intermediyer (premalıyn) tümörler denir. Üçüncü grup kanser türü ise maliyn (kötü huylu) tümörlerdir. “Maliyn” in kelime anlamı hızlı şekilde çoğalan ve ölüme sebep olan demektir. Kötü huylu kanserin özellikleri; hücrelerin hızlı çoğalması, kan damarına veya lenfatik dolaşıma geçerek (invazyon) bulunduğu dokuda ikincil bir tümör oluşturması veya vücudun başka bir bölgesinde tümör oluşturması, yani metastaz yapmasıdır (Franks ve Teich, 1996; Karp, 2005; Klug ve Cummings, 2002).

Tümör adlandırılmasında en çok kullanılan yöntem histolojik ya da sitolojik sınıflamadır ve doku ya da hücre adının sonuna kimi eklerin bağlanması ile isimlendirme yapılır. Beniyin tümörlerde hücre adının sonuna -om ya da -oma eki getirilerek isimlendirilir. Örneğin; fibroblast hücrelerinden türeyen tümöre fibroma, osteoblast hücrelerinden türeyen tümöre osteoma denir. Maliyn tümörler için bu ek, tümör epitel kökenli ise “karsinoma”, bağ ve destek dokusu kökenli ise “sarkoma”, kan hücrelerinden kaynaklanıyorsa lösemi, immün sistemden ise lenfomadır. Örneğin, fibröz dokunun maliyn tümörüne fibrosarkoma, kemik dokusundan türeyen tümöre osteojenik sarkoma denir (Livolsi ve ark., 1992; Vander ve ark., 1994).

### ***Kanserin biyolojisi***

Kanser oluşumu çok basamaklı bir süreçtir. Bu süreç gen mutasyonu veya onkogenlerin aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu gibi epigenetik değişiklikler sonucu başlamaktadır. Mutasyon oluşuktan sonra normal hücreden çevre dokuyu istila eden ve metastaz yapan maliyn hücrelere dönüşüm başlamış olmaktadır (İlyas ve ark., 1999).

### ***Hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptozis***

Hücrelerin bölünmesi, farklılaşması ve apoptozis normal hücrelerle kanserli hücreler arasında benzerlik göstermektedir. Kanserli hücreleri normal hücrelerden ayıran, bu aşamaların düzenlenmesi ile ilgilidir. Kanserde dört hücresel fonksiyon düzensizdir: birincisi, hücresel çoğalmayı sınırlayan faktörler inaktiftir. İkincisi, farklılaşma düzensizdir. Tümör hücreleri farklılaşmanın belli bir aşamasında bloke olurlar veya anormal hücre tipine dönüşürler. Üçüncüsü, kromozomal ve genetik stabilite bozulmuştur, farklı hücreler oluşur. Bu farklı hücrelerin bazıları invazyon ve metastaz sağlayan hareket ve enzim üretme yeteneği kazanmışlardır. Son olarak, sıkı bir şekilde denetlenen hücre ölüm programı (apoptozis) denetlenemez hale gelmiştir. Kanserin biyolojisini anlayabilmek için bu aşamaların normal hücrelerde nasıl kontrol edildiğini, kanserli hücrelerde ise nasıl kontrolsüz hale geldiğini öğrenmeyi gerektirir (Klug ve Cummings, 2002; McPhee ve ark., 2000).

Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü, mitoz bölünme safhaları (profaz, metafaz, anafaz, telofaz) arasında bir dizi olay ortaya koyar. Hücre döngüsünün süreci,

mitoz (M fazı) sırasında iki nükleusa kromozom dağılımı için gerekli olan DNA replikasyon (S fazı) işleviyle devam etmektedir. Bu işlevin arasına boşluk olarak anılan, G1 ve G2 adı verilen iki basamak katılmıştır. G1, S ve G2 hep birlikte hücre döngüsünün interfaz bölümünü oluşturmaktadır. G1 basamağı mitozdan hemen sonra başlar; ribozomlar, enzimler, membran türevi organeller gibi pek çok sitoplazmik elementin sentezi bu zaman süreci içerisinde yapılmaktadır. S fazında, DNA replikasyonu her kromozomun kopyasını yaparak kromozom sayısının ikiye katlanmasını sağlamaktadır. G2 fazı, büyümenin ve sentezin ikinci dönemi olarak mitozun başlamasına öncülük etmektedir. Hücreler ayrıca, mitozdan sonra hücre döngüsünden çıkarak çoğalmanın olmadığı dinlenme fazı olan G0'a girmektedir (Klug ve Cummings, 2002).

Hücre döngüsünün kontrol noktaları G1/S geçiş ve G2/M geçiş noktalarının yakınında olmaktadır. Her iki noktada döngünün ilerlemesine veya durmasına karar verilmektedir. Bu kararların verilmesinin kontrolü iki sınıf protein tarafından yapılmaktadır: birincisi protein kinazlar olarak bilinen enzimlerdir. İkinci grup proteinler ise siklinlerdir. Siklinler, siklin bağımlı kinazlar ile birleşerek (CDK) protein kinazların fosforile edeceği hedef proteinleri seçmektedir (Andreeff ve ark., 2000; Klug ve Cummings, 2002).

Hücre döngüsünde diğer bir denetim merkezi M kontrol noktasıdır. M kontrol noktası ile bağlantılı olan proteinler iğ ipliklerinin oluşumu ve bunların kromozom sentromerlerinin kinetoruyla yaptığı bağlanmayı engelleyerek hücrelerin anafaza girişini inhibe eder. Pek çok kinaz enzimi ve diğer proteinler iğ ipliklerinin kurulduğu bu kontrol noktasında işe karışır. Bu kontrol mekanizmalarından hepsinde olmasa da bazılarında meydana gelen bir değişiklik normal hücreden kanserli hücre oluşumuna neden olur. Normal çoğalma kontrollerinin, düzenleyici mekanizma bileşenlerini kodlayan hücre genlerindeki mutasyonlardan dolayı, etkilerini kaybettikleri görülür. Kinazları ve siklinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar hücrelerin maliyn hale dönüşümünde önemlidir. Kanser kontrolsüz hücre bölünmesi ve metastaz yeteneği kazanması bu genetik değişikliklerin sonucudur. Genetik değişiklikler ise geniş kapsamlı olarak genomik dayanıksızlık, kromozom kaybı, kromozomların yeniden düzenlenmesi veya insan kromozomlarının lokuslarına yabancı DNA dizilerinin (genellikle viral DNA dizileri) girmesini kapsar (Klug ve Cummings, 2002).

Apoptozis hücrelerin normal ölüm mekanizmasıdır. Programlanmış biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin bir setini kapsamaktadır. Normal dokuların oluşumunda, bakımında ve bozulmasında önemli bir rolü ile birlikte çok hücreli organizmalardaki sık ve yaygın bir işlemdir. Gelişme sırasında hemen hemen her dokuda ve birçok olgun dokuda gerçekleşmektedir. Apoptozis, büyüme sinyalinin olmadığı durumlarda otomatik olarak tetiklenmekte, aksi durumda hücreye canlılığını devam ettirmesi için devamlı sinyal verilmektedir. Hücre bölünmesi ve apoptozis arasındaki denge, organizmadaki hücre sayı homeostazisinin korunmasında kritiktir. Böylece olgun bir organizmadaki doku kitlesi sadece büyüme, farklılaşma ve hücre göçü ile korunmaz, aynı zamanda ve büyük oranda, apoptozis yöntemi ile hücrelerin kontrollü kaybedilmesiyle de korunmaktadır. Nekrozdan farkı, hücre zarı bütünlüğü kaybolmamakta ve hücre içeriği ortama yayılmamaktadır (Turner ve ark., 2004).

Apoptozis için üç önemli biyokimyasal yolak bulunmuştur: hepsi sonuçta bir aspartat özellikli sitozin proteinaz olan kaspazlardan kaynaklanmaktadır. Birinci yolak *Bcl-2* ailesinin aracılık ettiği mitokondriyal sitokrom C yolağıdır. *Apaf-1* aktive olması sonucu, kaspaz-9 ve sonra da kaspaz-3 aktive olmaktadır. İkinci yolak tümör nekroze edici faktör (TNF) reseptör ailesinin hücreye bağlanması kaspaz-8'i ve kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Son olarak da, granzime B (sitolik T hücresi ürünü) bir takım kaspazları aktive etmekte ve apoptozis başlamakta (Andreeff ve ark., 2000; Hostanska ve ark., 2003; Yin ve ark., 2004).

Apoptozis süresince, çekirdek büzülür ve kromatin yoğunlaşır. Bu olay gerçekleşince, DNA genelde nükleozomlar arasından nükleazlarca katalizlenmiş koparmalarla parçalara ayrılır. Hücrelerin komşularıyla bağlantısı kopar, yuvarlaklaşır, büzülür ve genelde organelleri yalın plazma zarını içeren apoptotik cisimciklere parçalanır. Bu cisimcikler T hücreleri tarafından işaretlenir. Komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Bu apoptozis sürecinin düzenlenmesi çok önemlidir. Çünkü bu süreçteki bir bozukluk ölmesi gereken bir hücrenin yaşaması ve belki de mutasyona uğramış bu hücrenin neoplastik hücre patlamasına yol açabilecek olmasıdır. Hücrelerin ölmemesi genetik bozukluğa ve mutasyonlu hücrelerin çoğalmasına yol açar (Andreeff ve ark., 2000; Turner ve ark., 2004).

#### *Proto-onkogenler, onkogenler ve tümör-baskılayıcı genler*

Proto-onkogenler normal hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eden gen grubudur. Proto-onkogenler hücre çoğalmasını uyaran proteinler kodlarken tümör-baskılayıcı genler aynı olayı baskılayan, durduran veya kısıtlayan proteinleri kodlamaktadır. Proto-onkogenlerde gerçekleşen değişiklikler bunların aktifleşerek çoğalma sinyalleri yaymasına neden olurken tümör-baskılayıcı genlerin ortadan kalkmasına veya aktivitesini yitirmesine yol açan mutasyonlar da hücre çoğalmasını engelleyen kısıtlamaları kaldırmaktadır (Dalay, 2003; Junqueira, 2003; McPhee ve ark., 2000).

Genel olarak mitoz iki yolla düzenlenir: (1) Hücre bölünmesini yürüten genlerin normal işleviyle, (2) Hücre bölünmesini baskılayan genlerin normal işleviyle. Birinci yol, proto-onkogenlerin yer aldığı bir mekanizmadır. Protoonkogenlerin fonksiyonu hücre bölünmesini teşvik eden proteinleri kodlamalarıdır. Bu genlerin miktarı arttığında hücre bölünmesini teşvik ederler. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için bu genler ve/veya bu gen ürünleri inaktifleştirilmiş olmalıdır. Eğer proto-onkogenler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur. Bu da tümör oluşumuna öncülük eder. Proto-onkogen mutasyonlarının sonucu olarak böyle bir durum oluştuğunda, bu genlere onkogen adı verilir. Çünkü bu genler kanserle ilişkili olarak kontrolsüz hücre çoğalmasını uyarırlar. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü üç mekanizmayla açıklanır: nokta mutasyonları, translokasyonlar ve aşırı gen ifadesi. Bu mekanizmalarla oluşan onkogenlerin başında *ras* gen ailesi gelir. 189 aminoasitlik bir protein kodlayan *ras* gen ailesi, plazma zarından sinyal geçişinin düzenlenmesinde görev yapar. *Ras*' in daima aktif kalması kendisine bağlı sinyal yollarını sürekli uyarır. İnsan kanserlerinde en çok değişikliğe uğrayan genlerden olan *ras* genlerinde mutasyonlar başta kolon, pankreas ve akciğer kanserlerinde görülür (Kastan ve Skapek, 2001; Klug ve Cummings, 2002; Thibodeau ve Patton, 1993).

Mitozu düzenleyen ikinci mekanizma, tümör-baskılayıcı genlerdir. Hücre döngüsü bölümlerinin birbirine geçişini baskılar ya da inaktive eder ve hücre bölünmesini durdurur. Bu genler ya da onların ürünleri, hücre bölünmesi için ya inaktif olmalıdırlar ya da hücrede bulunmamalıdırlar. Eğer bu genler kalıcı olarak inaktive edilirlerse ya da mutasyonlarla ortadan kaldırılırlarsa, hücre bölünmesinin kontrolü kaybolur ve hücre kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalmaya başlar. Tümör baskılayıcı genin klasik bir örneği retinoblastoma genidir. Retinoblastoma çocukluk göz tümörüdür ve retinoblastoma geninin (*Rb*) kaybolmasıyla oluşur. *Rb* geni hücre siklusunun G1 kontrol noktasını denetler. Meme, mesane ve akciğer tümörlerinde de *Rb* kaybı bildirilmiştir. Diğer önemli tümör baskılayıcı gen *p53* genidir. Gen, transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bir çekirdek proteini kodlar. *p53* normalde tümör baskılayıcı bir gen olarak, hücrelerin hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini kontrol eder, DNA hasarı söz konusu olduğunda hücrenin apoptozise gitmesini sağlar. *p53* mutasyonu meme, akciğer, karaciğer, mesane ve kolon kanserini içeren pek çok kanser çeşidinde bulunmuştur. *p53* genindeki kalıtsal mutasyonlar, Li-Fraumeni sendromuna - yumuşak doku, kemik ve beyin gibi bazı dokularda yüksek sıklıkla kanser oluşumuna yatkınlıkla ilgilidir – neden olmaktadır (Andreeff ve ark., 2000; Dandrea ve ark., 2004; Hsu ve ark., 2004; Kastan ve Skapek, 2001; Klug ve Cummings, 2002; Kuo ve ark., 2005; McPhee ve ark., 2000; Öztürk, 1991; Peters ve Vousden, 1997; Vande Woude ve Klein, 2003).

#### *İnvazyon, metastaz ve anjiojenez*

Kanserde hastalanma ve ölüm açısından en önemli sebep metastazdır. Metastazı, “hastalığın bir organdan diğer bir komşu olmadığı organa transferidir” şeklinde tanımlayabiliriz. Tümörün yayılması konakçı hücreler ile tümör hücreleri arasındaki etkileşim ile beş basamakta gerçekleşir; (1) küçük lenf ve kan damarlarına geçerek kendisini çevreleyen konakçı dokuya invazyon ve infiltrasyon, (2) dolaşıma kanser hücrelerinin tek tek veya grup halinde salınması, (3) dolaşımda hayatta kalmaları, (4) uzaktaki dokuda kapiller yatağa takılıp kalması, (5) lenfatik veya kan damarından geldiği dokuya geçerek burada ikincil bir tümör oluşturması şeklindedir (Franks ve Teich, 1996).

Metastazın oluşumunda başlangıç aşaması olan invazyon üç basamakta gerçekleşir; (1) mekanik baskı, (2) litik enzimlerin salımı, (3) tümör hücrelerinin hareketliliğinin artması. Kritik proteolitik etki membranda bulunan kollajenin parçalanmasındandır. Tümör hücreleri bağ dokusuna bu yolla penetre olurlar. Bu etkiyi oluşturan proteolitik endopeptidazlar matriks metalloproteazlardır. Tümör hücrelerinin hareketliliğini artıran adhezyon molekülleri normalde hücrelerin birbirine ve bazal laminaya bağlanmasını sağlar. Bunların anormal ekspresyonları metastazda rol oynamalarına neden olur. Bu moleküllerden kaderinler transmembran glikoproteinleridir ve kalsiyuma bağlı ekstrasellüler hücreler arası etkileşimi sağlar. Kaderinlerin gen kodlamasında oluşan bir hata hücreler arası bağlantıların zayıflamasına ve hücrelerin hareketlilik kazanmasına yol açar. Bir diğer adhezyon molekülü integrinler de transmembran glikoproteinleridir. Bunlar hücrenin ekstrasellüler matrikse tutunmasını, aktin iskeletinin organizasyonunu ve ekstrasellüler matriksten hücre içine sinyallerin iletilmesini sağlamaktadır. Apoptozis, hücre çoğalması, invazyon, metastaz ve anjiojenezin düzenlenmesinde rol alan sinyal molekülleridir. Tümör hücreleri lenf lümenine veya kan damarına



penetre olduktan sonra ya orada çoğalmaya devam ederler ya da dolaşıma hücre salıp vücudun uzak noktalarına dolaşım yoluyla ulaşırlar. Dolaşıma katıldıktan sonra hayatta kalabilmek için bir takım lenfatik ve immünolojik faktörlerle savaşmak zorunda kalırlar. Kan dolaşımının sürükleyemeyeceği yerler olan kapiller yataklarda veya lenf düğümlerinde takılıp kalırlar ve burada integrinler devreye girerek tümör hücrelerinin tutunmasını sağlarlar. Tümör hücreleri bir kez tutunduktan sonra damarın duvarından veya lenf lümeninden bulunduğu dokuya penetre olurlar ve ikincil tümör oluşumunu başlatırlar (D'Hallewin ve ark., 2002; Franks ve Teich, 1996; Liotta ve Kohn, 2000; Özgünen, 1995).

Anjiyenez metastaz döngüsünün hem başında hem de sonunda yer almaktadır. Damar oluşumları hücrelerin dolaşıma karışabilmeleri için gereklidir. Tümör büyümeye başladığında merkezdeki hücreleri hipoksik olurlar, tümör merkezine yaşamsal ihtiyaçlarının gidebilmesi için damarlanmaya başlar. Bu oluşum anjiyjenik faktörlerin (vasküler endotel büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi) salgılanması ve anjiyenezin inhibe eden faktörlerin farklılaşması veya uzaklaştırılması ile olur. Anjiyenez tümörün metastaz potansiyelini artırır. Tümör metastaz yaptıktan sonra yaşayabilmesi için gittiği ikincil organda da damarlanma yapar. Anjiyenezin olmadığı durumlarda tümör anaerob metabolizma yoluyla yaşamsal faaliyetlerini sürdürme yoluna da gidebilmektedir (Fidler ve ark., 2001; İlyas ve ark., 1999; Liotta ve Kohn, 2000; Kenemans ve ark., 2004).

### ***Karsinojenler***

Çevremizdeki kimyasal ajanlar, radyasyon ve virüsler kanser etkenleridir. Karsinojen olarak bilinen tüm bu ajanlar hücredeki proteinler, lipitler ve en önemlisi hücrenin genetik materyali olan nükleik asitlerle etkileşmelidir. Tek bir ajan tümör oluşumunda etkili değildir. Başlatıcı (initiator) karsinojenler genetik değişikliklere sebep olur, daha sonra artırıcı (promoter) karsinojenler bu mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasını uyarır, başlatıcılar kendileri karsinojen değildir. Hücrelerin karsinojen maddeye başlatıcılardan önce maruz kalmış olması gerekir, ne kadar zaman önce olduğu önemli değildir. Kimyasal karsinojenler, alkilasyon ajanları, polisiklik ve heterosiklik hidrokarbonlar, aromatik aminlerdir (Clayson, 2001; Cotran ve ark., 1999; Livolsi ve ark., 1992; Ruacan, 2003; Weisburger, 1994).

Radyasyon, kimyasal bağları parçalayabilen ultraviyole ve iyonizan radyasyon ile sınırlıdır. Ultraviyole radyasyonunun temel kaynağı güneştir. Ultraviyole ışınlarının dalga boylarının farklılık göstermesine göre UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) ve UVC (200–280 nm) olarak gruplandırılmıştır. Bunlardan Ultraviyole B' nin mutajenik olduğu düşünülmektedir. Hücresel DNA'da aynı zincir üzerindeki pirimidin bazları arasında yeni bir kimyasal bağ oluşturarak pirimidin dimerlerinin meydana gelmesine neden olurlar. Bu dimerler DNA'nın transkripsiyon ve transkripsiyonunu bozarlar. İyonizan radyasyon, X-ışınları ve gamma ışınları gibi elektromanyetik, alfa ve beta bölekçikleri gibi parçacık radyasyonundan meydana gelir. Bu ışınlar genellikle içinden geçtikleri hücrelerdeki su moleküllerini iyonlara ayırarak makro moleküllerle etkileşirler. Hücrelerde mutasyona yol açarlar. İyonizan ışınlar yüksek enerjileri ile vücutta tüm dokulara penetre olabildiğinden hemen tüm dokularda kansere neden

olabilmektedir. Ancak en sık gözlenenler lösemiler, akciğer, meme, tiroit, tükürük bezi tümörleridir (Cotran ve ark., 1999; Ruacan, 2003).

Çok sayıda DNA ve RNA virüslerinin canlılarda amiplerden primatlara kadar hayvan türlerinde ve viral orijinli insan kanserlerine yol açtığı bulunmuştur. Kansere yol açan virüsler değişik mekanizmalarla hücrelerde dönüşüme yol açarlar. Papilloma virüsler hücrel tümör baskılayıcı genlerin ürünleri, *p53* ve retinoblastoma proteinlerini etkisizleştirirler. Epstein-Barr virüsü B lenfositlerde poliklonal proliferasyona neden olur. Daha sonra kromozom translokasyonları veya mutasyon gibi yollarla onkogen aktivasyonu gelişerek hücre proliferasyonu hızlanır. HTLV-1 hücrelerde büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin miktarını artırarak hücre çoğalmasına neden olur. Mide de enfeksiyona ve ülsera sebep olduğu bilinen bakteri *Helicobacter pylori*'nin mide lenfoması ve mide kanserlerine yol açabildiği gösterilmiştir (Cortan ve ark., 1999; Ruacan, 2003).

### ***Kanserden Korunma Yolları***

Kanserin bir nedeni olarak dış faktörlerin rolleri üzerine yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar genel olarak ne çevrenin ne de kısmen kirliliğın kanser vakalarının büyük bir kısmından sorumlu olmadığını göstermektedir. Daha ziyade beslenme, tütün kullanımı, sağlık ve dişle ilgili olarak X ışınlarına maruz kalma, ultraviyole ışını, virüsler ve ilaçlar gibi ajanlar kanser gelişiminde belirgin roller oynamaktadır. Bu ajanların ve kişisel seçeneklerin (diyetteki besin bileşimi, tütün kullanımı ve güneşlenme gibi) önemli roller oynayarak tüm kanserlerin %50' sine neden olduğu tahmin edilmektedir (Klug ve Cummings, 2000).

### ***Kanserin Tedavisi***

Kanser tedavisinde üç ana yaklaşım vardır: cerrahi, radyasyon ve kimyasal tedavi. Kimyasal tedavi - sitotoksik ilaçlarla - az sayıdaki kanser türü için tercih edilen bir yöntemdir. Bu ilaçların etkinliği; kanserin tipine, hastanın biyolojik ve fizyolojik durumuna, tümörün büyümesi veya yayılıp yayılmadığına bağlıdır. Birçok tümörde cerrahi ve radyasyona yardımcı olarak kullanılır. Cerrahi öncesi tümörün kitlesini küçültmek için (neoadjuvan tedavi), cerrahi ve radyasyon tedavisi sonrası kalan hücreleri yok etmek için (adjuvan tedavi) kullanılır (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Larner ve Grosh, 2005).

Kanserin kimyasal tedavisinde üç hedef vardır. Birincisi kesin tedavi; kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek ölümcül sitotoksik etki sağlamak istenmektedir. İdeal olarak bu ilaçların sadece maliyn hücreleri etkilemesi amaçlanır. İkincisi, kontrol; eğer kanserin tamamen ortadan kaldırılması mümkün değilse, büyümesini durdurmak ve yayılmasını önlemek, hastanın normal hayatını sürdürmesini, hayat kalitesini sağlamaktır. Üçüncüsü anlık tedavi; kanser son evrede ise kesin tedavisi ve yayılmasını engellemek mümkün olmayabilir. Böyle durumda, hastalığın belirtilerine yönelik tedavi ve hayat kalitesini artırmak hedeflenir (Bozkurt, 2000; Calabresi ve Chabner, 2001; Mycek, 2001).

## **HYPERICUM**

### **Tanımı ve Botanik Özellikleri**

*Hypericum*, *Clusiaceae* familyasına (bir diğer adı *Guttiferae*) aittir. Bu familya 1000'den fazla tür içermektedir. En çok bilinen cins *Hypericaceae*' dir. *Hypericaceae* cinsi 400'den fazla tür içermektedir. Avrupa, Batı Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'da yaygın olarak bulunur. Ülkemizde 80' e yakın türü vardır. En çok bilinen tür *Hypericum perforatum* (Sarı kantaron, Binbirdelik otu, İng: St. John's Wort, Alm: Johanniskraut)' dur (Baytop, 1991; Couladis ve ark., 2002; Ferraz ve ark., 2005; Kitanow, 2001; Robson, 2003).

*Hypericum* türünün ortak özellikleri (ı) bitkinin sapına karşılıklı dizilmiş olan stipulasız (yaprak ile sapı arasında yer alan tomurcuk) yapraklar. Yapraklar şeffaf ve sıklıkla siyah veya kırmızı renkte salgı yapan noktacıklar içerir. (ıı) çiçek, 5 parçalı yeşil renkte (bazen hafif kırmızı renkte) çanak yaprağa ve sarı (sıklıkla hafif kırmızı renkte) taç yaprağa sahiptir. Stamenler 3-5 adet küçük demetler halinde, over 3-5 ince boyuncuklardan oluşur. (ııı) meyveleri iki veya daha fazla karpelden yapılmıştır, birçok küçük silindirik tohumlar içerir (Baytop, 1991; Robson, 2003).

*Hypericum perforatum*, Saint (St.) John's Wort ('wort' eski İngilizcede bitki anlamındadır) olarak da bilinir. '*Hypericum*', eski ismi *hypericon*'dan gelmektedir. *Hyper* yukarı, *eikon* doğaüstü özellikleri olan figür anlamındadır. '*perforatum*' Latince 'delinmiş' anlamındadır. Eğer yaprakları ışığa tutulacak olursa delik gibi görünen şeffaf noktacıklar görülür. Bunlar bitkinin esansiyel yağlarını içeren noktaldır. Çiçeklerinde bulunan siyah noktacıklar sıklığında kırmızı renkte pigment açığa çıkmaktadır. Bunun St. John'un kanını temsil ettiğine inanılmaktadır. St. John bayramına denk gelen 24 Haziran civarında çiçeklerini açtığı için St. John's Wort ismini almıştır. (Bloomfield ve ark., 1996; Bratman, 1997; Cass, 1998).

### ***Hypericum* Türlerinin Kimyasal Bileşenleri ve Bu Bileşenlerin Farmakolojik Özellikleri**

Drog olarak kullanılan *Hypericum*, birçok karışık ve biyoaktif bileşikler içermektedir. Bu biyoaktif ajanların bitkide bulunma oranları bitkinin yetiştiği bölgedeki güneş ışığının miktarı ve kalitesine, mevsimine, toplandığı bölgeye, toplandığı tarih ve genetik yapısına bağlıdır (Linde ve ark., 1996; Murch ve ark., 2003).

#### ***Naftodiantronlar***

Bu sınıf hiperisin ve kimyasal akrabalarını içermektedir. Bunlar pseudohiperisin, izohiperisin, hiposirellin A ve B, proto hiperisin ve bunların kimyasal öncülleri proto-hiperisin, hiperikodehidrodianthon ve ayrıca frangula-emodin ve antranol'dür (Ali ve ark., 2001; Linde ve ark., 1996). Bitkinin daha çok çiçek ve tomurcuklarında bulunurlar (Gaedcke, 2003).

Hiperisin ve pseudohiperisin mono amin oksidaz (MAO) inhibitörü olarak bilinir. Bu iki madde sentetik antidepresanlara benzer farmakolojik etki göstermektedir. Hiperisin, GABA-A, benzodiazepin ve serotonin reseptörlerine

nörotransmitterlerinin bağlanmasını potansiyalize etmektedir (Linde ve ark., 1996; Rodriguez-Landa ve Contreras, 2003; Skalisz ve ark., 2004).

Hiperisin güneş ışığına duyarlılığı artırır. Lipofilik yapıda olduğu için hücre membranındaki fosfolipidik yapılarla birleşir. Biyolojik sıvılara geçmektedir. İnsan serum albümini ve lipoproteinler gibi plazma proteinlerine bağlanmaktadır. İnsan immüoglobulin G'ye bağlanmaz. Hiperisin, hiposirellin A ve B'nin HIV virüsüne karşı antiviral etkisi vardır. Hiperisin, protein kinaz C ve Erk1/2 MAP kinaz inhibitörüdür. Antikanser etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Ali ve ark., 2001; Blank ve ark., 2003; Colasanti ve ark., 2000; Linde ve ark., 1996; Martarelli ve ark., 2004; Mills ve Bone, 2000). Hiperisinin maliyn glioma hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (Couldwell ve ark., 1994).

### **Flavonoidler**

a. Flavonoller: kempferol, luteolin, mirisetin, kersetin.

b. Flavonol glikozitleri: hiperozid (hiperin), kersitrin, izokersitrin, amentoflavon (I3', II8-biapigenin), luteolin, rutin.

Bitkinin çiçek ve yapraklarında bulunurlar (Gaedcke, 2003; Linde ve ark., 1996). Kersetrinin *in vitro* ortamda MAO-A'ı inhibe ettiği gösterilmiştir (Linde ve ark., 1996). Kersitrin bitkinin fototoksik aktivitesinin kontrolünde en etkili madde olduğu gösterilmiştir (Wilhelm ve ark., 2001). Bitkinin antienflamatuvar aktivitesinde de rol almaktadır. Bu aktiviteyi protein kinaz C'nin inhibisyonu, lipopolisakkarit ve sitokinleri azaltarak göstermektedir (Tedeschi ve ark., 2003). Kersetin ve apigeninin bazı tümör hücrelerinin büyümesini baskıladığı ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (Roschetti ve ark., 2004)

Biflavonlar ve hiperozidin bitkinin sedatif etkisinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Amentoflavonun serotonin reuptake inhibitörü olduğuna inanılmaktadır. *In vitro* ortamda benzodiazepin reseptörlerine bağlanma aktivitesi göstermektedir. Ayrıca sedatif, antienflamatuvar, antioksidan etkilerinin olduğu ve ülser gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Mazza ve Oomah, 1998; Mills ve Bone, 2000). Flavonoidler (kersetin ve hiperozid) antioksidan etkilerini nitrik oksit sentazı inhibe ederek göstermektedirler (Luo ve ark., 2004).

### **Floroglusinoller ve türevleri**

Bitkide bulunan floroglusinoller ve türevleri; hiperforin, adhiperforin, hiperozid ve lösosianidin'dir (Linde ve ark., 1996). Bitkinin çiçeklerinde, taze tomurcuklarında ve karpellerinde bulunurlar (Gaedcke, 2003). Bu sınıftaki maddelerin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral ve vasorelaksan özellikleri olduğu bilinmektedir (Linde ve ark., 1996).

Hiperforinin güçlü bir antibiyotik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. *Staphylococcus aureus*'un üzerine antibakteriyel etkisi vardır (Hölzl ve Petersen, 2003). Hiperforin, antidepresan etkisi vardır. Serotonin, noradrenalin ve dopamin reuptake inhibitörüdür. Sinaptik aralıktan glutamat ve GABA'nın da geri alınımını inhibe etmektedir. Bu reuptake inhibisyonunu presinaptik sinirlerdeki spesifik bağlanma yörelerinde bulunan taşıyıcı moleküller ile değil de sodyuma geçirgen kanallar yoluyla sağlamaktadır (Boubakir ve ark., 2005; Mennini ve Gobbi, 2004; Mills ve Bone, 2000). Hiperforin, sodyum kanallarına bağlı asetil kolinin geri

alımını inhibe etmektedir. Striatumda böyle bir etkinin parkinson benzeri etkiye yol açabileceğini göstermektedir. Hipokampus ve korteks üzerindeki etkisi ile öğrenme ve hafıza üzerinde faydalı etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Buchholzer ve ark., 2002). Hiperforin, apoptozisi indükleyerek çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksik aktivite göstermektedir (Martarelli ve ark., 2004).

### ***Proanthosianidinler ve prosianidinler***

Bitkide bulunan proanthosianidinler ve prosianidinler; kateşinin dimer, trimer, tetramer ve polimerleri ile epikateşindir. Bitkinin sapı, yaprakları ve meyvelerinde bulunur (Gaedcke, 2003; Linde ve ark., 1996). Kateşinin antioksidan etkisi vardır (Mazza ve Oomah, 1998).

### ***Tanenler***

Bitkinin sapı, yaprakları ve meyvelerinde bulunur (Gaedcke, 2003). Tanenler bitkinin antidiyareik etkisinden sorumludur. Antioksidan etkisi vardır. Ayrıca yerel olarak damar büzücü ve kan dindirici etkileri vardır. Bu etkileriyle bitkiye yara iyi edici özellik kazandırır (Linde ve ark., 1996; Mazza ve Oomah, 1998). Tümör hücrelerinde büyümeyi inhibe ettikleri ve apoptozisi indükledikleri gösterilmiştir (Roschetti ve ark., 2004).

### ***Kumarinler***

Bitkide bulunan kumarinler; umbellifon ve skopoletin. Umbellifonun antienflamatuar ve analjezik etkisi olduğu bilinmektedir. MAO-B inhibitörü oldukları gösterilmiştir (Linde ve ark., 1996; Mills ve Bone, 2000).

### ***Epoksanetrofiller***

*Hypericum*'un yanık iyi edici özelliğinin kaynağıdır (Linde ve ark., 1996).

### ***Uçucu yağlar***

Bitkide bulunan uçucu yağlar; satire edilmiş hidrokarbonlar (2-metiloktan), monoterenler (alfa-pinen, beta-pinen, limonene ve myrcene), sesquiterpenler (karyofilin ve humulin) ve eser miktarda 2-metildekan, 2-metilbutenol, undekan, n-alkaner ve n-alkanoller'dir (Linde ve ark., 1996).

2-metilbutenol'un sedatif etkisi olduğu bilinmektedir. n-alkanollerin nörolojik bozukluklara yardımcı olduğu söylenmektedir. Antimikrobiyal aktiviteleri vardır (Cass, 1998; Linde ve ark., 1996; Mills ve Bone, 2000).

### ***Aminoasitler***

Bitkide bulunan aminoasitler; sistein, GABA, glutamin, lözin, lizin, ornitin, prolin ve tionin'dir. Bitkinin çiçek ve yapraklarında bulunur (Gaedcke, 2003; Linde ve ark., 1996).

### ***Fitoöstrojenler***

Bitkide bulunan fitoöstrojenler; beta-sitosterol ve genistein. Östrojenik ajandır. Kolesterol düşürücü etkileri vardır (Linde ve ark., 1996; Mazza ve Oomah, 1998).

### ***Ksanton***

Bitkide bulunan ksanton noratirioldür. Kök ve çiçeklerinde bulunur (Gaedcke, 2003; Linde ve ark., 1996). Diüretik ve kardiyotonik etkileri vardır. *In vitro*

ortamda MAO-A inhibitörü oldukları gösterilmiştir (Cass, 1998; Mills ve Bone, 2000).

### ***Diğer maddeler***

Bitkide bulunan diğer maddeler; fenolik karboksilik asitler (kaffeik, klorojenik, p-kumarik, ferulik, isoferulik ve gentisik asit), diğer organik asitler (isovalerianik, laurik, miristik, nikotidik, palmitik ve stearik asitler), karotenoitler (leutein, luteoksanthin, violaksanthin, cis-throliksanthin, tirollikromon, vitamin C, kolin, pektin, filobafin ve rodandır (Linde ve ark., 1996).

Kumarik, kaffeik ve ferulik asitler bitkinin antioksidan aktivitesinden sorumludur (Skerget ve ark., 2005). Karotenoitlerin yara iyi edici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Polifenollerin mononükleer fagositlerin aktivitesini güçlendirici etkisi olduğu belirlenmiştir (Cass, 1998; Linde ve ark., 1996).

