

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FARKLI *SALVIA TOMENTOSA* EKSTRAKTLARININ C6
GLİOMA MONOLAYER VE SFEROİD HÜCRE KÜLTÜRÜ
MODELİNDE ANTİTÜMÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

169046

Seçnur DENİR

Balıkesir, Eylül-2005

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI *SALVIA TOMENTOSA* EKSTRAKTLARININ C6
GLİOMA MONOLAYER VE SFEROİD HÜCRE KÜLTÜRÜ
MODELİNDE ANTİTÜMÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçnur DENİR

Tez danışmanı: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Sınav Tarihi: 05.09.2005

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (Danışman)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Yrd. Doç. Dr. Bahar SUNAY

Balıkesir, Eylül-2005

ÖZET

FARKLI *SALVIA TOMENTOSA* EKSTRAKTLARININ C6 GLİOMA MONOLAYER VE SFEROİD HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELİNDE ANTİTÜMÖR ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Seçnur DENİR

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi/ Tez Danışmanı: Doç Dr. Feray KÖÇKAR)

Balıkesir,2005

Salvia tomentosa halk arasında hazımsızlık, larenjit, farenjit, ağız mukozası iltihabı, dişeti iltihabı, dil iltihabı, aşırı terleme ve sütün çok fazla gelmesine karşı kullanılan bir bitkidir. Halk arasında bu kadar yaygın bir şekilde kullanılan bu bitkinin antimikrobial ve antioksidant etkisi konusunda çalışmalar bulunmasına rağmen doku kültüründe antitümör aktivitesi üzerine herhangi bir çalışma mevcut değildir. *Salvia miltiorrhiza*'nın mevcut antitümör aktivitesi, halk arasında şifasına inanılan *Salvia tomentosa*'nın da böyle bir etkinliğinin olabileceğini akla getirmektedir.

Bu çalışmada C6 glioma hücrelerinde, tek tabakalı ve üç boyutlu tümör hücre kültürleri kullanılarak; metanol, petrol eteri ve kloroform çözücülerini ile elde edilmiş üç ayrı *Salvia tomentosa* ekstraktının antitümör etkinliğine bakılmıştır.

Ekstraktların hücre popülasyonundaki artışa etkisi monolayer kültürlerde ekstraktların 100 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda hemasitometre ile hücre sayımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlardan istatistik olarak anlamlı bulunan değerlerin yüksek konsantrasyonları seçilerek bu konsantrasyonlar üç boyutlu hücre kültürlerinde 48 saat inkübasyona maruz bırakılmışlardır. Bu sürenin son bir saatinde BrdU ile inkübe edilen sferoidlerden hazırlanan parafin kesitlerin bir kısmına immünohistokimya uygulanarak BrdU İşaretlenme İndeksi hesaplanmış bir kısmına ise hematoksilen-eozin boyası uygulanarak genel sferoid morfolojisi değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak *Salvia tomentosa*'nın C6 hücreleri üzerinde az da olsa hücre popülasyonunda büyümeyi inhibe edici etkiye sahip olduğu, BrdU İşaretlenme İndeksini kontrole göre anlamlı olarak azalttığı ve genel sferoid morfolojisinde de yer yer dağılmalara sebep olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Salvia tomentosa*, antitümör aktivite, hücre kültürü, C6 glioma, sferoid, monolayer

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTITUMOR EFFECTS OF DIFFERENT *SALVIA TOMENTOSA* EXTRACTS ON MONOLAYER AND SPHEROID MODEL OF C6 GLIOMA CELLS

Seçnur DENİR

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Msc. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR)

Balıkesir, 2005

Salvia tomentosa that belongs to *Salvia* genus is widely used in public for the treatment of several diseases, e.g. inflammation of mouth, sore throats. It is also believed it has antitumor properties in some part of Turkey. Infact, another *Salvia* species, *Salvia miltiorrhiza* was demonstrated to have antiproliferative effects on some tumor types. Although some studies are available for antimicrobial and antioxidant properties of this plant, there is no such study available on antiproliferative and antitumor activity of this species in cell culture.

Therefore, the aim of the study is to investigate the antitumor activity of three different whole plant extracts, namely methanol, petroleum ether and chloroform extracts, on rat C6 glioma cells using monolayer cell culture and multicellular spheroid model.

In monolayer cells, the antiproliferative effect of the extracts on cell population was determined using cell counting in three different concentrations, 100 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml, for 24h, 48h and 72 h incubation periods. The highest and statistically significant concentrations obtained from monolayer results were chosen for three dimensional spheroid model for 48 hours. At the end of this period, spheroids model was evaluated in two ways: Firstly, BrdU Labelling Index was immunohistochemically determined using microscopy of parafine slices prepared from BrdU labelled spheroids. Secondly, hematoxylen-eosine staining procedure has been performed for the evaluation of general morphology of spheroids.

Consequently, it was observed that *Salvia tomentosa* has an antiproliferative effect on C6 glioma cell population and the values obtained from BrdU Labelling Index of all chosen extracts in spheroid model was statitically significantly compared to control spheroids and more interestingly the chosen *S. tomentosa* extracts resulted in the dispersal on the morphology of spheroids cells.

Key words: *Salvia tomentosa*, antitumor activity, cellculture, C6 glioma, spheroid, monolayer

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanserın moleküler temeli	2
1.2. Kanser tedavisi ve kullanılan yöntemler	8
1.3. Kanser ve umut=Bitkisel tedaviler	10
1.3.1. Antitümör aktiviteye sahip bitkiler	11
1.3.2. Bitkisel ürünlerin güvenilirliği	15
1.3.3. Bitkisel kökene sahip ticari antikanser ilaçlar	15
1.4. <i>Salvia</i> genusu	17
1.4.1. <i>Salvia tomentosa</i> Miller	20
1.4.2. <i>Salvia tomentosa</i> 'nın kimyasal yapısı	20
1.4.3. <i>Salvia tomentosa</i> 'nın antimikrobiai aktivitesi	23
1.4.4. <i>Salvia tomentosa</i> 'nın antioksidant aktivitesi	24
1.5. Tümör hücre kültürü ve antitümör aktivite tayini	25
1.5.1. Multiselüler tümör sferoid modeli	25
1.6. Hücre siklusu değerlendirme yöntemleri	27
1.6.1. Halojenli pirimidinler ve BrdU işaretleme yöntemi ile hücre siklusunun değerlendirilmesi	29
1.7. Amaç	30
2. MATERYAL VE METOT	31
2.1. Materyal	31
2.1.1. Bitki materyalleri	31
2.1.2. Kimyasallar	31
2.1.3. Enzimler	32
2.1.4. İlaçlar	32
2.1.5. Kitler	32
2.1.6. Diğer maddeler	32
2.2. Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	33
2.3. Metot	34
2.3.1. Çalışmada kullanılan ortamın ve malzemenin temizliği ve sterilizasyonu	34
2.3.2. Bitki ekstraktlarının hazırlanması	34

2.3.3. Hücre kültürü deneyleri	35
2.3.3.1. Hücre kültüründe kullanılacak malzemelerin hazırlığı	35
2.3.3.1.1. DMEM-F12 hazırlanması	35
2.3.3.1.2. FCS'nin kullanıma hazırlanması	36
2.3.3.1.3. Çözelti ve ilaçların hazırlanması	36
2.3.3.2. Hücre kültürü teknikleri	37
2.3.3.2.1. Hücre soyunun açılması	37
2.3.3.2.2. Hücrelerin çoğaltılması	37
2.3.3.2.3. Hücrelerin pasajlanması	37
2.3.3.2.4. Hücre sayımı	38
2.3.3.2.5. Hücrelerin dondurulması ve saklanması	38
2.3.3.3. Antitümör aktivite deneyleri	39
2.3.3.3.1. Hücrelerin hazırlanması	39
2.3.3.3.2. Ekstraktların çözünmesi	39
2.3.3.3.3. Tek sıralı monolayer hücre kültürü deneyleri	39
2.3.3.3.3.a. Monolayer sonuçlarının değerlendirilmesi	40
2.3.3.3.4. Üç boyutlu sferoid modelde hücre kültürü deneyleri	40
2.3.3.3.4.a. Üç boyutlu sferoid kültürlerin değerlendirilmesi	41
2.3.3.3.4.a.1. Üç boyutlu sferoid deney modelinde ışık mikroskobu takibi ve parafin bloklama	42
2.3.3.3.4.a.2. BrdU'lu parafin kesitlere immunohistokimya uygulaması	43
2.3.3.3.4.a.3. Hematoksilen-eozin (Ehrlich) boyama	44
2.3.4 İstatistikî analizler	45
3. BULGULAR	46
3.1 <i>Salvia tomentosa</i> /Metanol ekstraktının monolayer hücre kültüründe C6 Glioma hücre soyuna etkileri	48
3.2. <i>Salvia tomentosa</i> /Petrol eteri ekstraktının monolayer hücre kültüründe C6 Glioma hücre soyuna etkileri	51
3.3. <i>Salvia tomentosa</i> /Kloroform ekstraktının monolayer hücre kültüründe C6 Glioma hücre soyuna etkileri	54
3.4. Üç boyutlu sferoid hücre kültürlerinde antitümör aktivitenin değerlendirilmesi	57
3.5 Üç Boyutlu sferoid kültürlerde hematoksilen-eozin boyası ile sferoid morfolojisi değerlendirmeleri	64
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	68
5. KAYNAKLAR	76

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
A	<i>Salvia tomentosa</i> /Metanol ekstraktı
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
Atm	Atmosfer
ATTC	Avrupa Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu
B	<i>Salvia tomentosa</i> /Petrol eteri ekstraktı
BrdU	Bromodeoksiüridin
BrUdR	5-bromodeoksiüridin
C	<i>Salvia tomentosa</i> /Kloroform ekstraktı
°C	Santigrad derece
C6	Sıçan glioma hücre soyu
CaCl ₂	Kalsiyumklorür
CDI	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri
CDK	Siklin-bağımlı kinaz
CH ₃	Metil grubu
CIUdR	5-klorodeoksiüridin
CO ₂	Karbondioksit
(COOH)-	Karboksil kökü
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM-F12(HAM)	Dulbecco's Modified Eagles Medium (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F12 Ham Medyumu)

DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Epikateşin
EGCG	Epigallokateşin
FCS	Fötal sığır serumu
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GBM	Glioblastoma multiforme
GT	Glutasyon transferaz
GTP	Guanozin trifosfat
[³ H]-TdR	[³ H]-Timidin
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HRP	Horseradish peroksidaz
IU/ml	Ünite/mililitre
IUdR	5-iyododeoksiüridin
LDL	Low density lipoprotein
mg	Miligram
ml	Mililitre
M.B.	Mikroskop büyütmesi
M.Ö.	Milattan önce
NaOH	Sodyum hidroksit
(NH ₂) ⁺	Amino grubu
PBS	Fosfat buffer saline
RNA	Ribontükleikasit

rpm	Round per minute
Syn.	Sinonim
TCM	Traditional Chinese Medicine
TLI	Thymidine Labeling Indeks
UV	Ultraviyole
Vb.	ve benzeri
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
μ	Mikro
γ	Gamma
α	Alfa
β	Beta

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1.	Hücre siklusu ve kontrol noktaları	4
Şekil 3.1.	C6 hücrelerinin mikroskop görüntüsü (M.B.X73)	47
Şekil 3.2.	<i>Salvia tomentosa</i> /metanol ekstraktının (A maddesi) C6 hücre soyunda hücre sayısı üzerine zamana bağlı etkisi. * istatistiki olarak anlamlı değerleri göstermektedir.	49
Şekil 3.3.	<i>Salvia tomentosa</i> /petrol eteri ekstraktı (B maddesi) uygulanmış C6 hücrelerinde çözücü kontrolü ve distile su verilmiş normal kontroldeki hücre popülasyonunun zamana göre değişimi	52
Şekil 3.4.	<i>Salvia tomentosa</i> /petrol eteri ekstraktının (B maddesi) C6 hücre soyunda hücre sayısı üzerine zamana bağlı etkisi. * istatistiki olarak anlamlı değerleri göstermektedir. 24 ve 72 saatlerde kontrol X ekstrakt, 48 de ise çözücü X ekstrakt karşılaştırılmıştır.	52
Şekil 3.5.	<i>Salvia tomentosa</i> /kloroform ekstraktı (C maddesi) uygulanmış C6 hücrelerinde çözücü kontrolü ve distile su verilmiş normal kontroldeki hücre popülasyonunun zamana göre değişimi	55
Şekil 3.6.	<i>Salvia tomentosa</i> /kloroform ekstraktının (C maddesi) C6 hücre soyunda hücre sayısı üzerine zamana bağlı etkisi. * istatistiki olarak anlamlı değerleri göstermektedir. 24 ve 72 saatlerde kontrol X ekstrakt, 48 de ise çözücü X ekstrakt karşılaştırılmıştır.	55

Şekil 3.7.	1x 10 ⁶ %100 canlı C6 Glioma hücresinin %3'lük agar-medyum karışımı üzerine ekildikten 7 gün sonra oluşan canlı sferoid resimleri (M.B.X148) .	58
Şekil 3.8.	1x 10 ⁶ %100 canlı C6 Glioma hücresinin %3'lük agar-medyum karışımı üzerine ekildikten 7 gün sonra oluşan canlı sferoid resimleri (M.B.X148).	58
Şekil 3.9.	Üç boyutlu sferoid kültürlerde deney gruplarının 48 saat inkübasyon süresi sonunda son bir saatte 20 µM'lık BrdU inkübasyonu sonrası monoklonal BrdU antikoru ile immunohistokimyasal boyama işlemi sonrasında BrdU-LI verileri	59
Şekil 3.10	1x10 ⁶ C6 Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 9 gün sonra son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapılmış ve parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış kontrol grubu sferoidlerin resimleri. Sferoidde çok sayıda kırmızı görünen BrdU(+) hücreler izlenmektedir (M.B.X132) .	60
Şekil 3.11.	1x10 ⁶ C6 Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 9 gün sonra son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapılmış ve parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış kontrol grubu sferoidlerin resimleri. Sferoidde çok sayıda kırmızı görünen BrdU(+) hücreler izlenmektedir (M.B.X83).	60
Şekil 3.12.	1x10 ⁶ C ₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra A 100 (Metanol 100 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerin resimleri. Sferoidlerden bütünlüğünü koruyanların periferinde az sayıda olmakla beraber kırmızı görünen hücreler	

izlenmektedir (M.B.X83).

61

Şekil 3.13.

1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü bozulmuş sferoidlerin proliferasyon zonu kabul edilen dış zon hücrelerinde az sayıda tutunma. 1-2 adet BrdU(+) sayılabilecek hücreler görülmekte (M.B.X331) .

61

Şekil 3.14.

1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü bozulmuş sferoidlerin proliferasyon zonu kabul edilen dış zon hücrelerinde az sayıda tutunma. 1-2 adet BrdU(+) sayılabilecek hücreler görülmekte (M.B.X331).

62

Şekil 3.15.

1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra C 10 (kloroform 10 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü korunmuş olmasına rağmen işaretlenme oldukça düşük seviyede gözlenmektedir. Çok az sayıda zayıf işaretli hücreler görülmektedir (M.B.X331).

62

Şekil 3.16.

1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra C 10 (kloroform 10 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu

	sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü korunmuş olmasına rağmen işaretlenme oldukça düşük seviyede gözlenmektedir. Çok az sayıda zayıf işaretli hücreler görülmektedir (M.B.X132).	63
Şekil 3.17.	1x 10 ⁶ %100 canlı C6 Glioma hücresinin %3'lük agar üzerine ekildikten 9 gün sonra tesbit edilen kontrol grubu sferoidlerine ait parafin kesitlerden hazırlanan ve hematoksilin-eozin boyası ile boyanmış resimler (M.B.X83) .	65
Şekil 3.18.	100 (Metanol 100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoksilin-eozin boyanmış parafin kesitler. A100 ekstraktının sferoid bütünlüğünü bozduğu görülmektedir (M.B.X83).	65
Şekil 3.19.	A 100 Ekstraktı (100 µg/ml) uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan preparatlarda sferoidlerin ekstrakta karşı farklı reaksiyon verdiği görülmektedir. Sferoidlerin bazılarında dejenerasyon ve dağılma görülmektedir (M.B.X83).	66
Şekil 3.20.	B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoksilin-eozin boyanmış parafin kesitler. B 100 ekstraktının sferoid bütünlüğünü bozduğu görülmektedir (M.B.X83).	66
Şekil 3.21.	B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoksilin-eozin boyanmış parafin kesitler. B 100 ekstraktının sferoid bütünlüğünü bozduğu görülmektedir (M.B.X132).	67
Şekil 3.22.	C 10 (kloroform 10 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoksilin-eozin boyanmış parafin kesitler. Sferoid bütünlüğünün diğer gruplardan daha çok korunduğu görülmektedir (M.B.X83).	67

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Bazı onkogenler ve etkiledikleri kanser türleri	6
Çizelge 1.2	Bazı tümör baskılayıcı genler ve etkiledikleri kanser türleri	7
Çizelge 1.3	Bazı <i>Salvia</i> türleri ve etnobotanik kullanımı	19
Çizelge 1.4.	<i>Salvia tomentosa</i> 'nın uçucu yağ bileşenleri ve yüzdeleri	21
Çizelge 2.1	Deneyleerde kullanılan laboratuvar gereçleri	33
Çizelge 2.2.	Doku kültürü deneylerinde kullanılan çözelti ve ilaçların hazırlanması	36
Çizelge 2.3.	İmmunohistokimyada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	43
Çizelge 3.1.	<i>Salvia tomentosa</i> /Metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı minimum, maksimum ve ortalama değerleri ile istatistiki verileri	50
Çizelge 3.2.	<i>Salvia tomentosa</i> /Petrol eteri ekstraktının farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı minimum, maksimum ve ortalama değerleri ile istatistiki veriler	53
Çizelge 3.3.	<i>Salvia tomentosa</i> /Kloroform ekstraktının farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı minimum, maksimum ve ortalama değerleri ile istatistiki verileri	56

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince paylaştığı değerli bilgileri, esirgemediği yardım, destek ve ilgisi için danışman hocam Balıkesir Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Feray KÖÇKAR'a,

Tezimin pratik çalışmaları süresince bilgisini benimle paylaşan ve yönlendiren, sonsuz ilgi ve yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e,

Çalışmalarım sırasında sonsuz yardım ve desteğinden dolayı Biyolog Sevilcan TUNA'ya ve Füsun ÖNCÜ'ye,

Yardım ve önerileri için Dr. A. Meriç ALTINÖZ'e,

Yardımları ve manevi destekleri için Selahattin ÜNAL ve Sibel DOĞAN'a ,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, elemanlarına ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Bitkilerin temini ve teşhisi için Balıkesir Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih SATIL'a ve Biyolog Rıdvan POLAT'a,

Başım sıkıştığı heran manevi desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, beni yalnız bırakmayan arkadaşım Biyolog Alp ALPER'e,

Her türlü yardımından dolayı Balıkesir Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü asistanı Onur Turhan'a,

Yardım ve desteklerini gördüğüm Balıkesir Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü asistanlarına, özellikle zor günlerimde destek olan Arş. Gör. Berna SANÖN, Araş. Gör. Dr. Serdar SAK ve Araş. Gör. Dr. Olga SAK'a,

Ayrıca hayatımın her anında bana destek olan, bu günlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme, sevgili babam Neşet DENİR'e ve annem merhume Sadet DENİR'e, hayatıma anlam katan canım kardeşim Mustafa Murat DENİR'e ve iyi ki varsınız dedirten babaannem Mediha DENİR ve dedem Selami DENİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Eylül-2005

Seçnur DENİR

1. GİRİŞ

Kanser, vücut hücrelerinin anormal şekilde vücut içine yayılması ve kontrolsüz olarak çoğalmasıyla karakterize edilen bir hastalıktır [1].

Kanser ingilizce yengeç anlamına gelir. Yengeç, düşmanını kısırdıktan sonra uzun, dişli kollarıyla sıkıca tutar ve yavaş yavaş kemirerek yok eder. Tedavi edilmediği takdirde insanı giderek zayıflatıp halsiz hale düşüren ve sonucunda da öldüren hastalığa bu nedenle 'kanser' adı verilmiştir [2].

Çoğalma ya da büyüme genlerin kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kanser türlerinde etkilidir. Genlerdeki bozukluklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan meydana gelen mutasyon adı verilen değişikliklerle de oluşabilir [2]. Mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği kabul edilmektedir. Çoğunlukla kalıtımla aktarılan bir hastalık olmamasına rağmen kanser, somatik hücre düzeyinde genetik bir hastalıktır [3]. Somatik hücrelerdeki mutasyonlar gelecek nesillere aktarılmaz. Bazı durumlarda bu tip değişiklikler kalıtımla aktarılır ve kansere karşı genetik bir yatkınlığın kazanılmasına neden olur. Kanser vakalarının % 1'inde meydana gelen bu durum eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonların sonraki nesillere aktarılmasıyla sağlanır. Bazen kalıtsal mutasyonlar kanser oluşumunda tek başına yetersiz kalır. Kanser oluşumunun tamamlanması ve homozigot genlerin oluşması için homolog lokuslarda ilave somatik mutasyonlar gerekir [3]. Kanserle ilişkili olan genomik değişiklikler tek nükleotid değişimi gibi küçük ölçekli veya kromozom bazında olan büyük ölçekli değişiklikler olabilir. İnsan tümörlerinin büyük çoğunluğunda gözle görülür büyük kromozomal değişikliklere rastlanır [3].

Kanser, çok hızlı yayılım göstermesi özelliği nedeniyle tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Çok farklı tedavi stratejileri kullanılarak bu sorun çözülmeye çalışılmaktadır. Bu farklı tedavi stratejilerinin ortak amacı tümörün kontrol altına alınarak büyümesinin önlenmesi ya da tedavisinin sağlanarak yok edilmesidir. Ancak bu süreç o denli zordur ki, çok sayıda yan etkiyi de beraberinde getirerek metabolizmayı altüst eder. Bu amaçla dizayn edilen antikanser ajanların hücre düzeyinde etkilerinin çok iyi araştırılması ve tedavinin de son derece kontrollü şekilde sürdürülmesi gerekmektedir.

Tüm bunlarla birlikte bilinen bir gerçek de kanserin günümüzün korkulu hastalığı durumuna gelmiş olmasıdır. Bunun nedenlerinin başında hastalığın bir çok tipinin sinsice seyretmesi ve günümüzdeki tedavi metodlarının bir çoğunun hastalığı yavaşlatıcı etkiden öteye gidemeyişidir. Her ne kadar erken teşhisin pozitif getirilerinin olduğu bilinse de hastalığın tedavi aşamasında bu durumun bile yetersiz kaldığı vakalara sıkça rastlanabilmektedir [1].

Bitkisel tedavi yöntemleri insanların eskilerden beri başvurdukları bir umut kapısıdır. Ancak bitkilerin kullanımı da son derece hassas olunması gereken bir konudur. Bu nedenle bitkilerin bilinçsiz kullanımı önlenmeli ve bu konuda çalışmalara daha geniş yer verilmelidir.

1.1. KANSERİN MOLEKÜLER TEMELİ

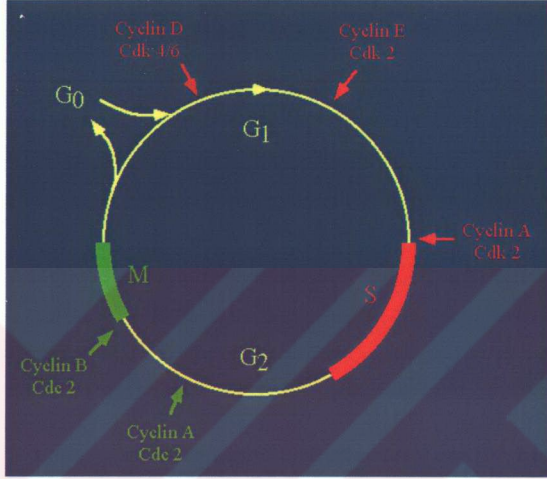
Memeli hücreleri mitoz bölünmeler ile çoğalırlar. Bir hücre ikiye bölünerek, kendisi ile aynı sayıda ve özellikte kromozomları içeren iki yavru hücre oluşturur. Sürekli bölünen hücrelerde, her mitoz bölünmeden sonra yeni bir nesil oluştuğu için hücre yaşlanması söz konusu değildir. Mitoz bölünme ile oluşan yavru hücrelerin her biri belli bir zaman aralığı sonunda ikinci bir mitoz bölünme geçirirler ve bu olaylar sürekli olarak tekrarlanır. Bu sürece 'hücre siklusu' adı verilir [4, 5, 6].

Sürekli bölünen bir hücre popülasyonu, ışık mikroskobu ile incelenirse, hücre siklusu içinde yalnızca mitoz (M) fazındaki hücrelerin morfolojik açıdan diğerlerinden farklı oldukları görülür [5]. Doku kültürü koşullarında ve bir petri kutusunun içinde yetiştirilen hücrelerde bölünmeye başlarken, bir yandan kromozomların görünür hale geçtiğini, diğer yandan da petrinin dibine yapışma derecesinin giderek azaldığını ve yayılmış şekilden yuvarlak şekle dönüştüğünü görürüz [4]. Küresel hale geçen ana hücre ikiye bölünür, bölünmeden hemen sonra yavru hücrelerin her biri tekrar cam yüzeye yayılarak yapışır ve yeniden çok yüzeyli şekil alırlar. Bunun dışında kalan tüm hücreler interfaz hücreleridir ve ışık mikroskobunda aynı morfolojik özellikleri gösterirler [4, 5].

Hücre bölünmeleri ve iki hücre bölünmesi arasında yer alan interfaz evresini oluşturan fazlar, birbirlerini peşpeşe izleyen olaylar oldukları ve her hücre neslinde tekrarlandıkları için, hücre siklusu aşağıdaki gibi bir daire şeklinde gösterilmektedir (Şekil 1.1). Hücrenin bu dairenin belli bir noktasından, ok doğrultusunda, yine aynı noktaya gelmesi için geçen süreye, 'jenerasyon süresi', 'mitotik siklus' ya da 'hücre siklusu süresi' adı verilir ve kısaca (Tc) sembolü ile ifade edilir [4, 5].

Hücre siklusu 4 fazda toplanır: G1, S, G2 ve mitoz. DNA sentezi S fazında meydana gelir [5, 6]. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, S, G2 ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler [2, 7, 8].

Sürekli bölünen memeli ise hücreleri ister *in vitro* ister *in vivo* koşullarda olsunlar, sırası ile; M, G1, S ve G2 fazlarından oluşan bir hücre siklusuna sahiptirler. Ancak değişik hücre tiplerinde bu fazların her birinin süreleri ve buna bağlı olarak da toplam hücre siklusu süreleri farklıdır [5, 6]. Mitotik faz bu fazların en kısasıdır (24 saatlik döngünün 1 saatlik kısmını kaplar). G1 fazı ise en uzun fazdır (yaklaşık 11 saat kadar sürer). S fazı 8 saatte tamamlanır. G2 ise 4 saat kadar sürer [6].



Şekil 1.1. Hücre siklusu ve kontrol noktaları [9]

Hücreyi bölünmeye sevk eden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyali alındığında, sinyal iletimi adı verilen ileti mekanizması (örneğin, MAP Kinaz, Protein Kinaz C veya JACK-STAT yolları) devreye girer. Bu ileti mekanizması hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller ya da nukleusa ulaşarak doğrudan transkripsiyonu kontrol eder [2, 7, 8]. Normal hücre büyümesi ve farklılaşmasında sinyal moleküllerinin kritik rolünden dolayı, hücre sinyal molekülleri kanser araştırmalarında önemli yer tutarlar [6].

Hücre siklusu, siklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre siklusunun

çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça karışık bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör subüniteleri, CDK'lar ise katalitik subüniteleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusun çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken, diğer taraftan da yıkılırlar. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. Yıkımları ise ubiquitin metabolik yoluyla sağlanır. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak ekspre edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip siklin D'nin ekspre edileceği doku tipine özgüdür.

Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'ların kendisi ya da siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler [2, 8, 10].

Hücre siklusunda görev yapan, hücrenin büyüme ve çoğalmasında da aynı zamanda kontrol eden proteinlerin genlerindeki bir mutasyonla kanser adını verdiğimiz hücrenin kontrolsüz bölünmesi gerçekleşir. Bu nedenle hücre siklusunda hücrenin bölünmesini teşvik eden genlere protoonkogenler denir ki bu genlerdeki herhangi bir mutasyon sonucu genler sürekli ekspre olarak kanser hücreleri oluştururlar (Çizelge 1.1) [2]. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için bu genler ve/veya gen ürünleri inaktifleştirilmiş olmalıdır. Eğer proto-onkogenler sürekli çalışır hale gelirse hücre bölünmesine neden olur, bu da tümör oluşumuna öncülük eder [3]. Bu şekilde değişikliğe uğramış protoonkogenlere onkogen denir. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesinde etkili olan en az üç mekanizma vardır: Bunlar nokta mutasyonları, translokasyonlar ve aşırı gen ifadesidir [2].

Çizelge 1.1 Bazı onkogenler ve etkiledikleri kanser türleri [2].

Gen	Mutasyonu Belirlenmiş Kanseri Tipi
Ras Genleri	Pankreas Bağırsak Akciğer Endometrium Lösemi Mesane
EGFR	Glioma
NEU	Meme Over Mide
MYC Genleri	Burkitt Lenfoma Akciğer Nöroblastoma
BLC-2	B-Lenfoma
CYCD-1	Meme B-Lenfoma
BCR-ABL	T-Lenfoma
SMO	Deri

Kontrol noktalarında görev yapıp gerekli uyarılarca bölünmeyi durdurucu özellikteki genlere de tümör baskılayıcı genler adı verilir (Çizelge 1.2). Mutasyonlarla inaktive olduklarında hücre siklusundaki kontrol edici özellikleri yok olduğundan kontrolsüz büyüyen kanserli hücre oluşur [2].

Tümör baskılayıcı genler içinde en önemli olanı p53 baskılayıcı geni potansiyel tümör hücrelerini öldürerek ya da hücre siklusunun G1 fazında yakalayarak kanser gelişmesini engellemede çok önemli bir rol oynar. p53 genindeki mutasyonlar, p53 aktivitesinin kaybolmasına sebep olur ve bu durum insan tümörlerinin yaklaşık yarısında gözlenmektedir. Birçok insan kanserinin mutant p53 supressör genine sahip olduğu bulunmuştur [2, 11, 12].

Çizelge 1.2 Bazı tümör baskılayıcı genler ve etkiledikleri kanser türleri [2]

Gen	Mutasyonu Belirlenmiş Kanser Tipi
RB1	Birçok Kanser
p53	Birçok Kanser
P16	Birçok Kanser
APC	Bağırsak
MSH2	Bağırsak Endometrium
MLH1	Mide Bağırsak Endometrium
WT-1	Mide
WT-1	Wilm's Tümörü
NF1	Melanoma
NF1	Nöroblastoma
BRCA1	Yumurtalık

1.2. KANSER TEDAVİSİ VE KULLANILAN YÖNTEMLER

Kanser tedavisi son derece masraflı ve gerek hasta gerekse çevresi için zor aşamaları içeren bir tedavi şeklidir.

Kansere klinik olarak 3 tip yaklaşım vardır: Cerrahi yaklaşım, radyasyon ve kemoterapi [1].

Genellikle kanser terapilerinde cerrahi müdahale çıkarılabilir tipte kansere sahip hastalar için başarılı geçer. Fakat müdahaledeki başarısızlık metastatik yayılımlara ya da tekrarlayan lokal primer tümörlere sebebiyet verir. Bundan dolayı integre bir terapötik yaklaşım istenir. Bu durumda cerrahi sırasında ya da sonrasında antikanser ajanların kullanılması yararlı olabilir [1].

Kemoterapi sistemik bir tedavi şeklidir, başka bir deyişle, kan dolaşımı aracılığı ile vücudun tüm bölgelerine yayılır, vücuttaki tüm dokuları etkiler. Bu açıdan kemoterapi, ameliyat ve radyoterapi gibi yerel tedavi amaçlayan tedavilerden farklıdır [2].

Kemoterapi devri 1940'ların sonunda klasik alkilleyici ajanların (nitrojen mustard, siklofosfamid) ve antimetabolitlerin (methotrexate, 5FU) özellikle lenfoma ve lösemilerin tedavisi için klinik uygulamalarda kullanılması ile başlamıştır. Bitki alkaloidleri ve hormonal ajanlar ise daha yeni ve etkili antitümör ilaçlardır [2, 13].

Kanser kemoterapisinde amaçlanan kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek sitotoksik etki sağlamaktır. Genellikle hücre replikasyonunu sağlayan metabolik olayların engellenmesi amaçlanır; örneğin DNA ve RNA sentezi için gerekli olan pürin ve pirimidin bazlarının işlevlerinin bozulması gibi. Etkilenen hücreler hücre döngüsünün farklı fazlarında olabilir [14]. Bazı ilaçlar faz spesifik olup hücreleri sadece belli fazlarda etkilerlerken bazıları da faza spesifik değildir ve döngünün herhangi bir fazında hücreye etki edebilir [15]. İdeal olarak bu ilaçların sadece malign hücreleri

etkilemesi amaçlanır. Ancak kullanımda olan ilaçlar kanser hücrelerine spesifik etki gösterememekte ve bölünmekte olan tüm normal ve anormal hücreleri etkilemektedir. Bu nedenle kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların hepsinin toksik ve tedavi edici etkilerinin doz-yanıt eğrileri diktir. İlaç dozunun hastanın fiziksel durumuna göre ayarlanması çok önemlidir. En fazla etkilenen hücreler hızlı çoğalan hücrelerdir [1, 14]. Ayrıca klinik olarak kullanılan bir çok kanser ilacı sadece bölünmeyi engelleyici etkiye sahip olmasına rağmen, metaztaza eğilimde özel bir etkileri yoktur [1].

Radyoterapi ise, tümör hücrelerinin kuvvetli radyasyon kullanılarak yok edilmeye çalışıldığı tedavi şeklidir. Bunun için elektronların ağır bir metal hedefe çarpmaları sonucu meydana gelen X ışınları ve radyoaktif bozunma sonucu meydana gelen gama ışınları kullanılmaktadır.

Radyoterapide radyasyon tümörün bulunduğu bölgeye doğru yönlendirilir. Bu yöntemde sağlıklı dokular mümkün olduğunca korunmaya çalışılır ancak radyasyon tümöre ulaşırken, tümörün çevresindeki sağlıklı dokulara da temas eder. Sağlam hücreler X ışınlarına daha dayanıklıdır. DNA tamirini daha iyi yaparlar ve çoğalma mekanizmalarını daha iyi kontrol ederler [2, 13].

Ayrıca günümüzde kullanılmakta olan gen tedavisi, immunoterapi, antikor tedavisi ve kanser aşılı da kanser tedavisi için umut verici tedavi yöntemleridir [2].

Gen tedavisi ile kansere neden olan bozukluğun onarımı hedeflenmektedir. İmmunoterapi ile vücudun kendi bağışıklık sistemini güçlendirerek kanser hücrelerinin öldürülmesi hedefleniyor. Antikor tedavisinde ise belirli tümör hücrelerine karşı çok özel antikorlar geliştirilip, daha sonra bunlarla kanser hücrelerini öldürmek amaçlanmaktadır. Kanser aşılı kansere karşı bağışıklık oluşturmayı amaçlayan aşılardır ve henüz deney aşamasında olan ilginç tedavi yöntemlerindedir. Bu yöntemde önce tümör dokusundan antijenik özelliğe sahip moleküller alınır. Bu antijenler hayvana verilip bağışıklık sistemi aktif hale geçirilir ve B hücreleri çok miktarda antikor salgılar. Bu antikorlar özel yöntemlerle toplanarak, hastanın kan dolaşımına verilir. Bu antikorlar

tümör dokusuna ulaştıklarında kanser hücrelerine yapışırlar. Antikor bağlayan kanser hücreleri hastanın bağışıklık sistemi tarafından daha kolay algılanır. Kanser hücresi yüzeyindeki antikora bağlanan bazı moleküller de bir dizi reaksiyon sonucu kanserli hücreyi parçalar [2].

1.3. KANSER VE UMUT = BİTKİSEL TEDAVİLER

Hastalıkların tedavi edici değere sahip taze ve kurutulmuş bitki kısımları (DROG) ya da bunlardan elde edilen ekstraksiyon ürünleri kullanılarak üretilen çay, damla, draje, kapsül, şurup, tablet ile tedavi edilmesi “fitoterapi” olarak değerlendirilmektedir. Fitoterapi farmakognozinin modern tedaviye uygulanışı olarak görülmektedir [16].

Şifalı bitkiler asırlardır yiyecek olarak ve tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır ve insan sağlığının ve yaşam kalitesinin artırılmasında binlerce yıldır önemli bir role sahiptirler [17]. Bitkilerin hastalıkların tedavisinde kullanılmasının ilk bilimsel izleri ve yazılı delilleri beşbin yıl öncesi erken dönem Çin, Hint ve Yakınoğu medeniyetlerine kadar uzanmaktadır [16, 18]. Özellikle Traditional Chinese Medicine (TCM) botanik kullanımı binlerce yıla dayanan zengin tarihe sahip bir kültürün içinde gelişmiştir [17, 18, 19].

Anadolu halkının yabani bitkileri ilaç olarak kullanışı çok eski devirlere kadar uzanmaktadır. Hititler dönemi yazıtlarında bulunan reçete formüllerinde kayıtlı bitki adları bunun bir kanıtıdır [20].

Bugün dünyanın pek çok ülkesinde alternatif tıp son derece ilerlemiş ve bir çok hastalığın tedavisinde insanlığın hizmetine sunulmuştur. Doğa yeryüzündeki en büyük eczanedir. Bilimin görevi bu büyük eczaneyi insanlığın hizmetine açmaktır.

Gerek insan sağlığı ve gerekse doğa ve evre sağlığı fitoterapinin gerekliliğini gulendirmektedir. Bugün dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler en seçkin ilaç kaynaklarındandır. Büyük farmasötik firmalar yüksek bitkilere yeniden ilgi göstermektedirler [16].

Son yıllarda fitoterapinin daha fazla anlam kazanmasında geleneksele karşı olan eğilimin yanı sıra tıbbi bitkilerin yeni formlarda sunulmasının da rolü vardır. Dünya Sağlık rgt (WHO) dünya nüfusunun % 60'ının sentetik ilaçları hiç kullanmadığını dörtte nn kendi geleneksel kültürlerindeki esas olarak bitkisel kaynaklı olan ilaçlara güvendiğini ve bunları kullanmaya devam ettiklerini saptamıştır [16]. Bu tedavilerin birçoğu bitki ekstraktlarının ya da onların aktif bileşenlerinin kullanımına dayanır. Ayrıca birçok batısal ilaç da orijini bitki ekstraktlarından alır [17]. Amerika'da halen ticari olarak bitkilerden ekstre edilen ilaçların % 75'i etnobotanik bilgiler sonucunda elde edilmiştir. Amerika'da reçetelenmiş ilaçların % 25'i doğal rnlerken diğer bir % 25 de doğal ürünlerden hareketle türevlenen maddelerden oluşmaktadır [16].

Kanser tedavisinde her ne kadar umut verici gelişmeler olsa da, bunlara hastalığın tip sayısının yksekliliğini ve başarı yüzdesinin düşüklüğü eklendiğinde insanlar bu zorlu yolda belki de şanslarını bir parça daha artırdıklarını düşündükleri alternatif metotlara başvurmaya başlarlar. Bunların başında da bitkisel tedavi metotları gelir.

1.3.1. ANTİTÜMÖR AKTİVİTEYE SAHİP BİTKİLER

Farklı yaygınlıkta kullanılan şifalı bitkiler Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından sahip oldukları kanser önleyici özelliklere göre tanımlanmışlardır. Bu şifalı bitkiler *Allium sp.* (sarımsak, soğan vb.) yelerini; *Labiatae* familyası üyelerini (fesleğen, nane, biberiye, adaçayı ve kekik); *Zingiberaceae* familyası üyelerini (safran ve zencefil); meyan kökü; yeşil ay; *Umbelliferae* (havuç) familyası üyelerini (anason, kimyon, kereviz, frenk maydanozu, kişniş , dereotu, rezene ve pırasa) ve *Artemisia sp.*'yi içerir [17].

Araştırmacılar bu bitkilerde bir çok kanser kemoprotektif fitokimyasal maddeler tanımlamışlardır. Buna ilaveten, legumenler, meyve ve sebzelerdeki çalışmalarda grldđđ üzere kanser kemoprotektif özellikte birçok bitki çok sayıda farklı fitosteroller, triterpenler, flavonoidler, saponinler ve karotenoidler içerirler. Bu yararlı bileşenler, antioksidantlar ve elektrofil toplayıcıları gibi rol oynayarak, immun sistemi uyarırlar, kanser gelişimi ile ilgili hormonal olayları ve metabolik yolları inhibe ederler [17].

Farklı fitokimyasallar koruyucu antioksidan enzim olan glutatyon trasferazı uyararak tümör düzenlenmesini inhibe ederler. GT, elektrofillerle glutatyon reaksiyonunu az toksik, suda iyi çözünen ve kolayca elde edilebilen bileşen formuna katalize eden detoksifiye enzimidir [17].

Araştırmalar göstermektedir ki; bitkilerdeki terpenoidler tümör ilerleyişini geciktirir ve tümörü küçültür, terpenoidler total ve LDL- kolesterol konsantrasyonunun da önemli derecede azalmasını sağlarlar. Bu yüzden kalp hastalıkları riskini azaltırlar. Çeşitli bitkilerde bulunan farklı terpenoidler güçlü antioksidant aktiviteye sahiptirler [17].

Chelidonium majus L. bitkisinden izole edilen ve Chelidonin alkaloidinin bir semi-sentetik tiofosforik asit bileşeni olan Ukrain, birçok onkolojik hastada tümör gelişimi ve metastazda gerilemeye neden olmuştur. Gelişimin farklı evrelerinde, çeşitli karsinomlara sahip hastaların Ukrain ile tedavisiyle ilgili 400'den fazla doküman vardır. Araştırmacılar göre Ukrain tedavisi; genel durumun yoluna konması, tümör gelişiminin yavaşlatılması ve onun immun uyarıcı etkisi gibi 3 farklı yolla etkili olmaktadır [21]. *Chelidonium majus L.* bitkisi alkaloidlerinden türevlenen semisentetik bir ilaç olan tiofosforik asit bileşeni olan ukrainin [21-24] insan kaynaklı 8 farklı kanserin 60 malignant hücre hattında % 100'lk bir büyüme inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiş, 5-20 mg'lık bu klinik tedavi sürecinde ve gönüllüler üzerinde yapılan 50 mg üzeri çalışmalarda da herhangi bir yan etki ya da reaksiyon gözlenmemiştir [21-24]. Yeterli olmayan kemoterapi ve radyasyon tedavisi sırasında

ukraininin Ewing sarkomunda tümör gerilemesine neden olduğu gözlenmiştir. Ukrain klinik olarak kolon kanserinde de etkilidir. Amerikan Kanser Enstitüsü tarafından yapılan çalışmalarda kolon kanserinin ukraine karşı yüksek derecede duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Çeşitli kanser tiplerinin farklı evrelerindeki hastalarla yapılan çalışmalarda ukrainin tümör ilerleyişini azaltarak yaşam süresini uzatıcı ve kemoterapötiklere karşı son derece hassas olan hücrelerde immun sistemi uyarıcı, düzenleyici etkisinden bahsedilmektedir [21, 23, 24]. Ukraine ilişkin ilgi çekici bir durum da, malignant insan tümörlerine karşı seçici sitotoksik etki göstermesi ve normal hücrelerde bu etkisini göstermemesidir [23, 24].

İnsanlar için kansere karşı koruyucu yeşil çaya olan evrensel ilgi, yeşil çayın non-toksik olması ve etki ettiği organ çeşidinin fazla olması nedeniyle son zamanlarda artış göstermiştir. (-)-Epigallokateşin gallet (EGCG) yeşil çayın ana bileşenidir. Diğer bileşenleri ise (-)-epikateşin gallet, (-)-epigallokateşin ve (-)-epikateşin (EC)'dir. EGCG ve yeşil çay ekstraktlarının kemirgenlerdeki karsinogenezis ve hücre kültür sistemleri ve insan epidemiyolojisine etkisini araştıran çok sayıda çalışma mevcuttur. Mevcut sonuçlar EGCG ve yeşil çayın kansere karşı koruyucu etkisinde birbirini takip eden önemli özellikleri işaret etmektedir: Kemirgen ve insanlara karşı non-toksiktirler. Geniş bir etki alanı vardır (sindirim sistemi (özofagus, mide, duodenum, kolon), karaciğer, akciğer, pankreas, deri, meme, safra kesesi ve prostat). Farklı insan kanseri hücre hatlarında büyümeyi inhibe eder. Farelerde akciğer metastazlarını inhibe eder [25].

Kanser başlamadan önce kanser koruyucu ajanlar, inaktif kanser hücrelerinin büyümesini önleyerek kanser oluşumunu geciktirirler. Tedavi sonrası klinik olarak sağlıklı kanser hastaları, kanserin yinelenme riskini, ikincil tümörleri ve metastazı önlemek için yeşil çay içebilirler. Kanser öncesi ve kanser tedavisi sonrası yeşil çay içilerek kansere karşı daha güçlü olunabilmektedir [25].

Vinkristin ve vinblastin Cezayir menekşesi adı verilen bir bitkiden (*Vinca rosea*) elde edilen ve yapısal olarak birbirine benzeyen ilaçlardır. Bu nedenle vinca alkaloidleri

olarak adlandırılırlar. Bu ilaçlar, hem hücre döngüsüne hem de faza spesifik ilaçlardır. Çünkü metafazda mitozu durdururlar. Mikrotübüler protein olan tübüline bağlanmaları GTP'ye bağımlıdır ve tübülün polimerize olarak mikrotübülleri oluşturmasını engellemektedir. Mikrotübüllerin yerine tübülün dimerleri ile alkaloid ilacı içeren parakristalin agregatları meydana gelmektedir. Mitoz mekiği bozularak kromozomların ayrılması ve hücre bölünmesi engellenir. Bu iki ilaç yapısal olarak birbirlerine çok benzemelerine rağmen tedavide farklı amaçlarla kullanılırlar. Genellikle diğer ilaçlarla birlikte kullanılırlar [17]. Vinkristin çocuklarda akut lenfoblastik lösemi, Wilm's tümörü, yumuşak dokuların Ewing sarkomu, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomaların ve diğer hızlı büyüyen neoplazmaların tedavisinde kullanılmaktadır. Metastatik testis tümörlerinin tedavisinde vinblastin, bazı ilaçlarla kombine olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomaların tedavisinde de kullanılmaktadır [17].

Yeni bir kemoterapik ajan olan Paclitaxel (Taxol), Ulusal Kanser Enstitüsü tarama programınca keşfedilmiştir. Bu ilaç Pasifik porsuk ağacı *Taxus brevifolia*'dan elde edilmiştir. Metastatik meme kanserli, ilerlemiş akciğer kanserli, baş ve boyun kanserli, melanoma, over kanseri ve lenfomalı hastalar Taxole pozitif cevap vermektedirler [17]. Paclitaxel geriye dönüşümlü olarak tübüline bağlanır ancak vinka alkaloidlerinden farklı olarak polimerizasyonu ve polimerin dayanıklılığını artırır. Böylece mikrotübül oluşumu artar. Paclitaxelin oluşturduğu bu çok sağlam mikrotübüller normal fonksiyon gösteremezler. Bu da hücre ölümüne neden olur [1, 15].