### **Farmakolojik Etkileri ve Fitoterapide Kullanımı**

#### ***Antidepresan etkisi***

*Hypericum perforatum*, selektif olmayan serotonin reuptake inhibitörüdür, hafif ve orta şiddette depresyon tedavisinde kullanılmaktadır. Sinaps aralığındaki serotoninin daha uzun süre kalmasını sağlamaktadır. Böylece serotonin kendi reseptörü ile daha uzun süre etkileşmektedir. Depresif insanlarda bu reseptörler normalden daha az duyarlıdır. Depresyon tedavisinde kullanılan diğer trisiklik antidepresan veya seçici serotonin reuptake inhibitörü ilaçların kullandığı biyokimyasal mekanizmalarla benzer mekanizmalarla etki göstermektedir. Bu ilaçlar kadar etkili olduğu, yan etkilerinin de daha az olduğu gösterilmiştir. Bu ilaçlarda görülen kardiyak ve antikolinergik yan etkiler *Hypericum* ekstresinde görülmemektedir (Cass, 1998; Kumar ve ark., 2003; Francis, 2005; Linde ve Knüppel, 2005). *Hypericum perforatum* ekstrelerinin hastalardaki antidepresan etkisi deney hayvanlarında da gözlenmiştir (Öztürk ve ark., 1996a; Öztürk, 1997; Bhattacharya ve ark., 1998). *Hypericum calycinum* gibi bazı başka türlerde de antidepresan etki gözlenmişken (Öztürk ve ark., 1996b; Öztürk, 1997), *Hypericum hyssopifolium* ssp. *elongatum*'da böyle bir antidepresan etki gözlenmemiştir.

*Hypericum perforatum*'un selektif olmayan serotonin reuptake inhibisyonu aynı şekilde noradrenalin ve dopamin için de geçerlidir. Serotonergik, dopaminergik ve GABAerjik reseptörlerin dansitesinde artışa neden olmaktadır (Rodriguez-Landa ve Contreras, 2003).

*Hypericum* ekstresi üzerinde yapılan çalışmalarda antidepresan aktivitesinin şu yollarla olabileceği gösterilmiştir;

- *İn vitro* ortamda noradrenalin, serotonin ve dopaminin sinaptik aralıktan geri alınımının inhibisyonu ve GABA reuptakinin inhibisyonu,
- *İn vivo* ortamda subkronik uygulamadan sonra frontal korteksteki beta adrenoreseptör dansitesinin downregulasyonu,
- *İn vivo* ortamda serebral dokudaki santral serotonergik reseptörlerin upregulasyonu, bu etki sentetik antidepresanların benzeri bir etkidir.
- *İn vitro* ortamda serotonin reseptörlerinin uyarılması azalmaktadır,
- *İn vitro* ortamda katekol-O-metiltransferaz'ın inhibisyonu,

- *Ex vivo* ortamda kan örneklerinde interlökin-6'nın baskılanması. Bu baskı hipotalamik - pineal bez - adrenal ekseninin deaktivasyonundan kaynaklanıyor olabilir, bu etki de kortikotropin salıcı hormon ve diğer adrenal düzenleyici hormonların inhibisyonuna neden olmaktadır,
- Bitkinin içerdiği melatonin de bu etkiye katkı sağlayabilecektir (Murch ve Saxena, 2002),
- *In vitro* ortamda MAO-A ve MAO-B aktivitesinin inhibisyonu (Mills ve Bone, 2000).

### ***Mevsimsel duyum bozukluğu üzerine etkisi***

Kış aylarında uzun süre güneş ışığı olmadığı zaman beyinde melatonin ve serotonin oranlarındaki değişim nedeniyle oluşmaktadır. Depresyon benzeri belirtiler görülmektedir. Tedavisinde ışık kullanılmaktadır. Işık tedavisi, kişiyi sabahın erken saatleri ve akşam saatleri boyunca floresan ışığa maruz bırakılarak yapılmaktadır. Işık tedavisi ile *Hypericum* kombine kullanıldığında iyileştirici etki artmaktadır (Cass, 1998; Francis, 2005). Bu etkide de bitkide bulunan melatoninin rol oynaması kuvvetle olasıdır (Murch ve Saxena, 2002).

### ***Alkolizm ve diğer bağımlılıklar üzerine etkileri***

Antidepresan ilaçlar başta alkolizm olmak üzere çeşitli bağımlılık türlerinin tedavisinde yardımcı olmaktadır (Buonopane ve Petrakis, 2005). Deney hayvanlarında yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, *Hypericum perforatum* ekstreleri de diğer antidepresanlar gibi alkolizm tedavisine yardımcı olmaktadır ve deney hayvanlarında alkol alımını azaltmaktadır (Rezvani ve ark., 1999; Xu ve ark., 2005). Bu bitkinin ekstreleri aynı zamanda alkol bağımlılığının sonucu olarak ortaya çıkan yoksunluk reaksiyonlarını (Abstinens sendromu) da azaltmaktadır (Coşkun ve ark., 2006). *Hypericum perforatum* sadece alkolizm sonucu oluşan yoksunluk reaksiyonlarını değil aynı zamanda nikotin (Uzbay ve ark., 2005a; Uzbay ve ark., 2007) ve kafein (Uzbay ve ark., 2005b; Uzbay ve ark., 2006) bağımlılığı sonucu oluşan yoksunluk belirtilerini de önlemektedir. *H. perforatum*'un yoksunluk sendromları üzerindeki bu etkilerine santral nitrik oksit salımının aracılık ettiğine ilişkin kanıtlar elde edilmiştir (Hosseinzadeh ve ark., 2005; Uzbay ve ark., 2007).

### ***Uyku bozuklukları ve insomnia üzerine etkisi***

Sedatif etkisi vardır ve bu etkisi deney hayvanlarında da gösterilmiştir (Öztürk ve ark., 1996a,b; Öztürk, 1997; Uzbay ve ark., 2006). Ayrıca, REM uykusuna geçiş süresini kısaltmaktadır. REM uykusunun süresini de bir ölçüde uzatmaktadır. Böylece daha kaliteli uyku uyumasını sağlamaktadır. Rahatlatıcı ve dinlendirici uykunun öznel olarak kişiye bağlı uyunamaması olan insomnia üzerine de sedatif etkisi ile dinlendirici nitelikte ve kendiliğinden uykuya dalmaya yardımcı olmaktadır (Babar, 1995; Cass, 1998; Wentworth ve ark., 2000). *Hypericum perforatum* tarafından uyku üzerinde oluşturulan bu etkilerde de melatonin'in rol oynaması söz konusudur, çünkü santral sinir sistemindeki melatonin uykuya geçiş süresini kısaltmakta, uyku süresini ve REM süresini uzatarak daha kaliteli bir uyku sağlamaktadır (Kunz ve ark., 2004; Kamel ve Gammak, 2006). Benzer biçimde sedatif etki *Hypericum calycinum*'da da görülmektedir (Öztürk ve ark., 1996a; Öztürk ve ark., 1996b).

### ***Antikonvülzan etki***

*Hypericum perforatum* antikonvülzan etkiye de sahiptir (Ivetic et al., 2002; Hosseinzadeh ve ark., 2005). Fare ve tavşan gibi deney hayvanlarında gözlenmiş olan bu etkide de melatonin ve endojen nitrik oksit rol oynamaktadır. Melatonin antikonvülzan etkiye sahiptir (Gaby, 2007) ve *Hypericum perforatum*'un etkisi nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME tarafından önlenmektedir (Hosseinzadeh ve ark., 2005).

### ***Antiviral etkisi***

Bitkinin yapısında bulunan hiperisin ve pseudohiperisinin *in vitro* ortamda Herpes simplex tip 1 ve tip 2 ile Hepatitis C virüsleri gibi retroviral virüslere karşı etkili olduğu gösterilmiştir. *In vitro* ortamda Tip A ve B İnfluenza'a, ağız içi yaralara neden olan Vesiküler Stomatit virüsü'ne, mononükleus enfeksiyonuna bağlı kronik halsizlik sendromuna yol açan Epstein-Barr virüsü'ne karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Sindhis virüsü, kemirgen Sitomegalovirüsü, Para-influenza 3 virüsüne karşı etkili olmadığı gösterilmiştir (Cass, 1998; Mazza ve Oomah, 1998; Mills ve Bone, 2000).

Hiperisin ve pseudohiperisin antiviral etkilerini çeşitli yollarla göstermektedir;

- Virüs kapsidi üzerinde çeşitli fitokimyasal etkilerle transkriptazın salımını inhibe ederek genetik materyalin hedef hücreye aktarımına engel olarak,
- HIV virüsünün yol açtığı hücrel sinyal yolağının intrasellüler aktarımına engel olarak,
- Genetik materyalin kodlanmasını sağlayan öncü poliproteinleri bağlayarak,
- Virionların (virüs RNA ve DNA'sı) işlenmesi veya yapılmasına zarar vererek,
- Taşıyıcı immün sisteminde immüno-supressif etkiye neden olan sinyal yolağını inhibe ederek (Mills ve Bone, 2000).

HIV virüsü üzerine hiperisinin etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu etkiyi virüsü inaktive etmesi yanında, virüsün saldırısına karşı sağlıklı hücrelerin membranlarını koruyarak sağlamaktadır. Kan nakli için vericiden alınan kana hiperisin eklenerek alıcıyı bu virüsten korumanın mümkün olabileceği düşünülmektedir (Cass, 1998; D'Hallewin ve ark., 2002).

### ***Antibakteriyel ve antifungal etkisi***

*In vivo* ve *in vitro* ortamda *Staphylococcus aureus*'a karşı sülfonilamidden daha etkili olduğu bulunmuştur. Etkili olduğu diğer gram pozitif ve gram negatif bakteriler; *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır. *Hypericum perforatum* metanol ekstresinin reçine üzerinden fraksiyonlanması ile elde edilen LI 160'ın antifungal etkisinin olduğu, gram pozitif bakterilere karşı da güçlü antibakteriyel etkisi olduğu gösterilmiştir (Linde ve ark., 1996; Mazza ve Oomah, 1998; Mills ve Bone, 2000). Bir başka çalışmada ise, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve beta-



hemolitik streptokoklar üzerinde hiç bir antibakteriyel etkinliğinin olmadığı gözlenmiştir (Şengül ve ark., 1991).

*Hypericum scabrum* ve *Hypericum capitatum*'un *Bacillus cereus* ve *Candida albicans*'a karşı etkili olduğu bulunmuştur. Yine bu iki bitki ekstrelerinin *Bacillus catarrhalis*, *Achillea biebersteinii* ve *Pimpinella anisum* türlerine karşı zayıf da olsa antibakteriyel etkileri bulunmaktadır (Sökmen ve ark., 1999). *Hypericum glandulosum*'un gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkisi bulunmaktadır (Rabanal ve ark., 2005).

#### ***Analjezik etkisi***

*Hypericum perforatum*'un belirgin analjezik etkisi vardır. Deney hayvanlarında da gösterilen bu analjezik etki santral sinir sistemi aracılığıyla ve endojen opioid mekanizmaların katkısı ile ortaya çıkmaktadır (Öztürk ve ark., 1996a; 1997). *Hypericum perforatum*'un bu etkisi klasik antidepresan ilaçlara benzemektedir, çünkü klasik antidepresan ilaçlarda da santral sinir sistemi aracılıklı analjezik etkisi vardır ve bu etkiye endojen opioid sistem aktivasyonu aracılık etmektedir (Öztürk ve ark., 2006). Yapılan ön denemelerin sonuçlarına göre, *Hypericum perforatum*'un analjezik etkisinde de opioid mekanizmalar ve OP1 reseptör aktivasyonu olduğuna ilişkin gözlemler elde edilmiştir (Öztürk ve Öztürk, 2001) Söz konusu analjezik etki diğer türler olan *Hypericum calycinum*, *Hypericum caprifoliatum* ve *Hypericum polyanthemum* ile de görülmektedir (Öztürk ve ark., 1996b; Viana ve ark., 2003).

#### ***Antienflamatuar etkisi ve immünolojik etkisi***

*Hypericum* ekstresinin içindeki maddelerin bir kısmı immün sistemi güçlendirirken diğer bir kısmı da baskılamaktadır. Şöyle ki, immün sistemin enfeksiyonla mücadelesini desteklerken, yaralanmalarda inflamasyonun artmasına yol açan immün etkiyi azaltmaktadır (Cass, 1998; Mazza ve Oomah, 1998).

Bitkinin ekstresi protein kinaz C, lipopolisakkarit, P maddesine bağlı siklooksijenaz-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve interlökin-6 salımını baskılar. *In vivo* ortamda inflamasyonu ve beyaz kan hücrelerinin infiltrasyonunu baskıladığı bulunmuştur. Lenfosit ve T hücrelerini aktive eden prostoglandin ve sitokinlerden olan araşidonik asit ve lökotren B salımını inhibe etmektedir. Kapiller damarların geçirgenliğini azaltmaktadır (Helgason ve ark., 2000; Linde ve ark., 1996; Mazza ve Oomah, 1998; Tedeschi ve ark., 2003).

Depresyonun tedavisinde uygulanan serotonerjik farmakoterapi immün fonksiyonun artmasına yol açar. Özellikle, antidepresan tedavisi natural killer (NK) hücre aktivitesini artırır. NK hücreleri, büyük granüllü lenfosit hücreleridir. Viral enfeksiyona ve kanserli hücelere karşı ilk savunma hücreleridir. *Hypericum perforatum*'un antidepresan aktivitesinin direk olarak immün sistemin fonksiyonunu da etkilediği bulunmuştur (Helgason ve ark., 2000).

Farelerle yapılan bir çalışmada *Hypericum canariense* ve *Hypericum glandulosum*'un analjezik ve antienflamatuar etkisi bulunduğu gösterilmiştir (Rabanal ve ark., 2005).

### ***Antioksidan etkisi***

Hücrelerin metabolizmaları esnasında açığa çıkan reaktif oksijen parçaları (ROS) hücreler için zararlıdır. Ortamdan uzaklaştırılmazsa bir takım moleküllerin (proteinler, DNA ve yağlar gibi) hasarına yol açarlar. Hücreler ROS'nın olumsuz etkilerinden korunmak için bir takım mekanizmalar geliştirmiştir. Ancak bu mekanizmalar zamanla yetersiz kalmakta yaşlanmayı hızlandırmaktadır (Silva ve ark., 2005).

Antioksidan etki yaşlanmaya bağlı birçok patojenik etkinin azaltılması veya ortadan kaldırılması için çok önemlidir. Bunlar; kanser, kalp hastalıkları, katarakt ve bilişsel bozukluklardır. Bu kronik hastalıklara yol açan serbest radikallerin ve oksidatif sürecin antioksidanlar tarafından bloke edildiği veya azaltıldığına inanılmaktadır (Mazza ve Oomah, 1998).

Bitki ve bitki türlerinin antioksidan aktiviteleri içerdikleri fenolik gruplardan kaynaklanmaktadır. *Hypericum perforatum* ekstresinin antioksidan aktivitesi içerdiği flavonlar ve fenolik asitler (kumarik, kaffeik ve ferulik asit)'dendir (Skerget ve ark., 2005).

### ***Hepatoprotektif etkisi***

*H. perforatum* halk arasında sarılığa karşı kullanılmaktadır (Mills ve Bone, 2000). Bu etkisi karbon tetraklorür ile deneysel hepatik dejenerasyon yapılan kemirgenlerde (fare ve sıçan) kanıtlanmıştır (Öztürk ve ark., 1992). Bu etkinin steroid pregnan X reseptörünün aktivasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Moore ve ark., 2000). Bitkinin fraksiyonlanarak etkinin izlendiği ön denemelerde hiperisine zengin fraksiyonlarda hepatoprotektif etkinin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Herekman-Demir ve ark., 2001).

### ***Yara iyi edici etkisi***

*Hypericum perforatum*'un yara iyileştirici etkileri çok eskiden beri bilinmektedir. Zeytinyağı içinde bitkinin bekletilmesiyle hazırlanan pomat ve merhemlerin yatalak hastalarda oluşan yaraların iyileşmesini hızlandırdığı gözlenmiştir (Ferne, 1897). Ayrıca, yanık yaralarının iyileşme sürecini kısaltmaktadır ve yara izinin daha az olmasını sağlamaktadır. Yara iyileştirici etkisinde bağ doku hücrelerini (fibroblastları) uyarak, kollajen yapımını arttırıp yaralı bölgenin sikatris dokusu ile kapanmasını sağlaması önemli rol oynamaktadır (Korkmaz ve ark., 2001; Öztürk ve ark., 2007). Yaralı bölgede yeni derinin oluşumunda epitel hücrelerin çoğalması üzerinde etkisi olduğuna inanılmaktadır. Yara üzerinde antiseptik aktiviteye de sahiptir. Yanık yarası ve diğer yaralar üzerindeki iyileştirici etkisinde bitkinin antienflamatuar, antibakteriyel ve antifungal etkilerinin de katkı sağladığı düşünülmektedir (Cass, 1998; Mazza ve Oomah, 1998; Mills ve Bone, 2000).

### ***Fototoksik etkisi***

Fototoksik etki (hiperisizm) yüksek miktarda sarı kantaron otlayan hayvanlarda, özellikle koyun ve büyükbaş hayvanlarında, görülmektedir (Schulz ve ark., 1998).

Yapısında bulunan naftodiantronlar, özellikle hiperisin ışığa duyarlılığı artırmaktadır. Fakat depresyon tedavisinde kullanılan dozunun kandaki miktarı bu toksik etkinin gözlemlenmesine yol açacak kadar çok değildir. Kullanılan

miktarın ancak 30–50 katı kadar yüksek dozda alınacak olursa fototoksik etki görülebilmektedir (Ernst ve Izzo, 2003; Schulz ve ark., 1998; Vandenbergaeerde ve ark., 1994).

### ***Antikanser etkisi***

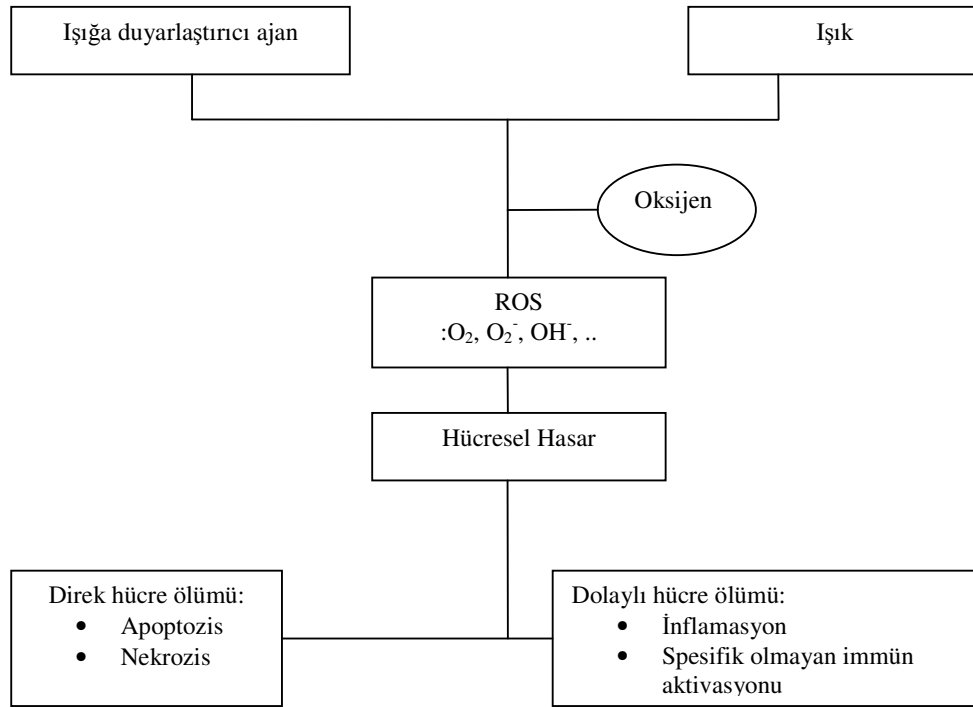
*Hypericum*'un antikanser etkisi daha çok fotodinamik tedavi (PDT) yöntemiyle araştırılmaktadır. Fotodinamik tedavi, kanser hücreleri ile kötü huylu olmayan fakat anormal büyüyen istenmeyen hücrelerin büyümesinin durdurulmasını, apoptoz ve nekrozunu indüklemektedir. Hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda kullanılmaktadır. Fotodinamik tedavi yöntemi dışında yapısında bulunan antikanser etkinliği düşünülen bileşiklerin izolasyonu ile doz ve zamana bağlı hücrel toksisitetlerine *in vitro* ortamda bakılmaktadır (Ali ve ark., 2001; Piette ve ark., 2003).

PDT' de (**Şekil 1**) ışığa duyarlaştırıcı bir ajan ile görünür ışık veya ultraviyole (UV) ışığı kullanılmaktadır. Kullanılan ışığa duyarlaştırıcı ajan tümör hücreleri tarafından absorbe edilmeli ve tutulmalı, görünür ışığın dalga boyu ise bu ajanla aynı absorpsiyon spektrumuna sahip olmalıdır. Bu ajan, görünür ışık ve oksijen varlığında süperoksit radikal anyonlar ( $:O_2^-$ ) (tip I reaksiyon), peroksidazlar ( $O_2^-$ ) ve hidroksil radikaller ( $OH^\cdot$ ) (tip II reaksiyon) gibi sitotoksik ürünler açığa çıkarır. Bu sitotoksik ürünler hücre membranının lipit ve proteinlerini oksitleyerek irreversibl hücrel hasara ve tümörün tahribatına yol açar. PDT istenmeyen hücreleri iki ana yolla öldürür: i.) Direk yol; hücreler apoptozis ve/veya nekrozise sürüklenir. ii.) Dolaylı yol; inflamasyon hücrelerini uyarır (nötrofil, makrofaj vb.), sitokinlerin salımı gerçekleşir ve seçici olmayan immün sistem aktivasyonuna yol açar. Bu yolların oluşumunda bir takım parametreler etkilidir. Işığa duyarlaştırıcı ajanın intrasellüler lokalizasyonu, fizikokimyasal özellikleri, floresanın oranı, oksijen miktarı ve hücre tipi gibi. (Agostinis ve ark., 2002; Delaey, ve ark., 2000; Du ve ark., 2004; Liu ve ark., 2000; Piette ve ark., 2003; Roscetti ve ark., 2004).

PDT' de direk tümör hücresinin ölümünde tümör damarlanmasında oluşturduğu değişikliklerle de rol oynamaktadır. *In vivo* ortamda PDT' den sonra tümör dokusunun kanlanması azalma, damarsal yapı bozukluğu görülmektedir (Agostinis ve ark., 2002).

PDT özofagal kanser, erken dönem akciğer kanseri, mesane kanser çeşitleri, beyin, baş ve boyun, göz, over kanserleri ile deri kanserlerinde (bazal ve squamoz karsinoma, Kaposi's sarkoma ve T hücreli lenfoma) denenmektedir. Güçlü lazerlerin gelişimi ve bunların fiber optik kablolarla kullanılması geliştikçe klinik uygulamaların da çeşitlilik kazanacağına inanılmaktadır (Agostinis ve ark., 2002).

Doğada bilinen en güçlü ışığa duyarlaştırıcı ajanlar *Hypericum* türevleri olan hiperisin, hiposirellin A ve B'dir. Hiperisinin PDT' de enzim inhibisyonu tek bir oksijen molekülü ile gerçekleşmektedir. Hiperisinin ışık ile aktivasyonu sonucu protein kinaz C ve diğer protein kinazları stimüle eden büyüme faktörleri inhibe olmakta, membran lipitlerinin peroksidasyonu indüklenmekte, süperoksit dismütaz aktivitesi artmakta ve hücrel glutatyon seviyesi düşmekte, mitokondriyal fonksiyonlar zayıflamaktadır (Agostinis ve ark., 2002; Delaey, ve ark., 2000).



**Şekil 1. Fotodinamik Tedavinin Şematik Gösterimi**

Hiperisin *in vitro* ortamda çeşitli tümör hücrelerine karşı antikanser aktivite göstermektedir. Bunlar; lösemi hücreleri (K562, K562, L-1210, P388, U937), kolon kanseri hücreleri (HCT-116, S32, S36A, SNU-C4), mide kanseri hücreleri (SNU-1), pankreas kanseri hücreleri (MiaPaCa-2, PANC-1), hepatoma hücreleri (HepG2, MIH1C1), epidermoit karsinoma hücreleri (A-431), glioblastoma hücreleri (A172, LN229, 93-492, U87), nasofarengial kanser hücreleri (CNE2, HK1, TW0-1), prostat kanseri hücreleri (LNCaP, PC-3)' dir. Yüksek konsantrasyonlarda bile normal hücrelere toksik etki göstermemektedir (Ali ve ark., 2001; Colasanti ve ark., 2000; Couldwell ve ark., 1994; Court, 2003; Delaey, ve ark., 2000; Du ve ark., 2004; Hostanska ve ark., 2003; Liu ve ark., 2000; Piette ve ark., 2003; Roscetti ve ark., 2004).

Epidermoit karsinoma hücreleriyle karanlık ortamda yapılan çalışmalarda, hiperisinin antitümör aktivitesinin, hücre membranında bulunan epidermal büyüme faktörü reseptörünün aktivitesini inhibe ederek olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak T hücresi protein tirozin kinazını inhibe ettiği gösterilmiştir (Court, 2003; Mills ve Bone, 2000).

Yapılan bir başka çalışmada karanlık ortamda hiperisinin hiperforin ile sinerjistik etki gösterdiği, kaspaza bağlı yolak ile apoptozisi indükleyerek hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Hostanska ve ark., 2003).

Multiple miyelom, meme, kolon ve küçük hücreli akciğer kanserlerinde gelişen antikanser ilaç rezistansında rol oynayan glutatyon-S-transferazı hiperisin baskılamaktadır (Du ve ark., 2004).

Hiperisin kanser tanısı konmasında da kullanılmıştır. Tümör dokusuna selektif olarak birikir, karakteristik parlak floresan ışık verir ve tümörün görünmesini sağlar. Mesane kanserinde kanser hücrelerine penetre olan hiperisin mavi ışık altında (dalga boyu 385–450 nm) kırmızı floresan (600–640 nm) ışığa ışınmaktadır (Pytel ve Schmeller, 2002; Uzdensky ve ark., 2003).

#### ***Yan etkisi ve kontrendikasyonları***

Yapılan geniş çaplı çalışmalarda *Hypericum* ekstresinin iyi tolare edildiği ve çok az düzeyde yan etki ortaya çıktığı gösterilmiştir. *Hypericum* ekstresi kullanıldığında rapor edilen yan etkiler; gastrointestinal hassasiyet, alerjik reaksiyonlar, yorgunluk, halsizlik, ağız kuruluğu, ışığa duyarlılık ve bunun sonucu deride oluşan lekelenmelerdir. Bu yan etkilerin büyüklüğü hafif ile orta derece arasındadır veya geçicidir (Henderson ve ark., 2002; Linde ve Knüppel, 2005).

*Hypericum* ekstresi zayıf ve orta derecede depresyon tedavisinde endikedir. Fakat ciddi depresyon vakalarında - intihar düşüncesi ve psikotik belirtileri olan hastalar gibi - uygun değildir. Ancak böyle durumlarda yardımcı tedavi olarak kullanılabilir (Linde ve Knüppel, 2005; Mills ve Bone, 2000).

#### ***İlaç Etkileşimleri***

*Hypericum* ekstresi sitokrom p450 (CYP) enzimlerini aktive etmektedir. Bu enzimler birçok ilacın metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2001). Ekstrenin bu etkisinin yapısında bulunan hiperisin, amentoflavon ve hiperforinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu üç bileşiğe ek olarak kuersetin ve klorojenik asitin de etkisine bakılmıştır. Hiperforin lipofilik yapıdadır ve steroid pregnan X reseptörünün potansiyel aktivatörüdür. Pregnan X reseptörü, CYP3A4 ve bir transport proteini olan P-glikoprotein'in indüklenmesine neden olmaktadır. Bu durum intestinal lümeninden ilaç absorpsiyonunun düşmesine yol açar (Mai ve ark., 2004; Moore ve ark., 2000).

*Hypericum* ekstresinin şu ilaçların biyoyararlılığını düşürdüğü gösterilmiştir; digoksin, HIV proteaz inhibitörleri (indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir), HIV non-nükleozid reverstranskriptaz inhibitörleri (nevirapin, efavirenz), warfarin, teofilin, antikonvülzanlar (karbamazepin, fenobarbiton, fenitoin), triptanlar (sumatriptan, naratriptan, rizatriptan, zolmitriptan), selektif serotonin reuptake inhibitörleri (sitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, sertralin), imatinib mesilate, immünosüpressantlar (siklosporin), oral kontraseptifler (Frye ve ark., 2004; Henderson ve ark., 2002; Mai ve ark., 2004; Müller ve ark., 2004).

## GEREÇLER

### Kullanılan Hücreler

#### *A549 Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu*

Akciğer kanserleri dünya çapında ölümlere neden olmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri bu kanser türünün %80'ini oluşturmaktadır (Chang ve ark., 2004; Kuo ve ark., 2005). A549 cell line'ı 1972 yılında Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki Orta Asya'lı bir erkeğin akciğer karsinomlu dokusundan explant kültür tekniği ile izole edilmiştir (http-2).

Lieber ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda A549 hücrelerinin sistidin difosfokolin yolağında yüksek oranda desatüre yağ asitleri ile birlikte lesitin sentezlediklerini göstermişlerdir. Hücrelerin keratin pozitif olduğu immünoperoksidaz boyama ile gösterilmiştir (http-2).

İki tip alveoler hücre vardır. Tip I alveollerin iç yüzeyinin %96'sını kaplamaktadır ve *in vitro* ortamda üretmek zordur. Tip II ise daha az yüzey kaplar. Tip I'e göre farklı ve birçok sayıda fonksiyonları vardır. Ayrıca tip II hücreler, tip I hücrelerinin ata hücreleridir. A549 hücreleri tip II hücreleri orijinelidir (Fang ve Aust, 1997; Shimizu ve ark., 2004).

Sitokinlerin ve tümör promotörlerinin A549 hücrelerinden prostaglandin E-2 (PGE<sub>2</sub>) ve siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin yüksek miktarlarda sentezlenmesine neden olduğu gösterilmiştir. PGE<sub>2</sub> ve COX-2'nin sentezlenmesi sonucu ezonoit yolağında düzenleyici rol alan nitrik oksit ve indüklenebilen nitrik oksit sentaz enziminin de düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Banerjee ve ark., 2002; Tong ve Tai, 2005).

A549 hücrelerinden inflamasyona yol açabilen ajanların varlığında interlökin-6 ve interlökin-8 salgılanmaktadır (Garofalo ve ark., 1996; Jepsen ve ark., 2004). İnflamasyon durumunda P maddesi A549 hücrelerinde ROS ve bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'in indüklenmesine yol açmaktadır (Springer ve ark., 2005).

#### *HeLa Serviks adenokarsinomu*

İzole edilen ilk insan kaynaklı epitel kanseridir. Serviks epitel adenokarsinom hücreleridir. Scherer tarafından 1952 yılında 31 yaşında zenci bir kadından alınmıştır. İmmünoperoksidaz boyama ile keratin pozitif oldukları gösterilmiştir. Hücrelerin %98'inde küçük telosentrik kromozomlar vardır. Test edilen 1385 hücrenin tümü anöloididir (Florea ve ark., 2005; http-3; Macville ve ark., 1999).

*p53* düzeyi düşük, retinoblastoma baskılayıcı gen (*pRB*) seviyesi normal olarak bulunmuştur (Baldi ve ark., 1996; Scheffner ve ark., 1991). Lizofosfatidilkolin, aktivatör protein 1, protein kinaz C yolağı ve c-jun-terminal kinaz aktivitesini artırmaktadır (Fang ve ark., 1997; Huber ve ark., 1997; Jang ve ark., 1996).

İnsan papilloma virüs 18 (HPV-18) proteini taşımaktadır. HPV-18 ile infekte olan HeLa hücrelerinden yüksek oranda çözünebilir APO-1/Fas antijeni salgılanmaktadır. Poliovirüsü 1 ve 2, İnsan Poliovirüsü 3, Adenovirüsü Tip 3, Encephalomyocarditis virüslerine duyarlıdır (Boshart ve ark., 1984; Bruder ve Kovessi, 1997; Gasowska-Giszczak ve ark., 2005; Macville ve ark., 1999; Scherer ve ark., 1953; Schneider-Gadicke ve ark.,1986).

HeLa hücrelerinde doğal olarak düşük süperoksit dismutaz aktivitesi vardır. Hücrede oksidatif stresin hücrel etkilerini incelemek açısından uygun bir modeldir (Horakova ve ark., 2001). Sitozolik bir enzim olan açıl fosfataz HeLa hücreleri için güçlü bir apoptoz indükleyicidir (Giannoni ve ark., 2000). İntrinsik glukokortikoid reseptörleri bulundurur (Dvorak ve ark., 2005). Üç tip inositol trifosfat reseptör izoformları tespit edilmiştir (Missiaen ve ark., 2004). HeLa hücrelerinde mitokondride kalsiyum birikimi diğer epitel hücrelerine göre daha hızlıdır. Mitokondri, nükleer tübül içine ve dışına hareket edebilmektedir (Lui ve ark., 2003; Varadi ve ark., 2004).

### ***NIH3T3 Fibroblast hücreleri***

NIH Swiss fare embriyosundan elde edilen yüksek oranda kontak inhibisyona duyarlı adherent fibroblast hücreleridir (Jainchill ve ark., 1969). Ectromelia virüsü'ne karşı test edilmiş ve negatif bulunmuştur (http-4).

Fare Sarkoma virüsleri, Sitomegalo virüsleri, Hepatit B ve C ile Lösemi virüsleri'ne duyarlıdır (Cavanaugh ve ark., 1996; Cranmer ve ark., 1996; Gonzalez ve ark., 1996; Jung ve ark., 2003; Siess ve ark., 1996). DNA transfeksiyonu çalışmalarında kullanılmaktadır (Chang ve Pastan, 1996; Shisler ve ark., 1996).

NIH3T3 hücrelerinde fosfotidilinositol transfer proteinlerinin  $\alpha$  ve  $\beta$  (PI-TP $\alpha$  ve PI-TP $\beta$ ) olmak üzere iki formu da bulunmaktadır. Bu proteinler nükleusa yerleşmiş, sitoplazmadan golgi sistemi ile bağlantılıdır. PI-TP $\alpha$  hücreyi apoptozise karşı korumakta, PI-TP $\beta$  ise apoptozise karşı duyarlı hale getirmektedir (van Tiel ve ark., 2004).

### **Kullanılan Testler**

#### ***Mitokondriyal aktiviteye dayalı testler ve MTT ölçümü***

Bu testte tetrazolium tuzu, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid, canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve mitokondriyal süksinat dehidrogenaza bağlı bir reaksiyonla mavi-mor renkli, suda çözünmeyen ürün olan formazana indirgenir. Formazan hücre zarını geçemediğinden hücre içinde toplanır. DMSO, isopropanol veya diğer uygun çözücü ilavesiyle ürün çözünüp, serbest kalır ve kolorimetrik olarak tespit edilebilir hale gelir. Çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazanın miktarının verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği mitokondrinin sağlamlığı ve metabolik aktivitesinin tanımlanmasını sağlar. Bu da hücre canlılığının ölçüsü olarak alınır. Spektrofotometrik olarak ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Bu yöntem daha çok hızlı çoğalan ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur (Barile, 1997; Denizot ve Lang, 1986; Horakova ve ark., 2001; Vijayan ve ark., 2003).

#### ***Lizozomal aktiviteye dayanan testler ve nötral kırmızısı boyama yöntemi (NR)***

Nötral kırmızısı boyası zayıf katyonik bir boyadır. Canlı hücrelere non iyonik difüzyon yoluyla hücre membranından girmektedir. Daha sonra boya canlı hücrenin lizozomlarına penetre olarak birikir. Bu yöntemin temeli, test maddesinin etki mekanizmasından bağımsız olarak, canlı hücre sayısındaki azalmayı ölçmeye dayanmaktadır. Sadece canlı hücrelerde boyanın lizozomlar

tarafından absorplanması tam olabilir. Büyümenin baskılanmasının derecesi, test maddelerinin miktarları ile bağlantılı olarak, toksisitenin belirtisidir. Bu test sayesinde seçici olarak lizozomları etkileyen kimyasalları tespit etmek mümkün olmaktadır. Böylece test maddesinin etki mekanizmasının anlaşılmasında da faydalıdır (Barille, 1997; Borenfreund ve Puerner, 1985; Svendsen ve ark., 2004). Bu yöntem de hızlı çoğalan hücre dizileri için uygundur (Horakova ve ark., 2001).

Asidik şartlarda, nötral kırmızısı boyası çift sarmallı DNA yapısına bağlanmakta ve floresan ışımaya vermektedir (Heli ve ark., 2005; Huang ve ark., 2001; Wang ve ark., 1999). *In vivo* çalışmalarda nöronal aktiviteye bağlı olarak nötral kırmızısı boyasının floresansı artmaktadır. Toksikitesinin az olması nedeniyle nöronal aktivitenin görüntülenmesinde güvenle kullanılabilir. Serebral kortekste ki Purkinje hücreleri gibi nöron gruplarını seçici olarak ve kolaylıkla boyayabilme özelliğine sahiptir (Okada, 2000).

### ***Hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin ölçülmesi ve yumuşak agar koloni formasyonu***

Yumuşak agar koloni formasyonu, *in vitro* ortamda ilaca bağlı sitotoksitenin belirlenmesinde uygun bir tekniktir. Bu yöntemde kültürde hücrelerin oluşturduğu koloniler sayılmaktadır. Hücrelere uygulanan test maddelerinin hücrelerin koloni oluşturma kabiliyetlerini hafif, orta derecede veya ileri derecede etkilediği şeklinde derecelendirilerek yorumlanmasını sağlar. İlaça duyarlılık koloni sayısı ile orantılıdır (Alley ve ark., 1982; Alley ve ark., 1991).

Tümör hücrelerinin sitotoksik ajanlara verdiği cevap *in vitro* ortam ile *in vivo* ortam arasında ilişki göstermektedir. Ayrıca *in vitro* ortamda tümör hücrelerinin gösterdiği koloni oluşturma kabiliyeti, *in vivo* ortamdaki davranışları hakkında da fikir sahibi olmayı sağlamaktadır (Alley ve Lieber, 1984b; Kirkels ve ark., 1983).

Kanser hücrelerinin koloni oluşturmada adhezyon moleküllerinin etkisi ile vazoaktif intestinal polipeptidin etkisine bakılmıştır (Moody ve ark., 1993; Yeates ve Powis, 1997).

### ***Hücrelerdeki DNA ve RNA miktarları ve akridin turuncusu ile boyama***

Akridin turuncusu hücre döngüsünün takibinde kullanışlı, nükleik asitlere selektif metakromatik bir boyadır. Akridin turuncusu, DNA ve RNA ile araya girerek veya elektrostatik çekim ile etkileşir. DNA'nın çift sarmallı arasında biriken akridin turuncusu yeşil floresan ışımaya gösterir; RNA'ya elektrostatik olarak bağlanan akridin turuncusu kırmızı floresan ışımaya gösterir. Bu boyama, hücrenin dinleme ve aktif haline göre, bölünen hücrelerde ve G<sub>1</sub> fazında farklı ışımaya gösterebilir (Heli ve ark., 2005; Kuznetsov ve ark., 2004).

Akridin turuncusu ayrıca, apoptozisin ölçülmesinde, intrasellüler pH oranlarının tespitinde ve proton pompası aktivitesinde de kullanılmaktadır. Apoptozis hücrenin küçülmesi, kromatin kopması ve nükleer parçalanma gibi morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Bu değişiklikler akridin turuncusu ile boyanarak görüntülenebilmektedir. Akridin turuncusu hücre içerisindeki lizozomlar gibi asidik organelleri de boyamaktadır. Lizozomal aktivitenin artış oranı, asitlik oranını artırır ve bu orana göre akridin turuncusu ile floresan ışımaya da



artırmaktadır (Gordon ve ark., 2000; Halaby ve ark., 2004; Rodgers ve ark., 1998).

### **Kullanılan Maddeler**

Akridin turuncusu (Sigma)

Dimetilsülfoksit – DMSO (Sigma, Merck)

Dulbecco's Modification Eagles Medium (Biological Industries)

Fetal Calf Serum (Biological Industries)

Formaldehit (Merck)

Fosfat Tuz Tamponu (PBS-A)

Glasiyel Asetik Asit (Sigma)

Hank's Balans Tuz Solüsyonu (Sigma)

Kalsiyum Klorür – CaCl<sub>2</sub> (Merck)

MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür}(Sigma)

Nötral kırmızısı (Sigma)

Penisilin – Streptomisin Solüsyonu (Sigma)

Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biological Industries)

### **Kullanılan Malzemeler**

Otoklavlanabilir cam şişe (Isolab)

96, 24 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP)

25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür şişeleri (TPP)

15 ve 50 ml'lik merkezkaç tüpü (TPP)

1, 2, 5, 10 ve 25 ml'lik cam pipet (Isolab)

5, 10 ve 25 ml'lik tek kullanımlık pipet (Serological Pipette)

Neubauer lamı (Isolab)

### **Kullanılan Cihazlar**

Steril kabin (Holten)

Karbondioksit inkübatörü (Heraeus)

Soğutmalı merkezkaç (Heraeus)

Inverted mikroskop (Olympus)

İmmüno-floresan mikroskop ve fotoğraf ataçmanı (Olympus)

ELISA cihazı (Bio-Tek)

Otoklav (Hirayama)

Kuru hava sterilizatörü (Heraeus)

## YÖNTEMLER

### Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması

Hücreler, deneyler için yeterli sayıya eriştiklerinde tripsinlenerek toplanmış ve Neubauer lamı ile sayılarak ml'de 250 000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. MTT ve nötral kırmızısı boyama yöntemleri için 96 kuyucuklu plakalara 0.1 ml hücre süspansiyonu (25 000 hücre) ekilip, hücrelerin plaka kuyucuklarının tabanına yapışmaları için 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda hücrelerin üzerlerindeki besiyerleri plakaların ters çevrilmesi suretiyle uzaklaştırılıp, üzerlerine test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilmiştir.

*Hypericum perforatum*'un çiçek ve yapraklarından elde edilen ekstresi (HPE) için 1–10–50–100–250 mg.ml<sup>-1</sup>, *Hypericum origanifolium*'un çiçeğinden elde edilen ekstresi (HOCE) için 1–10–50–100–250 mg.ml<sup>-1</sup>, *Hypericum origanifolium*'un yaprağından elde edilen ekstresi (HOYE) için 1–10–50–100–250 mg.ml<sup>-1</sup>, *Hypericum montbrettii*'nin çiçeğinden elde edilen ekstresi (HMCE) için 1–10–50–100–250 mg.ml<sup>-1</sup>, *Hypericum montbrettii*'nin yaprağından elde edilen ekstresi (HMYE) için 1–10–50–100–250 mg.ml<sup>-1</sup> dozları hazırlanmıştır. Tüm maddelerde çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda öngörülen şekilde besiyerinde DMSO oranı %0.1–0.2'yi geçmeyecek şekilde maddeler besiyerinde %0.1 olacak şekilde 1 ml içine 1 µl DMSO'da verilmiş ve final konsantrasyonlar: HPE için 1–10–50–100–250 µg.ml<sup>-1</sup>, HOCE için 1–10–50–100–250 µg.ml<sup>-1</sup>, HOYE için 1–10–50–100–250 µg.ml<sup>-1</sup>, HMCE için 1–10–50–100–250 µg.ml<sup>-1</sup>, HMYE için 1–10–50–100–250 µg.ml<sup>-1</sup> olarak sağlanmıştır<sup>(1)</sup>.

Bu konsantrasyonlarda besiyerinde hazırlanan test maddelerinin konsantrasyonları, kontrol grubu (boş besiyeri) ve %0.1 DMSO içeren çözücü kontrol grubu da teste eklenmiştir. Test maddeleri içeren besiyerleri 96 kuyucuklu plakaların kuyucuklarına 24 saat sayımları için 0.1 ml, 48 saat sayımları için 0.2 ml, 72 ve 96 saat sayımları için 0.3 ml koyularak gerekli sürelerde inkübasyona bırakılıp, bu süreler sonunda hücrelere gerekli boyama yöntemleri uygulanmıştır.

Koloni formasyonu, sayımı yapılan hücre süspansiyonundan ml'de 1000 hücre olacak şekilde hesaplayarak hazırlanmıştır.

Akridin turuncusu için, hücreler 250 000 hücre.ml<sup>-1</sup> olacak şekilde petrilere koyulan 22x22 mm steril lamellere ekilmiştir. 24 saat sonra lamellerin üzerindeki besiyerleri çekilip, test maddelerini içeren taze besiyerleri ilave edilmiştir. Diğer testlerde test maddeleriyle görülen maksimum etki süreleri kadar bekletildikten sonra hücrelere boyama işlemi uygulanmıştır<sup>(2)</sup>.

### MTT Ölçümü

Test maddeleri ile gerekli süre bekletilen hücreler alınıp, besiyerleri uzaklaştırılır. MTT çalışma solüsyonu, MTT stok çözeltisinden taze olarak hazırlanmıştır.

---

<sup>(1)</sup> Bitki ekstraktları Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM)'nde Dr. Nilgün ÖZTÜRK tarafından hazırlanmıştır.

<sup>(2)</sup> Kullanılan besiyerleri, katkı maddeleri ve tampon çözeltiler ile ilgili detaylı bilgiler Ek1'de sunulmuştur.

Her bir kuyucuğa 0.1 ml MTT çalışma solüsyonu ilave edilerek karbondioksit inkübatöründe 3–4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda plakalar alınıp, besiyerleri uzaklaştırılmış ve 0.1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu deneyin her aşaması boya ışıkta bozulduğu için mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır (Alley ve ark., 1988; Carmichael ve ark., 1987; Chiba ve ark., 1998; Tsuruo ve ark., 1983; Zhang ve ark., 2004).

### **Nötral Kırmızısı Boyama Yöntemi ile Sitotoksite Ölçümü**

Test maddeleri ile gerekli süre bekletilen hücreler alınıp, besiyerleri uzaklaştırılmış ve 37 °C'ye getirilmiş PBS ile yıkanmıştır. Nötral kırmızısı çalışma solüsyonu her bir kuyucuğa 0.1 ml ilave edilmiş ve plakalar 37 °C'de 3–4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plakalardan boyama çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Taze hazırlanan formaldehit-kalsiyum klorür yıkama ve fiksatif solüsyonundan 100'er ml ilave edilerek yıkanmış ve solüsyon plakalardan dökülmüştür. Daha sonra plakalar ters çevrilip kurutma kâğıdı üzerinde bir gün bekletilerek kurutulmuştur. Bu süre sonunda plakaların her bir kuyucuğuna 0.1 ml asetik asit-etanol solüsyonu ilave edilerek 15 dakika oda ısısında bekletilmiş ve 30 dakika çalkalayıcıda karıştırılarak boya homojen hale getirilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu deneyin her aşaması boya ışıkta bozulduğu için mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır (Alnuaimi ve ark., 2007; Chiba ve ark., 1998; Valdivieso-Garcia ve ark., 1993; Valentin ve ark., 2001).

### **Yumuşak Agar Koloni Formasyonu**

Steril olarak hazırlanmış %3 select agar 60°C'ye ve besiyeri 37°C'ye getirilmiştir. Alt agar tabakası 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğu için 1 ml olacak şekilde hesaplanarak hazırlanıp hemen kuyucuklara ilave edildikten sonra donması için 5 dakika buzdolabında +4°C'de bekletilmiştir. Bu sırada üst agar tabakası için de 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 1 ml olacak şekilde ve bu 1 ml'lik üst tabaka 1000 hücre içerecek şekilde hesaplanarak hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu karışım buzdolabından alınan plakalara ilave edilmiştir. Tekrar buzdolabında 5 dakika bekletildikten sonra üzerlerine bir kuyucuğun toplam hacmi 2 ml olduğu hesaplanarak 0.1 ml içinde test maddelerinin konsantrasyonları uygulanmış ve hücreler 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her gün takip edilerek koloniler 35–40 hücreye ulaştıkça (her hücre için bu süre farklıdır, yaklaşık 10–13 gün) inverted mikroskopta sayılmıştır. Sayımlar üçer kez tekrar edilmiştir (Alley ve Lieber, 1984a; Moody ve ark., 1993; Yeates ve Powis, 1997).

### **Akridin Turuncusu ile Floresan DNA ve RNA Boyaması**

Test maddeleri ile gereken süre muamele edilmiş lameller alınıp, 2 kez 2 dakika PBS ile yıkanmıştır. 5 dakika %70 etanol ile fikse edilen hücreler 5 defa distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra bunlar 2 kez PBS'de bekletilip oda ısısında 15 dakika akridin turuncusu çalışma solüsyonu ile boyanmıştır. Lamellerin kurutma kâğıdı üzerinde dik tutulması suretiyle boya uzaklaştırılmış ve 4 kez PBS ile yıkanmıştır. Lameller bir damla PBS damlatılmış lamaların üzerine kapatılarak ve çevreleri şeffaf turnak cilası ile sabitlenerek floresan mikroskobunda incelenip, fotoğrafları çekilmiştir (Gordon ve ark., 2000; Halaby ve ark., 2004; Rodgers ve ark., 1998).

Bu yöntemde fiksasyondan sonraki tüm işlemler mümkün olduğunca karanlık bir ortamda yapılmıştır<sup>(3)</sup>.

### **İstatiksel Değerlendirmeler**

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS® programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler; hücreler, günler ve gruplar parametrelerine göre değerlendirilmiş ve çok yönlü ANOVA ile post-hoc olarak da Tukey testi uygulanıp anlamlık düzeyleri belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

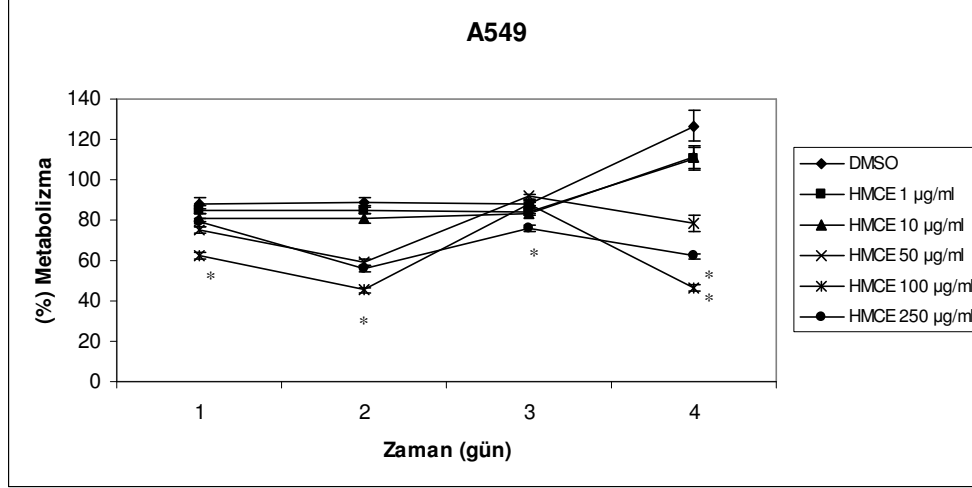
---

<sup>(3)</sup> Yöntemlerde kullanılan solüsyon ve boya formülleri ile ilgili detaylı bilgiler Ek2'de sunulmuştur.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

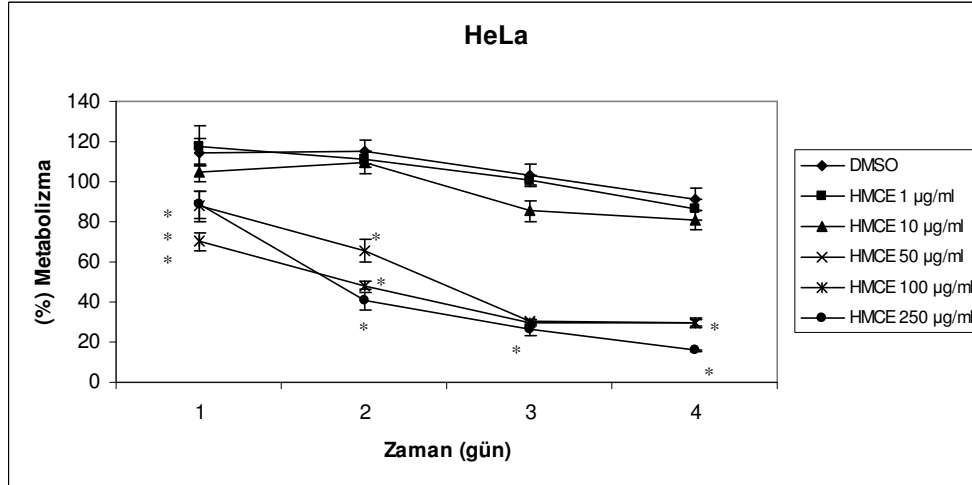
### *Hypericum montbrettii* Çiçeği Ekstresi

#### HMCE'nin MTT sonuçları



Şekil 2. *HMCE'nin* A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

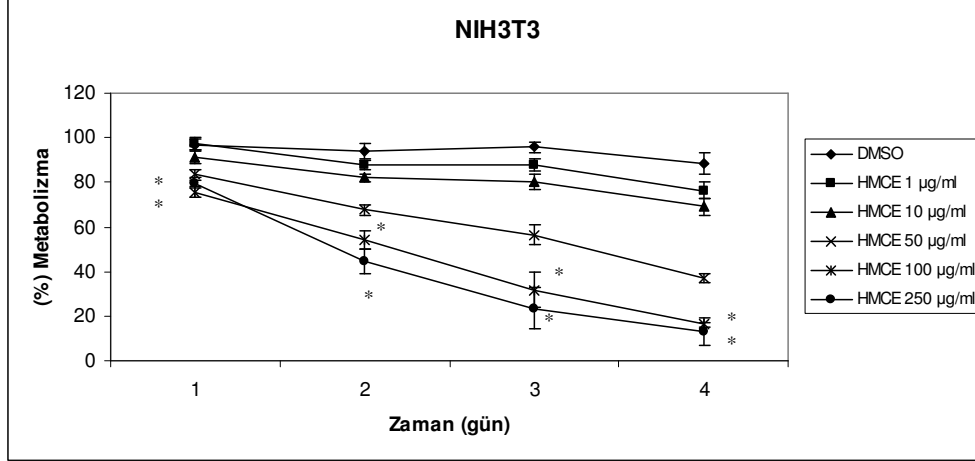
*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozların DMSO ile yakın olduğu, ikinci günde birinci güne oranla 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda sitotoksik etki olduğu, maksimum sonucun 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda (% 45.2683  $\pm$  1.0253) ikinci günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 2).



Şekil 3. *HMCE'nin* HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO ile yakın olduğu, ancak 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda doza bağımlı bir etkinin elde

edildiği ve bu etkinin özellikle ikinci günde başlayıp dördüncü gün de devam eden uzun süreli bir etki olduğu, bu dozlarda üçüncü günde alınan cevapların birbirine çok yakın olduğu gözlenmektedir. 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  *Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanması ile dördüncü günde maksimum cevap olarak hücre popülasyonunun kontrole göre ( $\% 15.7500 \pm 0.6160$ )'a kadar azaldığı görülmüştür (Şekil 3).



Şekil 4. HMCE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO ile yakın olduğu, 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda doza ve zamana bağımlı bir etkinin elde edildiği ve bu etkinin ikinci günden itibaren artarak dördüncü güne kadar sürdüğü, maksimum sonucun 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda ( $\% 12.8938 \pm 5.9829$ ) dördüncü günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 4).

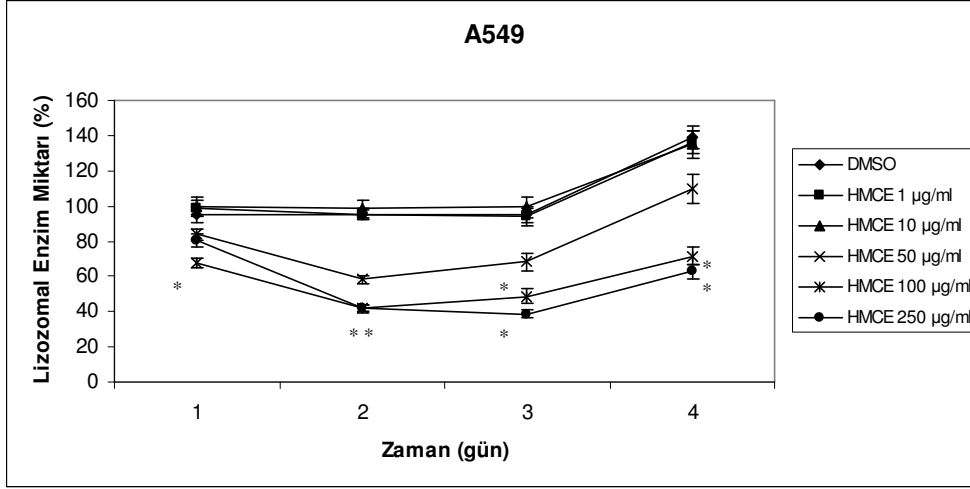
#### HMCE'nin NR sonuçları

*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında ikinci ve üçüncü günde zamana bağlı olarak azalma gözlenirken, dördüncü günde lizozomal enzim miktarında artış gözlenmektedir. 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda DMSO'ya yakın değerler elde edilmiştir. Maksimum etki 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda ( $\% 38.8492 \pm 2.6395$ ) üçüncü günde görülmüştür (Şekil 5).

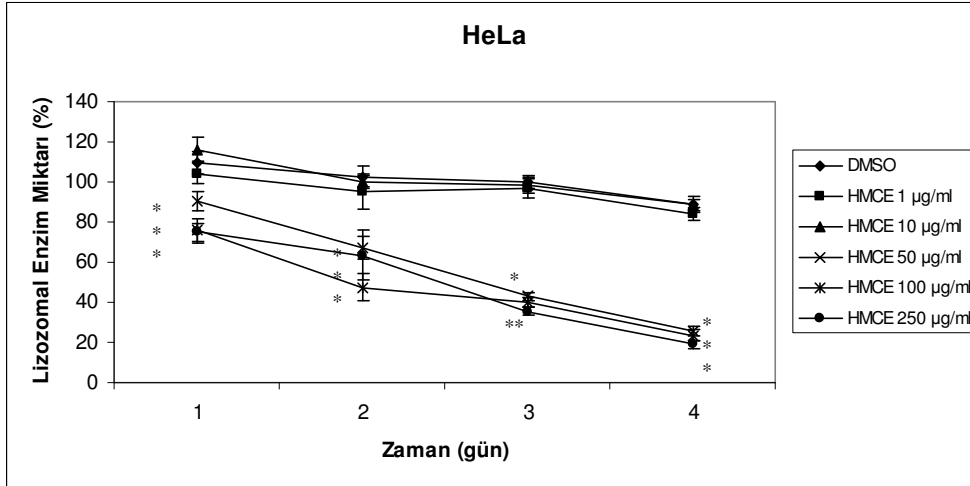
*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda DMSO'ya yakın değerler görülmektedir. 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında doza ve zamana bağımlı olarak azalma olduğu, maksimum azalmanın 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda ( $\% 19.0138 \pm 1.9741$ ) dördüncü günde olduğu gözlenmektedir (Şekil 6).

*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO'ya yakın olduğu, 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında ikinci ve dördüncü günlerde azalma, üçüncü günde ise hafif artış gözlenmektedir.

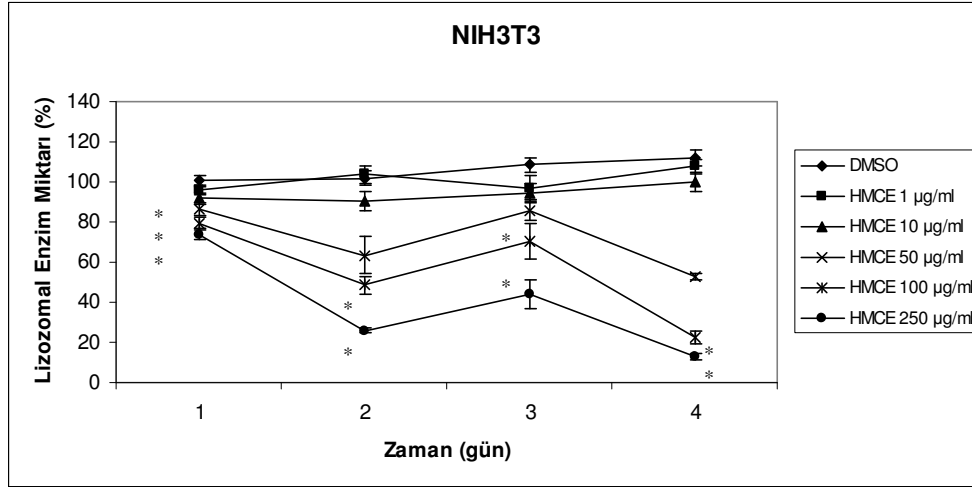
Maksimum azalma 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dozda (% 13.0100  $\pm$  1.4563) dördüncü günde görülmüştür (Şekil 7).



Şekil 5. *HMCE*'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

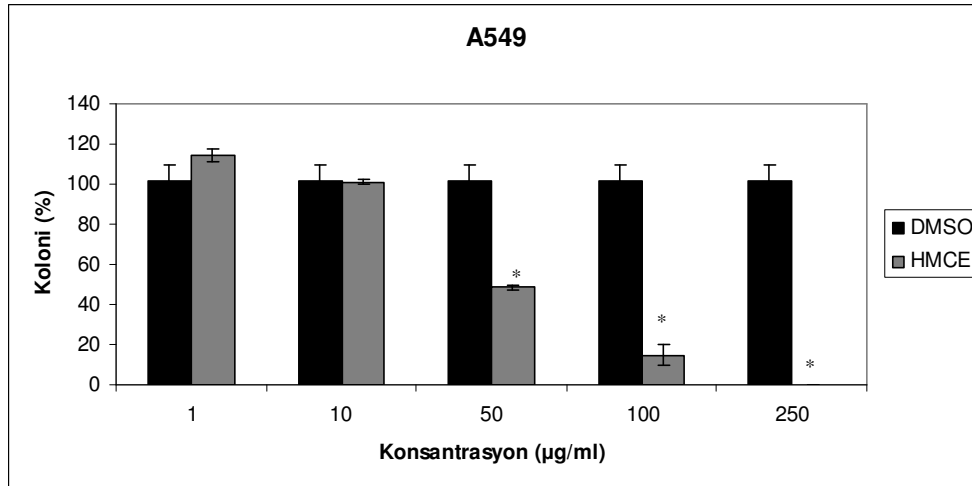


Şekil 6. *HMCE*'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)



Şekil 7. *HMCE*'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

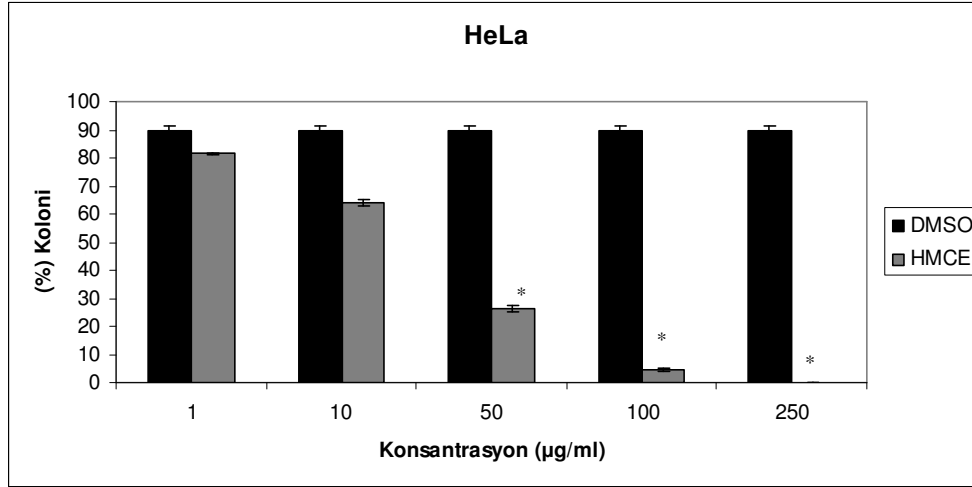
#### *HMCE*'nin koloni formasyonu sonuçları



Şekil 8. *HMCE*'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dozdan itibaren koloni sayılarında azalma olduğu görülmektedir (Şekil 8).





**Şekil 9.** *HMCE'nin* HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

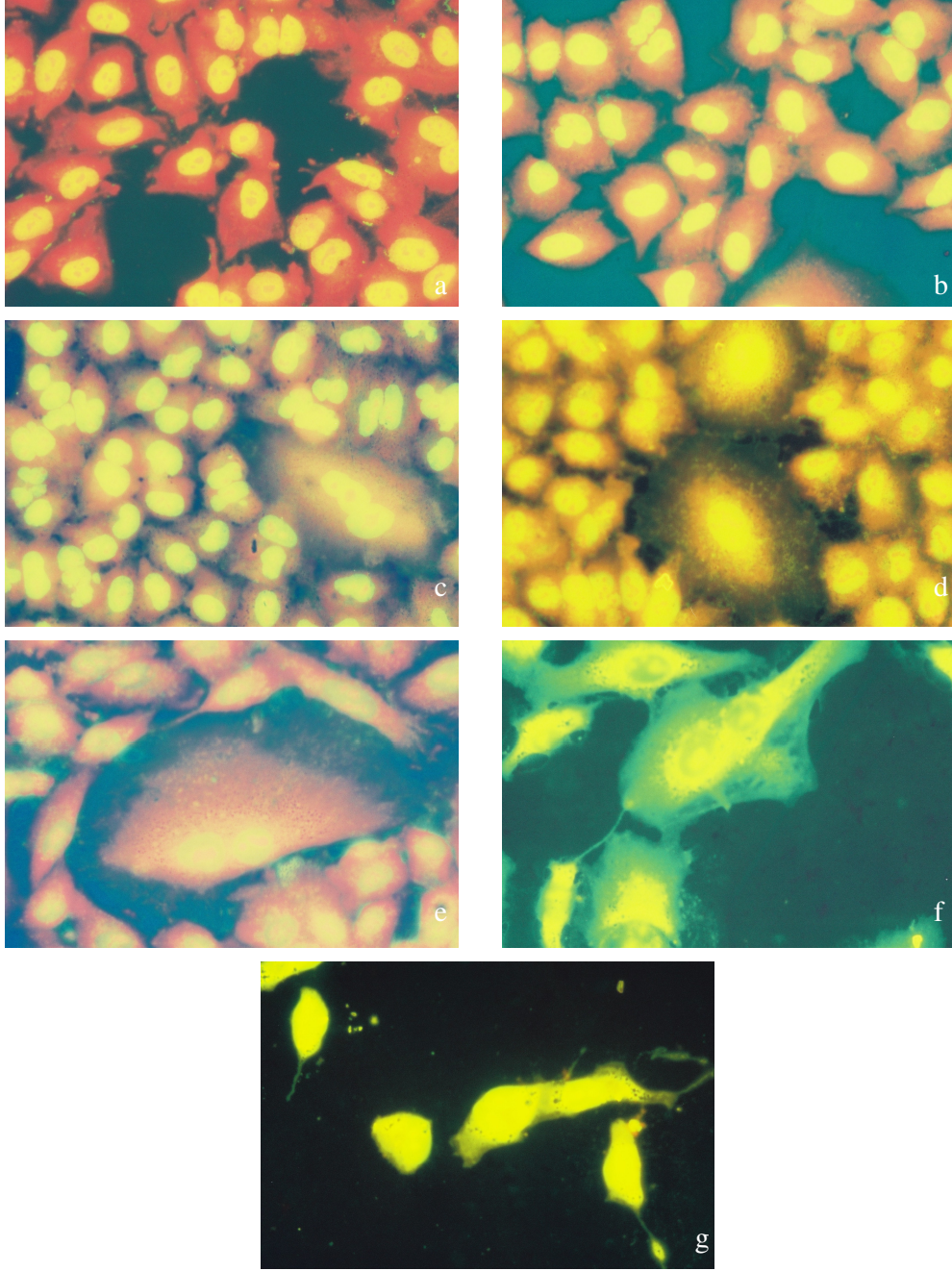
*HMCE'nin* HeLa hücrelerinde 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozdan itibaren koloni oluşumunu engellediği görülmektedir (Şekil 9).

#### ***HMCE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları***

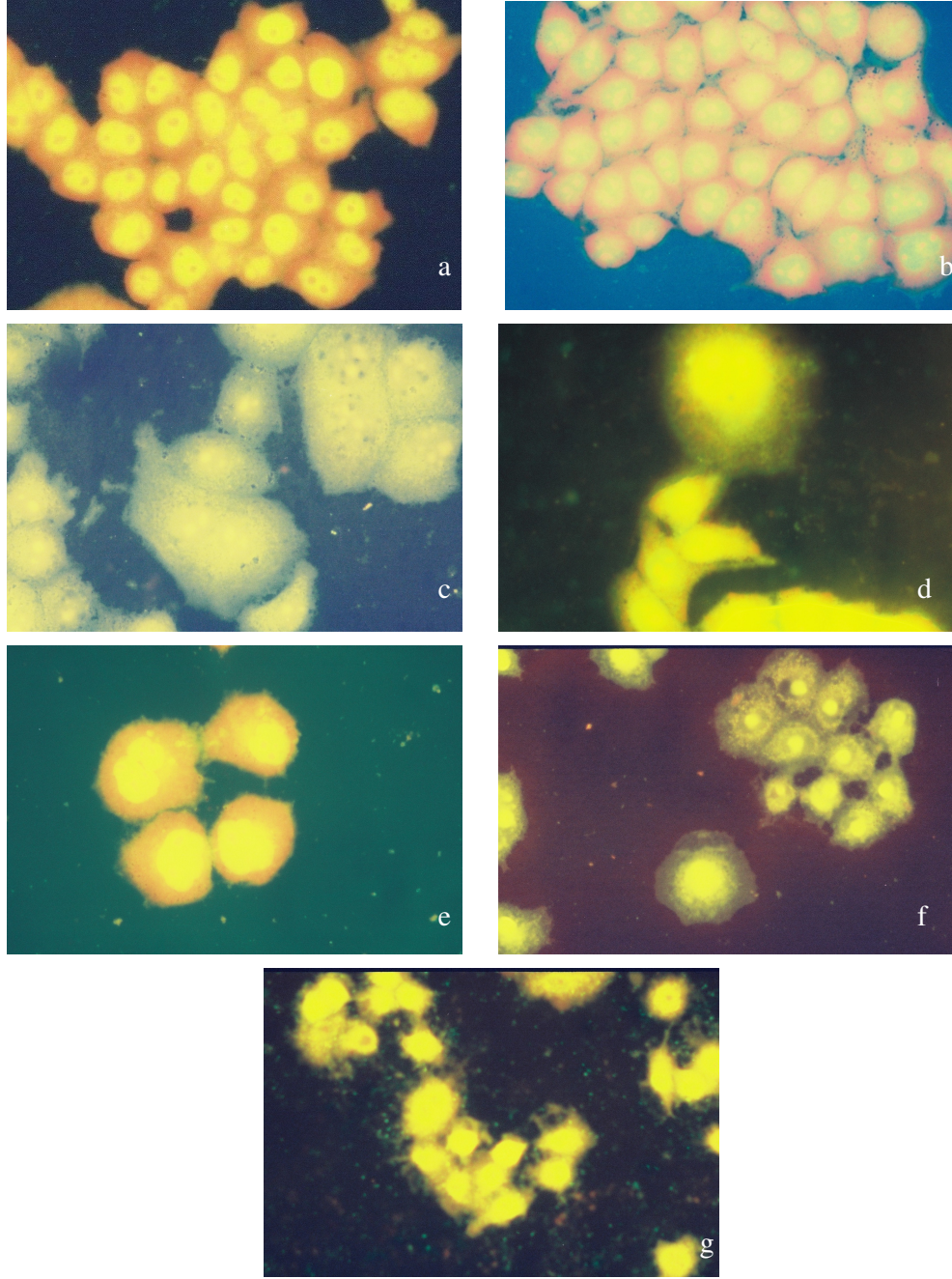
*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, ilk dozdan itibaren hücre şekillerinin bozulduğu, RNA sentezinin azaldığı, mikronükleusların gözlemlendiği, 10 ve 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarında vakuollenme olduğu, hücrelerin normal şekillerini kaybettiği görülmektedir. 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda RNA sentezinin tamamen durduğu, çekirdeğin parçalı bir hal aldığı ve düzgün görünümünü kaybettiği, hücrelerin ölüme gittikleri gözlenmektedir (Şekil 10).