Rusya'da kullanılan ilaçların üçte birinden fazlası bitkisel kökenli olup sentetik birçok ilacın ortaya atılmasına karşılık bu oran değişmemektedir [20].

1.3.2. BİTKİSEL ÜRÜNLERİN GÜVENİLİRLİĞİ

Bitkisel ilaçları ve uygulamalarını iyi anlayabilmek için onların botaniklerinin, kimyasının, farmakolojisinin, toksikolojisinin ve klinik etkilerinin bilinmesi gerekir. Bitkisel ilacın etkisi geç görüldüğü için uzun süre kullanılması gerektiğini ve en az üç aylık kullanım sonrasında preparatın etkisi hakkında bir bilgiye sahip olunabileceğini akılda tutmak yerinde olur [16]. Bazı bitkisel ürünler güvenilir ve faydalı fizyolojik etkiye sahip aktif ögeler içeriyor olabilirler. Oysa diğerleri kullanım için güvenilir olmayabilir [17].

Besin ve İlaç Yönetimi (The Food and Drug Administration) bazı bitkileri güvenilir olmadığı gerekçesi ile sınıflandırmıştır. Küçük miktarları bile bu yüzden dolayı ne yiyecek ne de içecek olarak kullanılmamalıdır [17].

Bazı bitkiler az miktarda güvenilirken; yüksek dozları toksik olabilir. Örneğin; meyan kökü duodonal ve gastrik ülserlerin tedavisinde güvenle kullanılabilirken, bu bitkinin aşırı kullanımından dolayı ölümler rapor edilmiştir. Yüksek dozlarda meyan kökü; hipokalemi, yüksek kan basıncı ve kalp yetmezliği gibi ciddi yan etkilere sebep olabilir. Letal olarak bilinen başka bitkiler de vardır. Örneğin Dalakotu kilo sorununda kullanılır. Yüksek dozlarında fatal hepatitis kaydedilmiştir[17].

1.3.3. BİTKİSEL KÖKENE SAHİP TİCARİ ANTİKANSER İLAÇLAR

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılmakta olan bir çok ilacın kökeni bitkilere dayanmaktadır. Vinblastin, vinkristin, etoposide, teniposide ve paclitaxel bunlar arasında en etkili biçimde kullanılanlardır [26].

Bu ilaçlar arasında en iyi bilineni *Madagascar periwinkle*, *Cantharanthus roseus* (*Vinca rosea* L.) (*Apocinaceae*)'den izole edilen vinca alkaloidleridir. *C. roseus* farklı kültürlerde diabet tedavisinde kullanılmış, vinblastin ve vinkristin güçlü

hipoglisemik ajan olarak bitkilerdeki araştırmalarda keşfedilmiştir. Son zamanlarda semisentetik bileşikler olan vindesine ve vinorelbine terapötik kullanıma katılmıştır. Vinca alkaloidleri mikrotübüler proteinlerin kristalizasyonuna sebep olarak, hücre bölünmesine müdahale eder ve hücrelerin metafazda tutulu kalmasına neden olur. Kolşisin ve maytansine gibi diğer antikanser ilaçlara benzer davranmalarına rağmen onlar gibi çapraz direnç göstermezler. Vinca alkaloidler geniş olarak hematolojik neoplazmlarda kullanılırlar. Vinblastine ve vinkristine kronik lenfositik lösemi ve Hodgkin's sendromunda birlikte kullanılırlar. Vinkristine ayrıca çocuklarda akut lenfositik lösemide ve yetişkinlerde lenfomada kullanılır. Vinblastine ilk olarak testiküler karsinomada kullanılmıştır. Vinorelbine küçük hücreli akciğer kanserinde ve meme kanserinde etkilidir. Vinca alkaloidlerinin çok önemli bir özelliği de düşük toksisite göstermeleridir. Vinkristine hafif myelobaskılayıcı aktivite gösterir ancak parastezi ve nöromusküler anomalilere yol açar. Vindesine hem myelotoksisite hem nörotoksisiteye neden olurken, vinblastine daha az nörotoksiktir fakat lökopeniye neden olur [26].

Klinik olarak aktif ajanlardan etoposide ve teniposide bir podofilotoksin izomeri olan epipodofilotoksinin glikosidik semisentetik türevidir. Podophyllum (*Podophyllaceae*) genusunun türlerinin köklerinden aktif antitümör ajanlar olarak izole edilirler. Bu bitkiler Amerika ve Asya toplumlarında tıbbi olarak siğil ve deri kanseri tedavilerde uzun bir tarihe sahiptirler. Podofilotoksin, antineoplastik bir ajandır ve germ hücre neoplasması, küçük hücreli akciğer kanseri ve çeşitli akciğer metastatik türlerini, malignant lenfomaları ve nasofarinks kanserlerini içeren çeşitli tümör tiplerine karşı yüksek etkiye sahiptir. Podofilotoksin ve türevleri, mikrotübül organizasyonunu bozucu ajanlardır ve kolşisin tipi metafaz blokerleridir. Tübülünde aynı bölgeye bağlanarak G1 ve G2'de tutulmayı sağlarlar. Bu ajanlar güçlü DNA Topoizomeraz II inhibitörleridir ancak Topoizomeraz I'e karşı daha az etkilidirler. Etoposide Hodgkin's hastalığında, metastatik lenfomalarda, lösemilerde, küçük hücreli akciğer kanserlerinde, testikular karsinomada önemli etkiye sahiptirler. Tenoposide primer olarak çocuklarda akut lenfositik lösemide *cytosine arabinoside* ile kombine halde kullanılır [26].

Paclitaxel (Taxol) Pasifik porsuk ağacı *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*)’dan izole edilmiş kompleks diterpen içeriğidir. Ayrıca *T. baccata*, *T. cuspidata*’yı da içeren farklı *Taxus* türlerinden de elde edilmiştir. Taxol tübülün polimerizasyonunu inhibe eder. Göğüs ve akciğer kanserlerine karşı anlamlı etkiye sahiptir. Ancak kemik iliğini baskılayıcı ve parastezi gibi istenmeyen etkilere sahiptir [1, 26].

1.4. *SALVIA* GENUSU

Anadolu insanı Paleolitik çağdan (yaklaşık M.Ö. 50000 yılları) beri bitkileri tedavi maksadıyla kullanmaktadır. *Salvia L.* (Adaçayı) grubunun bazı türleri de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Çizelge 1.3). Bu nedenle Adaçayı türlerine Latince “kurtarmak, iyileştirmek” anlamına gelen, SALVEO kelimesinden kaynaklanan *Salvia* adı verilmiştir [27]. Kaynaklara göre özellikle kekiğin, urum çiçeğinin, ıhlamurun, nanenin, biberiyenin tüm akıtıcı özelliklerini kendinde toplamış olan adaçayı bitkisini antik yıllarda (M.Ö. 460-357) Hipokrat’ın dahi kullandığı bilinmektedir [28]. *Salvia* cinsi faydalı bitkiler arasında önemli bir gruptur. *Salvia* genusu antiseptik karakterde monoterpenler içerir [29].

Son zamanlarda *Salvia* genusu üzerinde yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. *Salvia miltiorrhiza*’nın antiproliferatif ve güçlü potansiyel anti-apoptotik ajan olduğu bilinmektedir [18, 19]. *Salvia tomentosa* bitkisinden elde edilen bir flavonoid olan yaseozidinin (jaseosidin) ile 6-hidroksiluteolin, 7-glukozid’in DNA sentez hızını yavaşlattığı belirlenmiştir [29-31]. Bu durum kanser tedavisi için çok önemlidir

Salvia türleri Kuzey ve Güney yarım kürenin ılıman ve sıcak bölgelerinde yayılış göstermektedir [27, 32]. *Salvia L.* cinsinin iki önemli gen merkezi Amerika ve Kuzey Batı Asya’dır [27].

Salvia’ların yeryüzünde 900’ün üzerinde türü bulunmaktadır [27, 29, 33-35].

Türkiye sahip olduğu 89 tür ile Asya'daki *Salvia L.* genusu için büyük bir gen merkezidir [27]. Ülkemizdeki 89 *Salvia* türlerinin 45 tanesi çok sınırlı alanlarda doğal yayılışlı ve endemik karakterlidir [27, 35]. Türkiye'deki bitkilerin tıbbi potansiyelinin önemli olmasına rağmen, bitkiler üzerinde bu alandaki bilgi ve çalışmalar seyrek [35].

Salvia cinsinin bazı türleri ülkemiz açısından ekonomik ve tıbbi önem arz etmektedir. Ayrıca bu türlerden bazıları ülkemizin önemli ihraç ürünleri arasındadır [27, 33, 35, 36].

Salvia türlerinin etken madde içeren kuru yaprakları ve çiçekleri çeşitli ilaçların yapımında ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı *Salvia* türlerinin sahip olduğu güzel kokulu uçucu yağlar parfümeride ve yemek endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır [27, 28, 32, 33, 35]. Ülkemizde *Salvia L.* genusunun bazı türlerinin özellikle *Salvia officinalis*'in çayı yaygınlıkla kullanılmaktadır [27, 37]. Adaçayı (*S.officinalis*) uzun bir tıbbi kullanım listesi ile güvenilir [35]. Halk tarafından adaçayı olarak kullanılan *Salvia* türleri *S. officinalis* (Tıbbi adaçayı) ve *S. triloba* (Dağ elması) türleridir Bu türlere çok benzeyen *S. fruticosa* (*Syn. S. triloba*), *S. tomentosa* türleri de bazı yörelerde çay olarak toplanmakta ve kullanılmaktadır [30].

İdrar söktürücü ve spazmlara karşı etkileri, idrar tutukluğu, böbrek tembellikleri, ödemler, gut hastalığı, romatizma, migren gibi hastalıklara karşı değerli bir ilaçtır. Ateş düşürücüdür; birçok mikropu hastalıkların yol açtığı sıkıntılı gece terlemelerini durdurur. Adaçayı şeker hastalığına karşı etkisiyle de tanınır. Kaynatılmışı, kandaki yüksek şeker oranını oldukça çabuk normale düşürür. Güzellik bitkisi; cildin sağlığını en iyi biçimde korur, saç dökülmelerini yavaşlatır ve saçlı deriyi temizler, mikroplardan arındırır ve saçların büyümesini, gelişmesini sağlar. Dıştan kullanımlarda güçlü bir antiseptiktir. Yaraları tedavi eder; kanı durdurur; derinin iyileşmesini çabuklaştırır; dişetleri, damak, boğaz iltihaplanmalarına, pamukçuklara, çocukların bademcik şişmelerine, diş çürümelerine ve abselerine karşı önerilir. Losyon ve kompres biçiminde yaralara, abselere, ülserlere, çibanlara, berelere, kesiklere, burkulmalara, şişmelere karşı kullanılır [28].

Çizelge 1.3 Bazı *Salvia* türleri ve etnobotanik kullanımı [20, 35, 38]

Tür	Etnobotanik kullanımı	Kullanılan bitki bölümü
<i>Salvia tomentosa</i> Miller (Büyük çiçekli adaçayı)	Hazımsızlık, larenjit, farenjit, ağız mukozası iltihabı, dişeti iltihabı, dil iltihabı, aşırı terleme (antihidrotik), sütün fazla gelmesi	Yaprakları
<i>Salvia aethiopsis</i> L. (Yünlü adaçayı)	Midevi ve uyarıcı	Yaprak ve çiçekleri
<i>Salvia virgata</i> Jacq. (Yılancık)	Yara iyileştirici	Yaprakları
<i>Salvia viridis</i> L. (Syn: <i>S. hormonum</i> L.) (Yeşil adaçayı)	Midevi, kabızlık, terlemeyi azaltıcı (antihidrotik), yatıştırıcı	Çiçekli dallar ve yapraklar
<i>Salvia sclarea</i> L. (Ayıkulağı, Misk adaçayı, Tüylü adaçayı)	Midevi, kabızlık, terlemeyi azaltıcı (antihidrotik), yatıştırıcı ve parfümeri sanayii	Çiçekli dallar ve yapraklar
<i>Salvia fruticosa</i> Miller (Syn: <i>S. trilobae</i>)	Gaz söktürücü, midevi, ter kesici (antihidrotik), idrar artırıcı, haricen yara iyileştirici, antiseptik	Yapraklı ve çiçekli dallar
<i>Salvia officinalis</i> L.	Yatıştırıcı, midevi, diuretik, ter kesici (antihidrotik), Ağrı giderici (analjezik), ekspektoran (balgam söktürücü), dezenfektan	Yaprakları

1.4.1. *Salvia tomentosa* Mill.

Salvia tomentosa, yarı çalimsı çok yıllık bir bitkidir. 750- 1000 m'ye kadar kızıl ve karaçam ormanları altında meşe ve ardıç gibi maki elemanları arasında yayılış gösterir [27].

Salvia tomentosa halk arasında hazımsızlık, larenjit, farenjit, ağız mukozası iltihabı, dişeti iltihabı, dil iltihabı, aşırı terleme ve sütün çok fazla gelmesine karşı kullanılmaktadır [35].

1.4.2. *Salvia tomentosa*'nın kimyasal yapısı

Adaçayı türlerinin kimyasal içerikleri ve yağ bileşenleri farklıdır [30]. *Salvia* genusu (*Labiatae*) zengin bir diterpenoid kaynağıdır [39].

Salvia tomentosa köklerinden hazırlanan MeOH ekstraktında etil asetatta çözünen kısım kromatografi ile ayrıştırıldığında, 7 farklı diterpenoid bileşeni vermiştir. Spektrofotometrik sonuçlar, bu bileşenlerin hepsinin abietane olduğunu göstermiştir. *Salvia tomentosa*'da bulunan abietane tip 7 diterpen şunlardır: Horminone, Sugiöl, 7 α -acetoxyroleanone, Rosmanol, 8,11,13-abietatriene-18-oic asit, Salviol ve 12-methoxycarnosic asit [32].

Gabor Nagy ve ark. [39] tarafından yapılan çalışmada, *S. tomentosa*'ya ait 4 diterpenoid rapor edilmiştir. Bunlar, 7 α -acetoxyroleanone, 7 α -hydroxyroleanone, Royleanone ve 6,7-dehydroroyleanone'dir [39].

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, kolay kristalleşebilen uçucu, kuvvetli kokulu, su buharı ile sürüklenebilen yağimsı karışımlardır [38]. Bunlar; antiromatizmal, balgam söktürücü ve öksürük kesici, idrar söktürücü, mideyi ve gaz giderici, solucan düşürücü, sinir yatıştırıcı ve ferahlık verici etkiler göstermektedir [30].

Salvia genusuna ait bitkilerden izole edilmiş uçucu yağların kimyasal bileşenlerine ait çok sayıda rapor vardır. Bu raporların hepsi *Salvia* yağlarının ana ve/veya karakteristik bileşenlerinin 1,8-cineole (eucalyptol) ve borneol olduğunu göstermektedir (Çizelge 1.4) [35].

Haznedaroğlu ve ark. [40] tarafından yürütülmüş bir çalışmaya göre; cyclofenchene, 1,8-cineole, borneol ve β -caryophyllene *Salvia tomentosa* yağlarının temel bileşenleridir [35, 40]. Bu bulgulardan % 4.3 olarak bulunmuş borneol hariç diğer bileşenler Tepe ve ark. [35] tarafından yapılmış çalışmada farklı kaydedilmiştir. Uçucu yağ bileşimindeki değişiklikler çeşitli farklılıklardan (iklimsel, mevsimsel, coğrafik, jeolojik) ortaya çıkabilir [35]. *Salvia tomentosa* uçucu yağları bu bileşenlerle birlikte 44 farklı bileşen içerirler (Çizelge 1.4) [35, 40].

Çizelge 1.4 *Salvia tomentosa*'nın uçucu yağ bileşenleri ve yüzdeleri [35]

<i>Salvia tomentosa</i> 'nın uçucu yağlarının bileşenleri	% (Total = 97.7)
α -Thujene	0.7
α -Pinene	10.9
Camphene	2.4
β -Pinene	39.7
β -Myrcene	0.7
α -Terpinene	0.4
p -Cymene	1.1
Limonene	2.2
Eucalyptol	1.1
(Z)- β -Ocimene	0.7
(E)- β - Ocimene	0.2
γ -Terpinene	1.4
<i>cis</i> -Sabinene hydrate	0.4
Terpinolene	0.5
Linalool	0.9

<i>trans</i> -Sabinene hydrate	0.2
Camphor	9.7
Borneol	4.3
Terpinen-4-ol	0.7
α -Terpineol	0.3
Linalyl acetate	0.3
Bornyl asetate	0.5
Thymol	0.7
Carvacrol	0.9
α -Cubebene	0.5
α -Ylangene	0.3
α -Copaene	0.4
β -Bourbonene	0.8
β -Cubebene	0.2
α -Gurjunene	0.3
Caryophyllene	2.3
β -Copaene	0.6
Aromadendrene	0.3
α -Caryophyllene	1.9
Allo-Aromadendrene	0.2
γ -Muurolene	1.5
Germacrene D	0.6
β -Selinene	0.4
γ -Amorphene	1.2
γ -Cadinene	0.5
δ -Cadinene	1.4
Ledol	0.7
(-)-Spathulenol	0.4
Viridiflorol	2.3

Flavonoidler çiçeklere renklerini veren maddelerdir. Flavonoid droglar, 40 yıldan fazla bir süredir tıpta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların bileşimine katılmaktadırlar. Son yıllarda yapılan araştırmalarda elde edilen yeni flavonoid bileşiklerinin iyileştirici etkilerinin bulunup bulunmadığı konusunda araştırmalar devam etmektedir. Bu bileşiklerin, özellikle bağışıklık sistemi, kan damar sistemine etkileri, antitümör, antibakteriyel, antiviral ve benzeri diğer farmakolojik etkileri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır [31].

Yirmi yıldan beri flavonoidlerin anti-tümör etkileri üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Kanser tedavisinde flavonoidlerin ümit verici bir potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü 200'den fazla flavonoid bileşiğin antitümör etkilerinin araştırılmasını programına almıştır. Yapılan araştırmalarda kesin tedavi edici olmasa bile en azından kötü huylu kanser hücrelerinin yayılmasını engelleyici etki gösteren bazı flavonoid bileşikleri tanımlanmıştır [31]. Buna örnek olarak yeşil çaydaki kateşin verilebilir [25, 31].

Salvia tomentosa bitkisinden elde edilen bir flavonoid olan yaseozidinin (jaseosidin) ile 6-hidroksiluteolin,7-glukozid'in DNA sentez hızını yavaşlattığı bildirilmektedir [30, 31].

1.4.3. *Salvia tomentosa*'nın antimikrobiale aktivitesi

Yağların ana bileşiklerinin antimikrobiale aktivitesi birçok araştırmacı tarafından çok iyi tanımlanmıştır. Bir rapora göre, pinene-tip monoterpen hidrokarbonlar (α -pinene ve β -pinene) ve borneol (oksijene olmuş monoterpen)'ün mikroorganizmalara karşı aktivitesi önemsiz bulunmuştur. Borneolün aktivitesi diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Kafurun da önemsiz antifungal ve antimikrobiale aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Önemsiz aktivite kapasitelerine rağmen, pinene-tip monoterpenler, kafur ve borneolün spektrumun total etkisinden sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir. Terpenlerin etki mekanizmaları tamamen

anlaşılammıştır ancak lipofilik bileşiklerle membranı bozduğu tahmin edilmektedir. Bundan başka, suda çözünmeyen bileşiklerin azaltılmış aktivitesi, heksan bileşiğindeki oleoresinler, steroller ve onların türevleri, flavonlar ve diklorometan bileşiğindeki flavonoidler ve daha polar metanol bileşiklerinin hidrofobik subfraksiyonlarındaki sıcaklıkla değişen ve/veya değişmeyen birçok farklı sınıfa ait bileşenlerin birçok tipinin bulunduğunu nitelemektedir [35].

Haznedaroğlu ve ark. [40] tarafından yapılan çalışmaya göre antimikrobiale aktivitesi sınanmış *Salvia tomentosa* uçucu yağları 1,8-cineol (%17), β -caryophyllene (%11), cyclofenchene (%10) ve δ -cadinene (% 6) içermektedir. Bu uçucu yağlar Haznedaroğlu ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada kullanılmış dört gram pozitif ve dört gram negatif bakteriden *Pseudomonas aeruginosa* dışındakilerin üremesini dikkate değer ölçüde inhibe etmektedirler.

Tepe ve ark. [35] tarafından yapılan çalışmaya göre *Salvia tomentosa*'nın suda çözünen ekstraktları antimikrobiale aktivite sergilemezken suda çözünmeyen ekstraktlar *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *B. cereus*, *A. lwoffii*, *C. perfringens*, *M. smegmatis* ve *C. albicans*'a karşı yatıştırıcı aktiviteye sahiptirler. Bu mikroorganizmalardan *C. perfringens* en duyarlı mikroorganizma iken, *S. pneumoniae*, *M. smegmatis* diğer duyarlı mikroorganizmalar arasında yer almaktadırlar. Haznedaroğlu ve ark. [40] tarafından yapılan çalışmanın raporunda Gram negatif bakterilere karşı ise (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) gözlenmiş olan zayıf antimikrobiale aktivite Tepe ve ark. [35] tarafından yapılmış olan çalışmada herhangi bir şekilde gözlenmemiştir.

1.4.4. *Salvia tomentosa*'nın antioksidant aktivitesi

Antioksidantlar hücre membranlarındaki lipit bileşiklerinin oksidasyonlarını minimize ederler veya karsinojenik etkisi olduğu bilinen linoleik asit oksidasyonundan ortaya çıkan konjuge olmuş diene hidroperoksitleri ve uçucu organik bileşikleri inhibe

ederler [35]. Tepe ve ark. [35] tarafından yapılan çalışmada *Salvia tomentosa*'da polar bileşikler, polifenoller veya flavonlar ve aktivitelerinde önemli rol oynayan flavonoidleri gösteren non-polar bileşiklerden daha güçlü antioksidant etki göstermektedirler. Polar olan bileşenler de metanol ekstraktının hidrofobik kısmında yer almaktadırlar.

1.5. TÜMÖR HÜCRE KÜLTÜRÜ VE ANTİTÜMÖR AKTİVİTE TAYİNİ

Tümör büyümesinin durdurulması ve tümörlerin yok edilmesinde beklenen, tedaviden olabildiği kadar yarar sağlamak, buna karşılık yan etkileri en aza indirmektir. Tümör tedavisinde uygulanan programların rastgele oluşu, daha etkin ve sonucu önceden hesaplanabilen tedavi programlarına duyulan ihtiyacı artırmaktadır [4].

Son yıllarda tümör tedavisinde kullanılan ilaçların *in vitro* etkilerini açıklayan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmaların ortak amacı tümör hücre çoğalmasını durduran ve en az yan etkiye sahip ilaçları belirlemektir [41].

Son yıllarda geliştirilen çok hücreli tümör sferoid tekniği kullanılarak hem radyasyonun hem de ilaçların hücre düzeyindeki etkinlikleri araştırılabilir. Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir şekilde yansıtmakta bunun sonucunda hücreler arası ve mikroçevre ile olan ilişkileri ortaya koymaktadır. Sferoid oluşumunun engellenmesi, hücrelerin ilaçlara karşı duyarlılığını göstermesi ve bunun klinik uygulamalarla uygunluk göstermesi bakımından anlamlıdır [4].

1.5.1. MULTİSELÜLER TÜMÖR SFEROİD MODELİ

Tümör hücreleri ile yapılan *in vitro* deneylerde birçok laboratuvarında tek tabakalı tümör hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu *in vitro* hücre modeliyle kanserin temel oluşum mekanizmaları ve tedavisi üzerine oldukça değerli bilgiler edinilmiştir [42].