*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, ilk dozdan itibaren kontrol ve DMSO gruplarında gözlenen RNA görüntülerinin ve düzgün kenarlı çekirdek yapısının kaybolduğu, mikronükleusların arttığı, çekirdeğin parçalı bir hal aldığı görülmektedir. 1  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozdan itibaren RNA sentezinin durduğu, hücre sayısının azaldığı ve normal şekillerinin kaybolduğu, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda hücrelerin küçüldüğü ve ölüme gittiği gözlenmektedir (Şekil 11).

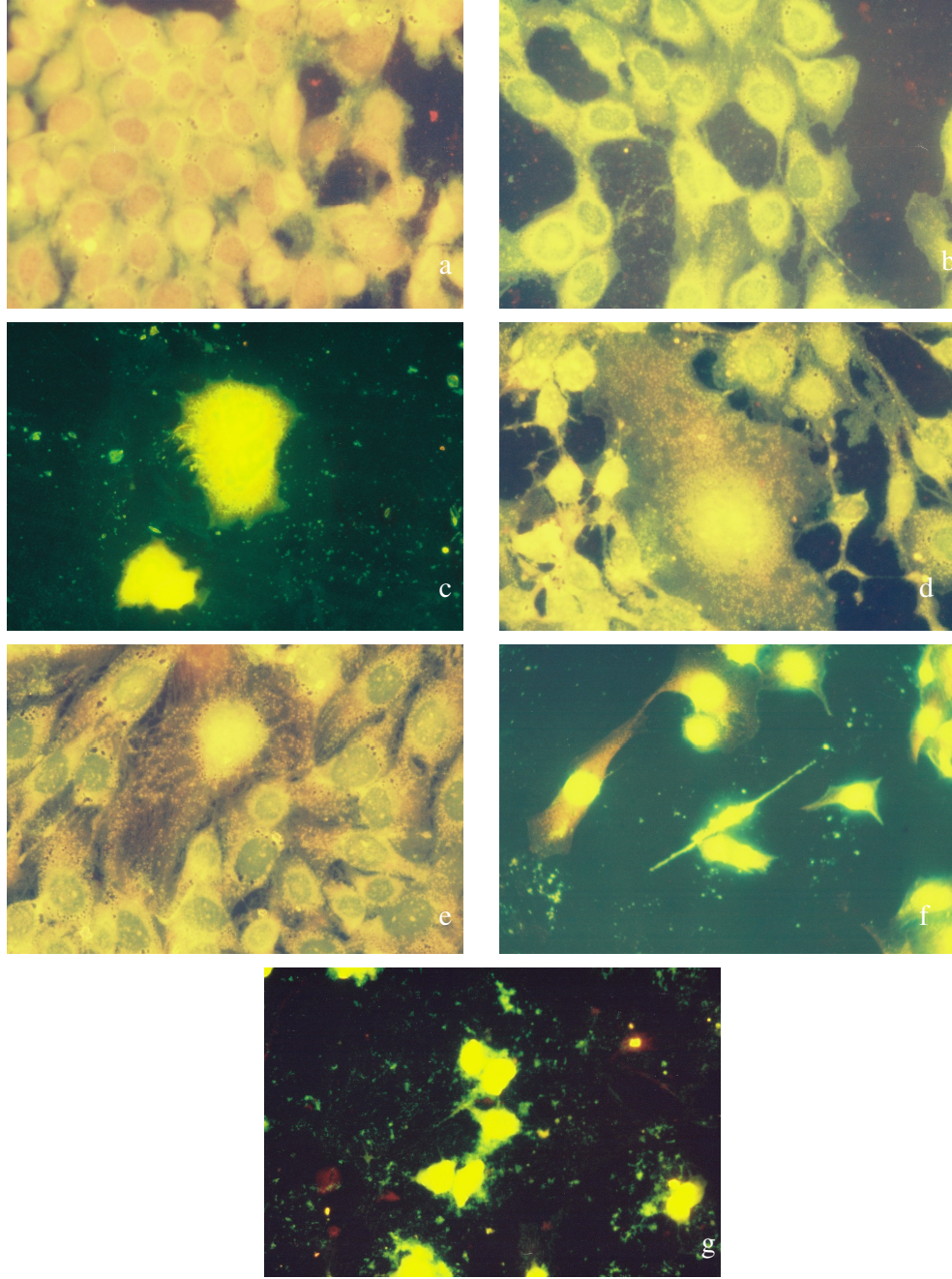
*Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi uygulanan NIH3T3 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, ilk dozdan itibaren hücre şekillerinin bozulduğu, çekirdeklerin kenarlarının bozulduğu ve parçalı bir hal aldığı görülmektedir. 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda hücrelerin fibroblastik özelliklerini yitirdiği, uzantılarının azaldığı, 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda hücrelerin parçalandığı gözlenmektedir (Şekil 12).



Şekil 10. HMCE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm =  $62.5 \mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

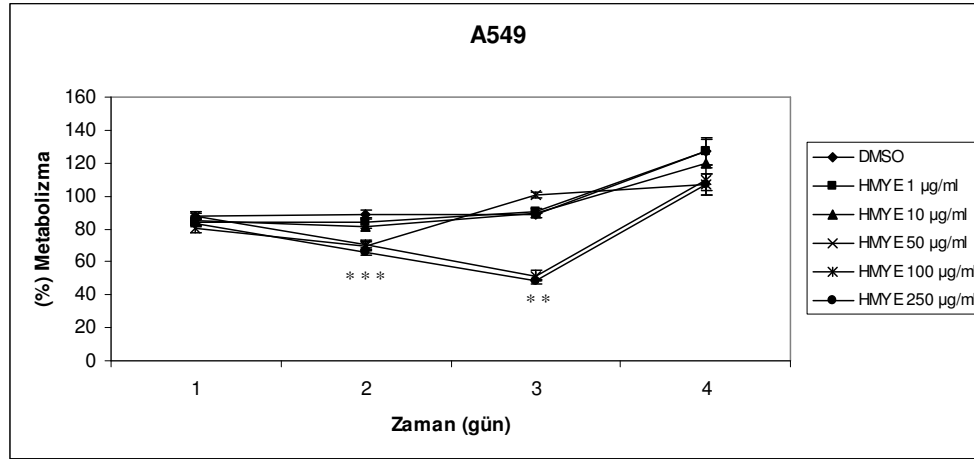


Şekil 11. HMCE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm =  $62.5 \mu\text{m}$ , büyütme 1600X)



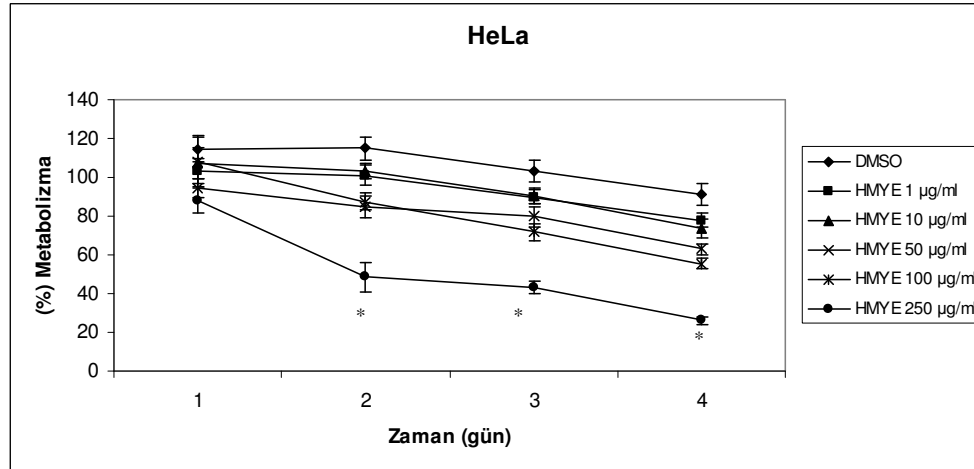
Şekil 12. HMCE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

**Hypericum montbrettii Yaprağı Ekstresi**  
**HMYE'nin MTT sonuçları**



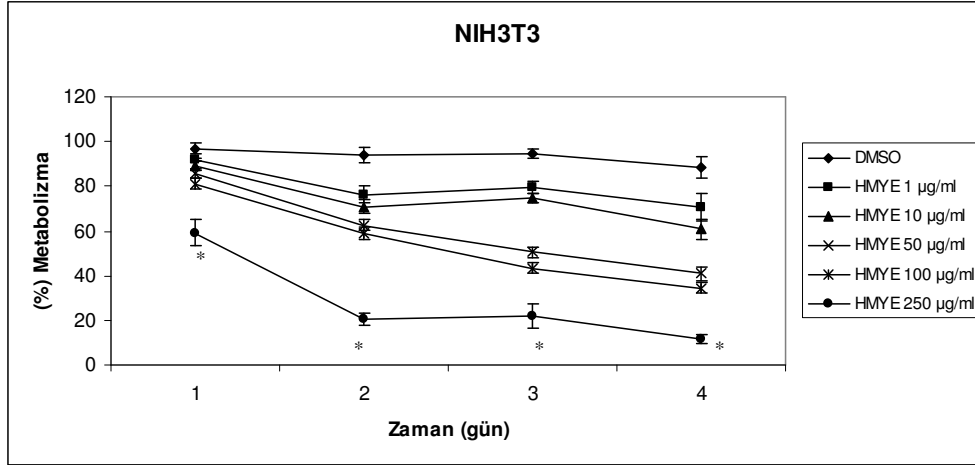
Şekil 13. HMYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde ikinci günde DMSO'ya göre 50, 100 ve 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda sitotoksik etki olduğu, maksimum sonucun 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda (% 51.5308  $\pm$  2.9960) üçüncü günde elde edildiği, dördüncü günde etkinin azaldığı görülmektedir (Şekil 13).



Şekil 14. HMYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

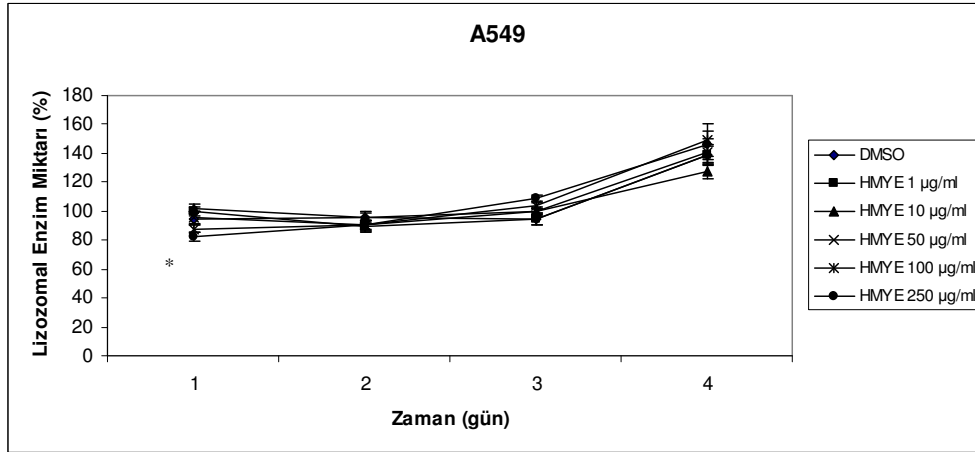
*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde ilk gün başlayıp dördüncü gün de devam eden zamana ve doza bağımlı bir etki gözlemlendiği, maksimum etkinin dördüncü günde ve 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda (% 26.0700  $\pm$  1.8520) olduğu görülmüştür (Şekil 14).



Şekil 15. *HMYE*'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

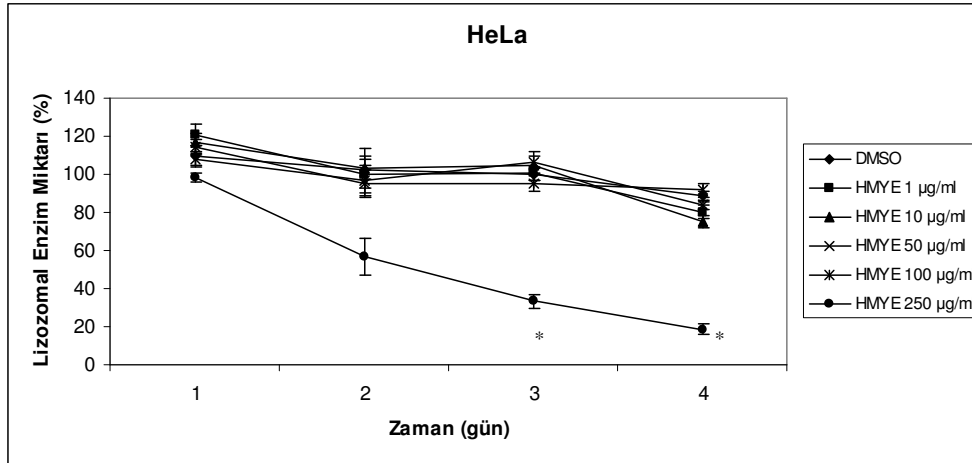
*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1 ile 10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ve 50 ile 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarının etkilerinin birbirine yakın olduğu, tüm dozlarda doza bağımlı bir etkinin elde edildiği, maksimum yanıtın dördüncü gün 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda hücre yuzdelerinin ( $\% 11.7300 \pm 2.3256$ )'ya düştüğü gözlenmektedir (Şekil 15).

#### *HMYE*'nin NR sonuçları



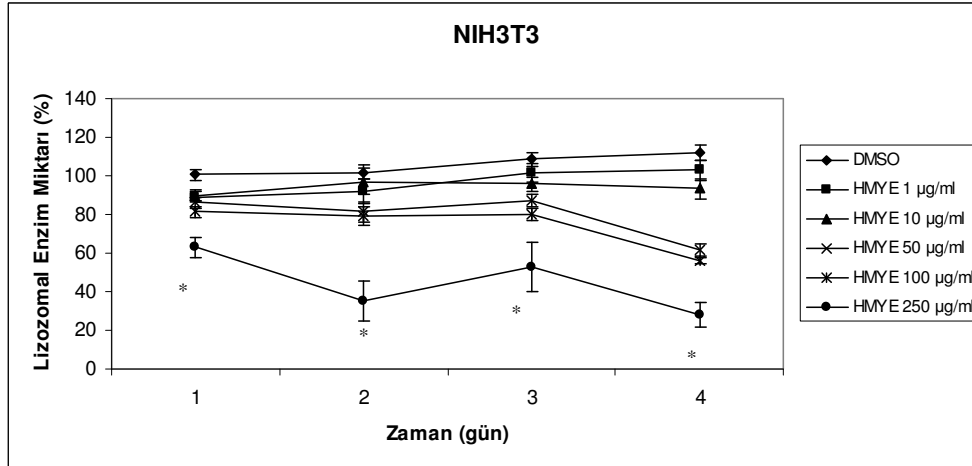
Şekil 16. *HMYE*'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde tüm dozlarda DMSO'ya yakın değerler elde edilmiştir. Lizozomal enzim miktarlarında dördüncü günde hafif artış gözlenmektedir (Şekil 16).



Şekil 17. *HMYE*'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

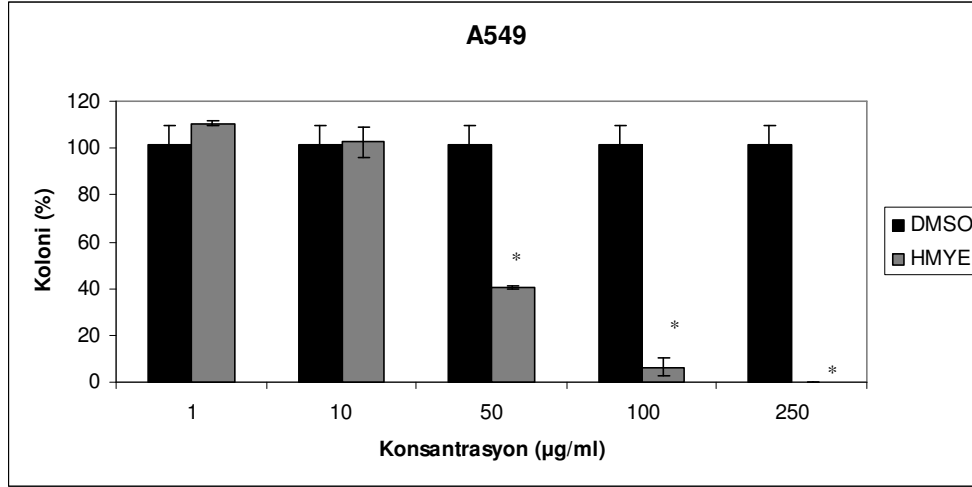
*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1, 10, 50 ve 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda DMSO'ya yakın değerler elde edilmiştir. 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda lizozomal enzim miktarlarında doza ve zamana bağımlı olarak azalma olduğu, maksimum azalmanın 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda (% 18.7838  $\pm$  2.8343) dördüncü günde olduğu gözlenmektedir (Şekil 17).



Şekil 18. *HMYE*'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

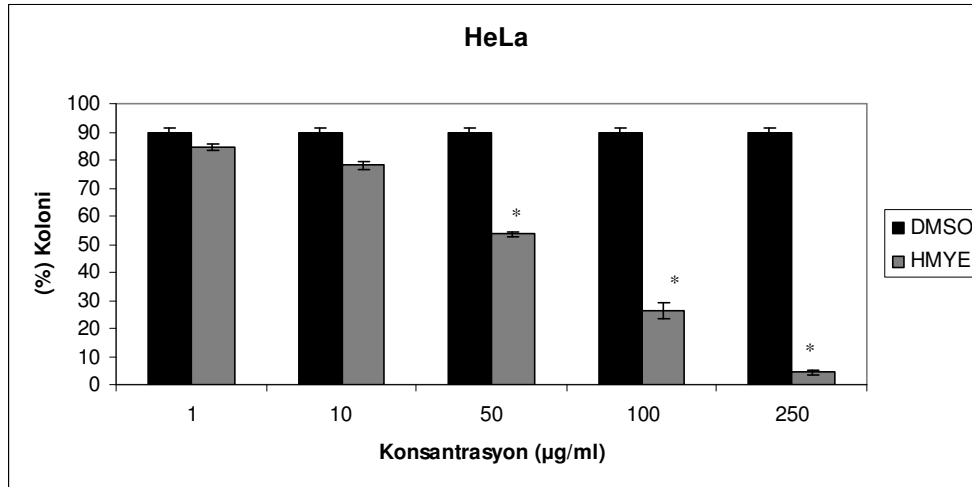
*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO'ya yakın olduğu, 50 ve  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarında lizozomal enzim miktarlarının dördüncü günde azaldığı, 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda birinci günden itibaren toksisite görüldüğü maksimum toksisitenin (% 28.0388  $\pm$  6.4462) dördüncü günde olduğu görülmektedir (Şekil 18).

### *HMYE'nin koloni formasyonu sonuçları*



Şekil 19. *HMYE'nin*A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyonu oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*HMYE'nin* A549 hücrelerinde 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozdan itibaren koloni oluşumunu engellediği görülmektedir (Şekil 8).

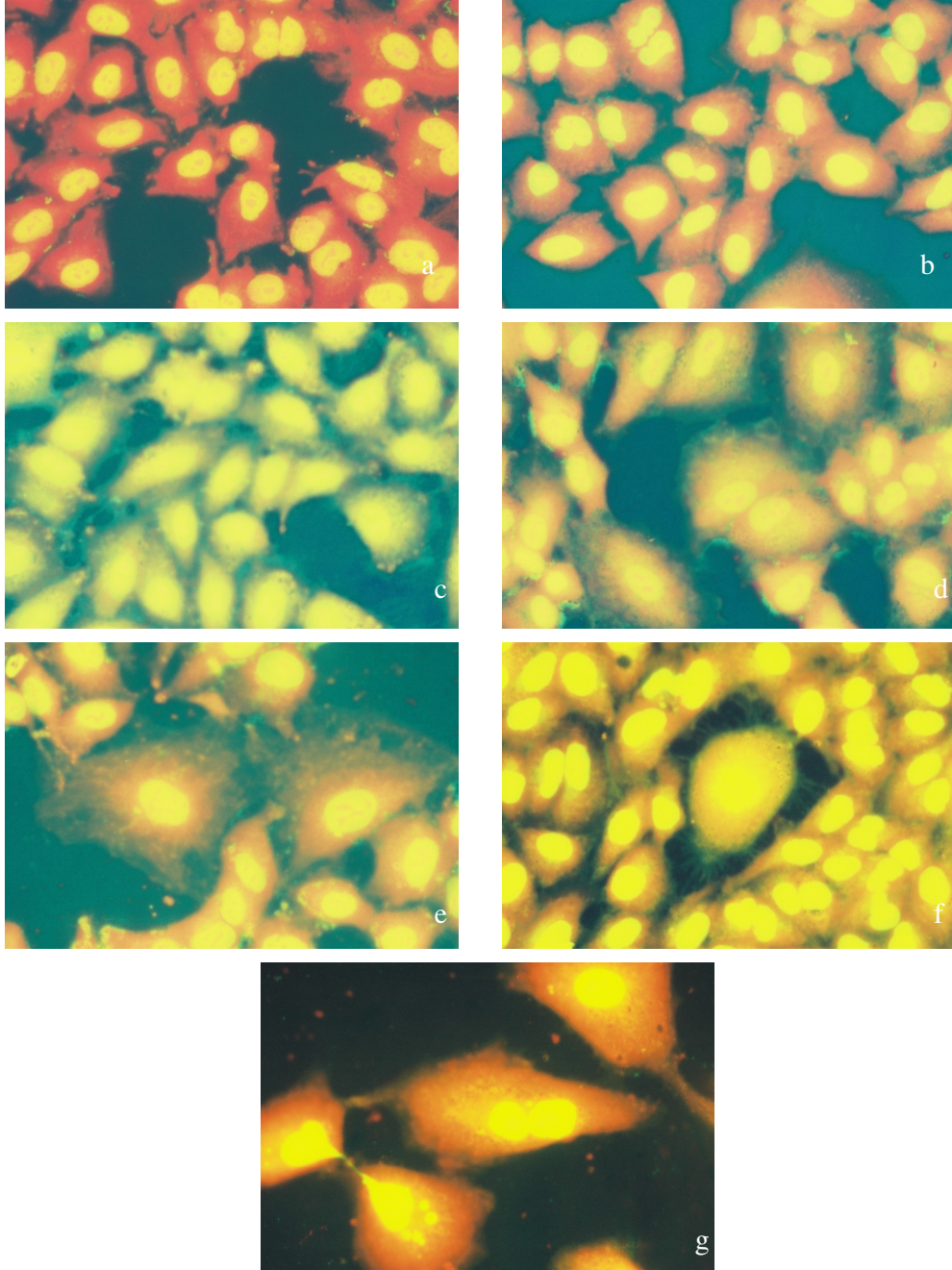


Şekil 20. *HMYE'nin* HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyonu oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinde koloni formasyonu sonucuna göre 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozdan itibaren doza bağımlı olarak koloni sayısında azalma görülmektedir (Şekil 20).

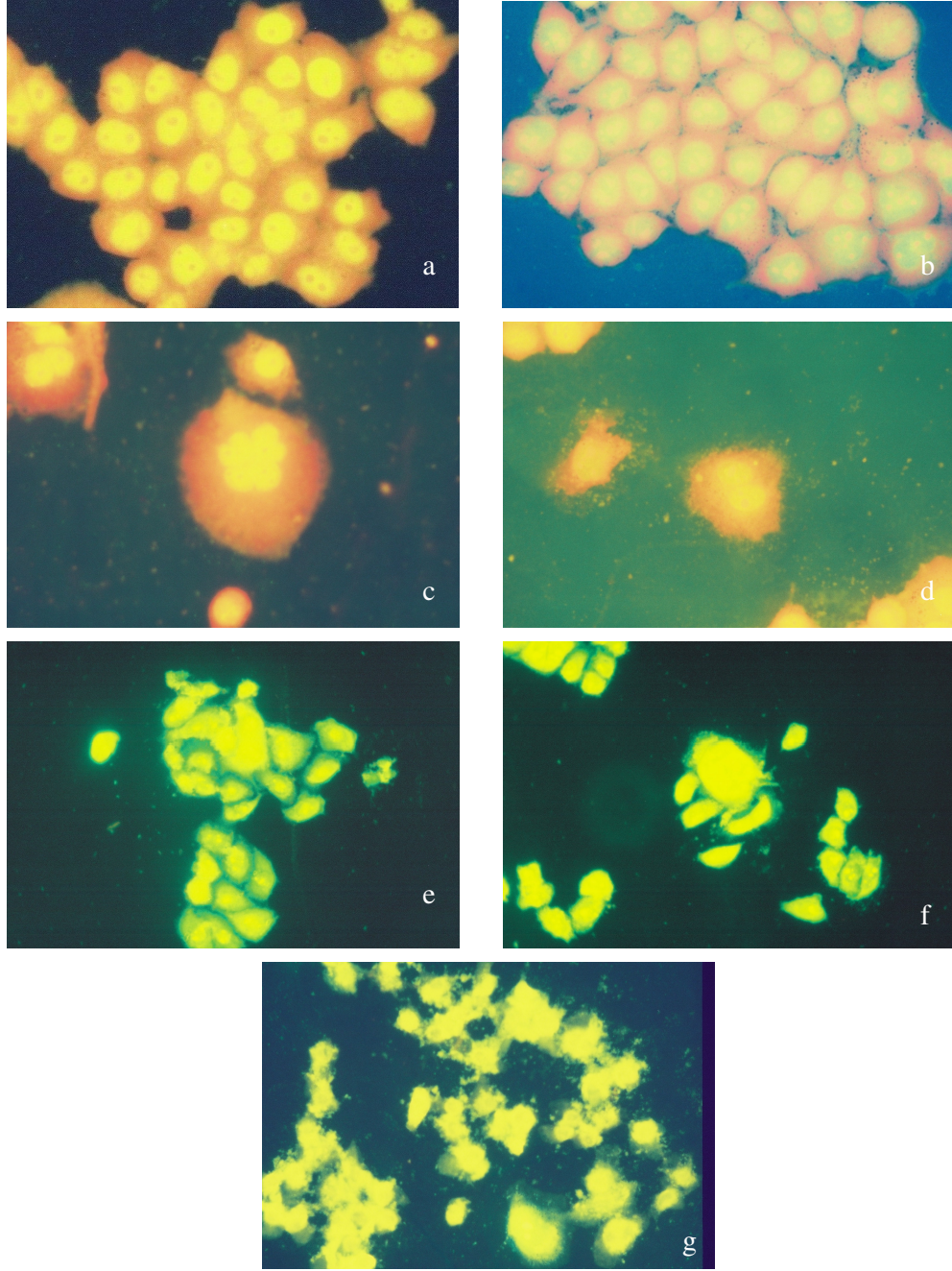


***HMYE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları***



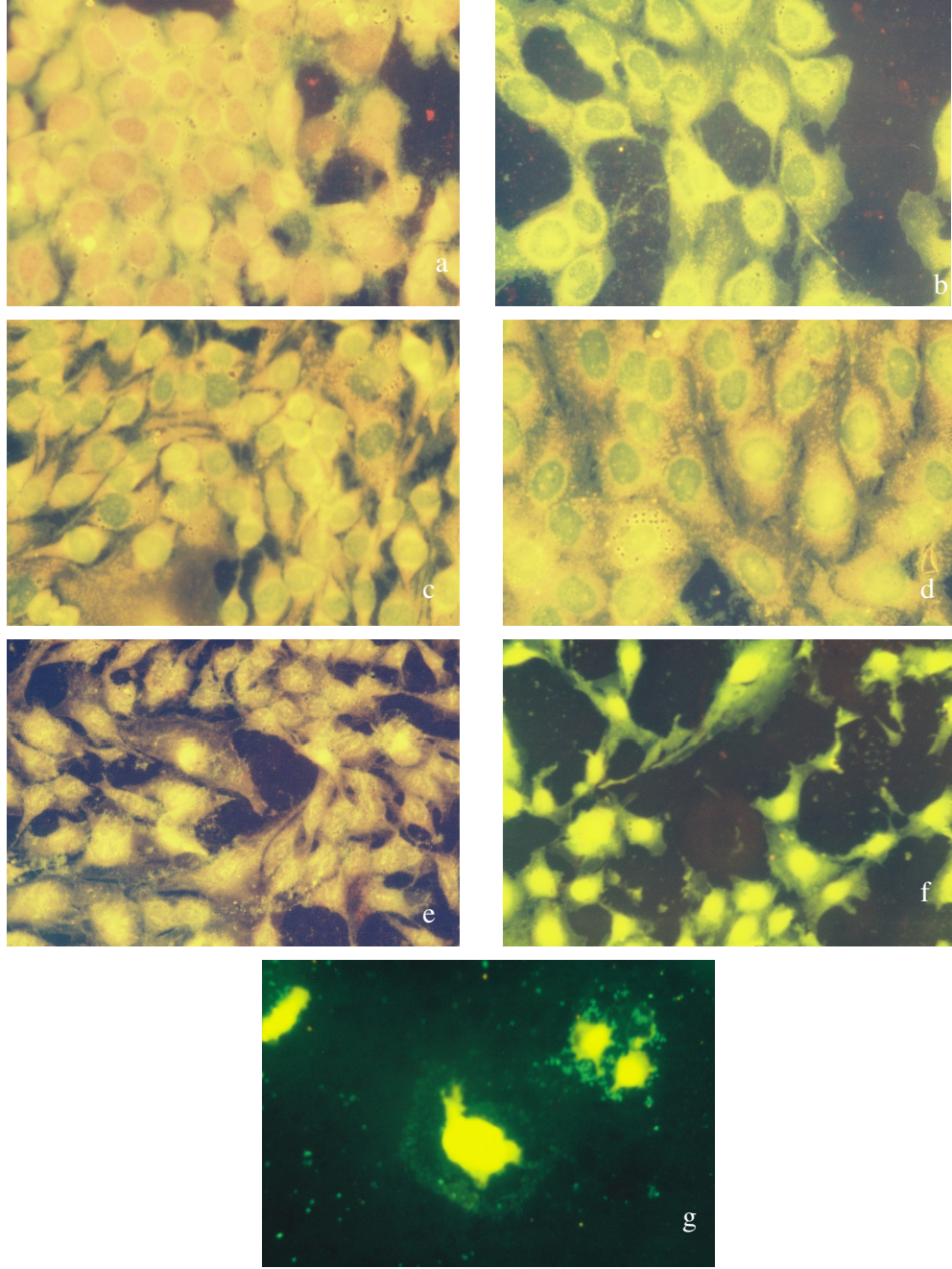
**Şekil 21. HMYE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c: 1 µg.ml<sup>-1</sup>, d: 10 µg.ml<sup>-1</sup>, e: 50 µg.ml<sup>-1</sup>, f: 100 µg.ml<sup>-1</sup>, g: 250 µg.ml<sup>-1</sup> (1cm = 62.5 µm, büyütme 1600X)**

*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, 1 µg.ml<sup>-1</sup> dozdan itibaren hücrelerin normal şekillerini kaybettiği, mikronükleus, vakuollenme ve parçalı çekirdek görüntüleri tespit edilmektedir (Şekil 21).



Şekil 22. HMYE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm =  $62.5 \mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

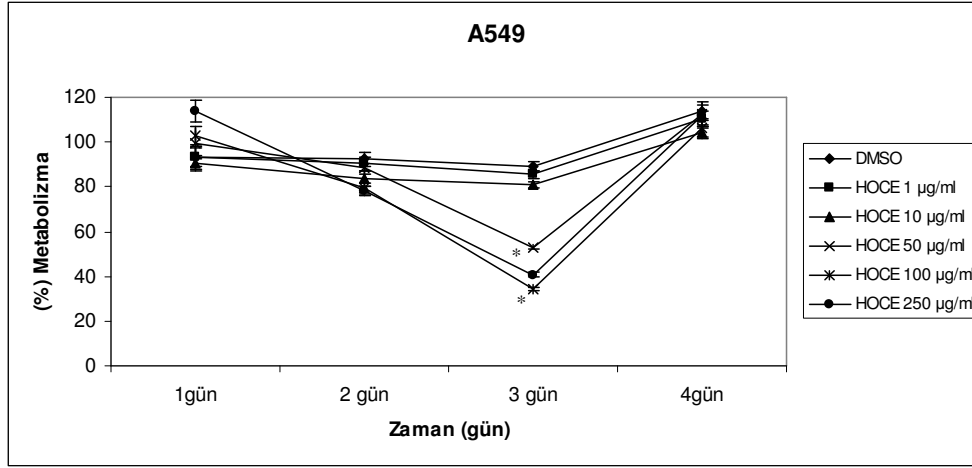
*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda,  $1$  ve  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  hücre şekillerinin bozulduğu ve hücre sayısının azaldığı, mikronükleuslar gözlemlendiği,  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan itibaren RNA sentezinin durduğu, hücrelerin küçüldüğü ve apoptotik bir görünüm aldığı görülmektedir (Şekil 22).



Şekil 23. HMYE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

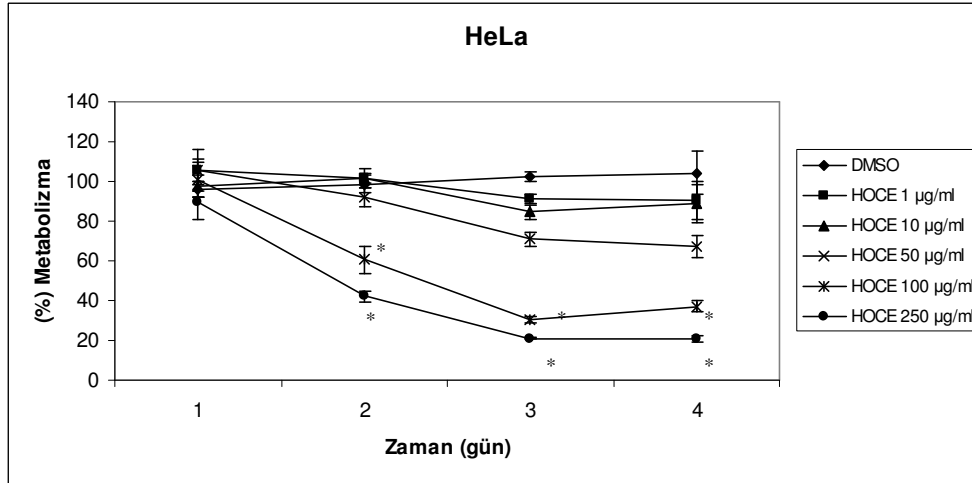
*Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan NIH3T3 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, 1 ve  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda hücrelerde vakuollenme oluştuğu,  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda hücrelerin küçüldüğü, sayılarının azaldığı ve normal şekillerinin kaybolduğu,  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda tamamen parçalandıkları görülmektedir (Şekil 23).

***Hypericum origanifolium* Çiçeği Ekstresi**  
**HOCE'nin MTT sonuçları**



Şekil 24. HOCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde ilk gün hücrelerdeki metabolizmanın tüm dozlarda hafif arttığı, 50, 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda üçüncü günde sitotoksik etki gözlemlendiği, maksimum sitotoksik etkinin 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda (% 34.3650  $\pm$  0.4879) üçüncü günde elde edildiği, dördüncü günde bu etkinin tüm dozlarda ortadan kalktığı görülmektedir (Şekil 24).

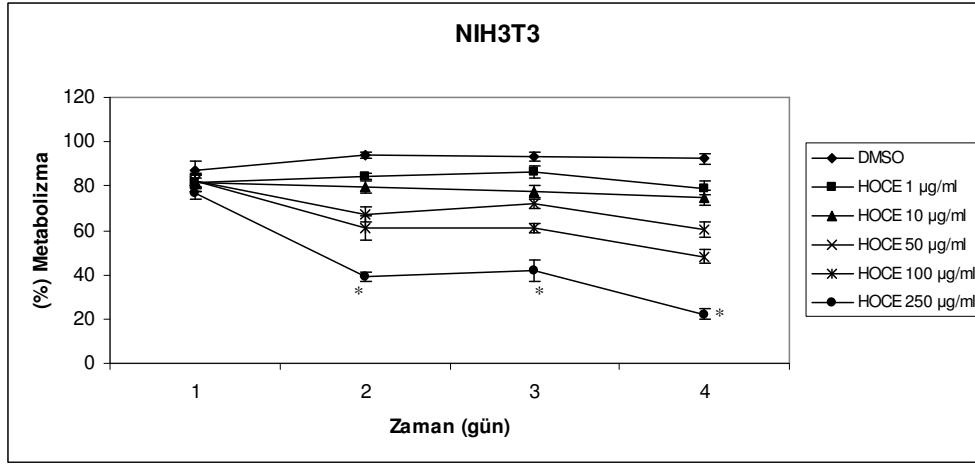


Şekil 25. HOCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO ile yakın olduğu, ancak 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarında doza ve zamana bağımlı bir etkinin elde edildiği ve bu etkinin ikinci günde başlayıp dördüncü gün

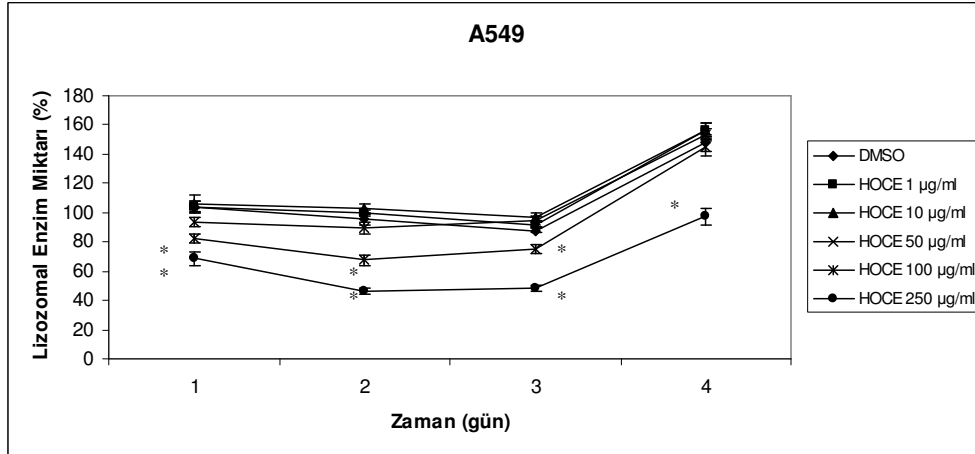
de devam eden uzun süreli bir etki olduğu gözlenmektedir. 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  *Hypericum organifolium* çiçeği ekstresi uygulanması ile dördüncü günde maksimum cevap olarak hücre popülasyonunun kontrole göre ( $\% 20.7250 \pm 1.6330$ )'a kadar azaldığı görülmüştür (Şekil 25).

*Hypericum organifolium* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO ile yakın olduğu, 50 ve 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarının etkilerinin birbirine yakın olduğu, 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda doza bağımlı bir sitotoksik etkinin elde edildiği ve bu etkinin ikinci günden itibaren artarak dördüncü güne kadar sürdüğü, maksimum sonucun 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ( $\% 22.0875 \pm 2.3591$ ) dördüncü günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 26).



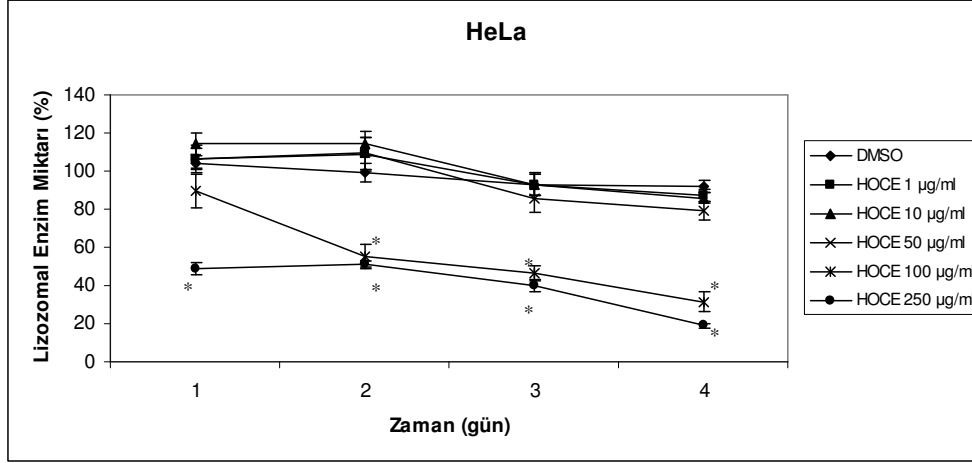
Şekil 26. HOCE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

#### HOCE'nin NR sonuçları



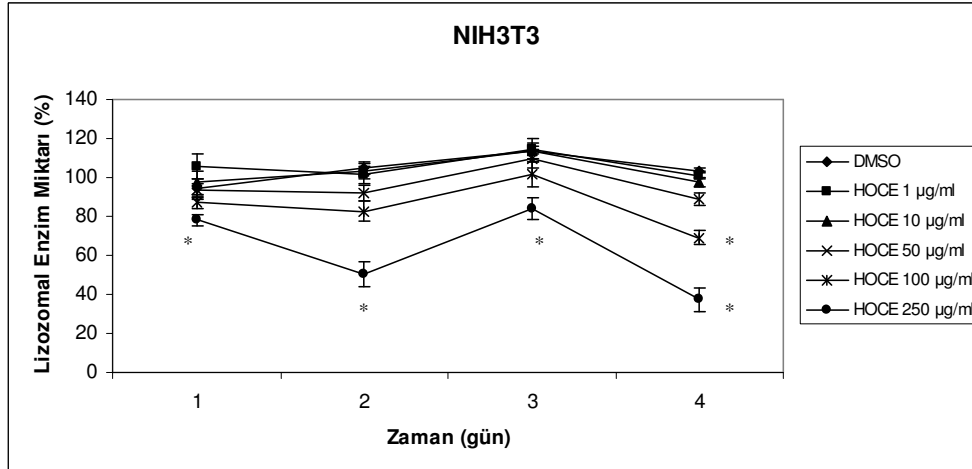
Şekil 27. HOCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde 1, 10 ve 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda DMSO'ya yakın değerler elde edilmiştir. 100 ve 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında ikinci ve üçüncü günde zamana bağlı olarak azalma gözlenirken, dördüncü günde lizozomal enzim miktarında artış gözlenmektedir. Maksimum etki 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda (% 46.1385  $\pm$  2.3300) ikinci günde görülmüştür (Şekil 27).



Şekil 28. *HOCE*'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

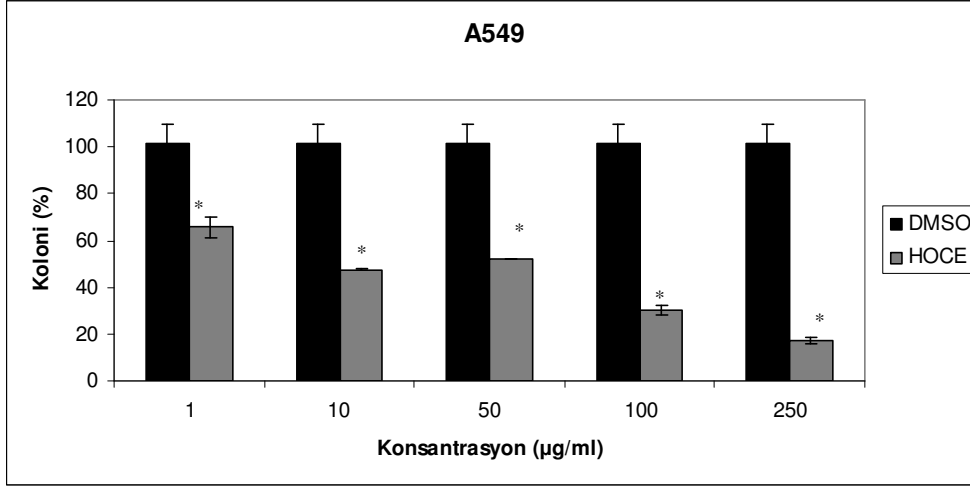
*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1, 10ve 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda DMSO ile yakın değerler görülmektedir. 100 ve 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında doza ve zamana bağımlı olarak azalma olduğu, maksimum inhibitör yanıtın 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda (% 18.8200  $\pm$  1.4226) dördüncü günde olduğu gözlenmektedir (Şekil 28).



Şekil 29. *HOCE*'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

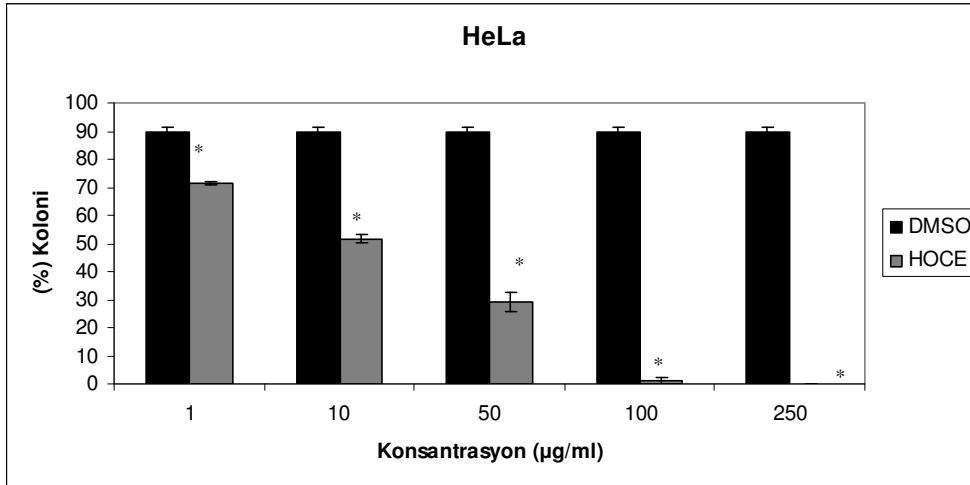
*Hypericum organifolium* çiçeği ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1, 10 ve 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO ile yakın olduğu, 100 ve 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarının ikinci ve dördüncü günde azaldığı, üçüncü günde arttığı, maksimum toksisitenin 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda (% 37.2838  $\pm$  5.6924) dördüncü günde olduğu görülmektedir (Şekil 29).

#### **HOCE'nin koloni formasyonu sonuçları**



Şekil 30. HOCE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

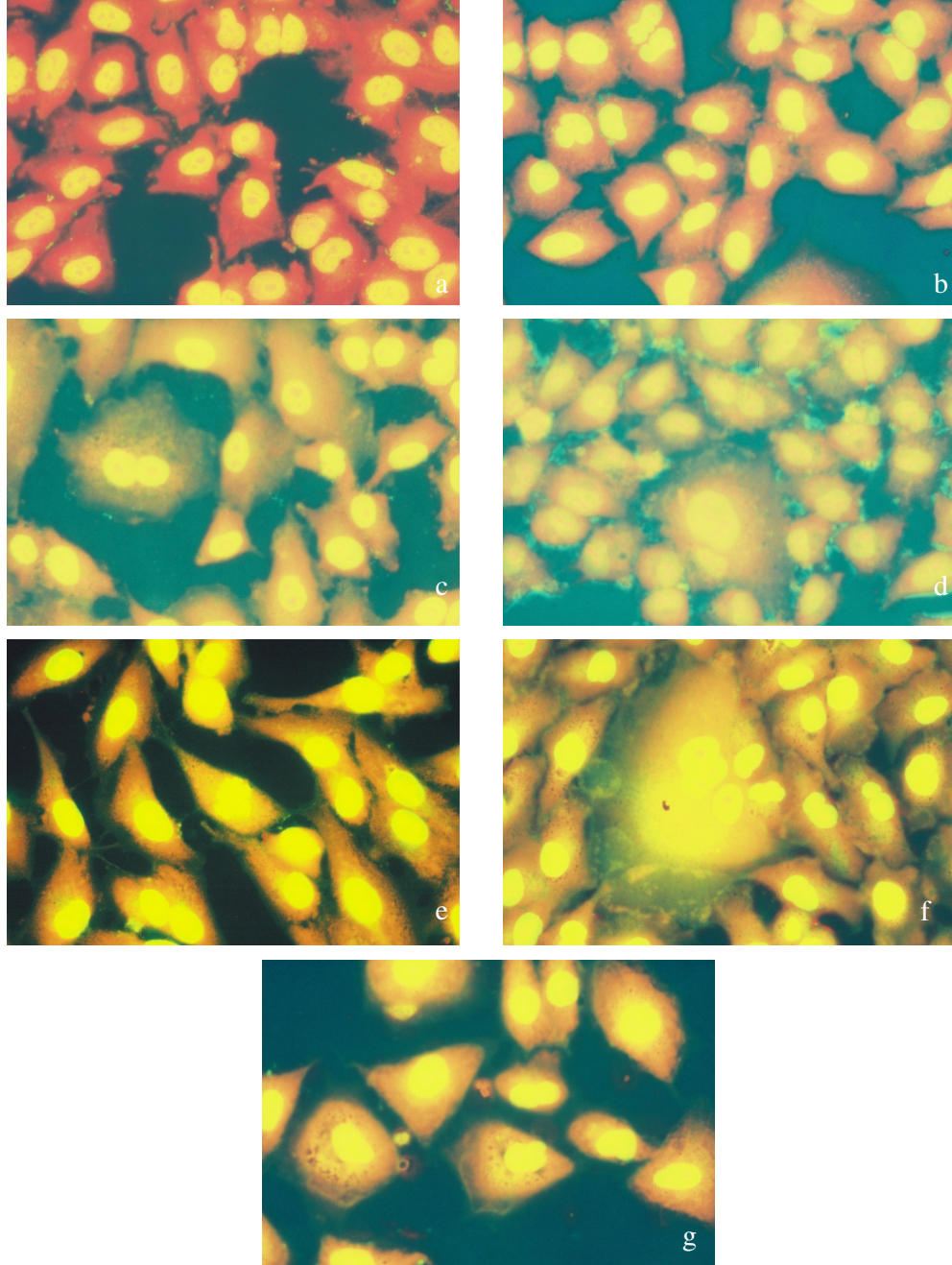
HOCE'nin A549 hücrelerinde koloni formasyonu sonucuna göre ilk dozdan itibaren doza bağımlı olarak koloni sayısında azalma olduğu görülmektedir (Şekil 30).



Şekil 31. HOCE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*HOCE'nin* HeLa hücrelerinde koloni formasyonu sonucuna göre ilk dozdan itibaren doza bağımlı olarak koloni sayısında azalma olduğu görülmektedir (Şekil 31).

***HOCE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları***

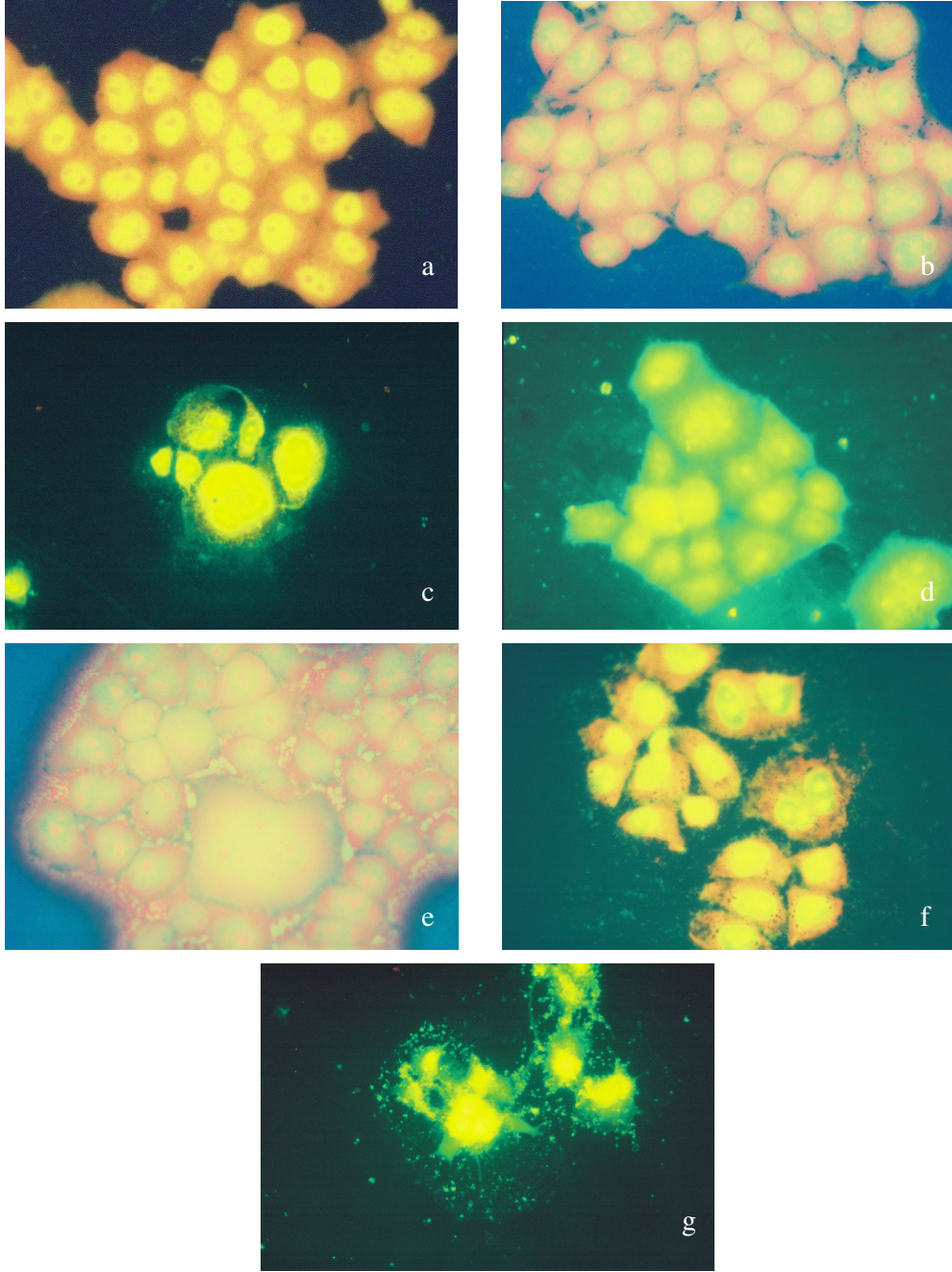


Şekil 32. HOCE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda,  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan itibaren hücre



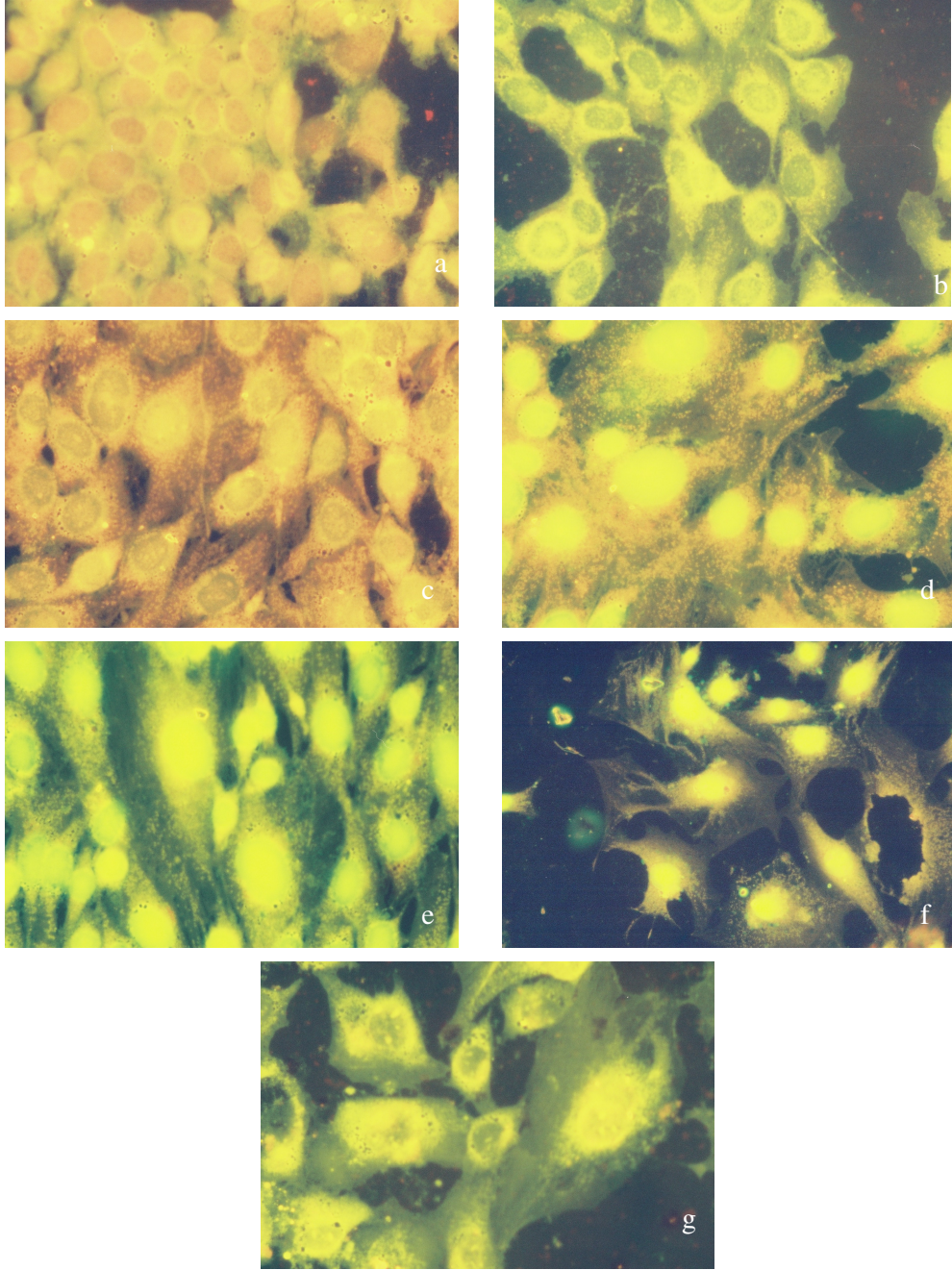
şekillerinin bozulduğu, mikronükleus ve vakuollerin olduğu görülmektedir (Şekil 32).



Şekil 33. HOCE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, 1 ve  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda hücrelerde RNA sentezinin durduğu,  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda hücrelerin küçüldüğü, vakuollenme

olduğu, sayılarının azaldığı ve normal şekillerinin kaybolduğu, 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda tamamen parçalandıkları görülmektedir (Şekil 33).



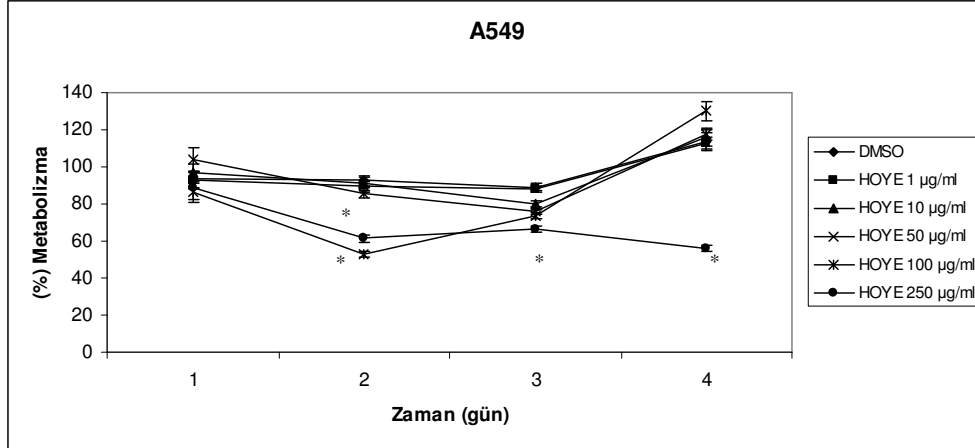
Şekil 34. HOCE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c: 1  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , d: 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , e: 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , f: 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , g: 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyüme 1600X)

*Hypericum origanifolium* çiçeği ekstresi uygulanan NIH3T3 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, 50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan itibaren hücrelerde

RNA sentezinin durduğu, hücre şekillerinin bozulduğu, sayılarının azaldığı, mikronükleus ve vakuollenme görülmektedir (Şekil 34).

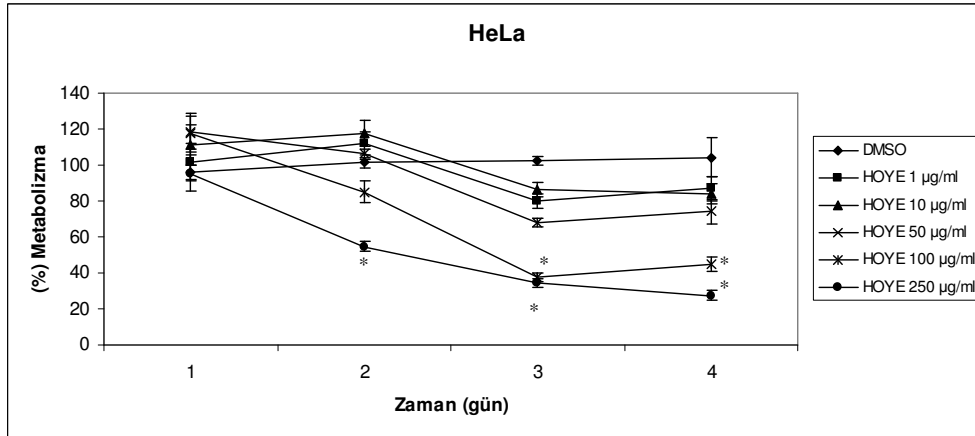
### *Hypericum origanifolium* Yaprağı Ekstresi

#### *HOYE'nin MTT sonuçları*



Şekil 35. *HOYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri* (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

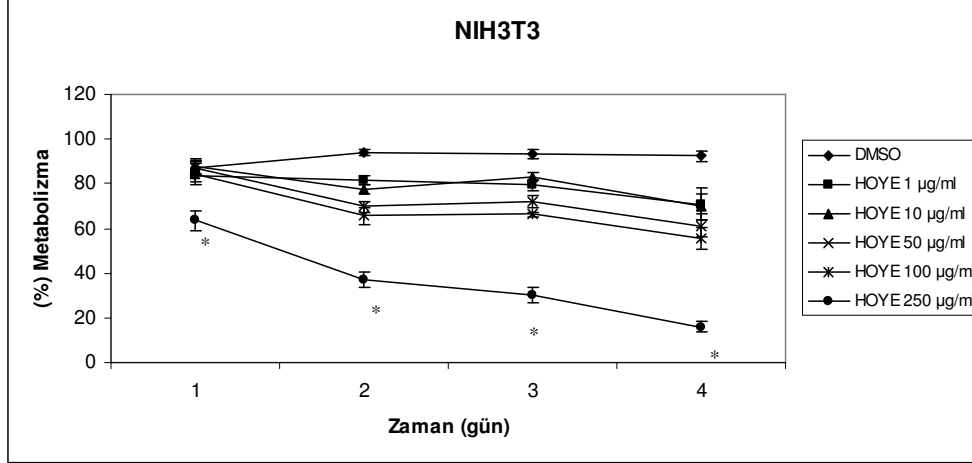
*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde antiproliferatif etkinin 100 ve 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda ikinci günden itibaren görüldüğü, maksimum sitotoksik etkinin 250  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda (% 55.9588  $\pm$  1.4989) dördüncü günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 35).



Şekil 36. *HOYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri* (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1, 10, 50 ve 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda birinci gün hücre metabolizmasında hafif bir artış olduğu, bu etkinin 1, 10 ve 50  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda üçüncü günden itibaren 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda ikinci günden itibaren azaldığı

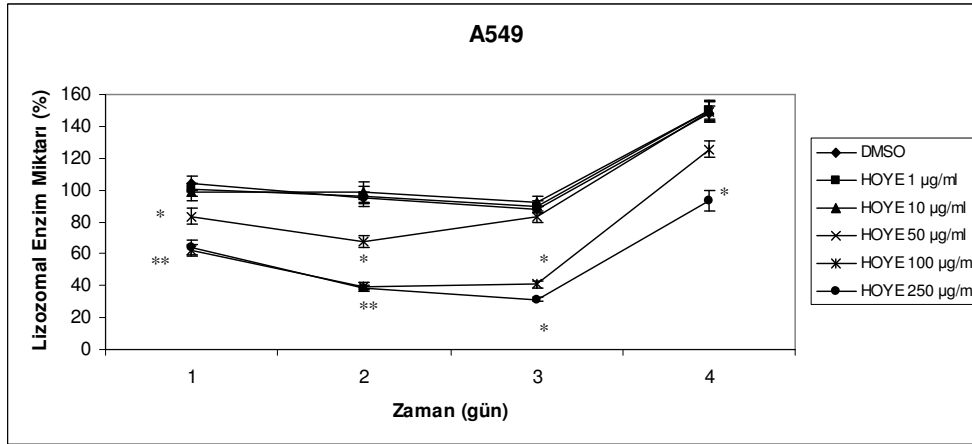
gözlenmektedir. 100 ve 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda ikinci günden itibaren dördüncü güne kadar devam eden doza bağımlı bir antiproliferatif etki elde edildiği, üçüncü günde alınan cevabın birbirine çok yakın olduğu ve maksimum sonucun dördüncü günde 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ( $\% 27.3863 \pm 2.7658$ ) olduğu görülmektedir (Şekil 36).



Şekil 37. HOYE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1, 10, 50 ve 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlar ile elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu, 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda doza bağımlı bir sitotoksik etkinin elde edildiği ve bu etkinin birinci günden itibaren artarak dördüncü güne kadar sürdüğü, maksimum sonucun 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ( $\% 16.0125 \pm 2.3256$ ) dördüncü günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 37).

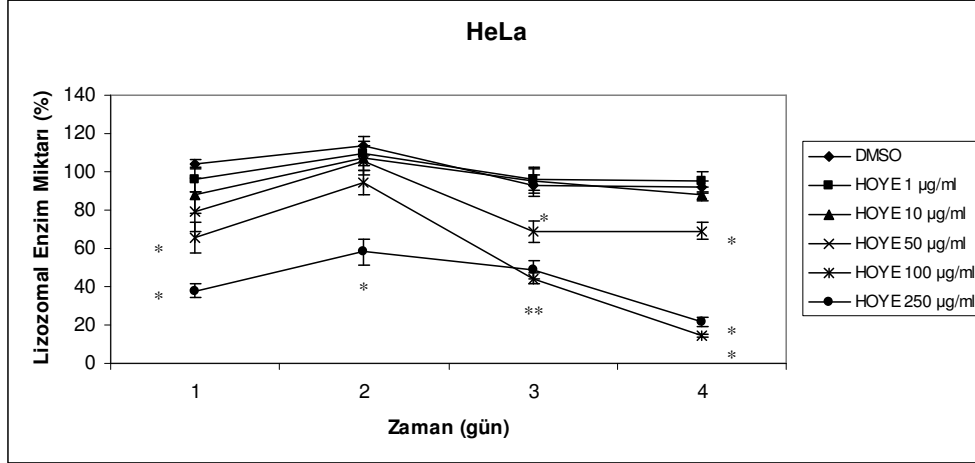
#### HOYE'nin NR sonuçları



Şekil 38. HOYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

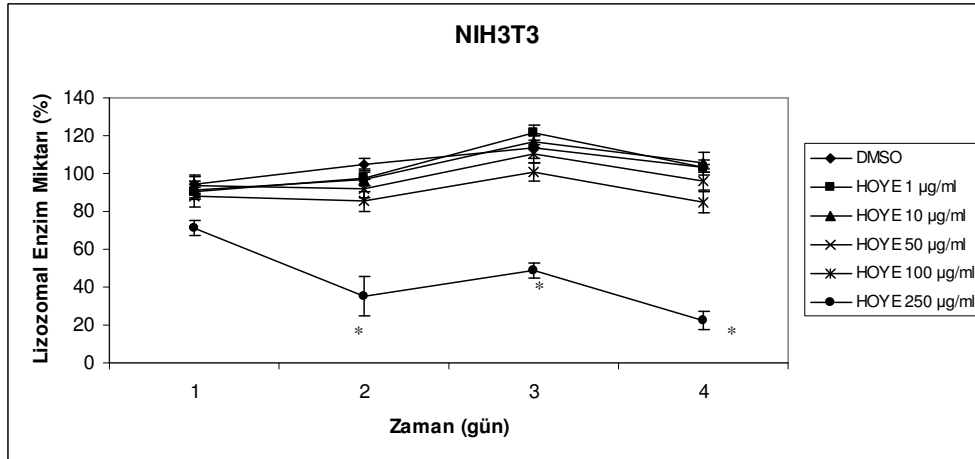
*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde 1 ve 10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda DMSO'ya yakın

değerler elde edilmiştir.  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda lizozomal enzim miktarlarında ikinci günde azalma olduğu, dördüncü günde ise artış olduğu görülmektedir.  $100$  ve  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında birinci ve ikinci günde azalma olduğu, bu etkinin dördüncü günde ortadan kalktığı, lizozomal enzim miktarlarındaki maksimum azalmanın üçüncü günde  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ( $\% 31.3983 \pm 1.1825$ ) olduğu görülmektedir (Şekil 38).



Şekil 39. HOYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

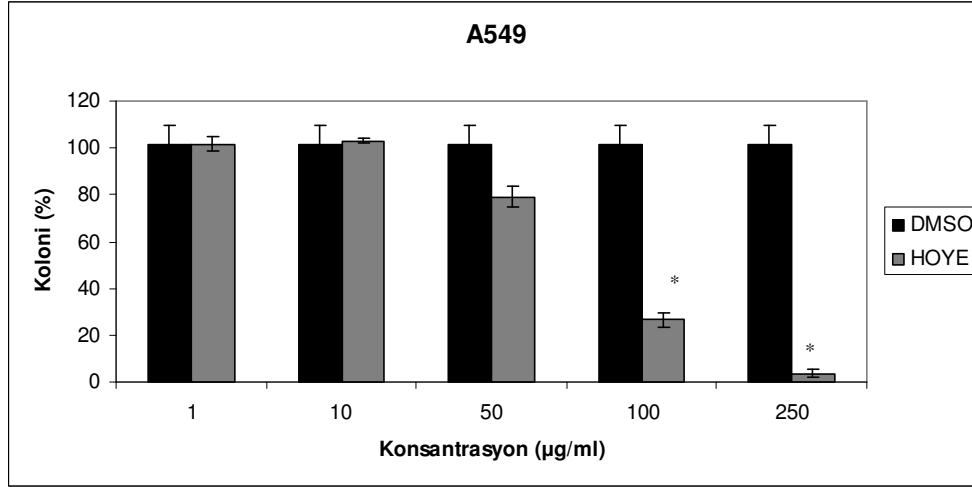
*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda üçüncü ve dördüncü günde lizozomal enzim miktarlarında azalma olduğu görülmektedir.  $100$  ve  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda ise lizozomal enzim miktarlarında ikinci günde artma olduğu, diğer günlerde azalma olduğu görülmektedir. Maksimum azalmanın  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ( $\% 14.2838 \pm 0.8727$ ) dördüncü günde olduğu gözlenmektedir (Şekil 39).