Tüm hücreler kültür kabına ilk konulduklarında yuvarlak şekillidirler. Daha sonra kabın yüzeyine tutunarak yayılırlar. Bu oluşan tabakaya monolayer denir [43]. Ancak, tek tabakalı kültür ortamında oksijen ve besinler kanser hücrelerine eşit oranda ulaşmakta ve hücreler bu koşullar altında iki boyutlu bir büyüme göstermektedir. Oysa vücutta kitle oluşturan solid tümörler üç boyutlu uzaysal bir konumda büyümektedir. Bu durum tümörlerin iç bölümündeki hücreler arasında oksijen ve besin dağılımının eşit olmamasına yol açmakta ve hücreler farklı düzeylerde fiziksel ve kimyasal streslerle karşılaşmaktadır. Oksijen ve besin kaynaklarının düşük olduğu bölümlerde hücre hasarı ve hatta nekroz kendiliğinden gelişebilmektedir. Ayrıca tek tabakalı hücre kültür modelinin aksine hücresel yanıtların gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülen hücreler arası temaslar üç boyutlu bir ortamda gerçekleşmektedir [42].

Sferoidler olarak kültüre edilmiş embriyonik hücreler üzerinde yapılan ilk çalışmalar, doku benzeri yapısal özellikleri ve *in vivo* benzeri gelişimi göstermiştir. Yüksek farklılaşma kapasitesi tek tabakalı kültürlerde sağlanamamıştır, fakat hepatositlerin, yetişkin insan glioma hücrelerinin, kuş fetal beyin hücrelerin ve insan saç foliküllerinin yeterli farklılaşma kapasitesi bulunabilmiştir. Bu durum özellikle ilaç testlerinde önemlidir, çünkü biyokimyasal verileri elde edebilmek için doğal metabolik aktivitelerin üst sınırı gereklidir ve bu da ancak doku benzeri yapılarda sağlanabilir [44].

Kemoterapötik ajanların toksik etkilerine karşı tümör hücrelerinin direnç geliştirmesi kanser tedavisindeki en önemli problemlerden biridir. İlaç direncinin oluşum mekanizmalarını belirlemek üzere çeşitli ilaçlar tek tabakalı kültür ortamında tümör hücre soylarına uygulanmış ve bu şekilde ilaç penetrasyonunda azalma, ilacın hücre dışına aktif pompalanması, ilaç inaktivasyonunun ve DNA onarım işlemini artması ve hücre içinde ilaçların hedef moleküllerinin ekspresyonunun değişmesi gibi hücresel düzeyde işleyen birçok biyokimyasal mekanizmalar ortaya çıkarılmıştır. Ancak bu gibi tek hücre düzeyinde ortaya çıkan direnç mekanizmalarının klinikte izlenen ilaç direnci için geçerli olup olmadığı konusunda ciddi endişeler bulunmaktadır. Bu konuda literatürde yapılmış olan çalışmalarda kullanılan tek tabakalı kültürde

büyütülen hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdukları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık bulunduğu gözlenmektedir. Bu durumda tek tabakalı kültürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümoral etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı görülmektedir. Bu nedenle tek tabakalı hücre kültürünün üç boyutlu *in vivo* solid tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıtmada yetersiz kaldığı giderek daha çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir [42,45].

In vitro sferoid kültürleri çeşitli metodlarla elde edilebilir. Bunlardan en sık kullanılanı sıvı üst tabaka yöntemidir. Bu yöntemde hücre kültür kaplarının tabanı agarla kaplanarak tümör hücrelerinin plastik zemine yapışmaları önlenmekte ve hücreler agarlı zemin üzerinde büyümelerini sürdürmektedir. 1-3 gün içinde küçük hücre kümelenmeleri oluşmakta ve ardından içinde tümör hücrelerinin sıkı bir şekilde organize olduğu düzgün sferoid yapıları şekillenmektedir. Sferoid üretme teknikleri arasında sıvı üst tabaka yönteminden başka “spinner flask” ve “gyratory rotation” gibi teknikler de bulunmaktadır. Ancak bu yöntemler ek donanım gereksinimi göstermekte ve çalışma maliyetleri oldukça yüksek olmaktadır. Sıvı üst tabaka yöntemi ise laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek ucuz, kolay ve hızlı bir yöntem olarak dikkati çekmektedir [42].

1.6. HÜCRE SIKLUSU DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Bilindiği üzere tümör dokusu, hücre devri'nin değişik fazlarında bulunan hücrelerden oluşmuş heterojen bir popülasyon olarak kabul edilir. Böyle bir hücre popülasyonunda DNA sentezinin yapılmadığı G1 fazında bulunan hücreler, DNA sentezinin yapıldığı sentez (S) fazında bulunan hücreler ile DNA'nın iki kat olarak bulunduğu G2 fazı ve bölünmenin gerçekleştiği mitoz (M) fazına ait hücreler bulunur. Bir hücre popülasyonunda S fazında bulunan hücrelerin sayısı S-fazı fraksiyonu olarak, S fazında bulunan hücrelerin popülasyondaki bütün hücrelere oranı da işaretlenme indeksi olarak adlandırılır [46-49].

Howard ve Pelc tarafından 1953 yılında geliştirilen ve otoradyografi temeline dayanan Timidin İşaretlenme İndeksi (TLI) adı verilen bu yöntemde, interfazdaki hücrelerin fizyolojik açıdan farklı davrandıklarının ortaya konması, hücre biyolojisinde yeni bir çığırın açılmasına neden olmuştur [4, 50]. Günümüzde tümörlerin çoğunda prognostik parametre olarak kullanılan bu yöntem, özellikle meme kanserli hastalar başta olmak üzere kantitatif olarak tümör büyüme hızını gösteren kinetik bir parametredir [51, 52]. Bu yöntem sayesinde tümörün büyüme oranı, lokal saldırganlığı, ve kısmen de uzak metastaz yapma olasılığı gösterilebilmektedir [52-58]. Thymidine Labeling Index'in hesaplanabilmesi için hücrelere birim zaman içerisinde radyoaktif thymidine ($^3\text{H-TdR}$) uygulanır. Bu uygulama sırasında DNA sentezi yapmakta olan hücreler yeni DNA molekülü yapısına $^3\text{H-TdR}$ 'yi alırlar [48, 52-59]. Bu yöntemde timidinde, bir hidrojen atomu radyoaktif izotopu olan trityumla değiştirilir ve bu özelliğine bağlı olarak β partikülleri yayar [4]. Bu durum otoradyografi sonrasında timidini alan hücre nükleuslarında siyah noktacıklar halinde izlenir [6, 48]. İşaretli hücrelerin toplam hücrelere oranı % olarak ifade edilir. TLI olarak adlandırılan bu veri hücre popülasyonunun proliferasyon oranını göstermesi bakımından, tümörün saldırganlığının, terapötik etkinin ve prognozun anlaşılmasında önemlidir [48, 53-60].

Ancak günümüzde radyoaktif bir metot olduğu gerekçesiyle uygulamadaki zorluklarından dolayı; bu metodun yerini yine bir timidin analogu olan halojenli pirimidin grubundan BrdU kullanımı almıştır. Bu yöntem, sadece S fazındaki hücrelerin BrUdR ile işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesinin izlenmesine dayanır [5, 60-62].

Nonradyoaktif timidin analogu olan bromodeoksiüridin S fazındaki hücrelerin DNA'sına bağlanarak bunun sonucunda anti-BrdU antikorlarının kullanımı ile ortaya çıkarılması sağlanır. Bu metot hücre kinetiği araştırmalarında [^3H] timidine göre daha elverişli bir metottur [60, 63].

Hücrelerin BrdU ile muamelesi sonunda monoklonal antikorlar kullanılarak immunohistokimyasal teknikler uygulanır ve DNA sentezi yapan hücrelerin oranı

(BrdU labeling indeks BrdU-LI) klinik datalar ve tümör histolojisiyle karşılaştırılarak mikroskopik olarak değerlendirilir [60].

Bu durumda ^3H -TdR yerine Bromodeoksiüridin (BrdU) ile işaretlenen S fazı hücrelerini görünür hale getirebilmek için otoradyografi yerine immunohistokimya teknikleri kullanılır [5].

1.6.1. HALOJENLİ PİRİMİDİNLER VE BrdU İŞARETLEME YÖNTEMİ İLE HÜCRE SIKLUSUNUN DEĞERLENİRİLMESİ

Bu yaklaşım [^3H] Timidin veya halojene olmuş analoglar Bromodeoksiüridin ve iyododeoksiüridin gibi işaretlenmiş pirimidin bazlarının kullanılması temeline dayanır [46].

Klor, brom ve iyot atomlarının bağlanma özellikleri metil grubu (CH_3) nun bağlanma özellikleri ile büyük benzerlik gösterir. Bunun sonucu olarak, halojenli pirimidinler grubu adını alan 5- klorodeoksiüridin (CIUdR), 5-iyododeoksiüridin (IUdR) ve 5-bromodeoksiüridin (BrUdR), yapılarında bulunan halojen grupları yüzünden, DNA molekülünün normal yapıtaşı olan timidine yapısında bulunan metil grubu sebebi ile çok benzerler. Bu benzerlik çok ileri düzeydedir ve bu halojenli pirimidinler, DNA sentezi sırasında timidin molekülünün yerini alarak DNA zincirinin yapısına girebilirler. Bu sebeple bu maddelere 'timidin analogu' adı verilir. Halojenli pirimi dinlerin DNA molekülünün yapısına girmesi ile, DNA zincirinde bir zayıflama meydana gelir ve bunun sonucu olarak da hücrenin X veya γ ışınlarına karşı duyarlılığı artar [5]. Bu zayıflama benzerliğin tam olarak olmamasından kaynaklanır.

BrUdR, timidin molekülündeki metil grubunun yerine aynı boyutlardaki bir brom atomunun geçmesi ile oluşan bir timidin analogudur. DNA sentezini düzenleyen enzimler timidin ile timidin analoglarını ayırt edemedikleri için, bunlar aynen timidin gibi yeni sentezlenen DNA'nın yapısına girebilirler.

BrUdR-DNA analizi yapılacak hücrelere ilk aşamada BrUdR uygulanır ve bu şekilde sadece S fazında bulunan hücrelerin işaretlenmeleri sağlanır [5]. Daha sonra immünohistokimya yöntemi uygulanarak işaretli hücrelerin ışık mikroskopunda görünür hale gelmesi sağlanabilir [5, 61].

1.7. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, antimikrobiyal ve antioksidant aktivitesi [35,40] çalışılmış olmasına rağmen, DNA sentez hızını yavaşlattığı ileri sürülen [30,31] ancak hücre kültüründe antitümör aktivitesi henüz belirlenmemiş olan ve Balıkesir’de bazı köylerde halk tarafından çayı yapılarak içilen ve antitümör etkisi olduğuna inanılan *Salvia tomentosa*’nın hücre çoğalması üzerine etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

Bu anlamda temelde hücre kültürü teknikleri kullanılarak yapılan deneyler, hücre kültürünün 2 farklı uygulaması kullanılarak gerçekleştirilmiştir: Hücre modeli olarak sıçan Glioma hücreleri (C6) kullanılmıştır.

- 1- Tek tabakalı hücre kültürleri: Tek tabakalı C6 hücre soyunda *Salvia tomentosa* ekstraktlarının hücre çoğalması üzerine etkisinin saptanması
- 2- Üç boyutlu sferoid hücre kültürleri:
 - a) Sferoid C6 hücre kültürlerinde, uygulanan *Salvia tomentosa* ekstraktları sonrası Hematoksilen-Eozin boyası ile hücrelerin sferoid bütünlüğünün değerlendirilmesi
 - b) Sferoid C6 hücre kültürlerine uygulanan *Salvia tomentosa* ekstraktları sonrası BrdU işaretlemesi yapılarak monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemleri ile BrdU işaretlenme indeksinin hesaplanması

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

2.1.1 Bitki Materyalleri

Ekstraktları hazırlanmak üzere kullanılan *Salvia tomentosa* bitkileri Yrd.Doç.Dr Fatih Satıl ve Rıdvan Polat tarafından 13.06.2003 tarihinde Balıkesir'in Bigadiç Yolu Kadıköy mevki ve 22. km'leri yol kenarlarından toplandı. Toplama zamanının seçimi *Salvia* türlerinin Mayıs-Haziran aylarında çiçeklenmesi ve Temmuz ayında da tohumlarının olgunlaşması göz önüne alınarak seçildi ve toplanan örneklerin bitkinin bütün özelliklerini temsil etmesine dikkat edildi [27].

Toplanan örnekler preslere alınarak nemsiz gölgeli ve hava akımı olan bir ortamda kurumaya bırakıldı. Örneklerin sağlıklı bir şekilde kuruması için kurutma kağıtları belirli aralıklarla değiştirildi [27].

Kuruyan örneklerin teşhisi Yrd.Doç.Dr. Fatih Satıl tarafından yapıldı. Örneklerin teşhisinde Türkiye florası, Tohumlu bitkiler sistematigi kitapları, daha önce konuyla ilgili makale ve tezler, ayrıca herbaryum örneklerinden faydalanıldı [27].

2.1.2 Kimyasallar

Borik Asid (Applichem A 2940, 0500), NaOH (Merck 106495), NaCl (Merck 106406), Na₂ HPO₄ (Merck 106586), NaH₂PO₄ (Merck 106346), Absolü etanol (Merck 100983), HCl (Merck 113386), Metanol (Merck 106008), H₂O₂ (Merck 108597), Toluol (Riedel-de Häen 32249), Phenol Red (Merck 107241), Trypan blue (Fluka GA 11761), Poly-l-Lysine Solution (Sigma P8920), KH₂PO₄ (Merck 105108), KCl (Merck 104934),

Sodyum tetraborat (Horasan Kimya), Formaldehit (Riedel-de H en 15513), NaHCO₃ (Merck 3011729), Agar (Gibco 00391M), Parafin Wax (Kimetsan KIM-PNB/01CP/040220), CaCl₂ (Merck 2380).

2.1.3 Enzimler

Tripsin (Sigma T4799)

2.1.4 İla lar

Penisilin (Sigma P-7794), Streptomisin (Sigma S-9137)

2.1.5 Kitler

BrdU (Sigma B-5002)

Ultra V block (Lab Vision TA-060-UB)

NCL-BrdU Mouse Monoclonal (NOVOCASTRA 103008)

Ultra Vision Detection System Anti-Mouse HRP (Lab Vision TM-060-HL)

Large Volume AEC Substrate System (Lab Vision TA-125-HA)

Ultramount (Lab Vision TA-060-UM)

2.1.6 Diğer Maddeler

Fötal Sığır Serumu (Sigma SF-7524)

DMEM-F12 (ATCC 30-2004)

2.2 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1 Deneylerde kullanılan laboratuvar gereçleri

Kullanılan Gereç	Modeli
İnkübatör	Sanyo
Laminar Akım Kabini	Hereaus
İnverted Mikroskop	Leitz
Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Mikrotom	REICHERT
Buzdolabı	Bosch
Manyetik karıştırıcı	RÜHRMAG
Etüv	Hereaus
Otoklav	Victor Recker
Santrifüj	Nüve
Su banyosu	Nüve
Pipet Aid	Drummond
Hassas Terazi	Savter monopan
Evaporatör	Buchi Rotary Evaporatör

2.3 Metot

2.3.1 Çalışmada Kullanılan Ortamın ve Malzemenin Temizliği ve Sterilizasyonu

Cam malzemeler bir gece çamaşır suyunda bekletildi. Daha sonra deterjanlı suda bir gece bekletilen malzemeler ertesi gün önce deterjanla yıkandı daha çeşme altında bol su ile durularak bir gece distile suda bekletildi. Daha sonra etüvde kurutulmuş malzemeler ağızları alüminyum folya ile kapatılarak pipetler ise pipet kutuları içerisinde 180°C'lik etüvde bir saat steril edildi.

Isıya dayanıklı pipet uçları, eppendorflar gibi plastik malzemeler ise otoklavda 121°C'de 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi.

Hazırlanan çözeltiler otoklavda 121°C'de 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi. Medyum, serum ve ekstraktlar gibi ısıya dayanıksız malzemeler ise 0.22 µm'lik milipor filtreler kullanılarak steril edildi.

Doku kültürü laboratuvarı yerleri ve çalışma alanları her hafta periyodik olarak % 70 alkol çözeltisi ile silindi. Laboratuvar kullanılmadığı zamanlarda ve içeriye girilmeden en az yarım saat önce laminar air flow çalıştırılarak ve UV lamba kullanılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı.

2.3.2 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Kurutulmuş bitki materyallerinin kök, gövde, çiçek, tohum ve yaprak gibi bitki kısımları açısından homojen olacak şekilde alınıp mikser yardımı ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılması sağlandı. Elektronik terazide 10'ar gram tartılarak; deterjanla yıkanıp saf sudan geçirilmiş 3 ayrı cam şişeye alındı. Bu şişelere sırasıyla 100'er ml. metanol, kloroform ve petrolium eter ilave edilerek kapakları kapatıldı. İyi karışması için sallanan şişeler direkt gün ışığı almayan bir yerde, oda ısısında bir hafta bekletildi. Bu süre dahilinde gün içerisinde belli aralıklarla sallanarak

durgunlaşması engellendi. Bir hafta sonunda bitki materyali ve çözücünün bulunduğu karışımlar porselen huni üzerine filtre kağıdı koyularak birbirlerinden ayrı halde süzüldü. Filtrasyon sonrası partiküllerinden ayrılmış örnekler maksimum 40-41°C'de evapore edildi. Evaporasyon sonrası balon jojenin cidarında boyanma şeklinde kendini gösteren bitki ekstraktı az miktar kendi çözücüsü ile geri kazanılarak eppendorf tüplerine alındı. 37-40°C su banyosunda bu çözücünün uçması için ağzları açık halde bekletildi. Elde edilen bitki ekstraktları deney aşamasına kadar +4°C'de saklandı.

2.3.3 Hücre Kültürü Deneyleri

2.3.3.1 Hücre Kültüründe Kullanılacak Malzemelerin Hazırlığı

Deneyler İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deneylerde İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Avrupa Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATTC) hücre bankasından sağlanan sıçan C6 Glioma (ECACC no:558807) hücreleri kullanıldı.

Hücreler, içersinde inaktive edilmiş % 10 fetal sığır serumu (FCS), 0.2 Mm glutamin, 100 µg/ml streptomisin 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 medyumunda (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Medyum, besleyici karışım F12 Ham Medyum) 37°C'de, % 5 CO₂ ve 1 atmosfer basınç altında 25 ve 75 cm²'lik steril flasklar içersinde kültüre edildi. Hücreler haftada 2 kez rutin olarak pasajlandı. Hücreler, yoğunluk olarak flaskın yarı yüzeyini kapladıklarında deneylerde kullanıldı.

2.3.3.1.1 DMEM-F12 Hazırlanması

Kaynamış ve soğumuş 1 lt bidistile su içersine 10 gr medyum tartılarak konur ve manyetik karıştırıcıda karışması sağlanır. Karışan medyum içersine 1 ml penisillin-streptomycin (100 IU/ml-100 µg/ml) karışımından eklenir. Birkaç saat karıştıktan sonra

Sartorius filtreden steril ortamda süzülerek şişelere bölünür. Kullanılacağı zaman 0.22 µm steril filtreden geçirilerek serum ve glutamin ilavesi yapılır.

2.3.3.1.2 FCS'nin Kullanıma Hazırlanması

FCS (Fötal Sığır Serum) -20°C'de saklanır ve taşınması soğuk zincirle yapılır. Stok serum kullanılmadan önce 56°C'de 1/2 saat ısı ile inaktive edilir. Daha sonra tekrar -20°C'de saklanır.

2.3.3.1.3 Çözelti ve İlaçların Hazırlanması (Çizelge 2.2)

Çizelge 2.2 Doku kültürü deneylerinde kullanılan çözelti ve ilaçların hazırlanması

ÇÖZELTİ ve İLAÇLAR	HAZIRLANIŞI
Kalsiyumsuz mağnezyumsuz fosfat tamponu (CMF-PBS)	1 lt bidistile su içine 8 gr NaCl, 0.25 gr KCl, 0.25 gr KH ₂ PO ₄ , 1.44 gr Na ₂ HPO ₄ , 0.01 gr Phenol Red tartılarak ilave edildi ve karıştırıldı. Otoklavda 121 °C , 3 Atm basınçta 15 dk steril edildi.
NaHCO ₃ (0.00052 M)	200 ml bidistile suya 8.8 gr NaHCO ₃ ve 0.01 gr Phenol red tartılarak ilave edildi ve karıştırıldı. Otoklavda 121 °C , 3 Atm basınçta 15 dk steril edildi.
% 0.05'lik Tripsin	100 ml CMF-PBS içersine 0.05 gr Tripsin ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve milipor filtreden süzülerek steril edildi.
% 3'lük Agar	3 gr agar 100 ml bidistile suya kondu ve karıştırıldı. Otoklavda 121 °C , 3 Atm basınçta 15 dk steril edildi.
Antibiyotikler	2 ml penisilin ve 2 ml streptomisin karıştırıldı ve üzerine 6 ml bidistile su eklendi. İyice karışması sağlandıktan sonra 1'er ml halinde eppendorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklandı. 1000 ml medyum için 1 ml kullanıldı.

2.3.3.2 Hücre Kültürü Teknikleri

2.3.3.2.1 Hücre Soyunun Açılması

Uzun süre sıvı azot buharında saklanmış olan hücreler çözünmesi sağlanan dek 37°C lik su banyosunda tutulur. Çözünen hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak üzerine 1-2 ml % 10 serumlu medyum ilave edilir ve 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant döküldükten sonra DMSO'nun etkisinden kurtarmak amacıyla tekrar 1-2 ml % 10 serumlu medyumla 2 defa 1500 rpm'de 1-2 dk daha santrifüj edilir. Pellete az miktar % 10 serumlu medyum eklenerek yavaşça pipetajlanır ve medyum konulmuş flasklara ekim yapılır.

2.3.3.2.2 Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 5 ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 10 ml % 10 FCS ve 100 IU/ml penisillin-streptomisin içeren DMEM-F12 medyumunu içersinde % 80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

2.3.3.2.3 Hücrelerin Pasajlanması

Flasklar içersinde % 100 yoğunluğa gelen hücrelerden medyum uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine % 0.05'lik tripsinden küçük flasklara 1-2 ml, büyük flasklara 2-3 ml eklenerek 37°C lik CO₂ etüvde bekletilerek kontrollü bir kalkmaları sağlanır. Yüzeyden ayrılan hücrelere tripsinle aynı miktarda medyum ilave edilerek tripsinin etkisi bloke edilir ve santrifüj tüpüne süspanse halde toplanan hücreler 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek süpernatantı uzaklaştırılır. Bir miktar medyumla süspanse edilen hücreler medyum konulmuş flasklara ekilir. Flasklar 37°C lik % 5 CO₂'li etüve kaldırılır.

2.3.3.2.4 Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1 mm²'lik alan ve 0.1 mm derinliğe sahip hemasitometre kullanılır. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulunur.

$$\text{Toplam hücre sayısı/ml} = \text{Hemasitometre sayım sonucu} \times 10^4 \times \text{Medyum miktarı(ml)}$$

2.3.3.2.5 Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler % 0.05'lik tripsin uygulanması ile yapışıkları yüzeyden kaldırılır. Kalktıkları gözlenen hücelere tripsinin etkisini bloke etmek için medyum eklenir ve süspansiyon santrifüj tüpünde toplanarak 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır. Pellete tekrar medyum eklenir ve tripsinin etkisinden kurtarmak için tekrar santrifüj edilir. Bu işlem sonrası pellete tekrar medyum ilave edilir ve pipetajla tek hücre süspansiyonu denen tek hücre süspansiyonu elde edilir. Hemasitometrede hücre sayımı yapıldı. Hücreleri içeren falcon tüpü, % 20 DMSO'lu medyum içeren ve % 40 FCS'li medyum içeren santrifüj tüpleri buz içersine oturtulur. Kullanılacak, soğuğa dayanıklı saklama tüpleri de buza oturtularak soğumaları sağlanır. Tüp içersindeki tek hücre süspansiyonundan serumlu medyum içersine alınan hücreler pastör pipeti ile karıştırılır. DMSO'lu medyum bu karışım içersine damla damla ilave edilir. Saklama tüpü daha sonra 1 gece -20°C'de, 1 gece de -70°C'de bekletildikten sonra sıvı nitrojene alınır. Ancak hücreler sıvı nitrojene değmemeli, bunun buharında kalmalıdır. Tüpte son konsantrasyon 2.5x10⁶ hücre/ml olmalıdır.

2.3.3.3 Antitümör Aktivite Deneyleri

2.3.3.3.1 Hücrelerin Hazırlanması

Flasklarda yarı yarıya yoğun hale gelen C6 hücreleri % 0.05'lik tripsin yardımıyla kontrollü olarak kaldırılıp aynı miktar medyum ilavesi ile toplandı. Toplanan hücre süspansiyonu 1500 rpm' de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantı uzaklaştırılmış dibe çökmüş hücreler serumlu medyumla tekrar sulandırılarak tek hücre süspansiyonu elde edildi. Bu süspansiyon hemositometrik kamera yardımıyla sayılarak toplam hücre sayısı hesaplandı.

2.3.3.3.2 Ekstraktların Çözünmesi

Ekstraktların her biri önce kendi çözücülerinden 1'er ml kullanılarak çözüldü. Üzeri steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Karışım 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Elde edilen stok çözeltiden son konsantrasyonu 100 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml olacak dilüsyonlar hazırlandı.

2.3.3.3.3 Tek sıralı monolayer hücre kültürü deneyleri

Deneylerde kullanılacak hücreler flaskları % 70-80 oranında kapladıklarında hücrelerin tutundukları flaskın zemininden kaldırılması amacıyla % 0.05'lik tripsinden küçük flasklara 1 ml, büyük flasklara ise 2 ml verildi ve kontrollü olarak 37°C'lik etüvde kalkmaları için bekletildi. Yüzeiden kalktıkları gözlenen hücrelerin üzerine tripsini inaktive etmek amacıyla aynı miktar medyum eklenerek hücrelerin toplanması sağlandı ve 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatantı döküldükten sonra kalan hücreler medyum içerisinde tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve hemositometrede sayılarak toplam hücre sayısı saptandı.

6 kuyucuklu kültür tabaklarının her kuyucuğuna 5'er ml DMEM-F12 medyumunu verildi. Bu kuyucukların her birine hücre sayısı hesaplanmış % 100 canlı tek hücre süspansiyondan 500000 C6 hücresi ekildi.

Tabakların yüzeyine tutunmaları için 1 saat inkübe edilen hücrelere, ekstraktların dilüsyonlarından kuyucuk başına 100'er microlitre verilerek son konsantrasyonun 100 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml şeklinde olması sağlandı. Kontrol gruplarına ise aynı miktarda distile su verildi. Çözücü kontrolleri için ise çözücünün deneyler sırasında hücrelere ulaşan en yüksek konsantrasyonu hazırlandı. Bunun için 1 ml çözücü üzerine 9 ml distile su eklenerek içerisinde bitki ekstraktı varmışçasına yapılan hesaplama göre aynı şekilde ekstraktın son konsantrasyonunun 100 µg/ml'lik olduğu hali elde edilir gibi hazırlandı.

Deneylerde ekstraktların her konsantrasyonu için 3 kuyucuk kullanıldı ve her konsantrasyon için 24, 48 ve 72 saatlik deney grupları oluşturuldu.

2.3.3.3.a. Monolayer sonuçlarının değerlendirilmesi

İnkübasyon süreleri sonunda deney gruplarındaki hücrelerin medyumları uzaklaştırılarak kuyucuk başına % 0.05'lik tripsinden 1'er ml verildi ve 37 °C'lik etüvde kontrollü tripsinizasyonları sağlandı. Kalkan hücrelerin üzerine aynı miktar (1 ml) medyum ilave edilerek tripsinin aktivitesi inhibe edildi ve hücreler bu karışım içerisinde toplanarak 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek hücrelerin üzerine 1'er ml medyum eklendi ve tek hücre süspansiyonu haline getirilerek hemisitometrik kamerada sayımları yapıldı. Elde edilen hücre sayıları paralel kontrol grupları ve paralel çözücü kontrolleri ile istatistiki olarak karşılaştırıldı.

2.3.3.3.4. Üç Boyutlu sferoid modelde hücre kültürü deneyleri

Monolayer sonuçlarında, her üç ekstraktın istatistiki olarak anlamlı bulunan en yüksek dozları multiselüler sferoid modelde denendi.

Çok hücreli tümör sferoidleri üretimi için sıvı üst tabaka yöntemi kullanıldı [42]. 6 kuyucuklu kültür tabaklarının zemini 1/1 agar/medyum karışımı ile kaplandı. Bunun için önce bidistile suda % 3'lük stok agar solüsyonu hazırlanarak steril edildi. Kültür tabaklarına verilmeden hemen önce 60°C'de ısıtılarak sıvı hale getirildi ve 40°C'ye ısıtılan DMEM-F12 medyumunu ile 1/1 oranında seyreltildi. Daha sonra kuyucukların her birine 1'er ml halinde dağıtılıp hafifçe yüzeye yayılması sağlanan agar solüsyonunun jel halini alması için kültür tabakları üstleri kapalı halde 10 dakika buzdolabında +4°C'de bekletildi.

Jel haline gelmiş agarlı kuyucukların herbirine 1'er ml DMEM-F12 medyumunu ilave edildi ve tripsinize edilerek flasklardaki monolayer hücre kültürlerinden kalkması sağlanmış ve tek hücre süspansiyonunda sayıları hemositometre ile saptanmış C6 hücrelerinden kuyucuk başına 1000000 hücre ekildi. Kültür tabakları 37°C, % 5 CO₂ ve 1 atmosfer basınçta inkübe edildi. Bu süre içerisinde sferoid gelişimi invert mikroskopta izlendi.

Bir hafta sonunda büyüklüğünün 100-400 mikrona ulaşan sferoidlere, 100 µg/ml konsantrasyonda *S.tomentosa*/metanol ekstraktı, 100 µg/ml *S. tomentosa*/petroleum eter ekstraktı ve 10 µg/ml *S.tomentosa*/ kloroform ekstraktı verildi. İnkübasyon süresi olarak, etkinin fazla olduğu düşünülen 48 saat seçildi. Bu süre içinde deney grupları 37°C, % 5 CO₂ ve 1 atmosfer basınçta inkübe edildi.

2.3.3.3.4.a. Üç Boyutlu sferoid kültürlerin değerlendirilmesi

48 saatlik inkübasyon sonucunda sferoid model deney grupları toplanarak 1000 rpm de 3 dk santrifüj edildi. Sferoidler kaldırılmadan süpernatantın bir kısmı pastör pipeti ile çekilip atıldı. Hücreler, kalan medyum üzerine mililitre başına 50 mikrolitre 20 mikromolarlık BrdU ilave edilerek 37°C'lik çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edilen hücrelerin süpernatantları, sferoid yapıyı bozmadan; pastör pipeti yardımıyla çekilip uzaklaştırıldı ve hücrelerin

üzerine 1'er ml % 10'luk formaldehit ilave edildi. Formaldehitte ½ saat inkübe edilen sferoidler 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildikten sonra formaldehit atıldı ve 1'er ml medyumla hafif kaldırılarak tümünün eppendorfa alınması sağlandı. 1000 rpm'de tekrar 3 dk santrifüj edilen sferoidler süpernatantı atıldıktan sonra kesilip süzölmüş yumurta akı ilave edilerek 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda yumurta akı içersinde çöken sferoidlerin üzerine % 70'lik alkol ilave edilerek 1 gece oda ısısında bekletildi.

Ertesi gün eppendorf içersinde katılaşan yumurta akı içinde sarılı sferoidlerin alkolü uzaklaştırıldı ve eppendorfun bistüri yardımı ile kesilmesi sonucunda çıkarıldı ve ışık mikroskobu takibine alınarak parafine gömüldü.

Alınan kesitlere hematoksilen–eozin boyası ve immunohistokimya uygulaması sonrası preparatlar mikroskopta değerlendirildi.

2.3.3.3.4.a.1. Üç Boyutlu Sferoid Deney Modelinde Işık Mikroskobu Takibi ve Parafin Bloklama

Toplanma sırasında formaldehitte tespit edilmiş sferoidler alkol serileri ile dehidrate edildi. Toluenle şeffaflandırılan sferoidler, sıcak parafine gömüldü. Bu işlemler 56-58°C'lik etüvde gerçekleştirildi: % 90 alkol ve % 96 alkolde 25'er dakika, % 100 alkolde 2x25 dakika, toluolde 30 dakika son olarak sıcak parafinde 45 dakika bekletildi. Sferoidler daha sonra oda ısısında plakalar içinde parafine gömülerek blok haline getirildi.

Bloklardan mikrotom yardımıyla alınan 4-5 mikronluk kesitlerin bir kısmı hematoksilen-eozin boyası için normal lamlara, bir kısmı da BrdU boyaması için polylizinli lamlara alındı.

2.3.3.3.4.a.2. BrdU'lu Parafin Kesitlere Monoklonal Antikor Metodu İle İmmunohistokimya Uygulaması

Çizelge 2.3 İmmunohistokimyada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
PBS	1 lt bidistile suya 11.5 gr Na_2HPO_4 , 2.96 gr $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 5.84 gr NaCl katılarak karıştırıldı. Ph 7.6'ya ayarlandı.
H_2O_2	1.5 ml H_2O_2 , 98.5 ml metanole kondu. Solüsyon taze olarak hazırlandı.
HCl	12.08 ml HCl distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Taze olarak hazırlandı.
% 5 CaCl_2	5 gr CaCl_2 , 100 ml distile suda çözündürüldü.
NaOH (0.25 M)	1 gr NaOH 100 ml distile suda çözündürüldü.
Tripsin	100 mg tripsin 100 ml distile suda çözündürüldü. İçine 4 ml % 5'lik CaCl_2 ilave edildi. Ph, NaOH ile 7.8'e ayarlandı. Solüsyon taze olarak hazırlandı.
Boraks (0.1 M)	Stok A= 0.2 M Borik Asit 1.24 gr Borik Asit 100 ml distile suda çözündürüldü. Stok B= 0.05 M Sodyum tetraborat 1.9 gr Sodyum tetraborat 100 ml distile suda çözündürüldü. Stok A'dan 90 ml, Stok B'den 10 ml alınarak karıştırıldı. pH: 7.4

Poli-lizinli lamlara alınan kesitler immunohistokimya işlemine kadar oda ısısında ve karanlıkta saklandı. Kesitler deparafinize edildi: Bunun için kesitler toluolde 2x10 dakika, % 100 alkol, % 96 alkol, % 90 alkol ve % 70 alkolde 2x5'er dakika bekletildi.

Kesitler distile suya alındı. 10-15 dakika PBS'te tutuldu. Daha sonra karanlık ortamda hidrojen peroksit aktivitesini bloke eden % 0.5'lik H₂O₂ ile muamele edilen preparatlar 3 kez distile suyla yıkandı. Preparatlar, 37°C'de 30 dakika, hücrede antijenik bölgenin açılmasını sağlayan tripsinle muamele edildi. Distile suda çalkalandı. 37°C'de 5 dakika PBS ile muamele edildikten sonra boraksın etkisine yardımcı olan 2 N HCl ile 37 °C de 20 dakika bekletildi. Preparatlar 10 dakika Boraks ile muamele edilerek DNA'nın biraz açılması sağlandı. Böylece DNA'ya bağlanmış durumdaki BrdU açığa çıkarılmış oldu. Boraks muamelesi sonrası distile su ile yıkanan preparatlar PBS'e alındı. PBS'ten alınarak altları kurulan preparatlarda kesitlerin olduğu sahalar PAP-PEN yardımıyla daire içine alındı ve preparatlar preparat kutusuna yerleştirilerek ortamın nemli olması sağlandı. İşaretlenen bu alanlara Ultra V Block damlatılarak 15 dakika bekletildi. Bu sayede hücre içersinde çalışmak istediğimiz antijenin dışında kalan antijenlerin kapatılması sağlandı. Ultra V Block uzaklaştırılarak, preparatlara 1:200 oranında dilue edilmiş, BrdU'ya bağlanacak primer antikör (BrdU antikörü) damlatılarak 1 saat süre ile oda ısısında bekletildi. 2 kez PBS ile yıkandı. Preparatlar primer antikora bağlanacak sekonder antikör olan Biotnylated goat Anti-Mouse ile 30 dakika muamele edildi. 2 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra preparatlar, antikörün ucuna bağlanacak enzim olan Streptavidin peroxidase ile 30 dakika muamele edildi. 2 kez PBS ile yıkandı. Kromojen ile 20 dakika oda ısısında tutuldu. Kromojen enzimle reaksiyona girerek boyanmayı sağladı ve bu sayede hücreler renkli olarak ayırd edilebilir duruma geldi. Preparatlar bu işlem sonrasında distile suya alındı. Mayer-Hematoksilen ile 3-5 dakika boyandı. Son olarak preparatlar Ultramount ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirildi.

2.3.3.3.4.a.3. Hematoksilen-Eozin (Ehrlich) boyama

Parafini giderilmiş kesitler alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Bu amaçla kesitler 30 dakika toluolde tutulduktan sonra iki kez % 96 alkolden geçirildi ve distile suya alındı.

Hematoksilen solüsyonunda 30 dakika boyandı. Çeşme suyunda çalkalandı. Boyanın fazlası asit alkolde (% 80 alkol 1 ml. HCl) çok çabuk differansiye edildi. Kesitler tekrar çeşme suyunda çalkalandı ve morarınca kadar suda bırakıldı. (En az 15 dakika). Kesitler kontrollü olarak 3 dakika eozinde tutuldu. Saf sudan geçirildi. Çabuk bir şekilde, tek tek alkol serilerinden geçirilerek toluole alındı ve kanada balzamu ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

2.3.4. İstatistik Analizler

Elde edilen verilerin paralel kontrol grubu ve paralel çözücü kontrolü ile karşılaştırmasında Minitab 10.b programı kullanılmıştır. Varyans Analizi Anova kullanılarak yapılmıştır. İstatistik karşılaştırmalarda $p \leq 0.05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Anadolu insanı Paleolitik çağından (yaklaşık M.Ö. 50000 yılları) beri bitkileri tedavi maksadıyla kullanmaktadır. *Salvia L.* (Adaçayı) grubunun bazı türleri de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bu nedenle Adaçayı türlerine Latince “kurtarmak, iyileştirmek” anlamına gelen, SALVEO kelimesinden kaynaklanan *Salvia* adı verilmiştir. *Salvia* cinsi faydalı bitkiler arasında önemli bir gruptur. *Salvia* genusu antiseptik karakterli monoterpenler içerir. Son zamanlarda *Salvia* genusu üzerinde yapılan çalışmalar, *Salvia*'lardaki bazı kimyasal bileşiklerin DNA'nın sentez hızını yavaşlattığını ileri sürülmektedir. Bu durum kanser tedavisi için çok önemlidir [27].

Salvia cinsinin bazı türleri ülkemiz açısından ekonomik ve tıbbi önem arz etmektedir. Ayrıca bu türlerden bazıları ülkemizin önemli ihraç ürünleri arasındadır [27, 35].

Salvia tomentosa halk arasında hazımsızlık, larenjit, farenjit, ağız mukozası iltihabı, dişeti iltihabı, dil iltihabı, aşırı terleme ve sütün çok fazla gelmesine karşı kullanılmaktadır [40].

Bu çalışmada kullanılan *Salvia tomentosa* bitkileri Yrd.Doç.Dr Fatih Satıl'dan temin edilmiş ve bu bitkilerin kök, gövde,çiçek,tohum ve yaprakları homojen bir şekilde kullanılarak metanol, petrol eteri ve kloroformda üç ayrı ekstraktı elde edilmiştir. Farklı bileşenlerin farklı çözücülerle gelebileceği olasılığı göz önüne alınarak, ekstrakt eldesi için üç ayrı çözücü kullanılmıştır.

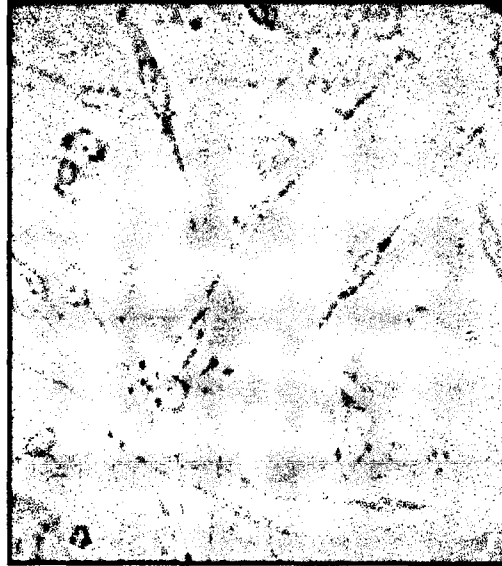
Bu çalışmada bazı kimyasal bileşenlerinin DNA'nın sentez hızını yavaşlattığı ileri sürülen [30,31] ancak hücre kültüründe antitümör aktivitesi hakkında hiçbir bilgi bulunmayan *Salvia tomentosa*'nın antitümör aktivite çalışmaları, doku kültürünün 2

modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doku kültürü çalışmalarında sıçan C6 glioma hücre soyu kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu soyun kullanılmasının nedeni bu soyun kolay ve hızlı üreme yeteneğinde olması ve sonuçların yansıtılması açısından daha esnek olacağı düşünülmesindedir.

Glioblastoma multiforme (GBM), erişkin yaş grubunda en sık görülen primer beyin tümörlerindendi [64]. Rastlanma sıklığı, tüm tümörler içinde % 2'dir [65]. Primer malign beyin tümörü görülme oranı ise yaklaşık olarak 5/100000'dir [65, 66].

Hayvan beyin tümörlerinin insan beyin tümörleri ile olan benzerlikleri, klinikte parametrelerin tanımlanması ve uygun tedavinin saptanmasında oldukça önemlidir. Sıçan C6 glioma hücre soyu da glioblastomanın büyüme, metastaz ve invazyonun çalışılması için yararlı bir hücre soyudur C6 hücreleri neonatal farelerin beyinlerine enjekte edildiklerinde Glioblastoma Multiforme ile morfolojik olarak benzerdirler [67].

Hızlı büyüyen C6 glioma hücreleri randomize eşleştirilmiş Wistar-Furth türünde sıçanlarda N,N'-nitrozometilüri verilerek ilk kez 1968 yılında Benda ve arkadaşları tarafından oluşturulmuştur [68].



Şekil 3.1. C6 hücrelerinin mikroskop görüntüsü (M.B.X73)

Salvia tomentosa'nın ekstraktları 3 ayrı çözücü kullanılarak elde edildikten sonra bu ekstraktların C6 glioma hücre hattında antitümör aktiviteleri hücre popülasyonundaki artışa bakılmak suretiyle değerlendirilmiştir. Buna göre, C6 glioma hücre hattı için kuyucuk başına 500000 hücre ekilerek, hücrelerin tutunması sağlandıktan sonra bitki ekstraktları son konsantrasyonları 100 µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml olacak şekilde kuyucuklara tatbik edilmiş ve % 5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 24 ,48 ve 72 saat inkübasyona maruz bırakılmışlardır. Kontrol gruplarına aynı miktar distile su, çözücü kontrollerine ise çözücünün hücrelere ulaştığı en yüksek miktarı uygulanmıştır. Yani çözücü kontrollerine, ekstraktın uygulandığı en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/ml'de kullanılan hacimde çözücü ilave edilmiştir. Deneyleerde her konsantrasyon için 3 kuyucuk kullanılmıştır. Bu süreler sonunda deney gruplarındaki hücreler % 0.05'lik tripsinle tripsinize edilerek toplanmış ve medyum içersinde tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra hemasitometrede sayımları yapılmış ve toplam hücre sayıları hesaplanmıştır.

Salvia tomentosa bitkisinden elde edilen metanol, kloroform ve petrolium eter ekstraktları, fare C6 glioma monolayer hücre kültürlerine uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat hücre-ekstrakt etkileşimi sonrasında, her kuyucuktan elde edilen toplam hücre sayıları saptandıktan sonra, istatistikleri alınmış; ortalama hücre sayıları ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

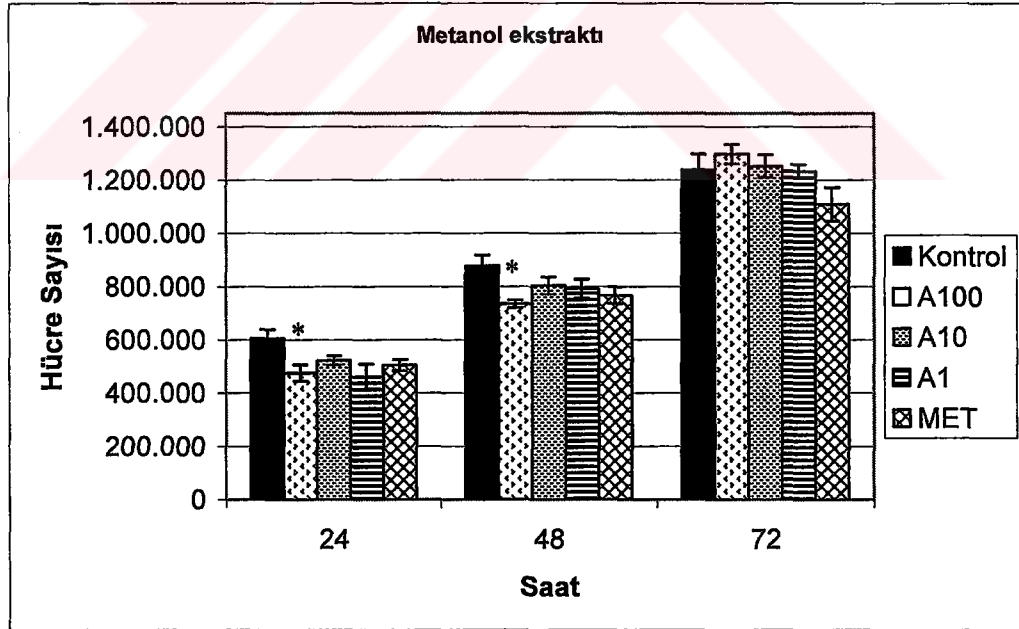
3.1. *Salvia tomentosa*/Metanol ekstraktının monolayer hücre kültüründe C6 Glioma hücre soyuna etkileri

Suda ve DMSO'da çözünmeyen ekstrakt 1 ml metanol kullanılarak çözünmüştür. Üzeri distile suyla 10 ml'ye tamamlanan ekstrakt daha sonra 0.22 µm'lik filtre yardımıyla süzülerek steril hale getirilmiştir. Son konsantrasyonu 100 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml olacak şekilde hesaplanarak 500000 C6 hücresinin ekili olduğu kuyucuklarda 100'er µl halinde tatbik edilerek 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarla denenmiştir.

Metanol çözücüsü kontrolle karşılaştırıldığında 24, 48 ve 72. saatlerde herhangi bir anlamlı etkiye rastlanmamıştır (Çizelge 3.1). Şekil 3.2’de görüldüğü gibi 24 saat sonunda sadece son konsantrasyonu 100 µg/ml olarak uygulanan ekstrakta kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir inhibisyon görülmektedir (p=0.049).