Şekil 40. HOYE'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

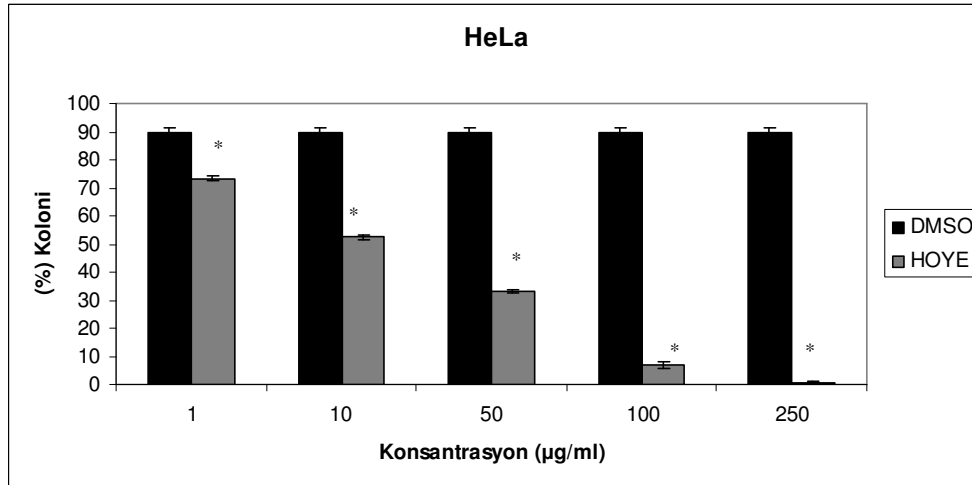
*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 1, 10, 50 ve 100  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozların etkilerinin DMSO'ya yakın olduğu görülmektedir. 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ikinci günden itibaren toksisite görüldüğü maksimum toksisitenin (% 22.5313  $\pm$  4.7071) dördüncü günde olduğu görülmektedir (Şekil 40).

#### **HOYE'nin koloni formasyonu sonuçları**



**Şekil 41.** HOYE'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

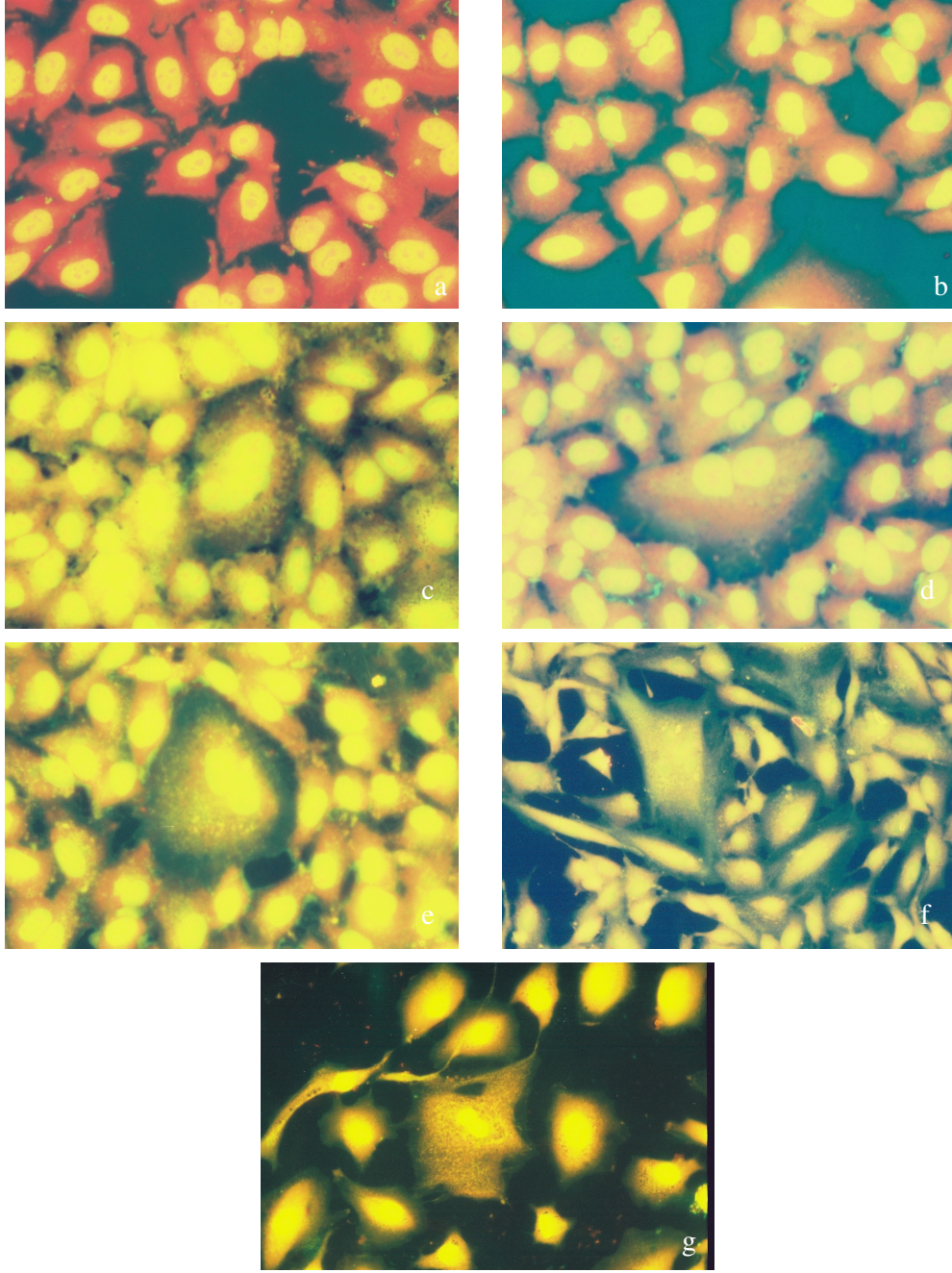
HOYE'nin A549 hücrelerinde 100 ve 250  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda koloni sayısında azalma görülmektedir (Şekil 41).



**Şekil 42.** HOYE'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyon oluşumu açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p<0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

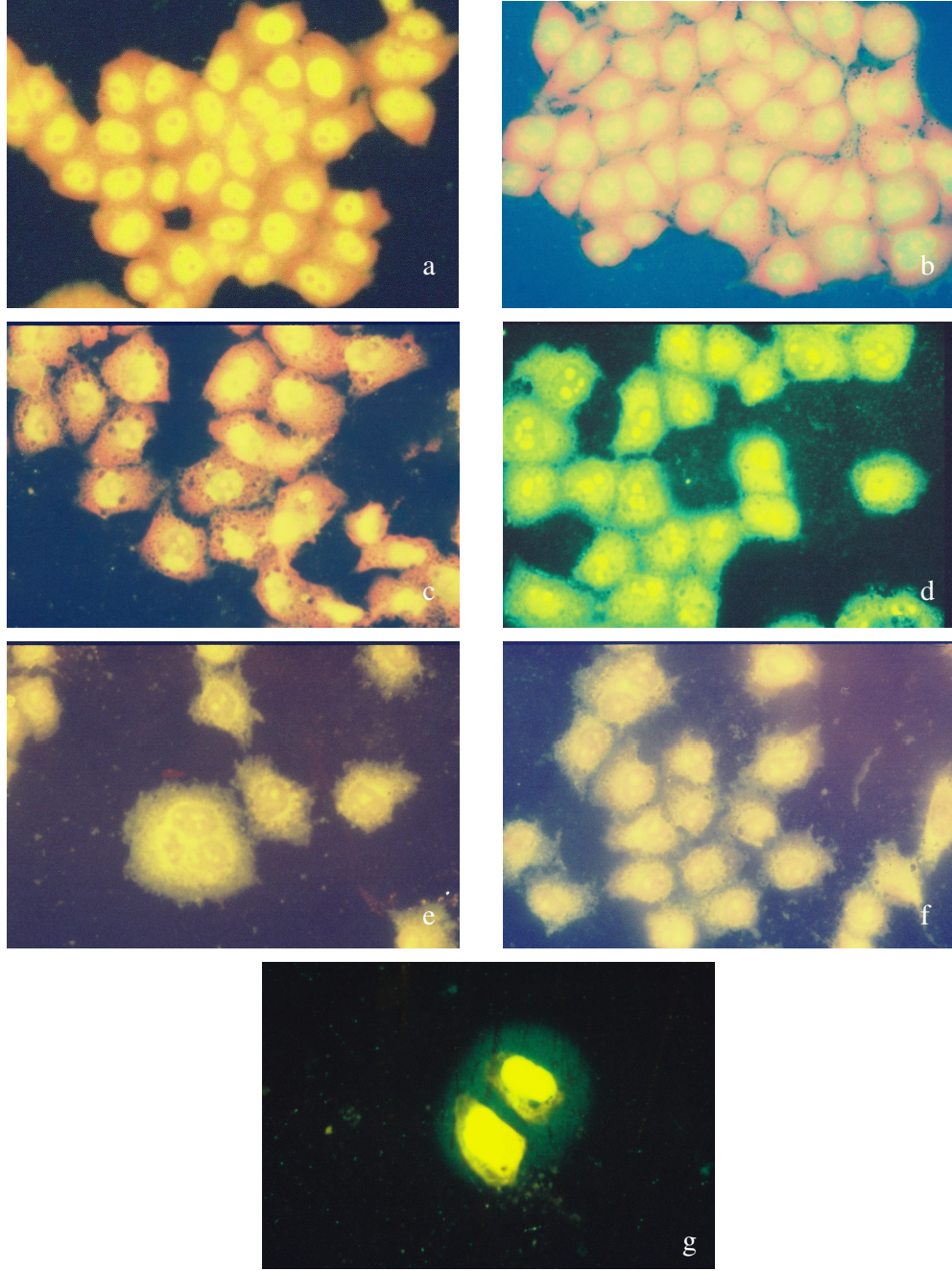
HOYE'nin HeLa hücrelerinde koloni formasyonu sonucuna göre ilk dozdan itibaren doza bağımlı olarak koloni sayısında azalma olduğu görülmektedir (Şekil 42).

**HOYE'nin akridin turuncusu boyama sonuçları**



**Şekil 43. HOYE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c: 1 µg.ml<sup>-1</sup>, d: 10 µg.ml<sup>-1</sup>, e: 50 µg.ml<sup>-1</sup>, f: 100 µg.ml<sup>-1</sup>, g: 250 µg.ml<sup>-1</sup> (1cm = 62.5 µm, büyütme 1600X)**

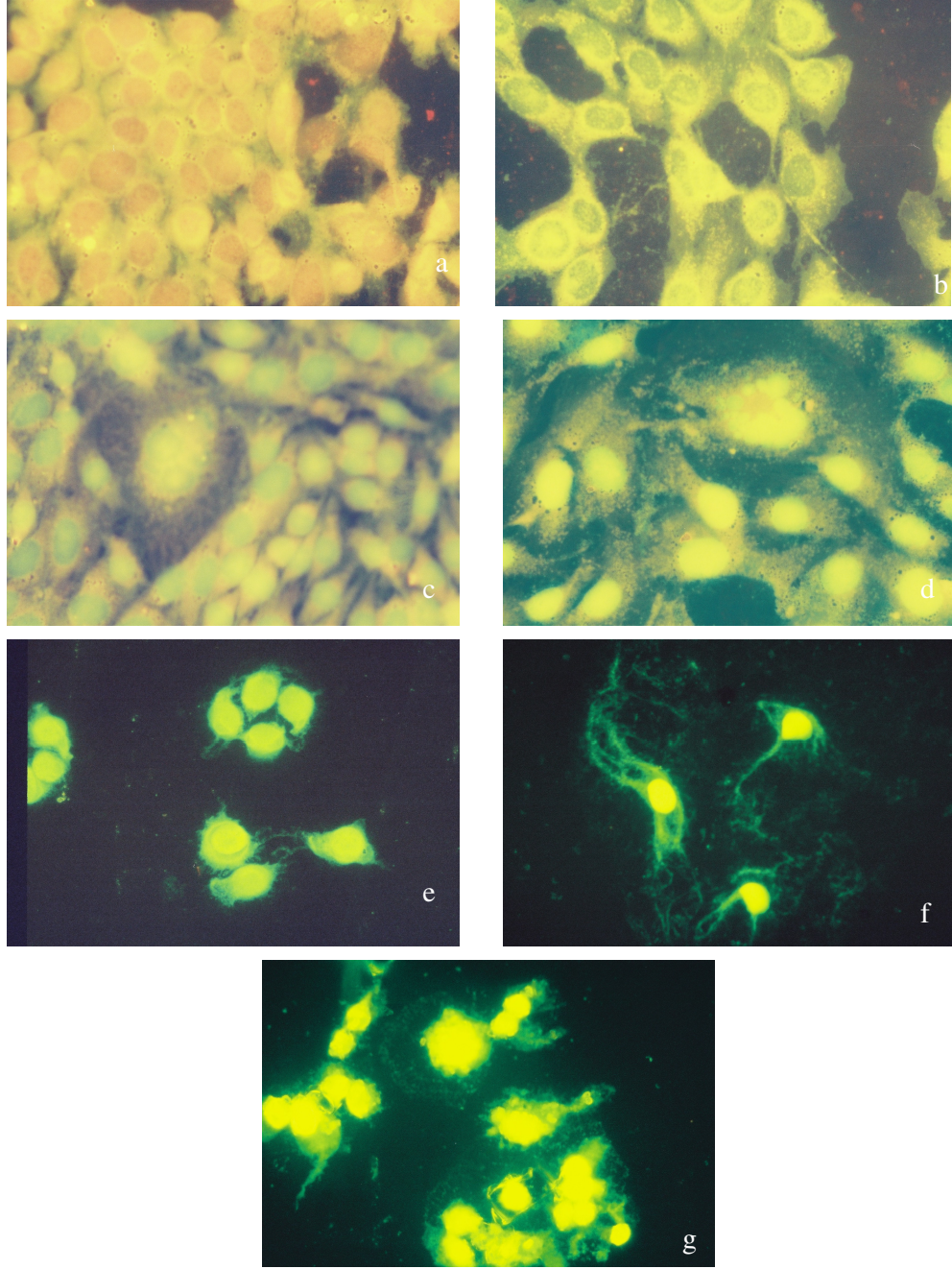
*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, ilk dozdan itibaren hücrelerin normal şekillerinin bozulduğu ve vakuollenme olduğu, 50 µg.ml<sup>-1</sup> dozda mikronükleuslar oluştuğu, 100 ve 250 µg.ml<sup>-1</sup> dozlarda hücrelerin özelliklerini tamamen yitirdikleri görülmektedir (Şekil 43).



Şekil 44. HOYE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ( $1\text{cm} = 62.5 \mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda,  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan itibaren hücrelerde vakuollenme olduğu, mikronükleusların oluştuğu,  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan sonra RNA sentezinin durduğu, hücrelerin giderek sağlıklı bir görüntü gösterdiği, çekirdeğin merkezden hücre membranına yaklaştığı,  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda hücrelerin ölüme gittiği görülmektedir (Şekil 44).



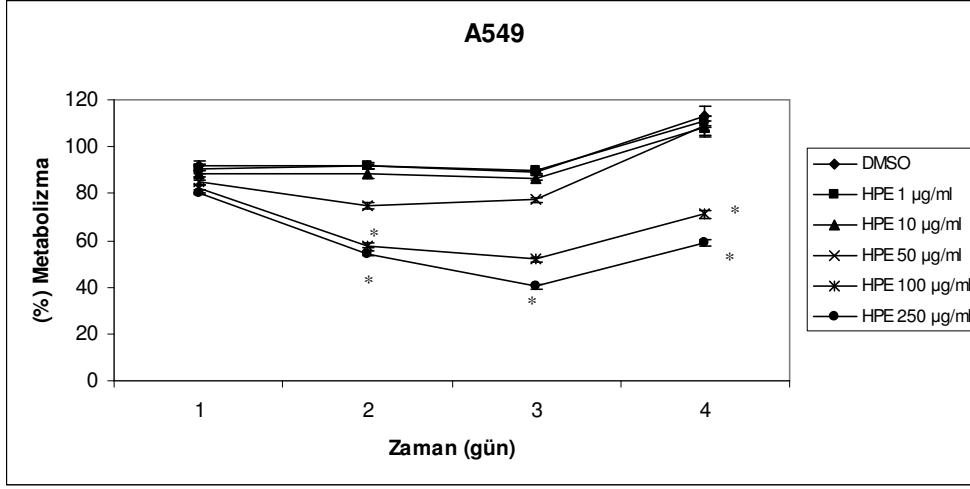


Şekil 45. HOYE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum origanifolium* yaprağı ekstresi uygulanan NIH3T3 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda,  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda çekirdeklerin parçalı bir hal aldığı, vakuollenme ve mikronükleusların oluştuğu,  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan sonra RNA sentezinin durduğu, hücrelerin sayılarının azaldığı, tek başlarına olduğu, normal şekillerini kayb ettikleri, giderek küçüldükleri, çekirdek ve sitoplâzmalarının belirsizleştiği görülmektedir (Şekil 45).

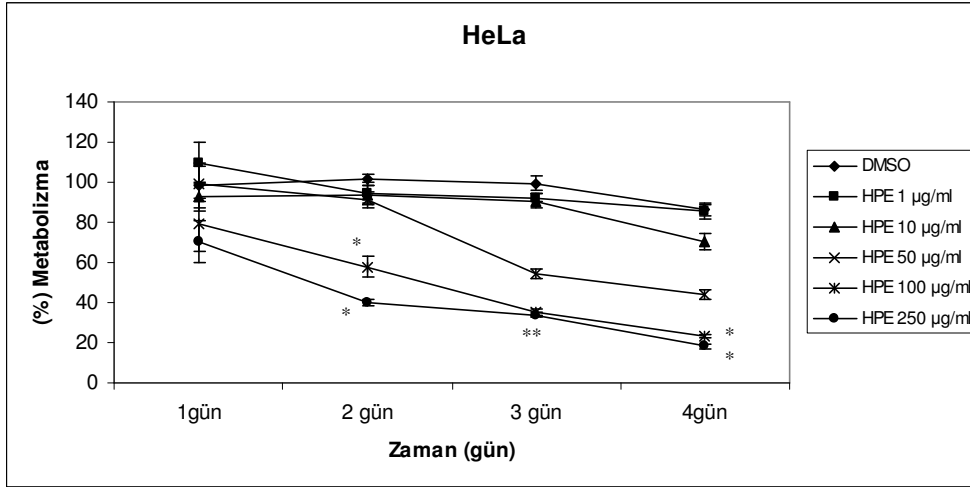
## *Hypericum perforatum* Ekstresi

### HP'nin MTT sonuçları



Şekil 46. HP'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

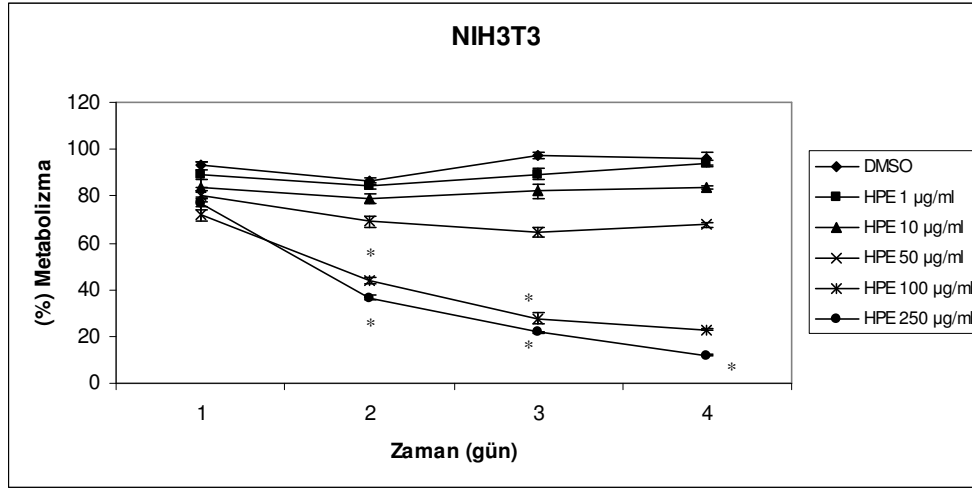
*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinin metabolizmasında ikinci ve üçüncü günde doza bağımlı bir azalma görüldüğü, dördüncü gün bu etkinin ortadan kalktığı gözlemlenmiştir. Maksimum sitotoksik etkinin  $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozda ( $40.1358 \pm 1.1194$ ) üçüncü günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 46).



Şekil 47. HP'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 1, 10 ve  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda ikinci günde DMSO'ya yakın bir etki elde edildiği, 100 ve  $250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  dozlarda ilk gün elde edilen sonuçların dört gün boyunca doza ve zamana bağımlı olarak artarak devam

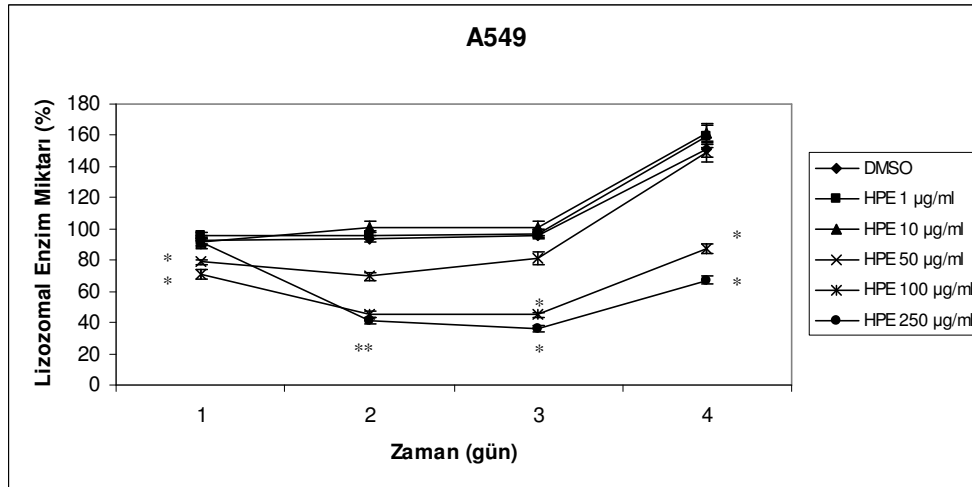
ettiği, üçüncü günde alınan cevabın birbirine çok yakın olduğu ve maksimum sonucun dördüncü günde 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda (% 18.3413  $\pm$  1.1708) olduğu görülmektedir (Şekil 47).



Şekil 48. *HP*'nin NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin MTT proliferasyon testi ile değerlendirmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan MTT ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda doza bağımlı bir toksisite görüldüğü ve bu etkinin ikinci günden itibaren artarak dördüncü güne kadar sürdüğü, maksimum sonucun 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda (% 11.7850  $\pm$  0.3409) dördüncü günde elde edildiği görülmektedir (Şekil 48).

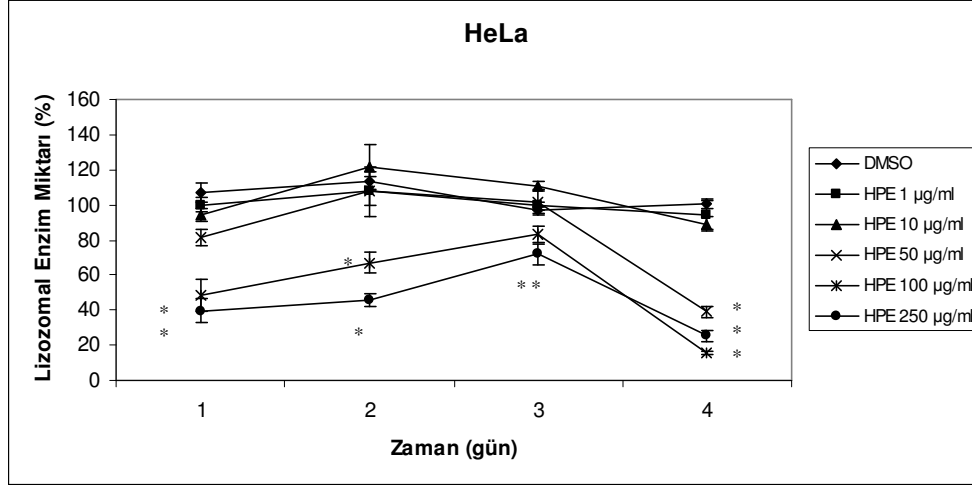
#### *HP*'nin NR sonuçları



Şekil 49. *HP*'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

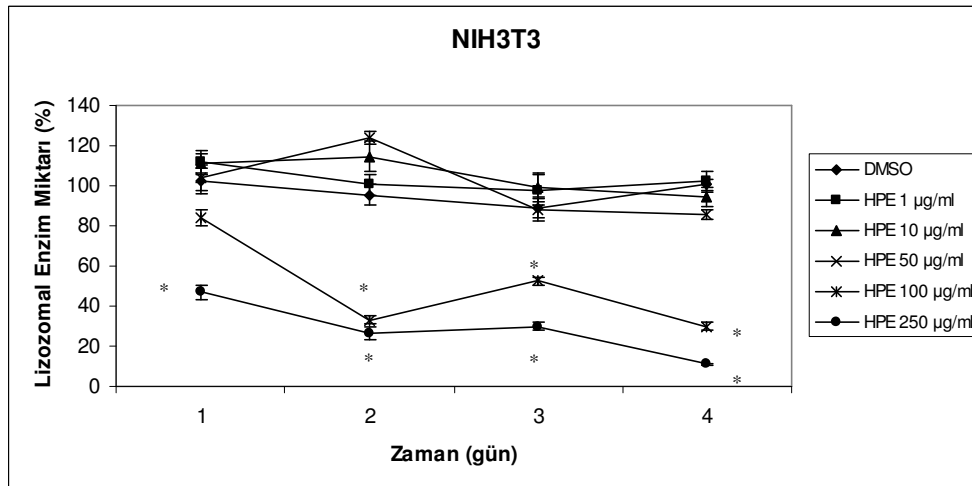
*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, A549 hücrelerinde 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda lizozomal enzim miktarlarında

birinci günde azalma olduğu, diğer günlerde ise DMSO ile benzer etki gözlenmektedir. 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında ikinci ve üçüncü günlerde azalma olduğu, bu etkinin dördüncü günde ortadan kalktığı, lizozomal enzim miktarlarındaki maksimum azalmanın üçüncü günde 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda (% 35.7433  $\pm$  1.9229) olduğu görülmektedir (Şekil 49).



Şekil 50. *HP'nin* HeLa hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

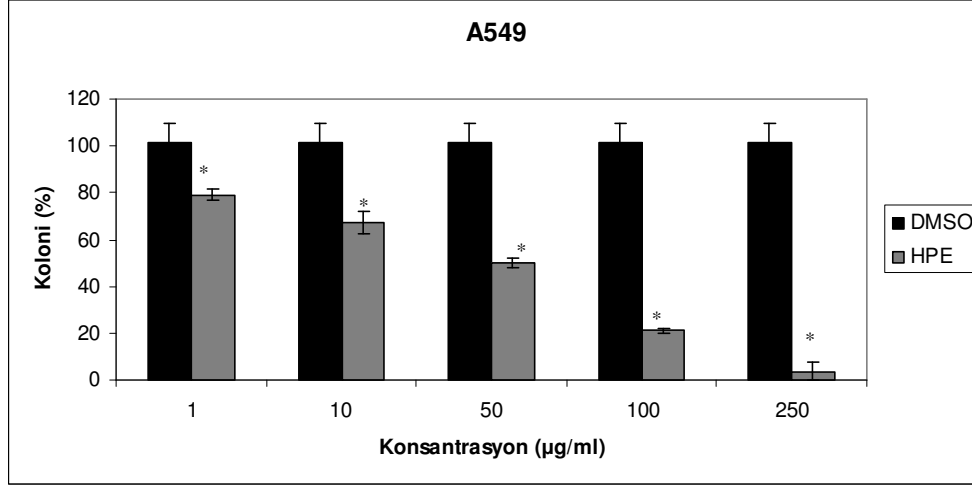
*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, HeLa hücrelerinde 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda dördüncü günde lizozomal enzim miktarında azalma olduğu görülmektedir. 100 ve 250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozlarda ise lizozomal enzim miktarlarında ikinci ve üçüncü günde artma olduğu, dördüncü günde azalma olduğu görülmektedir. Maksimum azalmanın 100  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  dozda (% 15.7788  $\pm$  1.1198) dördüncü günde olduğu gözlenmektedir (Şekil 50).



Şekil 51. *HP'nin* NIH3T3 hücreleri üzerine etkilerinin nötral kırmızısı boyama yöntemi ile lizozomal enzim miktarı açısından değerlendirilmeleri (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

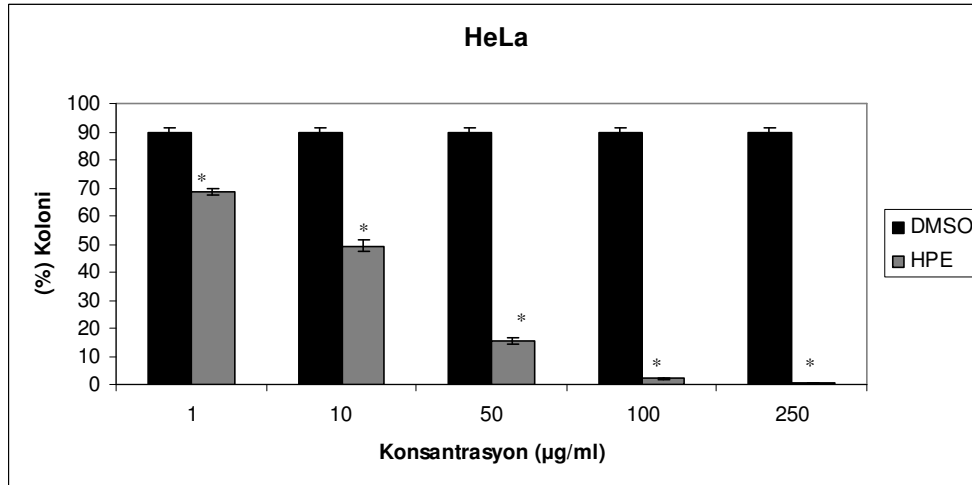
*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan hücrelerde yapılan NR ölçüm sonuçlarında, NIH3T3 hücrelerinde 100 ve 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dozlarda lizozomal enzim miktarlarında ikinci ve dördüncü günlerde azalma, üçüncü günde ise hafif bir artış gözlenmektedir. Maksimum azalma 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  dozda ( $\% 10.9088 \pm 0.4771$ ) dördüncü günde görülmüştür (Şekil 51).

#### *HP'nin koloni formasyonu sonuçları*



Şekil 52. *HP'nin A549 hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyonu açısından değerlendirilmeleri* (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

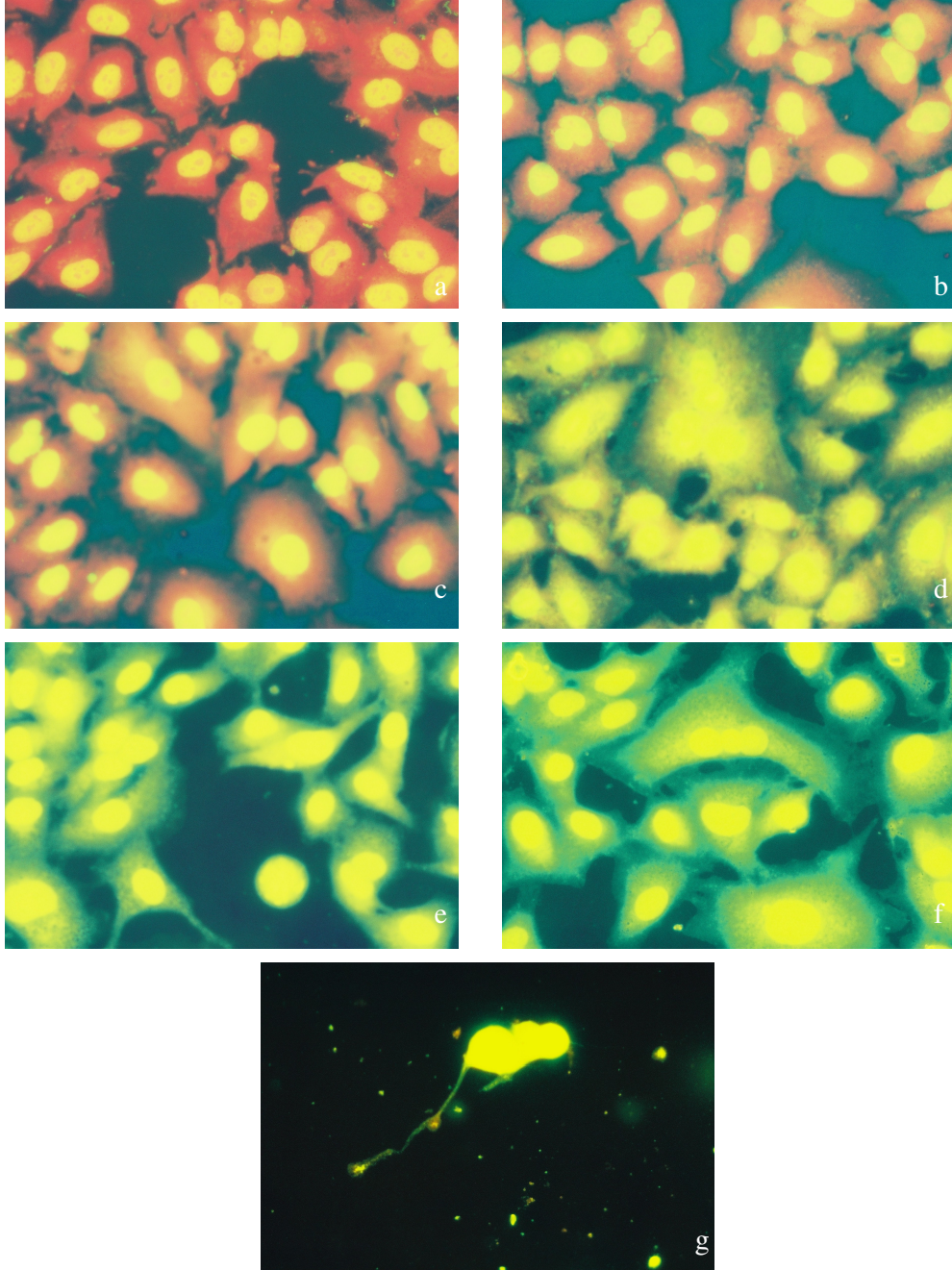
*HP'nin A549 hücrelerinde koloni formasyonu sonucuna göre ilk dozdan itibaren doza bağımlı olarak koloni sayısında azalma olduğu görülmektedir* (Şekil 52).