48. saatte bu konsantrasyonun paralel kontrole karşı inhibe edici etkisi devam etmektedir (p=0.028).

Diğer konsantrasyonlar 24. ve 48. saatlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısı açısından bir azalma görülmektedir ancak bu azalma istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.2).



Şekil 3.2 *Salvia tomentosa*/metanol ekstraktının (A maddesi) C6 hücre soyunda hücre sayısı üzerine zamana bağlı etkisi. * istatistiki olarak anlamlı değerleri göstermektedir.

Çizelge 3.1 *Salvia tomentosa*/metanol ekstraktının farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı minimum-maksimum ve ortalama değerleri ile istatistiki verileri

	Ortalama	Standart sapma	Ortalamanın Standart sapması	Minimum	Maksimum	P (Kontrol)
Metanol/24	505000	36827	21262	472500	545000	0.071
Metanol/48	767667	55046	31781	707500	815500	0.096
Metanol/72	1110000	108513	62650	1040000	1235000	0.206
A 100/24	475833	52520	30322	422500	527500	<u>0.049</u>
A 100/48	735000	26101	15069	717500	765000	<u>0.028</u>
A 100/72	1297500	62899	36315	1257500	1370000	0.444
A 10/24	522500	31225	18028	487500	547500	0.104
A 10/48	804167	55920	32286	740000	842500	0.222
A 10/72	1252500	74540	43036	1185000	1332500	0.863
A 1/24	460833	81253	46912	380000	542500	0.070
A 1/48	792500	61593	35561	735000	857500	0.183
A 1/72	1235000	41307	23848	1207500	1282500	0.950
Kontrol/24	605000	60673	35030	555000	672500	
Kontrol/48	878333	68981	39826	800000	930000	
Kontrol/72	1239167	101129	58387	1125000	1317500	

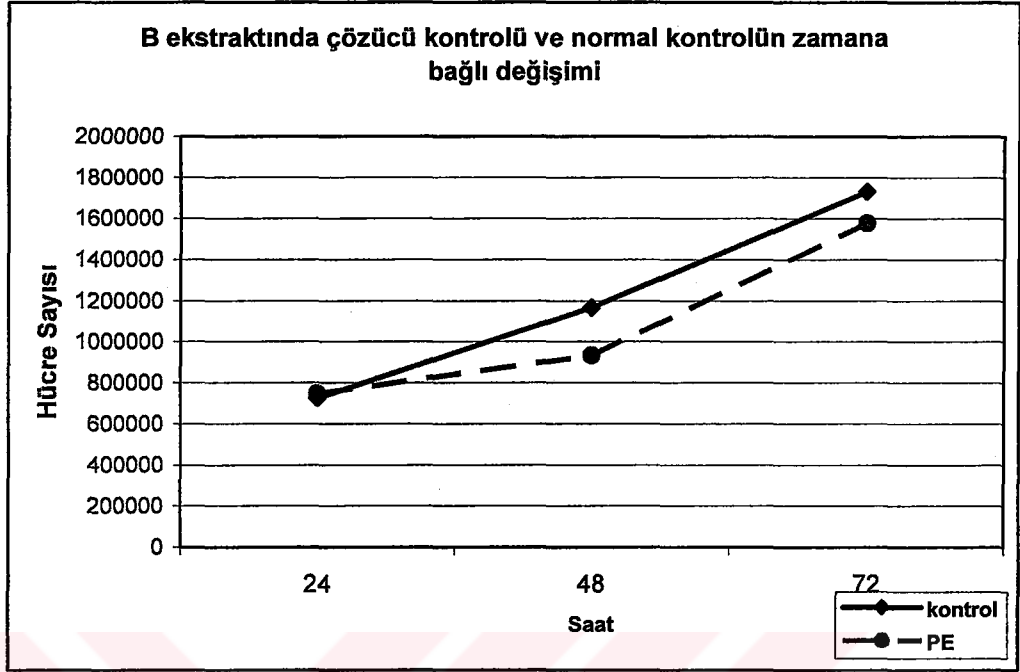
3.2. *Salvia tomentosa*/Petrol eteri ekstraktının monolayer hücre kültüründe C6 Glioma hücre soyuna etkileri

Suda ve DMSO'da çözünmeyen ekstrakt 1 ml petrol eteri kullanılarak çözünmüştür. Üzeri distile suyla 10 ml'ye tamamlanan ekstrakt daha sonra 0.22 µm'lik filtre yardımıyla süzülerek steril hale getirilmiştir. Son konsantrasyonu 100 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml olacak şekilde hesaplanarak 500000 C6 hücresinin ekili olduğu kuyucuklara 100'er µl halinde tatbik edilerek 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarla denenmiştir.

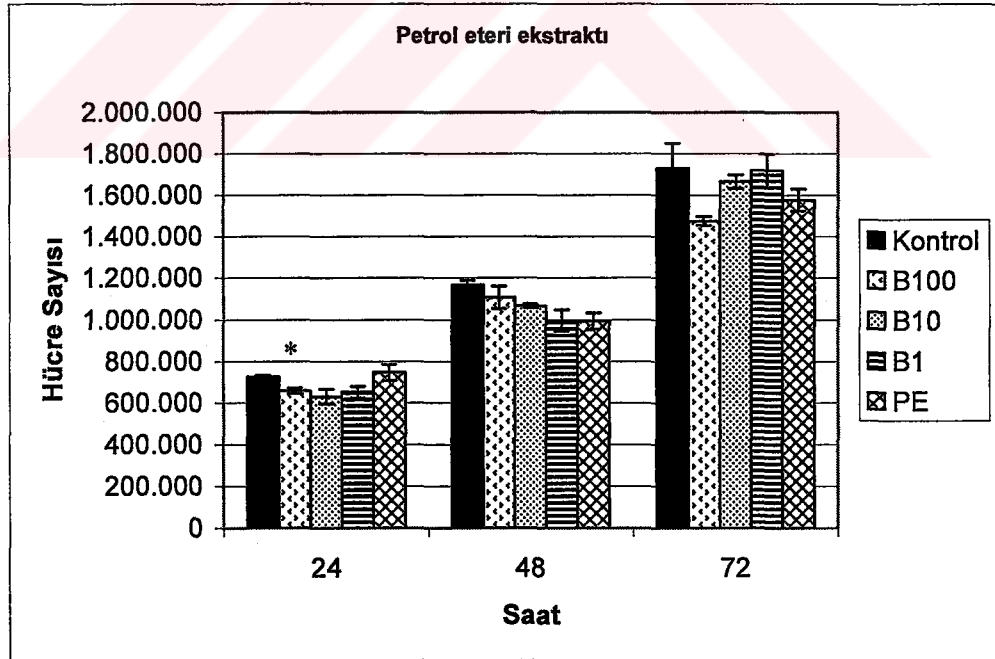
Öncelikle sadece çözücü kontrolleriyle, distile su kullanılan kontrol grupları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda 24 ve 72. saatlerde en yüksek çözücü hacmi kullanılmasına rağmen hücre popülasyonunda anlamlı bir azalış görülmemiştir. Fakat ilginç olarak 48. saatte çözücü kontrolü ve normal kontroller arasında istatistiki açıdan anlamlı olan bir azalma görülmektedir ($p=0.018$) (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

Sadece petrol eteri uygulandığında 48. saatte hücre popülasyonunda büyümeyi engelleyici bir etkinin olduğu düşünülerek, *Salvia tomentosa*/Petrol eteri ekstraktları sadece çözücü kontrolü ile karşılaştırıldığında, 48. saatte tüm konsantrasyonlarda hücre sayısında azalış göstermiş ancak bu azalış istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.2).

24 ve 72. saatlerde ekstraktlardan elde edilen veriler çözücünün etkisi ihmal edilerek sadece kontrole karşılaştırılmıştır. 24.saatte sadece 100 µg/ml'lik konsantrasyonda istatistiki olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p=0.014$). Diğer konsantrasyonda ve zaman aralıklarında yine bir azalış göstermesine rağmen bu azalış anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.2).



Şekil 3.3. *Salvia tomentosa*/petrol eteri ekstraktı (B maddesi) uygulanmış C6 hücrelerinde çözücü kontrolü ve distile su verilmiş normal kontroldeki hücre popülasyonunun zamana göre değişimi



Şekil 3.4 *Salvia tomentosa*/petrol eteri ekstraktının (B maddesi) C6 hücre soyunda hücre sayısı üzerine zamana bağlı etkisi. * istatistiki olarak anlamlı değerleri göstermektedir. 24 ve 72 saatlerde kontrol X ekstrakt, 48 de ise çözücü X ekstrakt karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.2 *Salvia tomentosa*/petrol eteri ekstraktının farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı minimum-maksimum ve ortalama değerleri ile istatistiki verileri

	Ortalama	Standart sapma	Ortalamanın standart sapması	Minimum	Maksimum	p (Petrol eteri)	P (Kontrol)
Petrol eteri /24	748333	68845	39747	702000	827500		0.611
Petrol eteri /48	993333	66583	38442	950000	1070000		<u>0.018</u>
Petrol eteri /72	1578333	92511	53411	1485000	1670000		0.313
B 100/24	658500	22869	13204	632500	675000		<u>0.014</u>
B 100/48	1107500	93173	53794	1000000	1165000	0.159	
B 100/72	1475833	37528	21667	1432500	1497500		0.107
B 10/24	631667	61712	35629	580000	700000		0.063
B 10/48	1066667	15069	8700	1052000	1082000	0.136	
B 10/72	1666667	57572	33239	1617500	1730000		0.636
B 1/24	652500	48798	28174	605000	702500		0.069
B 1/48	995833	90220	52088	942500	1100000	0.971	
B 1/72	1718333	138797	80134	1622500	1877500		0.935
Kontrol/24	725833	15877	9167	707000	735000	0.611	
Kontrol/48	1167500	39686	22913	1122500	1197500	<u>0.018</u>	
Kontrol/72	1730833	209528	1120971	1532500	1950000	0.313	

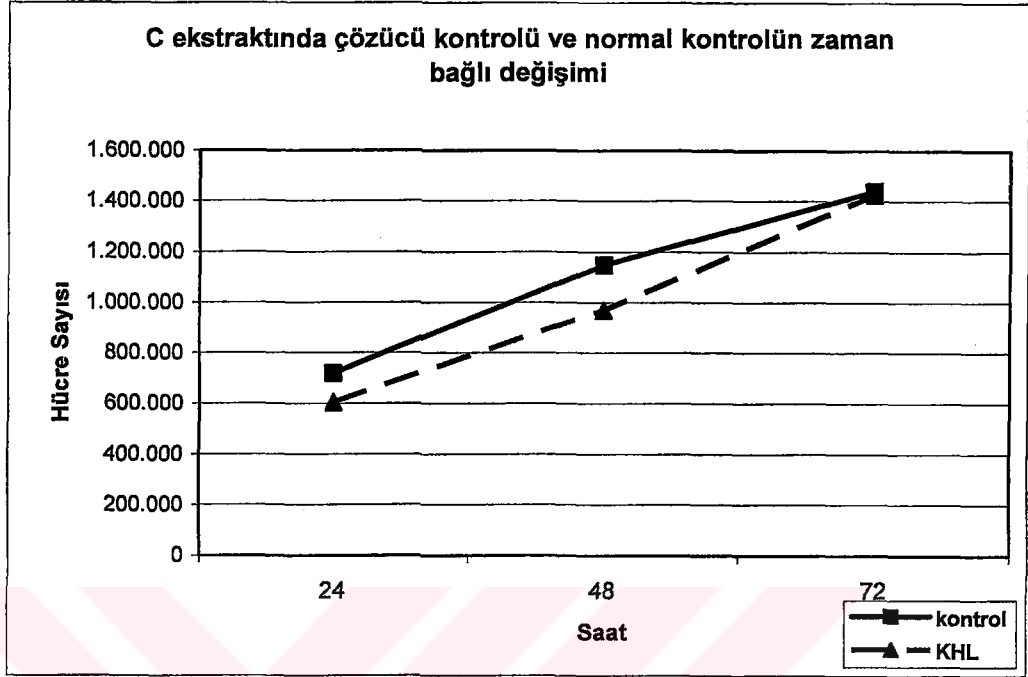
3.3. *Salvia tomentosa*/Kloroform ekstraktının monolayer hücre kültüründe C6 Glioma hücre soyuna etkileri

Suda ve DMSO'da çözünmeyen ekstrakt 1 ml kloroform kullanılarak çözünmüştür. Üzeri distile suyla 10 ml'ye tamamlanan ekstrakt daha sonra 0.22 µm'lik filtre yardımıyla süzülerek steril hale getirilmiştir. Son konsantrasyonu 100 µg/ml, 10 µg/ml ve 1 µg/ml olacak şekilde hesaplanarak 500000 C6 hücresinin ekili olduğu kuyucuklara 100'er µl halinde tatbik edilerek 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarla denenmiştir.

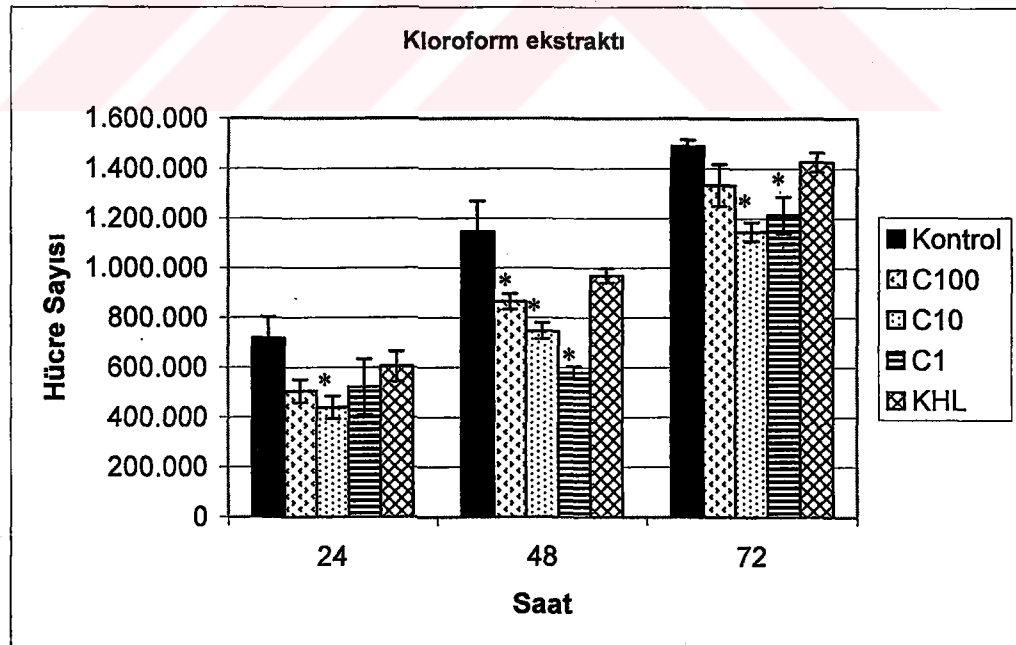
Petrol eteri ekstraktında olduğu gibi kloroform ekstraktlarından da öncelikle çözücü kontrolü ile distile su kullanılan normal kontrol grupları karşılaştırılmıştır. Yine 48. saatte sadece çözücü kullanılan grup ile kontrol arasında istatistiki olarak anlamlı bir azalış görülmüştür ($p=0.000$) (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.5). Buna göre bu etkiyi iyice gözlemek amacıyla verilerde 48. saatler çözücü kontrolü ile karşılaştırılmış, 24 ve 72. saatlere ait verilerse distile su verilen kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

48. saatlerde tüm konsantrasyonlarda çözücü kontrolü ile yapılan karşılaştırmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$) (Çizelge 3.3).

24 ve 72 saatlerde, 100 µg/ml'lik konsantrasyonda, distile su kullanılan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir etki gözlenmemiştir. 10 µg/ml'lik konsantrasyonda, hücre popülasyonunda anlamlı bir azalış görülmektedir ($p=0.045$, $p=0.002$). 1 µg/ml'lik konsantrasyonda hücre sayısındaki azalış 24. saatte anlamsız bulunmuştur. 72. saatte ise istatistiki olarak anlamlı bir azalış mevcuttur ($p=0.010$, $p=0.024$).



Şekil 3.5. *Salvia tomentosa*/kloroform ekstraktı (C maddesi) uygulanmış C6 hücrelerinde çözücü kontrolü ve distile su verilmiş normal kontroldeki hücre popülasyonunun zamana göre değişimi



Şekil 3.6. *Salvia tomentosa*/kloroform ekstraktının (C maddesi) C6 hücre soyunda hücre sayısı üzerine zamana bağlı etkisi. * istatistiki olarak anlamlı değerleri göstermektedir. 24 ve 72 saatlerde kontrol X ekstrakt, 48 de ise çözücü X ekstrakt karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.3 *Salvia tomentosa*/kloroform ekstraktının farklı konsantrasyonlarının zamana bağlı minimum-maksimum ve ortalama değerleri ile istatistiki verileri

	Ortalama	Standart sapma	Ortalamanın standart sapması	Minimum	Maksimum	p (Kloroform)	p (Kontrol)
Kloroform /24	604167	104413	60283	525000	722500	-	0,337
Kloroform /48	9691667	505182	291677	915000	1015000	-	<u>0,000</u>
Kloroform /72	1425833	67144	38766	1377500	1502500	-	0,237
C 100/24	505000	80467	46458	430000	590000	-	0,094
C 100/48	865000	54083	31225	820000	925000	<u>0,000</u>	=
C 100/72	1540000	233024	134536	1180000	1470000	-	0,733
C 10/24	440000	78103	45092	390000	530000	-	<u>0,045</u>
C 10/48	746667	55076	31798	690000	800000	<u>0,000</u>	=
C 10/72	1146667	68069	39299	1070000	1200000	-	<u>0,002</u>
C 1/24	521667	194170	112104	297500	637500	-	0,236
C 1/48	580000	43589	25166	530000	610000	<u>0,000</u>	=
C 1/72	1213333	127410	73560	1130000	1360000	-	<u>0,024</u>
Kontrol/24	718333	148584	85785	547500	817500	0,337	
Kontrol/48	1147333	210989	121815	915000	1327000	<u>0,000</u>	
Kontrol/72	1490000	43589	25166	1440000	1520000	0,237	

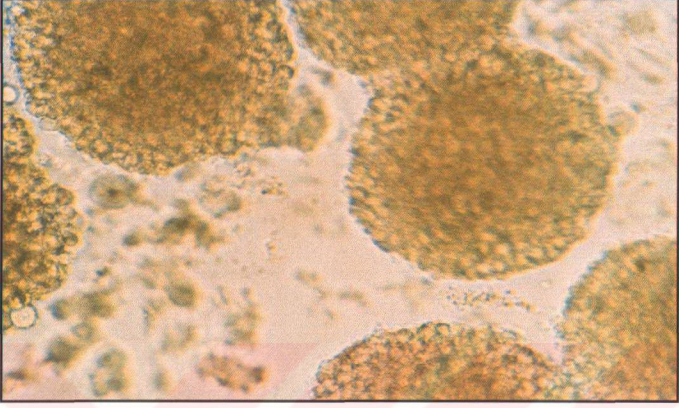
3.4. Üç boyutlu sferoid hücre kültürlerinde antitümör aktivitenin değerlendirilmesi

Üç boyutlu sferoid kültürler tümörün vücut içinde üç boyutlu uzaysal gelişimini yansıtması açısından önemli bir modeldir.

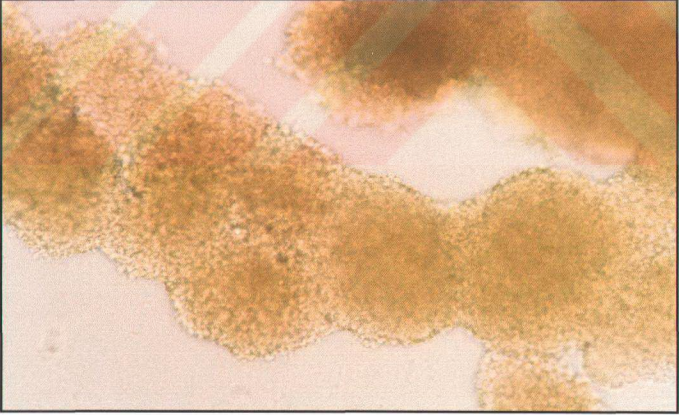
Tek tabakalı hücre kültürünün üç boyutlu *in vivo* solid tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıtmada yetersiz kaldığı giderek daha çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörlerde söz konusu hücrelerarası ilişkileri ve mikro çevresel koşulları çok daha net olarak ortaya koyabilmektedir. Buna paralel olarak birçok tümör hücre soyunun üç boyutlu sferoidler şeklinde üretildiğinde antineoplastik ajanlara ve radyasyona karşı tek tabakalı kültüre göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir [42].

Bu amaçtan yola çıkılarak C6 hücrelerinin sferoid kültürleri yapılmıştır. Bu amaçla % 3'lük agar kullanılarak 1/1 oranında agar medyum karışımı hazırlanarak kuyucukara verilmiş ve donan bu karışım üzerine kuyucuk başına 1000000 hücre ekimi yapılmıştır. Sferoid gelişim invert mikroskopta takip edilmiş ve 1 hafta sonra deney aşamasına gelen (100-400 mikron) sferoidlere (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8) monolayer sonuçlarının anlamlı gruplarından seçilen en yüksek konsantrasyonlar uygulanmış ve 48 inkübasyona bırakılmıştır. Buna göre ekstraktlar, metanol ekstraktı için 100 µg/ml, petrol eteri için 100 µg/ml ve kloroform için 10 µg/ml'lik konsantrasyonlarda uygulanmıştır.

Sferoid modelde uygulanan deneylerin değerlendirilmesi iki aşamada yapılmıştır. İlk aşamada gruplar 48 saatlik inkübasyon süresinin son saatinde 20 µM'lık BrdU ile 1 saat inkübe edilmiş ve daha sonra takibe alınarak hazırlanmış parafin bloklardan elde edilen kesitlere uygulanan monoklonal antikor yöntemi ile immunohistokimyasal boyama sonucunda uzman kişi tarafından değerlendirilerek BrdU işaretlenme indeksi (BrdU-LI) hesaplanmıştır. BrdU işaretlenme indeksi, BrdU ile işaretlenen hücrelerin toplam hücre popülasyonunda % değerleri bulunarak elde edilmiştir.



Şekil 3.7: 1×10^6 %100 canlı C6 Glioma hücresinin %3'lük agar-medyum karışımı üzerine ekildikten 7 gün sonra oluşan canlı sferoid resimleri (M.B.X148).



Şekil 3.8: 1×10^6 %100 canlı C6 Glioma hücresinin %3'lük agar-medyum karışımı üzerine ekildikten 7 gün sonra oluşan canlı sferoid resimleri. C6 hücreleri sferoid oluştururken sferoidlerin birbirlerine kaynaşarak iplik halinde segmentli bir topluluk oluşturdukları görülmektedir (M.B.X148).

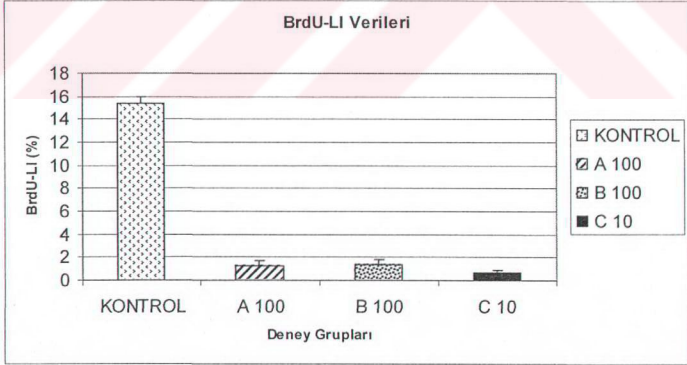
BrdU, DNA sentezini tayin etmek için timidin protokolüne eşdeğer bir alternatiftir. BrdU timidinin analogudur ve DNA içine girer. Anti-BrdU monoklonal antikor ile bıyanarak sayım yapılabilir veya ELISA ile ölçülebilir [69].

Yapılan BrdU işaretlenme indeksi değerlendirmelerine göre Kontrol grubunda sferoid periferinde ve az olmakla birlikte merkezinde işaretlenme gözlendi. Kontrol grubunda işaretlenme indeksi % 15.36 olarak belirlendi.

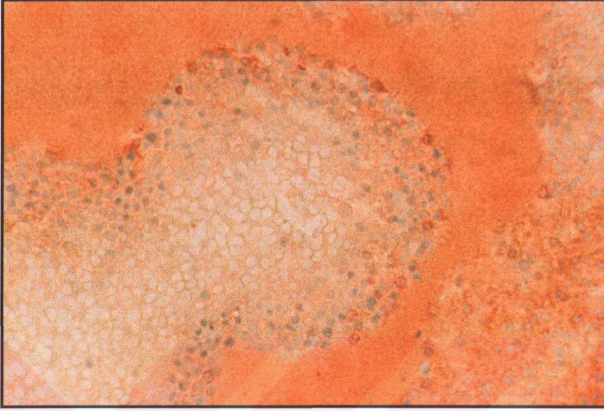
A (Metanol/100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış sferoidlerde periferde az sayıda işaretli hücre gözlenmiştir. Bu grupta işaretlenme indeksi % 1.29 olarak tespit edilmiştir.

B (Petrol eteri/100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış sferoidlerde de periferde az sayıda işaretli hücre gözlenmiş ve işaretlenme indeksi % 1.33 olarak tespit edilmiştir.

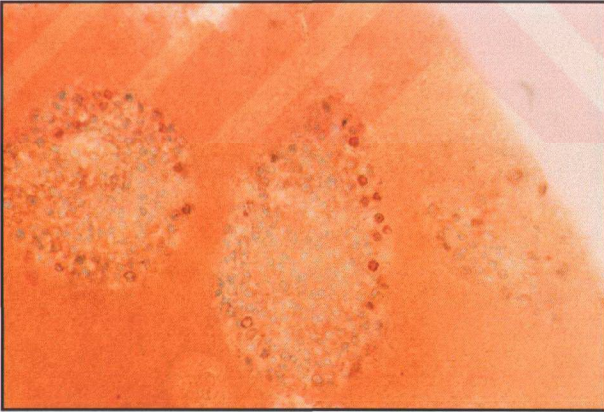
C (Kloroform/10 µg/ml) ekstraktı uygulanmış sferoidlerde ise işaretlenme indeksi % 0.66 olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16).



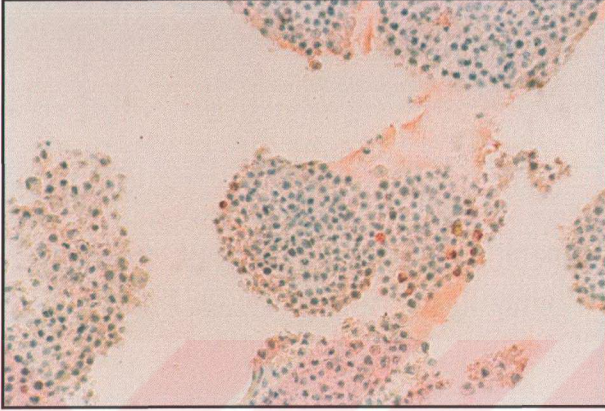
Şekil 3.9 Üç boyutlu sferoid kültürlerde deney gruplarının 48 saat inkübasyon süresi sonunda son bir saatte 20 µM'lık BrdU inkübasyonu sonrası monoklonal BrdU antikorunu ile immunohistokimyasal boyama işlemi sonrasında BrdU-LI verileri(A100=Metanol ekstraktı (100 µg/ml), B100= Petrol eteri ekstraktı (100 µg/ml), C10=Kloroform ekstraktı (10 µg/ml))



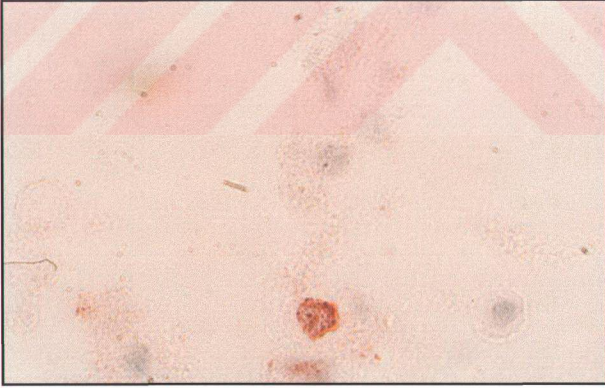
Şekil 3.10: 1×10^6 C6 Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 9 gün sonra son saatte 1 saat süreli $20 \mu\text{M}$ BrdU inkübasyonu sonrası yapılmış ve parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış kontrol grubu sferoidlerin resimleri. Sferoidde çok sayıda kırmızı görünen BrdU(+) hücreler izlenmektedir (M.B.X132).



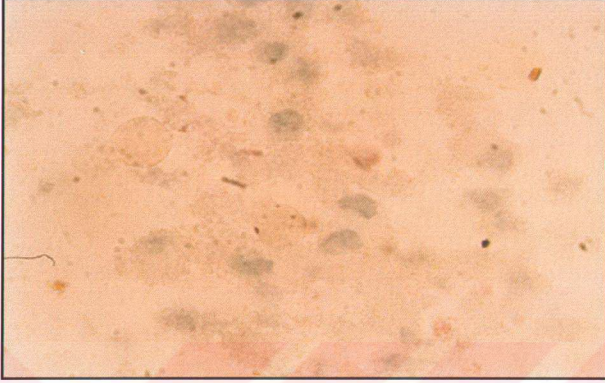
Şekil 3.11: 1×10^6 C6 Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 9 gün sonra son saatte 1 saat süreli $20 \mu\text{M}$ BrdU inkübasyonu sonrası yapılmış ve parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış kontrol grubu sferoidlerin resimleri. Sferoidde çok sayıda kırmızı görünen BrdU(+) hücreler izlenmektedir (M.B.X83).



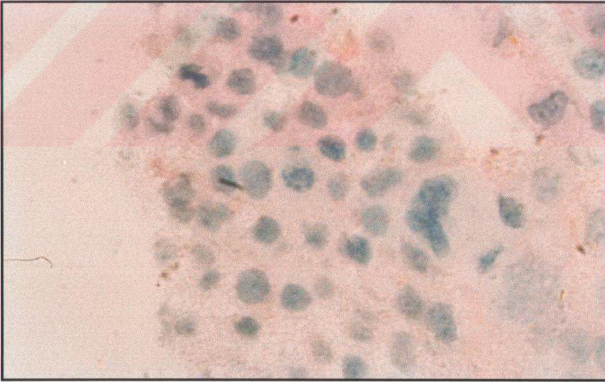
Şekil 3.12: 1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra A 100 (Metanol 100 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış kesitlerin resimleri. Sferoidlerden bütünlüğünü koruyanların periferinde az sayıda olmakla beraber kırmızı görünen hücreler izlenmektedir (M.B.X83).



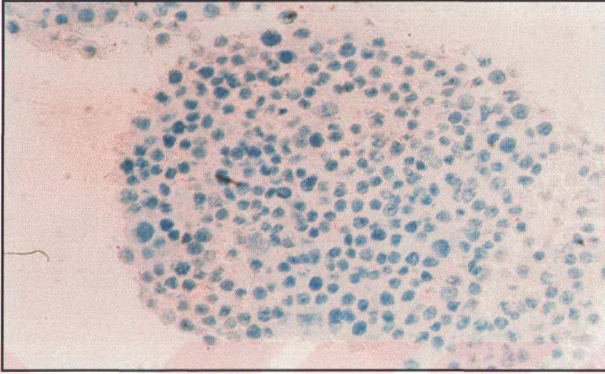
Şekil 3.13: 1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü bozulmuş sferoidlerin proliferasyon zonu kabul edilen dış zon hücrelerinde az sayıda tutunma. 1-2 adet BrdU(+) sayılabilecek hücreler görülmekte (M.B.X331).



Şekil 3.14: 1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü bozulmuş sferoidlerin proliferasyon zonu kabul edilen dış zon hücrelerinde az sayıda tutunma. 1-2 adet BrdU(+) sayılabilecek hücreler görülmekte (M.B.X331).



Şekil 3.15: 1×10^6 C₆ Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra C 10 (kloroform 10 µg/ml) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 µM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü korunmuş olmasına rağmen işaretlenme oldukça düşük seviyede gözlenmektedir. Çok az sayıda zayıf işaretli hücreler görülmektedir (M.B.X331).



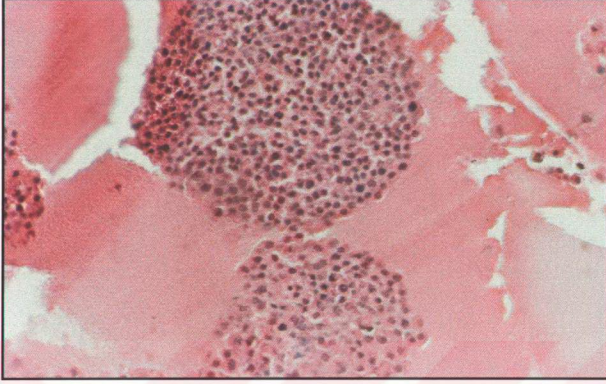
Şekil 3.16: 1×10^6 C6 Glioma hücresi agar agar üzerine ekildikten 7 gün sonra C 10 (kloroform 10 $\mu\text{g/ml}$) ekstraktı ile 48 saat inkübe edilmiş ve son saatte 1 saat süreli 20 μM BrdU inkübasyonu sonrası yapıldıktan sonra parafin kesitleri alınmış sferoidlerde monoklonal antikor ve immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanmış sferoidlerin resimleri. Sferoid bütünlüğü korunmuş olmasına rağmen işaretlenme oldukça düşük seviyede gözlenmektedir. Çok az sayıda zayıf işaretli hücreler görülmektedir (M.B.X132).

3.5. Üç Boyutlu sferoid kültürlerde hematoksilen-eozin boyası ile sferoid morfolojisi değerlendirmeleri

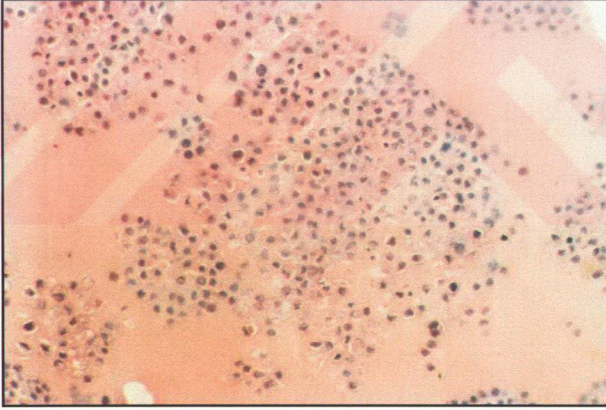
Monolayer sonuçlarına göre her grup için anlamlı kabul edilen bir değerin seçilmesiyle sferoid tekniğinde yapılan hematoksilen-eozin boyası sonucunda sferoid yapılar ışık mikroskobunda değerlendirildi. Yapılan değerlendirmeye göre A (metanol) ekstraktının 100 µg/ml'lik konsantrasyonunda genel sferoid yapısının düzgün görüldüğü ancak bütünlüğü bozulmamış, düzgün görümlü sferoidlerin yanında sınırları kaybolmuş, dağıntı sferoid yapılarına rastlandı (Şekil 3.18 ve 3.19).

B (petrol eteri) ekstraktının 100 µg/ml'lik konsantrasyonunun uygulandığı sferoidlerde ise bütünlüğü bozulmamış sferoidlerin yanında çok sayıda sınırları kaybolmuş, dağıntı sferoid yapıları gözlemlendi. B ekstraktının A'ya göre daha fazla sayıda dejenere sferoid içerdiği ve bu dejenerasyonun daha büyük boyutta olduğu görüldü (Şekil 3.20 ve 3.21).

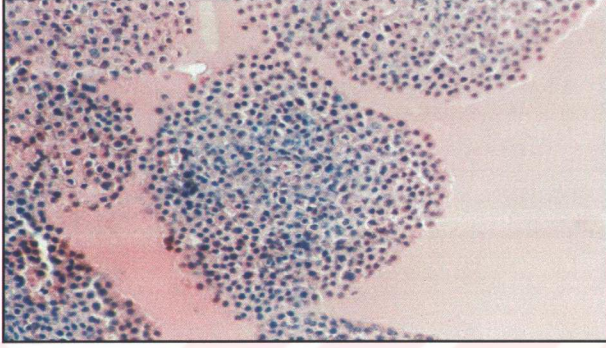
C (kloroform) ekstraktı uygulanan sferoid grubunda ise az sayıda sferoidde gözlenen dejenerasyona karşılık genel anlamda sferoid bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi (Şekil 3.22).



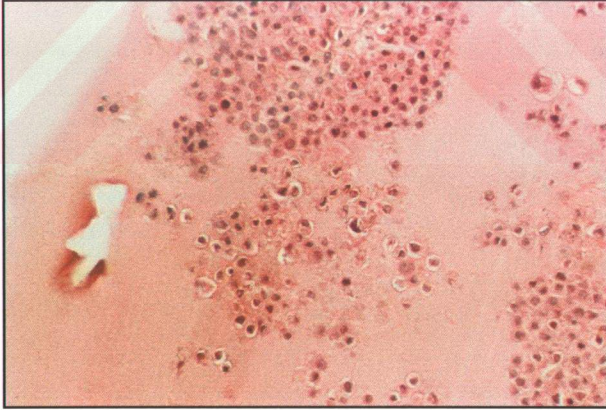
Şekil 3.17: 1×10^6 %100 canlı C6 Glioma hücesinin %3'lük agar üzerine ekildikten 9 gün sonra tesbit edilen kontrol grubu sferoidlerine ait parafin kesitlerden hazırlanan ve hematoksilien-eozin boyası ile boyanmış resimler (M.B.X83).



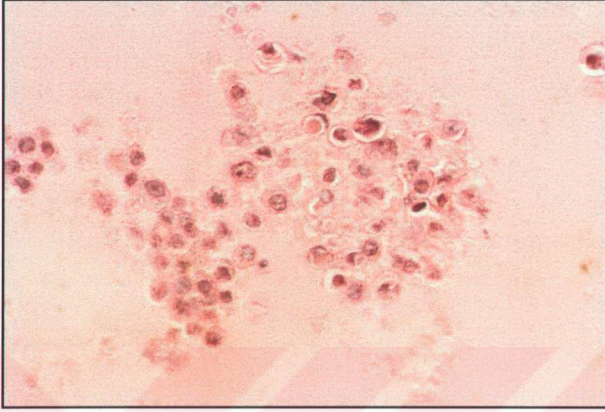
Şekil 3.18: A 100 (Metanol 100 $\mu\text{g/ml}$) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoksilien-eozin boyanmış parafin kesitler. A100 ekstraktının sferoid bütünlüğünü bozduğu görülmektedir (M.B.X83).



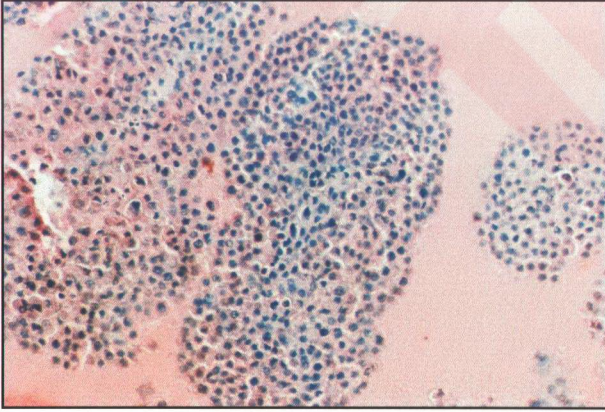
Şekil 3.19: A 100 Ekstraktı (100 µg/ml) uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan preparatlarda sferoidlerin ekstrakta karşı farklı reaksiyon verdiği görülmektedir. Sferoidlerin bazılarında dejenerasyon ve dağılıma görülmektedir (M.B.X83).



Şekil 3.20: B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoxilen-eozin boyanmış parafin kesitler. B 100 ekstraktının sferoid bütünlüğünü bozduğu görülmektedir (M.B.X83).



Şekil 3.21: B 100 (petrol eteri 100 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoxilen-eozin boyanmış parafin kesitler. B 100 ekstraktının sferoid bütünlüğünü bozduğu görülmektedir (M.B.X132).



Şekil 3.22: C 10 (kloroform 10 µg/ml) ekstraktı uygulanmış C6 sferoidlerinden hazırlanan hematoxilen-eozin boyanmış parafin kesitler. Sferoid bütünlüğünün diğer gruplardan daha çok korunduğu görülmektedir (M.B.X83).

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanser çok hızlı yayılım göstermesi özelliği nedeniyle tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Çok farklı tedavi stratejileri kullanılarak bu sorun çözülmeye çalışılmaktadır. Bu farklı tedavi stratejilerinin ortak amacı tümörün kontrol altına alınarak büyümesinin önlenmesi ya da tedavisinin sağlanarak yok edilmesidir. Ancak bu süreç o denli zordur ki, çok sayıda yan etkiyi de beraberinde getirerek metabolizmayı altüst eder. Bu amaçla dizayn edilen antikanser ajanların hücre düzeyinde etkilerinin çok iyi araştırılması ve tedavinin de son derece kontrollü şekilde sürdürülmesi gerekmektedir [1].

Kanser tedavisi son derece masraflı ve gerek hasta gerekse çevresi için zor aşamaları içeren bir tedavi şeklidir [16].

Amerikan halkının yaklaşık % 25'inin hayatları boyunca bir kez herhangi bir kanser tanısı alacakları düşünülmektedir. Her yıl bir milyon yeni kanser tanısı teşhis edilmektedir. Bu hastaların %25'den azı tek başına ve/veya radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir. Geriye kalan hastaların büyük bir bölümüne hastalığın herhangi bir evresinde kemoterapi uygulanmaktadır. Kanser hastalarının küçük bir bölümünde (yaklaşık % 10) kanserin tipi nedeniyle kemoterapi ile tam şifa veya uzun bir iyileşme dönemi sağlanabilmektedir. Ancak hastaların çoğunda ilaç tedavisi hastalığı sadece baskılamakta ve komplikasyonlar ve/veya ölümlerle sonuçlanmaktadır. Kanser hastalarının ortalama olarak 5 yıl yaşama şansları % 40 kadardır ve kardiyovasküler sisteme ait hastalıklardan sonra kanser, ölümlerin en sık ikinci nedenidir [15].

Kanser tedavisinde her ne kadar umut verici gelişmeler olsa da, bunlara hastalığın tip sayısının yüksekliği ve başarı yüzdesinin düşüklüğü eklendiğinde insanlar bu zorlu yolda belki de şanslarını bir parça daha artırdıklarını düşündükleri alternatif

metotlara başvurmaya başlarlar. Bunların başında da bitkisel tedavi metotları gelir. Bitkisel tedavi metodlarının tedavi sürecinde yan etkiler açısından da rahat bir tedavi şekli olması bu durumu kuvvetlendirmektedir.

Gerek insan sağlığı ve gerekse doğa ve çevre sağlığı fitoterapinin gerekliliğini güçlendirmektedir. Bugün dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler en seçkin ilaç kaynaklarından. Büyük farmasötik firmalar yeni lider yapılar için bir kaynak olarak yüksek bitkilere yeniden ilgi göstermektedirler [20].

Bitki olarak kullanıldığında faydalı olabilecek ancak rastgele kullanımda faydası bir yana zararlı olabilen bitki ve bitkisel preparatların kullanımı ile ilgili bir standart oluşturulması gerekli ve zorunludur. Fakat şifalı bitkilerin halk arasında kullanımı konusunda ne yazık ki mevcut bir standart bulunmamaktadır. İnsan sağlığını yakından ilgilendiren bir çok bitki hiçbir denetime tabi tutulmaksızın halk arasında kullanılmakta, bu bitkiler semt pazarlarında tamamen ehliyetsiz kişilerce halka şifalı bitkiler olarak sunulmaktadır.

Fitoterapinin varolan kimyasal ilaçlarla tedavinin yerine geçmesi söz konusu olmasa da tedavide kimyasal ilaçlara destek vermekte aynı zamanda da tedavi süresince yaşanan sıkıntıları hafifletmektedir [20].

Bu nedenle bu çalışmada, Balıkesir ve çevresinde halk tarafından çayı yapılarak içilen ve antitümör etkisi olduğuna inanılan *Salvia tomentosa* bitkisinden elde edilen ekstraktların hücre kültüründe, hücre çoğalması üzerine etkisinin olup olmadığı çalışılmıştır.

Bu çalışmada hücre kültürü deneylerinde C6 glioma hücre soyu kullanılmıştır. C6 hücreleri neonatal farelerin beyinlerine enjekte edildiklerinde Glioblastoma Multiforme ile morfolojik olarak benzerdirler [67]. Glioblastoma multiforme (GBM), erişkin yaş grubunda en sık görülen primer beyin tümörlerindedir [64, 65]. Mitoz ve nükleer polimorfizmin yanında nekroz, kanama ve mikrovasküler hücre artışına sahip kötü prognozla karakterize edilen en malign astrositik beyin tümörüdür [70].

Tedavisi; cerrahi kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin ayrı ayrı ve çoğunlukla birlikte uygulanması ile sağlanmaya çalışılmaktadır [71, 72]. Ancak tedavinin başarısı hızlı büyüme, genetik ve biyolojik çeşitlilik ve tümör infiltrasyonunun derecesi gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [64]. Yeni Glioblastoma tanısı konmuş 674 hasta ile yapılan yalnız radyasyon tedavisi ile radyasyon ve kemoterapi tedavisinin bir arada uygulandığı randomize çalışmada her iki tedavi sonucunda yaşam süresi bir seneden az olarak saptanmıştır [73]. Glioblastoma multiforme (GBM)'li hastalarda neoplastik hücrelerin merkezi sinir sistemine infiltrasyonu nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açmaktadır [67].

Çalışmada kullanılan ekstraktlar *Salvia tomentosa* bitkisinin kök, gövde, çiçek, tohum ve yapraklarının homojen kullanımıyla metanol, petrol eteri ve kloroformda elde edilmiştir.

Monolayer hücre kültürü deneylerinde her kuyucuğa 500000 hücre ekilmiş, hücrelerin yüzeye tutunması için 1 saat beklendikten sonra ekstraktlar verilmiştir. Kullanılan ekstraktların distile su ve DMSO'da çözünmeme problemi ile karşılaşıldığından her ekstrakt kendi çözücüsü ile çözülmüştür. Ancak hücre kültüründe, antitümör aktivite çalışmalarının ilk aşamasını oluşturan monolayer hücre kültürü deneylerinde her çözücü için çözücünün deney gruplarına ulaşan en yüksek konsantrasyonu çözücü kontrol grubunu oluşturacak şekilde istatistiki karşılaştırmalarda kontrol grubuna ek olarak kullanılmıştır. Kontrol gruplarında ise distile su kullanılmıştır

Monolayer hücre kültürü deneylerinde her üç ekstraktın 100 µg/ml , 10 µg/ml ve 1 µg/ml'lik konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat sürelerle denenmiş ve bu konsantrasyonların hücre sayısındaki artışa karşı etkisi gözlenmiştir. Deneylerde hücre sayıları hemasitometre kullanılarak saptanmıştır. Her deney grubu 3'lü çalışılmış ve anlamlılık değerleri tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, *Salvia tomentosa*/Metanol ekstraktının son konsantrasyonun 100 µg/ml olduğu ekstraktında 24. ve 48. saatlerde hücre popülasyonunda kontrole göre

istatistiki olarak anlamlı bir inhibisyon gözlenirken, bu ekstraktta diğer değerlerde ve inkübasyon sürelerinde herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır. Bu gruba ait çözücü kontrollerinin kontrol grubu ile karşılaştırmalarında ise istatistiksel açıdan bir anlamlılık tespit edilmemiştir. Bu durum bize deney gruplarına ulaşan metanol miktarının herhangi bir toksisite içermediğini düşündürmektedir. Bu durumda metanolla elde edilen ekstraktın 100 µg/ml'lik konsantrasyonunun hücre popülasyonundaki artış üzerinde etkili olduğu söylenebilir(Çizelge 3.1).