Şekil 53. *HP'nin HeLa hücreleri üzerine etkilerinin koloni formasyonu açısından değerlendirilmeleri* (\*) Günlere göre anlamlı farklılıklar, anlamlılık değeri  $p < 0.05$ , Ortalama değerler  $\pm$  Standart hata (n=8)

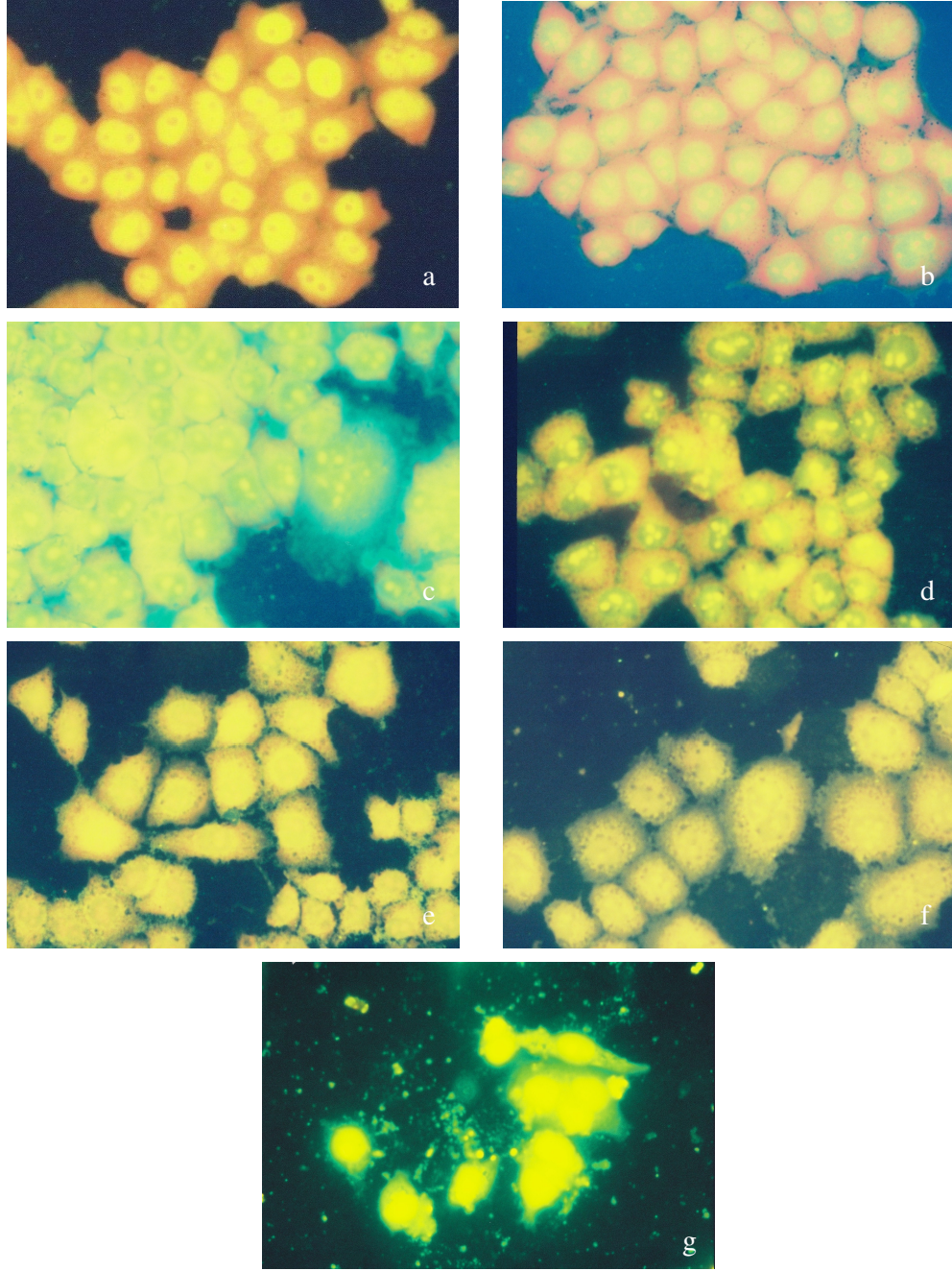
*HP'nin HeLa hücrelerinde koloni formasyonu sonucuna göre ilk dozdan itibaren doza bağımlı olarak koloni sayısında azalma olduğu görülmektedir* (Şekil 53).

*HP'nin akridin turuncusu boyama sonuçları*



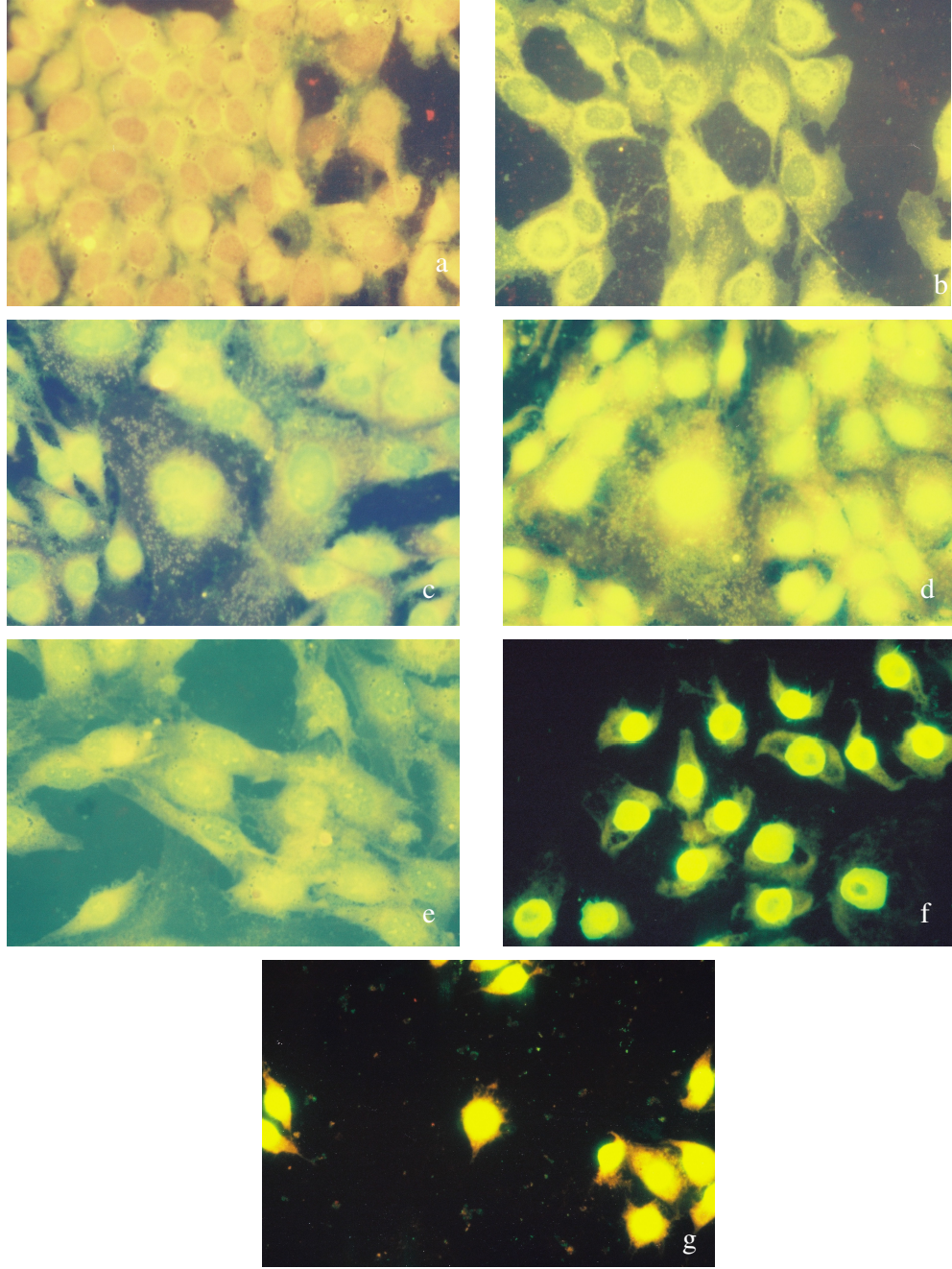
Şekil 54. HPE uygulanan A549 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm = 62.5  $\mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda,  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozdan itibaren RNA sentezinin azaldığı, hücrelerin normal şekillerinin bozulduğu,  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda ölüme gittiği görülmektedir (Şekil 54).



**Şekil 55.** HPE uygulanan HeLa hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskobunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm =  $62.5 \mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan HeLa hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, ilk dozdan itibaren RNA sentezinin azaldığı, hücre çekirdeklerinin parçalı bir hal aldığı, mikronükleusların oluştuğu, hücrelerin bol vakuollü ve karakterizasyonlarını yitirmiş oldukları görülmektedir.  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda hücrelerin parçalandığı gözlenmektedir (Şekil 55).



Şekil 56. HPE uygulanan NIH3T3 hücrelerinin akridin turuncusu ile boyanması sonucunda floresan mikroskopunda elde edilen görüntüleri. a: Kontrol, b: DMSO, c:  $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , d:  $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , e:  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , f:  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , g:  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (1cm =  $62.5 \mu\text{m}$ , büyütme 1600X)

*Hypericum perforatum* ekstresi uygulanan NIH3T3 hücrelerinde akridin turuncusu ile floresan boyama sonucunda, ilk dozdan itibaren doza bağımlı olarak hücre şekillerinin gitgide bozulduğu,  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozda RNA sentezinin durduğu,  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  ve  $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$  dozlarda hücre sitoplâzmalarının belirsizleştiği, hücrelerin ölüme gittiği gözlenmektedir (Şekil 56).



## SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kullanılan bitkilerden *Hypericum perforatum*'un sitotoksik, antiproliferatif ve proapoptotik etkileri daha önceden çeşitli araştırmacıların raporlarıyla bildirilmiştir (Couladis ve ark., 2002; Hostanska ve ark., 2003; Roscetti ve ark., 2004). Hatta içerdiği hiperforin, amentoflavon gibi maddelerin sitotoksik, antianjiojenik, apoptotik ve antiproliferatif etkileri de gösterilmiştir (Guruvayoorappan ve Kuttan, 2007). Ayrıca antikanser aktiviteyi destekler nitelikte bu bitkinin antioksidan özellikleri de yine daha önceden yapılmış araştırmalarla gösterilmiştir (Silva ve ark., 2005; Skerget ve ark., 2005). Tez çalışmaları kapsamında elde edilen bulgular daha önceden *Hypericum perforatum* ile elde edilen bu gözlemleri doğrular niteliktedir. Ancak aynı familyaya ait diğer iki bitki türünün kanserle ilişkili olarak henüz hiçbir etkisi araştırılmamıştır. Bu iki türden *Hypericum montbrettii* ile ilgili bugüne kadar tek biyoaktivite çalışması yapılmıştır; bu türün kurutulmuş çiçeklerinden hazırlanan çeşitli ekstraların antibakteriyel etkiler taşıdığı yapılan bir *in vitro* çalışmayla gösterilmiştir (Sakar ve Tamer, 1990). Çalışılan üçüncü tür olan *Hypericum organifolium* ile ilgili yayınlanmış biyoaktivite çalışması bulunmamaktadır. Ancak Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilen bir tez ile bu iki türün (*Hypericum montbrettii* ve *Hypericum organifolium*) antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri gösterilmiştir (İbadova, 2006). Bu gözlemler *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum organifolium*'un antikanser özellikler taşıyabileceğinin kanıtı olmasından dolayı, çiçek ve yapraklarından ayrı ayrı hazırlanan ekstralarının kanser hücreleri olan A549, HeLa ve bir normal hücre olan NIH3T3 üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

Her üç türün ekstralarından elde edilen bulgulara göre antiproliferatif ve sitotoksik etkileri açısından birbirlerine benzemektedirler. Ancak nötral kırmızısı sonuçları açısından ekstralar arası bazı farklılıklar göze çarpmaktadır. Nötral kırmızısı deneyi apoptotik aktivite açısından önemli enzimleri içeren lizozomal aktiviteyi ölçmektedir (Ondrouskova ve ark., 2007; Tardy ve ark., 2006). Gözlemlerimiz farklı ekstraların farklı hücre tiplerinde lizozomal aktiviteyi farklı biçimlerde etkilediğini göstermektedir. Örneğin, *Hypericum montbrettii* çiçeği ekstresi 100 ve 250 µg.ml<sup>-1</sup> dozlarda A549 hücrelerinde 2. ve 3. günlerde lizozomal enzim miktarında azalma, 4. günde lizozomal enzim miktarında artış gözlenirken, HeLa hücrelerinde aynı dozlarda zamana bağlı olarak lizozomal aktivitede azalma görülmekte, NIH3T3 hücrelerinde ise 3. günde artış, 4. günde de azalma gözlenmektedir. *Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresinde ise 250 dozda A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak lizozomal aktivitede artış, HeLa hücrelerinde ise zamana bağlı olarak azalma görülmektedir. *Hypericum perforatum* ekstresinde A549 hücrelerinde 100 ve 250 µg.ml<sup>-1</sup> dozlarda 2. ve 3. günde lizozomal enzim miktarında azalma 4. günde ise artış görülürken, HeLa hücrelerinde 2. ve 3. günlerde artış, fakat 4. günde ise azalma gözlenmektedir. Bu farklılıklar çok büyük bir olasılıkla ekstraların bileşimlerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Akridin turuncusu ile boyama sonuçlarında elde ettiğimiz görüntülerde tüm ekstralarda düşük dozlardan itibaren hücrelerin normal şekillerini kaybettiği görülmekte, 100 ve 250 µg/ml gibi yüksek dozlarda da nükleuslarının

parçalandığı, hücrelerin küçüldüğü ve apoptotik bir görünüm aldığı gözlenmektedir. Lizozomal enzim aktivitesindeki artışa paralel olarak artan asitlik oranının boya ile floresan ışınımı artıracağı bilinmektedir (Gordon ve ark., 2000; Halaby ve ark., 2004). Bu bilgi bağlamında, boyama sonuçlarının nötral kırmızısı sonuçlarıyla paralellik gösterdiği gözlenmiştir. Örneğin, *Hypericum montbrettii* yaprağı ekstresi uygulanan A549 hücrelerinde 250 µg.ml<sup>-1</sup> dozda diğer dozlara göre daha fazla ışınım görülmektedir.

Deneylerde dikkat çeken bir başka nokta ise, kullanılan tüm ekstrelerin koloni formasyonunu azaltmasıdır. Koloni formasyonu, kanser patojenezinde önemli bir aşamalar olan anjiojenez ve metastaz açısından önemli bir parametredir (Shen ve ark., 2007). Bitki ekstreleri koloni formasyonunu inhibe ettiğinden dolayı her üç türünde antianjiojenik ve antimetastatik etkilerinin olduğu akla yakın bir olasılık olarak düşünülmelidir (Medina ve ark., 2006). Zaten daha önceden yapılan çalışmalarla *Hypericum perforatum*'un bileşenlerinden bir tanesi olan hiperforinin çok net olmamakla birlikte antimetastatik ve antianjiojenik etkilerinin olduğu savı ileri sürülmüştür. Bulgularımız Medina ve arkadaşları (2006) tarafından elde edilen gözlemleri doğrular niteliktedir. Ne var ki, çalışılan ekstrelerin hiperforin ve diğer fitokimyasal bileşenleri hakkında henüz bilgi sahibi olunamaması nedeniyle daha detaylı yorum yapmak olası değildir. Yine tez çalışmalarında ortaya çıkan ortak bir özellik olarak, her üç ekstrenin nispeten yüksek dozlardaki (100–250 µg.ml<sup>-1</sup>) sitotoksik etkisi dikkat çekmektedir. Bu sitotoksik etki büyük bir olasılıkla ekstrelerde bulunan hiperisin ve pseudohiperisin gibi naftodiantronlardan kaynaklanmaktadır. Bu görüşü destekleyen çalışmalar yapılmıştır (Ali ve ark., 2001; Blank ve ark., 2003; Martarelli ve ark., 2004). Ancak, bu gözlemlerin ekstrelerin fitokimyasal analizi ile pekiştirilmesi gerekmektedir. Halen bu iki bitki ekstresinin fitokimyasal analizleri İtalya da bir araştırma gurubu ile kolaboratif araştırma halinde gerçekleştirilmektedir.

Sonuç olarak, gerek antiproliferatif ve sitotoksik etkileri daha önceden bilinen *Hypericum perforatum* gerekse hakkında hemen hemen hiçbir şey bilinmeyen *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum origanifolium*'un antikanser aktivite açısından önemli olabileceği ve kanser tedavisi için bitkilerin bir kaynak oluşturabileceği fikri uyanmaktadır. Ancak, bu fikrin gerçeye dönüşebilmesi için daha yapılması gereken çok fazla araştırma bulunmaktadır:

1. Daha önceden de belirtildiği gibi *Hypericum perforatum* antikanser, antiproliferatif, apoptotik, antianjiojenik ve antimetastatik özellikler taşıdığı görülmektedir. Burada temel sorun bitkinin hangi bileşeninin hangi etkiden sorumlu olduğunun hâlâ tam olarak anlaşılabilmiş olmasıdır. Naftodiantronlar sitotoksik etkiden sorumlu görülürken, amentoflavon ve diğer flavonoidlerin antimetastatik aktiviteden sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Guruvayoorappan ve Kuttan, 2007). Ayrıca hiperforinin proapoptotik, antianjiojenik ve antimetastatik etkilerinden söz edilmektedir (Medina ve ark., 2006). Ancak hiperforinin antianjiojenik ve antimetastatik etkileri kesin olarak kanıtlanmış değildir. Bu nedenle *Hypericum perforatum* bileşenlerinin özellikle apoptotik, antianjiojenik ve antimetastatik etkileri açısından detaylı bir taramadan geçirilmesi gerekmektedir.

2. Yukarıda belirtilen etkiler ve bununla bağlantılı olarak kanser konusundaki net yararın anlaşılabilmesi için çeşitli tümörleri taşıyan hayvan modelleri ile *in vivo* çalışmalara gereksinim vardır. Bu gereksinim hem *Hypericum perforatum* ekstresi hem de aktif bileşenler için geçerlidir. Aslında *Hypericum perforatum* ve aktif bileşeni hiperisin için Ehrlich asites tümör, Sarkoma 180, lösemi ve fareye implante insan prostat karsinomu üzerinde *in vivo* tümör modelleri ile araştırmalar yapılmıştır (Milles ve Bone, 2000; Martarelli ve ark., 2004). Ancak *Hypericum perforatum*'un diğer bileşenler için benzeri karşılaştırmalı çalışmaları henüz gerçekleştirilmemiştir.

3. *Hypericum montbrettii* ve *Hypericum origanifolium* ekstrelerinin kimyasal bileşenin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Bu sayede antiproliferatif ve sitotoksik etkilerden sorumlu maddelerin ne olduğu anlaşılabilir.

4. Yukarıda belirtilen iki tür ile ilişkili olarak başka *in vitro* ve *in vivo* kanser modellerinin kullanılması gerekecektir. Örneğin matrijel tekniğinin kullanılması ile antimetastatik ve antianjiojenik etkiler daha net bir şekilde ortaya koyulabilir (Guidolin ve ark., 2004; Kleinman ve Martin, 2005).

5. Aktif bileşenlerin araştırılması sadece yeni ilaç geliştirme çalışmaları açısından değil aynı zamanda bitki içinde birbirine zıt etkiler göstermesi muhtemel bileşenlerin araştırılması açısından da önemlidir. *Hypericum* ekstreleri kimyasal bileşim açısından son derece karmaşık karışımlardır ve muhtemelen antikanser aktivite ile zıtlık gösteren başka aktiviteler de olabilecektir. Nitekim çok önemli boyutlarda olmasa da *Hypericum perforatum*'un kuvvetli yara iyileştirici etkisinde mitotik ve proliferatif etkilerin rolü olduğu daha önce yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (Öztürk ve ark., 2007). Bu mitotik aktivite artışı aslında antikanser etki ile çelişmektedir ve muhtemelen de farklı bileşenlerle çelişkili etkiler ortaya çıkmaktadır. Saflaştırılmış aktif maddelerle deneylerin tekrarı bu düşüncenin anlaşılmasını olanaklı kılacaktır.

## KAYNAKLAR

- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., Witte, P., Hypericin in cancer treatment: more light on the way, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34, 221–241, (2002).
- Akay, T., Genel Histoloji, 5. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 1, 3, 4, 40, 41, 150, (2001).
- Ali, S. M., Chee, S. K., Yuen, G. Y., Olivo, M., Hypericin and hypocrellin induced apoptosis in human mucosal carcinoma cells, *J. Photochem. Photobiol.*, 65, 59–73, (2001).
- Alley, M. C., Lieber, M. M., Drug application to the surface of soft-agarose cell cultures, *Human Tumor Cloning*, 205–214, (1984a).
- Alley, M. C., Lieber, M. M., Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumour cells, *Br. J. Cancer*, 49, 225–233, (1984b).
- Alley, M. C., Pacula-Cox, C. M., Hursey, M. L., Rubinstein, L. R., Boyd, M. R., Morphometric and colorimetric analyses of human tumor cell line growth and drug sensitivity in soft agar culture, *Cancer Res.*, 51, 1247–1256, (1991).
- Alley, M. C., Scudierreo D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R., Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.*, 48, 589–601, (1988).
- Alley, M. C., Uhl, C. B., Lieber, M. M., Improved detection of drug cytotoxicity in the soft agar colony formation assay through use of a metabolizable tetrazolium salt, *Life Sci.*, 31, 3071–3078, (1982).
- Alnuaimi, M. M., Rauf, M. A., Ashraf, S. S., Comparative decoloration study of neutral red by different oxidative processes, *Dyes and Pigments*, 72(3), 367-371, (2007).
- Andreeff, M., Goodrich, D. W., Pardee, A. B., Cell proliferation, differentiation, and apoptosis, *Cancer Medicine e.5* (içinde), R. C. Bast (Ed.), B. C. Decker Inc., London, UK, 17-19, 24-26, (2000).
- Babar, E., Uyanma işlergeleri, uyku ve beynin elektriksel aktivitesi, *Tıbbi Fizyoloji* (içinde), W. F. Ganong (Ed.), 16. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 214, (1995).
- Baldi, A., Boccia, V., Claudio, P. P., De Luca, A., Giordano, A., Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (10), 4629-4632, (1996).
- Banerjee, T., Van Der Vliet, A., Ziboh, V. A., Downregulation of COX–2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids*, 66 (5–6), 485–492, (2002).
- Barile, F. A., Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research* (içinde), J. V. Castell, M. J. Gomez-Lechon (Eds.), Academic Press, California, USA, 41-43, (1997).

- Baytop, A., *Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, İstanbul, 31–41, 211–212, (1991).*
- Bhattacharya, S. K., Chakrabarti, A., Chatterjee, S. S., Activity profiles of two hyperforin-containing *Hypericum* extracts in behavioral models, *Pharmacopsychiatry*, 31 (Suppl.1), 22-29, (1998).
- Blank M., Mandel M., Keisari Y., Meruelo D., Lavie G., Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin, *Cancer Res.*, 63, 8241-8247, 2003.
- Bloomfield, H. H., Nordfors, M., Willams, P., *Hypericum & Depression*, Prelude Press, Los Angeles, California, 49–52, (1996).
- Borenfreund, E., Puerner, J. A., Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicol. Lett.*, 24, 119–124, (1985).
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H., A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer, *EMBO J.*, 3 (5), 1151-1157, (1984).
- Boubakir, Z., Beuerle, T., Liu, B., Beerhues, L., The first prenylation step in hyperforin biosynthesis, *Phytomedicine*, 66, 51–57, (2005).
- Bozkurt, A., *Antineoplastik ilaçlar, Farmakoloji Ders Kitabı (içinde), T. A. Bökesoy, İ. Çakıcı, M. Melli (Eds.), Gazi Kitabevi, Ankara, 625–640, (2000).*
- Bratman, S., *Beat Depression with St. John's Wort*, Prima Publishing, Rocklin, 1–3, (1997).
- Bruder, J. T., Kovesdi, I., Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signalling pathway and induces interleukin-8 expression, *J. Virol.*, 71 (1), 398-404, (1997).
- Buchholzer, M., Dvorak, C., Chatterfee, S. S., Klein, J., Dual modulation of striatal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 301, 714–719, (2002).
- Buonopane, A., Petrakis, I. L., *Pharmacotherapy of alcohol use disorders, Subst. Use Misuse.*, 40 (13-14), 2001-2020, (2005).
- Calabresi, P., Chabner, B. A., *Chemotherapy of neoplastic diseases, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (içinde), J. G. Hardman, L. E. Limbird (Eds.), 10. Edition, McGraw-Hill, New York, 1386, (2001).*
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, 47, 936–942, (1987).
- Cass, H., *St. John's Wort: Nature's Blues Buster*, 1. edition, Avery Publishing Group, New York, 5,6, 64–67, (1998).
- Cavanaugh, V. J., Stenberg, R. M., Staley, T. L., Virgin IV, H. W., MacDonald, M. R., Paetzold, S., Farrell, H. E., Rawlinson, W. D., Campbell, A. E., Murine cytomegalovirus with a deletion of genes spanning HindIII-J and –I displays altered cell and tissue tropism, *J. Virol.*, 70 (3), 1365-1374, (1996).

- Chang, G. C., Hsu, S. L., Tsai, J. R., Liang, F. P., Lin, S. Y., Sheu, G. T., Chen, C. Y., Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 1453–1464, (2004).
- Chang, K., Pastan, I., Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 136–140, (1996).
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K., Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells, *Toxicol. in Vitro*, 12, 251–258, (1998).
- Clayson, D. B., *Toxicological Carcinogenesis*, Lewis Publishers, Florida, 113–114, (2001).
- Cranmer, L. D., Clark, C. L., Morello, C. S., Farrell, H. E., Rawlinson, W. D., Spector, D. H., Identification, analysis, and evolutionary relationships of the putative murine cytomegalovirus homologs of the human cytomegalovirus UL82 (pp71) and UL83 (pp65) matrix phosphoproteins, *J. Virol*, 70 (11), 7929–7939, (1996).
- Colasanti, A., Kisslinger, A., Liuzzi, R., Quarto, M., Riccio, P., Roberti, G., Tranmontano, D., Villani, F., Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate, *J. Photochem. Photobiol.*, 54, 103–107, (2000).
- Coşkun, I., Uzbay, I. T., Öztürk, N., Öztürk, Y., Attenuation of ethanol withdrawal syndrome by extract of *Hypericum perforatum* in Wistar rats, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 20, 481–488, (2006).
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6. Edition, W. B. Saunders Company, USA, 4, 330, (1999).
- Couladis, M., Badisa, R. B., Baziou, P., Chaudhuri, S. K., Pilarinou, E., Verykokidou, E., Harvala, C., Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum sp.* brine shrimps and human cancer cell lines, *Phytother. Res.*, 16, 719–722, (2002).
- Cloudwell, W. T., Gopalakrishna, R., Hinton, D. R., He, S., Weiss, M. H., Law, R. E., Apuzzo, M. L. J., Hypericin: a potential anti-glioma therapy, *Neurosurgery*, 35, 705–710, (1994).
- Court, W. E., Hypericin as a potential antitumor agent, *Hypericum*, The Genus *Hypericum* (içinde), E. Ernst (Ed.), 1. Edition, Taylor & Francis, London, UK, 73–76, (2003).
- Dalay, N., Onkogenler ve tümör supresör genler, *Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri* (içinde), XV. Ulusal Kanser Kongresi, 23 Nisan, Antalya, 21–29, (2003).
- Dandrea, T., Hellmold, H., Jonsson, C., Zhivotovsky, B., Hofer, T., Warngard, L., Cotgreave, I., The transcriptosomal response of human A549 lung cells to a hydrogen peroxide-generating system: regulation to DNA damage, cell cycle arrest, and caspase activation, *Free Radic. Biol. & Med.*, 36(7), 881–896, (2004).

- Delaey, E., Vandebogaerde, A., Merlevede, W., Witte, P., Photocytotoxicity of hypericin in normoxic and hypoxic conditions, *J. Photochem. Photobiol.*, 56, 19–24, (2000).
- Denizot, F., Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, 89, 271–277, (1986).
- D’Hallewin, M., Bezdetnaya, L., Guillemin, F., Fluorescence detection of bladder cancer: a review, *Eur. Urol.*, 42, 417–425, (2002).
- Du, H. Y., Olivo, M., Tan, B. K. H., Bay, B. H., Photoactivation of hypericin down-regulates glutathione S-transferase activity in nasopharyngeal cancer cells, *Cancer Lett.*, 207, 175–181, (2004).
- Dvorak, Z., Modriansky, M., Ulrichova, J., Maurel, P., Vilarem, M., Pascussi, J., Disruption of microtubules leads to glucocorticoid receptor degradation in HeLa cell line, *Cell Signal.*, 17, 187–196, (2005).
- Ernst, E., Izzo, A. A., The clinical pharmacology of *Hypericum perforatum*, *Hypericum*, The Genus *Hypericum* (içinde), E. Ernst (Ed.), 1. Edition., Taylor & Francis, London, UK, 155, (2003).
- Fang, R., Aust, A. E., Induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells treated with crocidolite asbestos, *Arch. Biochem. Biophys.*, 340 (2), 369–375, (1997).
- Fang, X., Gibson, S., Flowers, M., Furui, T., Bast R. C. Jr, Mills, G. B., Lysophosphatidylcholine stimulates activator protein 1 and the c-JunN-terminal kinase activity, *J. Biol. Chem.*, 272 (21), 13683–13689, (1997).
- Fernie, W. T., Herbal Simples Approved for Modern Uses of Cure, Boericke and Tafel, Philadelphia, 287–291, (1897).
- Ferraz, A., Faria, D. H., Benneti, M. N., Brondani Da Rocha, A., Schwartzmann, G., Henriques, A., Von Poser, G. L., Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*, *Phytomedicine*, 12, 112–115, (2005).
- Fidler, I. J., Kerbel, R. S., Ellis, L. M., Biology of cancer: angiogenesis, *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (içinde), V. T. Devita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (Eds.), 6. Edition, Lippincott’s Williams & Wilkins, 141, 142, Philadelphia, USA, (2001).
- Florea, A., Dopp, E., Büsselberg, D., Elevated  $Ca^{2+}_i$  transients induced by trimethyltin chloride in HeLa cells: types and levels of response, *Cell Calcium*, 37, 251–258, (2005).
- Francis, A. J. P., Antidepressant action of St. John’s Wort, *Hypericum perforatum*: a test of the circadian hypotheses, *Phytomedicine*, 12 (3), 167–172, (2005).
- Franks, L. M., Teich, N. M., Cellular and Molecular Biology of Cancer, 3. Edition, Oxford University Press, New York, USA, 2–4, 21–25, (1996).

- Frye, R. F., Fitzgerald, S. M., Lagattuta, T. F., Hruska, M. W., Egorin, M. J., Effect of St John's Wort on imatinib mesylate pharmacokinetics, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 76, 323–329, (2004).
- Gaby, A. R., Natural approaches to epilepsy, *Altern. Med. Rev.*, 12 (1), 9-24, (2007).
- Gaedcke, F., St John's Wort herb extracts, *Hypericum*, The Genus *Hypericum* (içinde), E. Ernst (Ed.), 1. Edition., Taylor & Francis, London, UK, 51, 52, (2003).
- Garofalo, R., Sabry, M., Jamaluddin, M., Yu, R. K., Casola, A., Ogra, P. L., Brasier, A. R., Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation, *J. Virol.*, 70 (12), 8773-8781, (1996).
- Gasowska-Giszczak, U., Darmochwal-Kolarz, D., Wasniewska, A., Dziubinska-Parol, I., Rolinski, J., Oleszczuk, J.: Apoptosis of HeLa cell lines incubated with retinol, *Eur. J. Obstet. & Gynecol. Reprod. Biol.*, 119 (1), 119–122, (2005).
- Giannoni, E., Cirri, P., Paoli, P., Flaschi, T., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Ramponi, G., Acylphosphatase is a strong apoptosis inducer in HeLa cell line, *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, 3, 264–270, (2000).
- Gonzalez Armas, J. C., Morello, C. S., Cranmer, L. D., Spector, D. H., DNA immunization confers protection against murine cytomegalovirus infection, *J. Virol.*, 70 (11), 7921-7928, (1996).
- Gordon, K. E., Binas, B., Chapman, R. S., Kurian, K. M., Clarkson, R. W. E., Clark, A. J., Lane, E. B., Watson, C. J., A novel cell culture model for studying differentiation and apoptosis in the mouse mammary gland, *Breast Cancer Res.*, 2, 222–235, (2000).
- Guidolin, D., Vacca, A., Nussdorfer, G. G., Ribatti, D., A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay *in vitro*, *Microvascular Res.*, 67, 117-124, (2004).
- Guruvayoorappan, C., Kuttan, G., Effect of amentoflavone on the inhibition of pulmonary metastasis induced by B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice, *Integr. Cancer Ther.*, 6, 185-197, (2007).
- Guyton, H., Hall, J. E., *Tıbbi Fizyoloji*, 9. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri LTD. ŞTİ., İstanbul, 3, (1996).
- Halaby, R., Homsi, A., Regna, K., Bartoszewicz, J., O'rouke, M., Parga, B., Villatoro, Fajardo, I., Triptolide induces apoptosis of human breast cancer cells, *Breast J.*, 10 (5), 313–316, (2004).
- Helgason, C. M., Wieseler Frank, J. L., Johnson, D. R., Frank, M. G., Hendricks, S. E., The effects of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on NK cell activity *in vitro*, *Immunopharmacology*, 46, 247–251, (2000).
- Heli, H., Bathaie, S. Z., Mousavi, M. F., An electrochemical study of neutral red-DNA interaction, *Electrochim. Acta*, 51, 1108–1116, (2005).



- Henderson, L., Yue, Q. Y., Bergquist, C., Gerden, B., Arlett, P., St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes, *J. Clin. Pharmacol.*, 54, 349–356, (2002).
- Herekman-Demir, T., Öztürk, N., Öztürk, Y., Hepatoprotective effect of St John's Wort, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 15 (Suppl 1), 104, (2001).
- Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M., Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (6), 650–664, (2001).
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G. R., Rakhshanizadeh, M., Anticonvulsant effect of *Hypericum perforatum*: role of nitric oxide, *J. Ethnopharmacol.*, 98 (1-2), 207–208, (2005).
- Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M., Saller, R., Hyperforin a constituent of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 56, 121–132, (2003).
- Hölzl, J., Petersen, M., Chemical constituents of *Hypericum* spp., *Hypericum*, The Genus *Hypericum* (içinde), E. Ernst (Ed.), 1. Edition., Taylor & Francis, London, UK, 78-89, (2003).
- Hsu, Y., Kuo, P. L., Lin, C. C., Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells, *Life Sci.*, 75, 2303–2316, (2004).
- http-1 <http://www.losev.org.tr> (14.11.2004)
- http-2 <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-185> (28.10.2006)
- http-3 <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CCL-2> (28.10.2006)
- http-4 <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=CRL-1658> (28.10.2006)
- Huang, C. Z., Li, Y. F., Feng, P., A spectrophotometric study on the interaction of neutral red with double-stranded DNA in large excess, *Talanta*, 55, 321–328, (2001).
- Huber, M., Selinka, H. C., Kandolf, R., Tyrosine phosphorylation events during coxsackievirus B3 replication, *J. Virol.*, 71 (1), 595-600, (1997).
- Ibadova, S., Bazı *Hypericum* Türlerinin Fenolik Bileşimi ile Antioksidan ve Serbest Radikal Süpürücü Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2006).

- Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P. M., Bodmer, W. F., Genetic pathways in colorectal and other cancers, *Eur. J. Cancer*, 35 (3), 335–351, (1999).
- Ivetic, V., Popovic, M., Mimica-Dukic, N., Barak, O., Pilija, V., St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) and kindling epilepsy in rabbit, *Phytomedicine*, 9 (6), 496–499, (2002).
- Jainchill, J., L., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Murine sarcoma and leukemia viruses: Assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J. Virol.*, 4 (5), 549–553, (1969).
- Jang, S., I., Steinert, P. M., Markova, N. G., Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene, *J. Biol. Chem.*, 271 (39), 24105–24114, (1996).
- Jepsen, K. F., Abildtrup, A., Larsen, S. T., Monophthalates promotes IL–6 production in the human epithelial cell line A549, *Toxicol in Vitro*, 18, 265–269, (2004).
- Jung, E. Y., Kang, H. K., Chang, J., Yu, D., Jang, K. L., Cooperative transformation of murine fibroblast NIH3T3 cells by hepatitis C virus core protein and hepatitis B virus X protein, *Virus Res.*, 94, 79–84, (2003).
- Junqueira, L. C., Basic Histology, 10. Edition, Lange Medical Books McGraw-Hill Companies, 64, 65, (2003).
- Kamel, N. S., Gammak, J. K., Insomnia in the elderly: cause, approach, and treatment, *Am. J. Med.*, 119 (6), 463–469, (2006).
- Karp, G., Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments, 4. Edition, John Wiley & Sons, USA, 669, (2005).
- Kastan, M. B., Skapek, S. X., Molecular biology of cancer: the cell cycle, *Cancer: Principles & Practice of Oncology* (çinde), V. T. Devita, S. Hellman, S. A. Rosenberg (Eds.), 6. Edition, Lippincott's Williams & Wilkins, 91, 92, 103, 104, Philadelphia, USA, (2001).
- Kayaalp, S. O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 372, 373, (2000).
- Kenemans, P., Verstraeten, R. A., Verhijen, R. H. M., Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer, *Maturitas Eur. Menopause J.*, 49, 34–43, (2004).
- Kirkels, W. J., Pelgrim, O. E., Hoogenboom, A. M. M., Alders, M. W., Debruyne, F. M. J., Voous, G. P., Herman, C. J., Patterns of tumor colony development over time in soft-agar culture, *Int. J. Cancer*, 32, 399–406, (1983).
- Kitanow, G. M., Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species, *Biochem. Syst. Ecol.*, 29, 171–178, (2001).
- Kleinman, H. K., Martin, G. R., Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity, *Sem. in Cancer Biol.* 15, 378–386, (2005).
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Genetik, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 24, 28, 635–651, (2002).

- Korkmaz, S., Öztürk, Y., Öztürk, N., Wound-healing activity of St.-John's Wort on chicken embryonic fibroblasts, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 15, 104, (2001).
- Kumar, V., Singh, P. N., Bhattacharya, S. K., Neuropsychopharmacological studies on indian *Hypericum perforatum* Linn, *Hypericum*, The Genus *Hypericum* (içinde), E. Ernst (Ed.), 1. Edition., Taylor & Francis, London, UK, 179, (2003).
- Kunz, D., Mahlberg, R., Muller, C., Tilmann, A., Bes, F., Melatonin in patients with reduced REM sleep duration: two randomized controlled trials, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89 (1), 128-134, (2004).
- Kuo, P. L., Hsu, Y. L., Lin, T. C., Lin, C. C., The antiproliferative activity of prodelphinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf is through cell cycle arrest and Fas-mediated apoptotic pathway in A549 cells, *Food Chem. Toxicol.*, 43, 315-323, (2005).
- Kuznetsov, G., Towle, M. J., Cheng, H., Kawamura, T., Tendyke, K., Liu, D., Kishi, Y., Yu, M. J., Littlefield, B. A., Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389, *Cancer Res.*, 64, 5760-5766, (2004).
- Larner, J. M., Grosh, W. W., Mechanisms of action of antineoplastic drugs, Broody's Human Pharmacology (içinde), K. P. Minneman, L. Wecker (Eds.), Elsevier Mosby, Pennsylvania, 523, (2005).
- Linde, K., Knüppel, L., Large-scale observational studies of *Hypericum* extracts in patients with depressive disorders-a systematic review, *Phytomedicine*, 12, 148-157, (2005).
- Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C. D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D., St. John's Wort for depression—an overview and meta-analysis of randomized clinical trials, *Br. Med. J.*, 313 (7052), 253-258, (1996).
- Liotta, L. A., Kohn, E. C., Invasion and metastases, *Cancer Medicine* e.5 (içinde), R. C. Bast (Ed.), B. C. Decker Inc., London, UK, 121-128, (2000).
- Livolsi, V. A., Merino, M. J., Brooks, J. S. J., Saul, S. H., Tomaszewski, J. E., *Patoloji*, 2. Baskı, Saray Tıp Kitabevleri, İzmir, 33, 35, 36, (1992).
- Liu, C. D., Kwan, D., Saxton, R. E., Mcfadden, D. W., Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*, *J. Surg. Res.*, 93, 137-143, (2000).
- Lui, P. P. Y., Chan, F. L., Suen, Y. K., Kwok, T. T., Konga, S. K. The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca<sup>2+</sup> signaling with the involvement of mitochondria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308, 826-833, (2003).
- Luo, L., Sun, Q., Mao, Y. Y., Lu, Y. H., Tan, R. X., Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase, *J. Ethnopharmacol.*, 93, 221-225, (2004).
- Macville, M., Schrock, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T., Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping, *Cancer Res.*, 59 (1), 141-150, (1999).

- Mai, I., Bauer, S., Perloff, E.S., Johne, A., Uehleke, B., Frank, B., Budde, K., Roots, I., Hyperforin content determines the magnitude of the St. John's Wort-cyclosporine drug interaction, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 76, 330–340, (2004).
- Martarelli, D., Martarelli, B., Pediconi, D., Nabissi, M. I., Perfumi, M., Pompei, P., *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice, *Cancer Lett.*, 210, 27–33, (2004).
- Mazza, G., Oomah, B. D., Herbs, Botanicals, and Teas, CRC Press, Florida, 133, 134, 142–145, (1998).
- McPhee, S. J., Lingappa, V. R., Ganong, W. F., Lange, J. D., Pathophysiology of Disease, 3. Edition, Lange Medical Books McGraw-Hill, 79-81, (2000).
- Medina, M. A., Martínez-Poveda, B., Amores-Sánchez, M. I., Quesada, A. R., Hyperforin: More than an antidepressant bioactive compound?, *Life Sci.*, 79, 105-111, (2006).
- Mennini, T., Gobbi, M., The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*, *Life Sci.*, 75: 1021–1027, (2004).
- Mills, S., Bone, K., Principles and Practice of Phytotherapy, Churchill Livingstone, Edinburgh, 543–546, 548–550, (2000).
- Missiaen, L., Van Acker, K., Van Baelen, K., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Parys, J. B., De Smedt, H., Vanoevelen, J., Dode, L., Rizzuto, R., Callewaert, G., Calcium release from the golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments, *Cell Calcium*, 36, 479–487, (2004).
- Moody, T. W., Zia, F., Draoui, M., Brenneman, D. E., Fridkin, M., Davidson, A., Gozes, I., A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits non-small cell lung cancer growth, *Biochemistry*, 90, 4345–4349, (1993).
- Moore, L. B., Goodwin, B., Jones, S. A., Wisely, G. B., Serabjit-Singh, C. J., Wilson, T. M., Collins, J. L., Kliewer, S. A., St. John's Wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(13), 7500–7502, (2000).
- Murch, S. J., Haq, K., Rupasinghe, V., Saxena, P. K., Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.), *Environ. Exp. Bot.*, 49, 251–257, (2003).
- Murch, S. J., Saxena, P. K., Mammalian neurohormones: potential significance in reproductive physiology of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)? *Naturwissenschaften*, 89 (12), 555–560, (2002).
- Müller, R. S., Breikreutz, J., Gröning, R., Interactions between aqueous *Hypericum perforatum* extracts and drugs: *in vitro* studies, *Phytother. Res.*, 18, 1019–1023, (2004).
- Mycek, M. J., Harvey, R. A., Farmakoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 373, 374, (2001).

- Okada, D., Neutral red as a hydrophobic probe for monitoring neuronal activity, *J. Neurosci. Methods*, 101, 85–92, (2000).
- Ondrouskova, E., Soucek, K., Horvat, V., Smarda, J., Alternative pathways of programmed cell death are activated in cells with defective caspase-dependent apoptosis, *Leuk. Res.*, article in press, 2007.
- Özgül, T., Tıbbi fizyolojinin genel ve hücre sel temeli, *Tıbbi Fizyoloji (içinde)*, W. F. Ganong (Ed.), 16. Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 7–9, (1995).
- Öztürk, M., *p53* mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure, *Lancet*, 338 (8779), 1356-1359, (1991).
- Öztürk, N., Korkmaz, S., Öztürk, Y., Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.*, 111, 33–39, (2007).
- Öztürk, Y., Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models, *Pharmacopsychiatry*, 30 (Suppl 2), 125-128, (1997).
- Öztürk, Y., Aydın, S., Başer, K. H. C., Kırimer, N., Kurtar-Öztürk, N., Hepatoprotective activity of *Hypericum perforatum* L. alcoholic extracts in rodents, *Phytother. Res.*, 6 (1), 44-46, (1992).
- Öztürk, Y., Aydın, S., Beis, R., Başer, K. H. C., Berberoğlu, H., Effects of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice, *Phytomedicine*, 3 (2), 139-144, (1996a).
- Öztürk, Y., Aydın, S., Beis, R., Başer, K. H. C., Berberoğlu, H., Effects of *Hypericum calycinum* L. extracts on the central nervous system in mice, *Phytother. Res.*, 10, 700–702, (1996b).
- Öztürk, Y., Aydın, S., Beis, R., Herekman-Demir, T., The involvement of endogenous opioid mechanisms in the antinociceptive effects induced by antidepressant drugs, desipramine and trimipramine, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 83, 592-597, (2006).
- Öztürk, Y., Öztürk, N., Possible mechanism of the analgesic effect of St.-John's Wort, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 15 (Suppl1), 138, (2001).
- Peters, G., Vousden K. H., *Oncogenes and Tumour Suppressors*, Oxford University Press, Oxford, 189–191, (1997).
- Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J., Habraken, Y., Agostinis, P., Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers, *Biochem. Pharmacol.*, 66, 1651–1659, (2003).
- Pytel, A., Schmeller, N., New aspect of photodynamic diagnosis of bladder tumors: fluorescence cytology, *Urology*, 59, 216–219, (2002).
- Rabanal, R. M., Bonkanka, C. X., Hernandez-Perez, M., Sanchez-Mateo, C. C., Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait, *J. Ethnopharmacol.*, 96, 591–596, (2005).
- Rezvani, A. H., Overstreet, D. H., Yang, Y., Clark, E. Jr., Attenuation of alcohol intake by extract of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) in two different strains of alcohol-preferring rats, *Alcohol Alcohol*, 34 (5), 699–705, (1999).

- Robson, N. K. B., *Hypericum* botany, *Hypericum*, The Genus *Hypericum* (içinde), E. Ernst (Ed.), 1. Edition., Taylor & Francis, London, UK, 1, (2003).
- Rodgers, S. E., Connolly, J. L., Chappell, J. D., Dermody, T. S., Reovirus growth in cell culture does not require the full complement of viral proteins: identification of a  $\sigma$  1s-null mutant, *J. Virol.*, 72 (11), 8597–8604, (1998).
- Rodriguez-Landa, J. F., Contreras, C. M., A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts, *Phytomedicine*, 10, 688–699, (2003).
- Roscetti, G., Franzese, O., Comandini, A., Bonmasar, E., Cytotoxic activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 erythroleukemic cells: differential effects between methanolic extract and hypericin, *Phytother. Res.*, 18, 66–72, (2004).
- Ruacan, Ş., Karsinogenez, Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri (içinde), XV. Ulusal Kanser Kongresi, Nisan, 23, Antalya, 5–11, (2003).
- Sakar, M. K., Tamer, A. U., Antimicrobial activity of different extracts from some *Hypericum species*, *Fitoterapia*, 61 ( 5), 464-466, (1990).
- Scheffner, M., Munger, K., Byrne, J. C., Howley, P. M., The state of the *p53* and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(13), 5523-5527, (1991).
- Scherer, W. F., Syverton J. T., Gey G. O., Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *J. Exp. Med.*, 97 (5), 695–710, (1953).
- Schneider-Gadicke, A., Schwarz, E., Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes, *EMBO J.*, 5 (9), 2285-2292, (1986).
- Schulz, V., Hansel, R., Tyler, V. E., Rational Phytotherapy, 3. Edition, Berlin, Springer, 56–57, 62, (1998).
- Shen, Y., Cai, M., Xia, W., Liu, J., Zhang, Q., Xie, H., Wang, C., Wang, X., Zheng, S., FTY720, a synthetic compound from *Isaria sinclairii*, inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells, *Cancer Lett.*, 254, 288-297, (2007).
- Shimizu, K., Endo, O., Goto, S., Sakoda, A., Ono, Y., Sakai, Y., Bioassay-based evaluation of toxicity of suspended particulate matter in humans: integrated uses of alveolar cells (A549) in air-liquid interface culture and hepatocarcinoma cells (Hep G2), *Biochem. Eng. J.*, 22, 1–9, (2004).
- Shisler, J., Duerksen-Hughes, P., Hermiston, T. M., Wold, W. S. M., Gooding, L. R., Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A is dependent on binding to either *p300*, or *p105-Rb* and induction of DNA synthesis, *J. Virol.*, 70 (1), 68-77, (1996).
- Siess, D. C., Kozak, S. L., Kabat, D., Exceptional fusogenicity of chinese hamster ovary cells with murine retroviruses suggests roles for cellular factor(s) and receptor clusters in the membrane fusion process, *J. Virol.*, 70 (6), 3432-3439, (1996).

- Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., Dias, A. C. P., Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts, *Food Chem.*, 90, 157–167, (2005).
- Skalisz, L. L., Beijamini, V., Andreatini, R., Effect of *Hypericum perforatum* on marble-burying by mice, *Phytother. Res.*, 18, 399–402, (2004).
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A. R., Simonic, M., Knez, Z., Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food Chem.*, 89, 191–198, (2005).
- Sokmen, A., Jones, B. M., Erturk, M., Antimicrobial activity of extracts form the cell cultures of some Turkish medicinal plants, *Phytother. Res.*, 13, 355–357, (1999).
- Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Hankard, P. K., Weeks, J. M., A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker?, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 57, 20–29, (2004).
- Şengül, M., Aydın, S., Öztürk, N., Öztürk, Y., Başer, K. H. C., *Hypericum perforatum* L.'un antimikrobiyel aktivitesi üzerine bir çalışma, *Bildiriler Kitabı*, IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 16–19 Mayıs, Eskişehir, 230–234, (1991).
- Tardy, C., Codogno, P., Autefage, H., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1765, 101–125, (2006).
- Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H., Anti-inflammatory actions of St. John's Wort: inhibition of human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 $\alpha$  (STAT-1 $\alpha$ ) activation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 307 (1), 254–261, (2003).
- Thibodeau, G. A., Patton, K. T., *Anatomy and Physiology*, 2. Edition, Mosby-Year Book, St. Louis, 851, (1993).
- Tong, M., Tai, H. H., 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase can be induced by dexamethasone and other glucocorticoids at the therapeutic level in A549 human lung adenocarcinoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 435, 50–55, (2005).
- Tsuruo, T., Lida, H., Nojiri, M., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y., Circumvention of vincristine and adriamycin resistance *in vitro* and *in vivo* by calcium influx blockers, *Cancer Res.*, 43, 2905–2910, (1983).
- Turner, P. C., Bates, A. D., White, M. R. H., *Moleküler Biyoloji*, 2. Baskı, Nobel Yayıncılık, 312–315, (2004).
- Uzbay, I T, Coşkun, I., Kayır, H., Öztürk, N., Öztürk, Y., Extract of *Hypericum perforatum* blocks caffeine-induced lokomotor activity in mice: A possible role of nitric oxide, *Phytother. Res.*, 21 (5) , 415–419, (2007).
- Uzbay, I. T., Coşkun, I., Kayır, H., Öztürk, N., Öztürk, Y., St. John's Wort blocks caffeine-induced locomotor activity in mice, *World J. Biol. Psychiat.*, 6 (Suppl.1), 310, (2005a).

- Uzbay, I. T., Kayır, H., Coşkun, I., Öztürk, N., Öztürk, Y.: St. John's Wort blocks nicotine-induced locomotor activity in mice, *World J. Biol. Psychiat.*, 6 (Suppl.1), 310, (2005b).
- Uzbay, T., Kayır, H., Coşkun, I., Öztürk, N., Öztürk, Y., Extract of *Hypericum perforatum* blocks nicotine-induced locomotor activity in mice, *Turk J. Pharm. Sci.*, 3 (1), 31-39, (2006).
- Uzdensky, A. B., Bragin, D. E., Kolosov, M. S., Kubin, A., Loew, H. G., Moan, J., Photodynamic effect of hypericin and a water soluble derivative on isolated crayfish neuron and surrounding glial cells, *J. Photochem. Photobiol.*, 72, 27–33, (2003).
- Valdivieso-Garcia, A., Clarke, R. C., Rahn, K., Durette, A., Macleod, D. L., Gyles, C. L., Neutral red assay for measurement of quantitati vero cell cytotoxicity, *Appl. Environ. Microbiol.*, 6, 1981–1983, (1993).
- Valentin, I., Philippe, M., Lhunguenot, J., Changnon, M., Uridin uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay, *Toxicol.*, 158, 127–139, (2001).
- van Tiel, C.M., Schenning, M., Snoek, G.T., Wirtz, K.W.A., Overexpression of phosphatidylinositol transfer protein  $\beta$  in NIH3T3 cells has a stimulatory effect on sphingomyelin synthesis and apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1636, 151–158, (2004).
- Vande Woude, G. F., Klein, G., *Advances in Cancer Research*, Academic Press, California, USA, 114–119, (2003).
- Vandenbogaerde, A. L., Kamuhabwa, A., Delaey, E., Himpens, B. E., Merlevede, W. J., Witte, P., Photocytotoxic effect of pseudohypericin versus hypericin, *J. Photochem. Photobiol.*, 45, 87–94, (1994).
- Vander, A. J., Sherman, J. H., Luciano, D. S., *Human Physiology: the mechanisms of body function*, 6. Edition, McGraw-Hill, 78, 79, (1994).
- Varadi, A., Cirulli, V., Rutter, G. A., Mitochondrial localization as a determinant of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in HeLa cells, *Cell Calcium* 36, 499–508, (2004).
- Viana, A.F., Heckler, A.P., Fenner, R., Rates, S.M., Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae), *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36 (5), 631-634, (2003).
- Vijayan, P., Kumar, S. V., Dhanaraj, S. A., Mukherjee, Suresh, B., *In vitro* cytotoxicity and antitumour properties of *Hypericum mysorensense* and *Hypericum patulum*, *Phytother. Res.*, 17, 952–956, (2003).
- Wang, Z., Gorski, C., Hamman, M. A., Huang, S., Lesko, L. J., Hall, S. D., The effects of St John's Wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome p450 activity, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 70 (4), 317–326, (2001).
- Wang, Y. T., Zhao, F. L., Li, K. A., Tong, S. Y., Molecular spectroscopic study of DNA binding with neutral red and application to assay of nucleic acids, *Anal. Chim. Acta*, 396, 75–81, (1999).



- Weisburger, E. K., General principles of chemical carcinogenesis, *Carcinogenesis* (içinde), M. P. Waalkes, J. M. Ward (Eds.), Raven Press, New York, 2, 3, (1994).
- Wentworth, J. M., Agostini, M., Love, J., Schwabe, J. W., Chatterjee, V. K. K., St. John's Wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor, *J. Endocrinol.*, 166, 11–16, (2000).
- Wilhelm, K. P., Biel, S., Siegers, C. P., Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts, *Phytomedicine*, 8 (4), 306–309, (2001).
- Xu, B. J., Zheng, Y. N., Sung, C. K., Natural medicines for alcoholism treatment: a review, *Drug Alcohol Rev.*, 24 (6), 525-536, (2005).
- Yeates, L. C., Powis, G., The expression of the molecular chaperone calnexin is decreased in cancer cells grown as colonies compared to monolayer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 66–70, (1997).
- Yin, X., Zhou, J., Jie, C., Xing, D., Zhang, Y., Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549, *Life Sci.*, 75, 2233–2244, (2004).
- Zhang, X., Pennec, G. L., Steffen, R., Müller, W. E. G., Zhang, W., Application of a MTT assay for screening nutritional factors in growth media of primary sponge cell culture, *Biotechnol. Prog.*, 20, 151–155, (2004).

## **EK 1**

### **BESİYERLERİ, KATKI MADDELERİ ve TAMPON ÇÖZELTİLER**

#### **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)**

Bu solüsyon aşağıda kodu verilen toz D MEM şişesi üzerinde verilen bilgiler doğrultusunda hazırlanmıştır.

1 lt -1X veya 100 ml -10X solüsyon hazırlamak için:

DMEM (toz)	13.42 g
Steril distile su	100 ml veya 1 lt

#### ***Hazırlanışı:***

Steril olan toz steril kabinde daha önce darası alınmış kapaklı bir steril şişeye konur. Kapalı olarak steril kabinin dışına alınarak tartılır. Gerekli miktar suyun %90'ı steril kabinde ilave edilerek karıştırılır ve hacim tamamlanır.

#### ***Sterilizasyonu:***

Steril olarak hazırlanmayan solüsyon, steril kabinde steril malzeme ile vakum veya basınç uygulayarak 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir (enjektör ucu filtresi de kullanılabilir).

#### ***Saklama Şartları:***

Tozu ve solüsyonu buzdolabında saklanır.

**pH:** 7.2 – 7.4

**Raf Ömrü:** 36 Ay

**Not:** Rengi sarıya yakın turuncudur. D MEM Sigma D 5648 kullanılmaktadır. Bu medyumun özellikleri; sodyum bikarbonatsız (NaHCO<sub>3</sub>), 4500 mg.lt<sup>-1</sup> D-glukozlu, 2mM L-glutaminli, 0.005mg.lt<sup>-1</sup> fenol-red'li olmasıdır.

#### **%10 FCS'li D MEM**

#### ***NIH3T3 Hücreleri için;***

100 ml %10 serumlu medyum hazırlamak için;

10X D MEM sol.	10 ml
% 9.2 NaHCO <sub>3</sub>	4 ml
Penisilin- Streptomisin sol. %1	
Fetal Calf Serum	10 ml
Steril distile su	75 ml

#### ***Hazırlanışı:***

Steril kabinde, steril pipet yardımı ile steril şişelere hazırlanır.

Solüsyonun pH'sı 1N hidroklorik asit (HCl) ve 1N sodyum hidroksit (NaOH) ile ayarlanır.

*Sterilizasyonu:*

Steril hazırlanır. Solüsyonların her biri steril olmalıdır.

*Saklama Şartları:*

Buzdolabında saklanır. Uzun süre saklanacaksa derin dondurucuda tutulmalıdır.

Mümkün olduğunca taze hazırlanıp kullanılmalıdır.

*Raf Ömrü:* 3 ay

*pH:* 7.2 – 7.4

*Not:* Primer kültürlerde %20 serum içeren medyum kullanılabilir. Düşük konsantrasyonlu medyumlarda (%1, %5, %7.5) su miktarı yeniden hesaplanmalıdır. DMEM L-glutaminsiz ise ayrıca 2mM L-glutamin ilave edilmelidir.

*Kullanılan Maddeler:*

DMEM Sigma D 5648

Fetal Calf Serum Biological Industries 04–121-1A veya Sigma F 2442, F 9665, F4135, F3018.

Heat inactive değilse 56 °C'de 1 saat inaktif edilmelidir. Penisilin-streptomisin solüsyonu Biological Industries 03-031-1B veya Sigma P 0781, P 4333, L-glutamin kullanılıyorsa Sigma G 7513'ten %1 oranında kullanılır.

**DMEM - F 12 Medium**

***A549 Hücreleri İçin;***

100 ml için:

10X DMEM	5ml
10X F12HamNutrient	5ml
Penisilin - streptomisin sol.	1ml
Amfoterisin B sol.	1ml
Fetal Calf Serum	10ml
%9.2 NaHCO <sub>3</sub>	5.225ml
Steril distile su	73ml

*Sterilizasyonu:*

Steril ortamda steril edilmiş maddelerle hazırlanmalıdır.

*Saklama Şartları:*

Formülde bulunan maddeler ayrı ayrı derin dondurucuda, hazırlanan medyum buzdolabında saklanır.

*Raf Ömrü:* Hazırlanınca 6 ay içinde kullanılmalıdır.

*pH:* 7.2 – 7.3

*Kullanılan Maddeler:*

DMEM: Sigma D 5648

F-12 HAM: Sigma N 6760

Penisilin - streptomisin sol.: Sigma P 0781'den hazırlanmıştır.

Fetal Calf Serum: Sigma F 3018

### **Penisilin – Streptomisin Solüsyonu**

100ml solüsyon için:

Penisilin (toz) 1.000.000 U

Streptomisin (toz) 1.000 mg

%0.9 Sodyum klorür (NaCl) çözeltisi 100 ml

#### ***Sterilizasyonu:***

Steril olarak hazırlanır veya 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzülerek sterilize edilir.

#### ***Saklama Şartları:***

-20°C'de saklanır. Uzun süre saklanacaksa -80°C tercih edilmelidir.

#### ***Raf Ömrü:*** 12 ay

**Not:** Solüsyon 50X olarak da hazırlanabilir ve medyuma %2 ilave edilebilir. Bu solüsyon kültürü 3 gün süre ile korur. Bu solüsyon liyofilize antibiyotiklerle (ilaç) hazırlandığında hafif bulanık görünümlü olmaktadır.

Antibiyotik solüsyonu fungusidli hazırlanacaksa: Penisilin 10.000 U.ml<sup>-1</sup>, Streptomisin 10.000 µg.ml<sup>-1</sup> ve Amfoterisin B 25 µg.ml<sup>-1</sup> olacak şekilde serum fizyolojik içinde çözündürülerek hazırlanır.

Bu solüsyon hazır olarak alındığında: Biological Industries 03-031-1B veya Sigma P 0781, P 4333 kullanılabilir. Hazır bulunmadığı takdirde hücre kültürü kataloğlarında verilen değerlere göre yukarıdaki şekilde hazırlanabilir.

### **10X Tripsin-EDTA**

100 ml hazırlamak için:

Tripsin (toz) 500mg

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (toz) 1,86 g

NaCl (toz) 900mg

Distile su 100ml

#### ***Hazırlanışı:***

Önce NaCl'ü suyun %90'ında çözerek serum fizyolojik hazırlanır. Sonra tripsin ve EDTA ilave edilir. Manyetik karıştırıcı üzerinde berraklaşana kadar NaOH ilave edilir. 100 ml'ye tamamlanır.

#### ***Sterilizasyonu:***

0.22 µm por çaplı membran filtre ile steril edilir.

***Saklama Şartları:***

-80° C'de saklanır.

***Raf Ömrü:*** 18 ay

***pH:*** 8

***Not:*** Enzim aktivitesi düşük tripsin olmamalıdır. Mümkünse hazır 10X tripsin-EDTA solüsyonu kullanılmalıdır. EDTA'sız tripsin solüsyonu kullanılıyorsa 300 mM EDTA solüsyonu 1X tripsin solüsyonu hazırlanırken ilave edilir. Tripsin solüsyonu kalsiyumsuz ve magnezyumsuz olmalıdır.

***Kullanılan Maddeler:***

Toz tripsin Sigma T 2271

EDTA Merck

Hazır kullanılacaksa:

10X Tripsin-EDTA Sigma T 4174

10X Tripsin solüsyonu Sigma T4549 veya Biological Industries 03-046-1B

Hazır bulunmadığı takdirde hücre kültürü kataloglarında verilen değerlere göre yukarıdaki şekilde hazırlanabilir.

***IX Tripsin-EDTA Solüsyonu***

100 ml için:

10X Puck's Saline A (PSA)	10 ml
%5 NaHCO <sub>3</sub>	0.7 ml
10X Tripsin-EDTA	10 ml
Steril Distile Su	79.3 ml

***Hazırlanışı:***

Steril kabinde steril malzeme ile hazırlanır. Sterilizasyonu için membran filtre kullanılır.

***Saklama Şartları:***

-20°C'de saklanır. Uzun süre saklanacaksa -80 °C'de tercih edilmelidir.

***Raf Ömrü:*** 18 ay

***pH:*** 7.2

***Not:*** 10X Tripsin çözeltisi EDTA'sız ise 0.33 ml 300 mM EDTA formüle ilave edilir.

***10X PSA Tampon Çözeltisi***

100 ml için:

Potasyum klorür (KCl) (4 g.lt <sup>-1</sup> )	0.4 g
NaCl (80 g.lt <sup>-1</sup> )	8 g
NaHCO <sub>3</sub> (3.5 g.lt <sup>-1</sup> )	0.35 g

D-glukoz (10 g.lt <sup>-1</sup> )	1 g
Fenol-red (0.05 g.lt <sup>-1</sup> )	0.005 g
Bidistile su	100 ml

**Hazırlanışı:**

Oda ısısında tüm maddeler tartılarak 90 ml su içinde çözündürülür, 100 ml'ye tamamlanır.

**Sterilizasyonu:**

Steril kabinde steril malzeme kullanılarak membran filtre ile steril edilir.

**Saklama Şartları:**

Oda ısısında veya buzdolabında saklanır.

**Raf Ömrü:** 24 ay

**pH:** 7.2 ± 0.2

**Not:** Fenol-red Sigma P 0290 solüsyon olarak kullanılabilir. % 1 ilave edilir. Tripsin için kullanılan tampon çözeltiler kalsiyum ve magnezyum içermemelidirler.

**300 mM EDTA Solüsyonu**

100 ml için:

EDTA disodyum (toz)	11.166 g
Bidistile su	100 ml
NaOH ~1.2g	pH = 8

(veya 1N NaOH)

**Hazırlanışı:**

90 ml su içinde EDTA çözündürülür. Manyetik karıştırıcı üzerinde solüsyon berrak hal alana kadar NaOH taneleri tek tek atılır. pH = 8 olduğunda solüsyon berraklaşır. 100 ml'ye tamamlanır.

**Sterilizasyonu:**

Sıkı kapalı ve ısıya dayanıklı cam şişede 121 °C'de 1.1 atm basınçta 30 dakikada yapılır.

**Saklama Şartları:**

Oda ısısında +20 °C'de saklanır.

**Raf Ömrü:** 24 ay

**pH:** 8

**Not:** EDTA disodyum tuzu kullanılır. Anhidr çözünmez. pH=8 dışında EDTA yeterince çözünmediği için bulanıktır.

EDTA'nın formülü: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.2H<sub>2</sub>O

Mol ağırlığı: 372.2 g

### 10x Fosfat Tuz Tampon Çözeltisi (PBS - Phosphate Buffer Saline)

10X 1 lt için:

NaCl	80g
KCl	2 g
Potasyum bifosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2 g
Sodyum bifosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	11.4 g
Bidistile su	1000 ml

#### **Hazırlanışı:**

Maddeler tartılarak 900 ml suda çözündürülür. 1 lt'ye tamamlanarak pH ayarlanır.

#### **Sterilizasyonu:**

Sıkı kapalı ve ısıya dayanıklı cam şişede 121 °C'de 1.1 atm basınçta 30 dakikada yapılır.

#### **Saklama Şartları:**

Oda ısısında saklanır.

**Raf Ömrü:** 24 ay

**pH:** 7.3

**Not:** Kullanılacağı zaman steril kabinde açılır ve 100 ml için 10 ml alınarak 90 ml steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Primer kültür yapılırken: doku %1–2 ml penisilin-streptomisin solüsyonu ilaveli PBS içinde 5–10 dakika bekletildikten sonra izolasyon işlemi uygulanır.

1X PBS içindeki madde konsantrasyonları: NaCl = 137 mM, KCl = 2.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 8 mM.

#### **1N Hidroklorik Asit Hazırlanması**

	1000 ml için	100 ml için
%37'lik HCl	82,80 ml	8,28 ml
Distile su	917,2 ml	91,72 ml

#### **Hesaplanması ve Hazırlanışı:**

Konsantre HCl çözeltisi %37' liktir.

Eşdeğer gram sayısı = 36.46    Dansitesi = 1.19

H = 1 g      Cl = 35.46 g

100 lt'de      37g HCl varsa

x lt'de      36.46 g vardır.    x = 98.54 lt çözeltide 36.46 g HCl vardır.

d = 1.19 = 98.54/V ise V = 82.80 ml %37'lik HCl alındığında 1 lt için 1N'i verecek miktar bulunur.

***Sterilizasyonu:***

0.22 µm por çaplı membran filtreden süzülür.

***Saklama Şartları:***

Buzdolabında saklanır.

***Raf Ömrü:*** 24 ay

***Not:*** Besiyerinin baza kayan pH'sını ayarlamak için kullanılır.

**1N NaOH Hazırlanması**

Eşdeğer gram sayısı = 40

Na = 23 g      O = 16 g      H = 1 g

NaOH                      4g

Distile su                      100ml

***Hazırlanışı:***

4g NaOH 40-50ml suda iyice çözündürülür. Distile su ile 100ml'ye tamamlanır.

***Sterilizasyonu:***

Membran filtreden süzülür.

***Saklama Şartları:***

Buzdolabında saklanır.

***Raf Ömrü:*** 24 ay

***Not:*** Besiyerinin aside kayan pH'larını ayarlamak için kullanılır.



## **EK 2**

### **YÖNTEMLERDE KULLANILAN SOLÜSYON ve BOYA FORMÜLLERİ**

#### **MTT Stok Çözeltisi:**

500 mg MTT toz 100 ml PBS içinde çözündürülüp, membran filtre ile steril edilir ve ışık geçirmeyen şişelere konulur. -20 °C'de raf ömrü 6 aydır.

#### **MTT Çalışma Solüsyonu:**

1 kısım stok çözeltisi + 9 kısım besiyeri.

#### **Nötral Kırmızısı Stok Çözeltisi:**

0.4 gr Nötral kırmızı + 100 ml distile su

Membran filtreden geçirilip steril edilir. Işık geçirmeyen şişelere konur ve buzdolabında saklanır.

#### **Nötral Kırmızısı Çalışma Solüsyonu:**

1 kısım stok çözeltisi + 100 kısım besiyeri.

#### **Nötral Kırmızısı Boyama Yöntemi İçin Yıkama ve Fiksatif Solüsyonu:**

Formaldehit-kalsiyum klorür yıkama ve fiksatif solüsyonu kullanılır. Taze olarak hazırlanıp hemen kullanılmalıdır.

1.3 ml %37'lik formaldehit + 10 ml %10'luk kalsiyum klorür çözeltisi + 89 ml distile su.

#### **Nötral Kırmızısı Okuma Solüsyonu:**

%1'lik asetik asit etanol çözeltisi kullanılır. 1 ml asetik asit + 99 ml %50'lik etanol.

#### **Koloni Formasyonu İçin Agar:**

%3'lük agar distile su ile hazırlanıp, otoklav ile steril edilir.

#### **Koloni Formasyonu İçin Alt Agar Tabakası:**

1 kısım %3'lük agar + 4 kısım serumlu besiyeri.

#### **Koloni Formasyonu İçin Üst Agar Tabakası:**

1 kısım hücre süspansyonu + 2 kısım alt agar tabakası

#### **Akridin Turuncusu Stok Çözeltisi:**

100 mg AO + 100 ml distile su.

Buzdolabında ışık geçirmeyen kaplarda 6 ay saklanabilir.

#### **Akridin Turuncusu Çalışma Solüsyonu:**

1 kısım AO stok çözeltisi + 9 kısım PBS.

Taze hazırlanıp kullanılmalıdır.