Salvia tomentosa/petrol eteri ekstraktında öncelikle sadece çözücü kontrolleri ve distile su verilmiş olan kontrol grupları ile yapılan karşılaştırmada 24 ve 72. saatlerde en yüksek çözücü hacmi kullanılmasına rağmen anlamlı bir azalış görülmezken, 48. saatte istatistiki açıdan anlamlı olan bir azalış göze çarpmaktadır ($p=0.018$). Sadece 24, 48 ve 72. saatlerde çözücü kontrolünde hücre popülasyonu lineer bir şekilde büyümeye devam etmiş fakat çözücü kontrolüyle karşılaştırıldığında bu linearite biraz sapma göstermiştir (Şekil 3.3). Bu da sadece petrol eteri uygulandığında 48. saatte hücre popülasyonu büyümesi üzerinde engelleyici bir etkinin olduğunu göstermektedir (Çizelge 3.2).

Çözücü kontrolü ve distile su verilmiş kontrol gruplarının karşılaştırmasında 48. saatte görülen anlamlılıktan dolayı petrol eterinde çözüldürülmüş *Salvia tomentosa* ekstraktları ile çözücü kontrolü 48. saatte istatistiki olarak karşılaştırılmıştır. Hücre sayısında bir azalış olsa da bu durum istatistiki açıdan herhangi bir anlamlılık göstermemektedir (Çizelge 3.2 ve Şekil 3.4).

24 ve 72. saatlerde ekstraktlardan elde edilen veriler çözücünün etkisi ihmal edilerek sadece distile su verilen kontroller ile karşılaştırılmıştır.

24. saatte sadece 100 µg/ml'lik konsantrasyonda istatistiki olarak önemli bir azalış görülmüştür ($p=0.014$). Diğer konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde yine bir azalış gözlenmesine rağmen bu azalış anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.2).

Salvia tomentosa/kloroform ekstraktının uygulandığı deney gruplarında da çözücü kontrolü ve distile su verilmiş normal kontroller karşılaştırıldığında 48. saatte ortaya çıkan anlamlılık değerinden dolayı, bu etkiyi iyice gözlemlemek amacıyla tüm veriler 48. saatte sadece kloroform uygulanmış çözücü kontrolleri ile karşılaştırılmıştır. Tüm konsantrasyonlarda istatistiki açıdan anlamlılık saptanmıştır (Çizelge 3.3).

24 ve 72. saatlerde tüm konsantrasyonlar distile su uygulanan paralel kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, 100 µg/ml'lik konsantrasyonda 24 ve 72. saatlerde hücre popülasyonu üzerinde anlamlı bir inhibisyon gözlenmemiştir. 48. saatte bu etki anlamlıdır fakat, 48. saatteki bu etki kloroformun kendi toksik etkisi olabileceğinden gözardı edilmiştir (Şekil 3.3).

10 µg/ml'lik konsantrasyonda 24, 48 ve 72. saatte hücre popülasyonunda anlamlı bir azalma görülmektedir. Yine 48. saatteki azalma çözücünün etkisini düşündürse de uygulanan çözücü kontrolü, ekstraktın 100 µg/ml'lik hacmi içerisindeki hali ile uygulandığından 10 µg/ml'lik konsantrasyon için bu gerçeği yansıtmayabilir.

1 µg/ml'lik konsantrasyonda hücre sayısındaki azalış 24. saatte anlamsızdır. 48 ve 72. saatlerde istatistiki olarak anlamlı bir azalış mevcuttur. Yine 48. saatteki azalış çözücünün toksik etkisini düşündürse de, 1 µg/ml'lik konsantrasyonlarda çözücü kontrolle karşılaştırıldığında 100 kat daha az hacimde çözücü kullanıldığını düşünürsek bu etkinin etkene spesifik olduğu düşünülebilir.

Tümör hücreleri ile yapılan *in vitro* deneylerde birçok laboratuvarında tek tabakalı tümör hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu *in vitro* hücre modeliyle kanserin temel oluşum mekanizmaları ve tedavisi üzerine oldukça değerli bilgiler edinilmiştir. Ancak, tek tabakalı kültür ortamında oksijen ve besinler kanser hücrelerine eşit oranda ulaşmakta ve hücreler bu koşullar altında iki boyutlu bir büyüme göstermektedir. Oysa vücutta kitle oluşturan solid tümörler üç boyutlu uzaysal bir konumda büyümektedir. Bu durum tümörlerin iç bölümündeki hücreler arasında oksijen ve besin dağılımının eşit olmamasına yol açmakta ve hücreler farklı düzeylerde fiziksel ve kimyasal streslerle

karşılaşmaktadır. Oksijen ve besin kaynaklarının düşük olduğu bölümlerde hücre hasarı ve hatta nekroz kendiliğinden gelişebilmektedir. Ayrıca tek tabakalı hücre kültür modelinin aksine hücrel yanıtın gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülen hücreler arası temaslar üç boyutlu bir ortamda gerçekleşmektedir [42].

Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörlerde söz konusu hücrelerarası ilişkileri ve mikro çevresel koşulları çok daha net olarak ortaya koyabilmektedir [42].

Bu durumdan yola çıkılarak tek tabakalı hücreler üzerinde ekstraktların istatistiksel olarak anlamlılık taşıyan en yüksek değerleri seçilmiş ve seçilen bu değerler vücuttaki üç boyutlu tümör yapısını daha iyi yansıtan sferoid kültürlerde denenmiştir. C6 hücreleri ile materyal-metodta belirtildiği gibi sferoid model oluşturulmuştur (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Tek tabakalı hücre kültürü modelinde her ekstrakt için etkili olduğu tespit edilen en yüksek konsantrasyonlar metanol için 100 µg/ml, petrol eteri için 100 µg/ml ve kloroform için 10 µg/ml'dir. Bu konsantrasyonlar sferoid modelde uygun olan 48 saat inkübasyon zamanında uygulanmıştır.

Sferoid kültürlerde değerlendirmeler iki aşamalı gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada DNA sentezi yapan hücreleri işaretlemek amacıyla timidin analogu olan BrdU kullanılmıştır. BrdU ile işaretlenmiş sferoidler ışık mikaroskopu takibi sonrası parafine gömülmüş ve parafin kesitlere immunohistokimya uygulaması ile BrdU'yu alarak işaretlenmiş sentez fazındaki hücreler sayılarak yüzdeleri alınmış ve böylece BrdU işaretlenme indeksi (BrdU-LI) değerleri hesaplanmıştır.

Yapılan değerlendirmeye göre sferoidlere uygulanan metanol (100 µg/ml), petrol eteri (100 µg/ml) ve kloroform (10 µg/ml) da hücrelerde işaretlenme indeksinin kontrol grubu işaretlenme indeksine oranla oldukça anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Gruplar kendi aralarında da ufak farklar göstermekle beraber; istatistiki olarak bir anlamlılık taşımamaktadırlar (p=0.000) (Şekil 3.9).

Sferoid kültürlerde ikinci aşamada sferoid morfolojisini incelemek amacıyla sferoidlerin parafin kesitlerine hematoksilin-eozin boyası uygulanmıştır. Kesitler ışık mikroskopunda değerlendirmeye alınmıştır.

Monolayer sonuçlarına göre her grup için anlamlı kabul edilen bir değerin seçilmesiyle sferoid tekniğinde yapılan hematoksilin-eozin boyası sonucunda ışık mikroskopik olarak yapılan değerlendirmeye göre, metanol (100 µg/ml) ekstraktı uygulanan grupta genel sferoid yapısının düzgün görüldüğü ancak bütünlüğü bozulmamış, düzgün görümlü sferoidlerin yanında sınırları kaybolmuş, dağınık sferoid yapılarının olduğu gözlemlendi.

Petrol eteri (100 µg/ml) ekstraktının uygulandığı sferoidlerde ise bütünlüğü bozulmamış sferoidlerin yanında çok sayıda sınırları kaybolmuş, dağınık sferoid yapıları gözlemlendi. Petrol eteri ekstraktının metanol ekstraktına göre daha fazla sayıda dejenerasyon sferoid içerdiği ve bu dejenerasyonun daha büyük boyutta olduğu görüldü.

Kloroform (10 µg/ml) ekstraktı uygulanan sferoid grubunda ise az sayıda sferoidde gözlenen dejenerasyona karşılık genel anlamda sferoid bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak *Salvia tomentosa* bitkisinden 3 ayrı çözücü kullanılarak elde edilmeye çalışılmış ekstraktların C6 Glioma hücrelerinde yapılan *in vitro* deneylerde verdiği sonuçlardan yola çıkılarak bu bitkinin hücre popülasyonundaki artışı azaltmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. C6 hücre soyu ile yapılan monolayer hücre kültürü deneyleri bu azalmayı desteklerken, üç boyutlu tümör yapısını yansıtan sferoid hücre kültürü deneyleri sonucunda parafin kesitlere uygulanmış hematoksilin-eozin boyası sonuçları da, monolayerda istatistiksel anlamlılık taşıyan bu grupların ışık mikroskopik olarak genel sferoid yapısını dejenerasyon ettiğini göstermekte ve bu durum düzgün sferoid yapılarının yanında yer yer dağınık sferoid formları ile desteklemektedir. Ancak bu dejenerasyon kloroform grubunda daha az, hatta neredeyse yok gibidir.

Sferoid hücre kültürlerine BrdU uygulaması sonrasında gerçekleştirilen immunohistokimya neticesinde saptanan BrdU işaretlenme indeksi değerleri de bu ekstraktların hücre artışını inhibe edici etkisini desteklemektedirler. Bu sonuca göre ekstraktların uygulandığı hücrelerde kontrole göre DNA sentezi yapan hücre sayısında istatistiksel olarak dikkate değer ölçüde anlamlılık tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan yola çıkılarak, daha sonraki çalışmalarda bu bitki ekstraktlarının kimyasal içeriklerinin tanımlanmasının ekstraktların etki mekanizmalarının aydınlatılması açısından daha yararlı olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Dhanikula, A.B., Panchagnula, R., "Localized paclitaxel delivery", *International Journal of Pharmaceutics*, 183, (1999) 85-100.
- [2] Bozkurt, H., Bazı Cisplatin Türevlerinin Sitotoksitesinin ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Balıkesir, (2004).
- [3] Klug, W., Cummings, M., Genetik Kavramlar, Öner, C., Palme Yayıncılık, Ankara, (2002) 635-653.
- [4] Güneri, A.D., Gempitabin, Dimetilsülfoksit (DMSO) ve Parasetamol'ün FM3A Hücre Kültürlerinde Proliferasyon Üzerine Etkileri, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, (2002).
- [5] Özalpan, A., Temel Radyobioloji, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, (2001), 77-80, 92-93, 115-119, 196-197.
- [6] Kierszenbaum, A.L., Histology and Cell Biology, Mosby, St. Louis, Missouri, America, (2002) 40-45.
- [7] <http://www.turkcancer-foundation.org.tr/sorun-1.php>
- [8] Engin, K., Özyardımcı, N., Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar.
- [9] www.fhcr.org/labs/fero/RL_gifs/cycle.jpg
- [10] Price, P.M., Megyesi, J., Safirstein, R., "Cell Cycle Regulation: Repair and Regeneration in acute Renal Failure" *Seminars in Nephrology*, 23(5), (2003) 449-459.
- [11] Lowitz, B.B., Casciato, D.A., Medical Oncology and Principles of Cancer, Manual of Clinical Oncology, 4th Edition, Philadelphia, (2000).
- [12] <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/Biologypages/T/TumorSupressorgenes.html>
- [13] http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/s_liu/Html
- [14] http://www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health_advice/netdoctor/archive/100004845.html

- [15] Mycek, M., Richard, H., Champe, P., Farmakoloji, Oktay, Ş., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (1998) 373-398.
- [16] Çubukçu, B., Sarıtar, G., Meriçli, A.H., Sütüpınar, N., Mat, A., Meriçli, F., Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, (2002) 1-3.
- [17] Craig, W.J., "Health-promoting properties of common herbs 1,2 (Suppl.)", *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 3, (1999) 491-499.
- [18] Chor, S.Y., Hui, A.Y., To, K.F., Chan, K.K., Go, Y.Y., Chan, H.L.Y., Leung, W.K., Sung, J.J.Y., "Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of herbal medicine on hepatic satellite cell", *Journal of Ethnopharmacology*, (2005).
- [19] Franek, K.J., Zhou, Z., Zhang, W.D., Chen, W.Y., "In vitro studies of baicalin alone or in combination with *Salvia miltiorrhiza* extract as a potential anti-cancer agent", *International Journal of Oncology*, (2005) 26, 217-224.
- [20] Baytop, T., Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, (1999) 142-144.
- [21] Lohninger, A., Hamler, F., "Chelidonium majus L. (Ukrain) in the treatment of cancer patients", *Drugs Exptl. Clin. Res. XVIII (Suppl.)*, (1992) 73-77.
- [22] Ślesak, B., Nowicky, J.W., Harlozinska, A., "In vitro effects of Chelidonium majus L. alkaloid thiophosphoric acid conjugates (ukrain) on the phenotype of normal human lymphocytes", *Drugs Exptl. Clin. Res. XVIII (Suppl.)*, (1992) 17-21.
- [23] Nowicky J.W., Manolakis, G., Meijer, D., Vatanasapt, V., Brzosko, W.J., "Ukrain both as an anti cancer and immunoregulatory agent", *Drugs Exptl. Clin. Res. XVIII (Suppl.)*, (1992) 51-54.
- [24] Kleinrok, Z., Jagiełło-Wójtowicz, E., Matuszek, B., Chodkowska, A., "Basic central pharmacological properties of thiophosphoric acid alkaloid derivatives from *Chelidonium majus L.*", *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 44, (1992) 227-239.
- [25] Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, E., Imai, K., Nakachi, K., Fujiki, H., "Green tea and cancer chemoprevention", *Mutation Research*, 428, (1999) 339-344.
- [26] Alexandrova, R., Alexandrov, I., Velcheva, M., Varadinova, T., "Phytoproducts and Cancer", *Experimental Pathology and Parasitology*, 4, (2000).
- [27] Polat, R., Balıkesir Yöresinde Yayılış Gösteren *Salvia L.* Türleri Üzerinde Anatomik, Morfolojik ve Ekolojik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004).

- [28] Gündoğmaz, G., Değişik *Salvia L.* Türlerinden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivitesinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Balıkesir, (2002).
- [29] Kandemir, N., "The Morphological , Anatomical and Karyological Properties of Endemic *Salvia hypargeia* Fich.& Mey. (Lamiaceae) In Turkey", *Pak. J. Bot.*, (2003) 35 (2): 219-136.
- [30] Nakipoğlu, M., "Şifalı Çay Olarak Kullanılan Bitkiler ve Adaçayı", Dokuz Eylül Üniversitesi *Eğitim Bilimleri Dergisi*,(1993) 91-94.
- [31] Nakipoğlu, M., Otan, H., "Tıbbi Bitkilerin Flavonoidleri", ANADOLU J of AARI 4 (1), (1994) 70-93.
- [32] Kawazoe, K., Yamamoto, M., Takaishi, Y., Honda, G., Fujita, T., Sezik, E., Yesilada, E., "Rearranged abietane-type diterpenes from *Salvia dichroantha*", *Phytochemistry*, 50, (1999), 493-497.
- [33] Nakiboğlu, M., Kesercioğlu, T., Investigations on some *Salvia L.* Species Collected from Türkiye, In S.P. Raychaudhuri (ed.) Recent Advances in Medicinal Aromatic and Spice Crops, Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delphi, İndia, (1992) (2): 325-344.
- [34] Özdemir, C., Şenel, G., "The Morphological, Anatomical and Karyological Properties of *Salvia sclarea L*", *Tr. J. of Botany*, (1999) 23, 7-18.
- [35] Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., "Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae)", *Food Chemistry*, (2003).
- [36] Anon, Ege bölgesi ihracat ithalat yıllığı, Karınca Matbaacılık ve Tic. Ort., 452 sok., No: 11, İzmir, (1988) 145-158.
- [37] Ceylan, A., Kaya, N., Çelik, N., "Tıbbi Adaçayı (*S. officinalis*)'nın kültürü üzerine araştırmalar", Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt: 26, Sayı: 1 Ğ (1990) 127-136
- [38] Ceylan, A., Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, İzmir, (1996), 225-255.
- [39] Nagy, G., Günther, G., Máthé, I., Blunden, G., Yang, M., Crabb, T.A., "Diterpenoids from *Salvia glutinosa*, *S. austriaca*, *S. tomentosa* and *S. verticillata* roots", *Phytochemistry*, 52, (1999), 1105-1109.
- [40] Haznedaroğlu, M.Z., Karabay, N.U., "Antibacterial Activity of *Salvia tomentosa* essential oil", *Fitoterapia*, Nov; 72(7), (2001), 829-831.

- [41] Bilir, A., Solakoğlu, S., Anıl, Y.D., Petorak, İ., Müslümanoğlu, M., “Tümör Hücrelerinin İlaçlara Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Kullanılan İn Vitro Test Yöntemlerinin Güvenirliliği”, *İst. Tıp Fak. Mecmuası*, 56:3, (1993).
- [42] Ahıshalı, B., Bilir, A., “Tümör Hücrelerinin Multiselüler Tümör Sferoid Modelinde Üretilmesi”, *İst. Tıp Fak. Mecmuası*, 65:1, (2002).
- [43] Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kurs Kitabı-I, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Isparta, (2003), 1-12, 177-183.
- [44] Hücre Kültürü Teknolojisinde Temel Prensipler ve Yapay Organlar, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İzmir, (2004), 1-8, 31-38.
- [45] Santini, M.T., Gabriella, R., “Three-dimensional spheroid model in tumor biology”, *Pathobiology*, (1999) 67:148
- [46] Daidone, M.R., Costa, A., Silvestrini, R., “Cell proliferation markers in human solid tumors: assessing their impact in clinical oncology”, (*Methods In Cell Biology*), 64, 48,359-369.
- [47] Karatay, M.C., Katırcıoğlu, O.S., Süoğlu, Y., Ünal, M., Erdamar, B., Bilir, A., “Larenks yassı epitel hücreli karsinomunda timidin labeling indeksi”, XXIII. Ulusal Otorinolarenoloji ve Baş-Boyun Cerrahisi Kongresi, Antalya, (1995).
- [48] Bilir, A., Gülgün, C., “Tümör Prognozunda Thymidine Labeling Index'in Önemi”, *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası*, 58:2, (1995).
- [49] Meyer, J.S., Fahrner, M., Daniel, F.C., “Pathology and Bheviör of Small Breast Carcinomas”, *Seminars in Diagnostic Pathology*, 16, 3, (1999), 257-268.
- [50] Studzinski, G.P., *Cell growth and apoptozis*, IRL Oxford University Press, Oxford, (1994) 7-18.
- [51] Müslümanoğlu, M., Bilir, A., Özmen, V., İğci, A., Bozfakıoğlu, Y., Dağoğlu, T., Parlak, M., Keçer, M., Ünal, M., *Meme Karsinomlarında Proliferatif İndeks olan Tymidine Labeling (TLI): Tümör çapı hariç prognostik poarametrelerden bağımsız bir faktördür*, *Meme Hastalıkları Dergisi*, Vol.2, No.4, (1995).
- [52] Bilir, A, Eralp, Y, Cabioglu, N, Agizhali, B, Camlica, H, Aydiner, A, “Thymidine Labeling Index: Prognostic Role in Breast Cancer”, *American Journal of Clinical Oncology*, 27, 4, (2004).
- [53] Bilir, A., “Gossypol ve Dimethylsulfoxide'nin L-Strain Hücre Kültürlerinde G0 Fazı Üzerine Etkisi”, *İst. Tıp Fak. Mecm.*, 54, (1991) 31-38.

- [54] Bilir, A., Anıl, D., Erbenği, T., "Dimetil Sulfoksit'in L-Strain Hücrelerinde S Fazına Etkisi", *Klinik Gelişim The Journal of İstanbul Chamber of Medicine*, Vol.1, No.2, (1987).
- [55] Bilir, A., Anıl, Y.D., Erbenği, T., Gürtekin, M., "Colcemid'in L-Strain Hücre Kültürlerinde S Fazına Etkisi", *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 5.6.7. (Bileşik sayı), 1988-1990 (1991) 11-43.
- [56] Onel, D., Sarı, H., Cengiz, A., Bilir, A., Anıl, D., Erbenği, T., "Ultrasonun L-Strain Fibroblast Hücre Kültürü Üzerine Etkileri", *İst Tıp Fak. Mecm.*, 53, (1990) 19-28.
- [57] Anıl, Y.D., AYTEKİN, Y., Erbenği, T., ÖZKAN, T., Bilir, A., Aykaç, İ., ÖNER, A., "Testosteron'un L-Strain Hücre Kültürlerinde S Fazına Etkisi", *Türk Üroloji Dergisi*, 13, 1, (1987) 7-13.
- [58] Ünal, M., Bilir, A., Karatay, M.C., "Larenks epidermoid karsinomunda cisplatin ve 5-fluorourasil duyarlılığının timidin işaretleme indeksi ile araştırılması: Ön çalışma", *Kulak Burun Boğaz İhtisas Dergisi*, Cilt 7, Sayı 2, Ağustos (2000) 130-133.
- [59] Bilir, A., Altınöz, M.A., Atar, E., Erkan, M., Aydınler, A., "Acetaminophen modulations of chemotherapy efficacy in MDAH 2774 human endometrioid ovarian cancer cells in vitro", *Neoplasma*, 49, 1, (2002).
- [60] Toshikazu, H., Zitsch, R.P., Gluckman, J.L., "Cell kinetics study of upper aerodigestive tract squamous cell carcinoma using bromodeoxyuridine", *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 102, (1993).
- [61] Schutte, B., Reynders, M.M.J., Van Assche, C.L.M.V.J., Hupperets, PSGJ, Bosman, FT, Blijham, GH, "An Improved Method for the Immunocytochemical Detection of Bromodeoxyuridine Labeled Nuclei Using Flow Cytometry", *Cytometry*, 8, (1987), 372-376.
- [62] Waldman, F., Chew, K., Ljung, B.M., Goodson, W., Hom, J., Duarte, L.A., Smith, H.S., Mayall, B., "A comparison between Bromodeoxyuridine and 3H Thymidine Labeling in Human Breast Tumors", *Modern Pathology*, 4, 6, (1991) 718.
- [63] Koehm, S., "Bromodeoxyuridine Staining", St. Luke's Hospital Chesterfield, Missouri, (1997).
- [64] Obara, S., Nakata, M., Takeshima, H., Katagiri, H., Asano, T., Oka, Y., Maruyama, I., Kuratsu, J., "Integrin-linked kinase (ILK) regulation of the cell viability in PTEN mutant glioblastoma and *in vitro* inhibition by the specific COX-2 inhibitor NS-398", *Cancer Lett*, (2004) 208: 115-122.

- [65] Albayrak, B., İnsan Glioblastoma Multiforme Primer Hücre Kültüründe ve Sıçan C6 Gliom Modelinde, Tibolon ve Medroksi Asetat Progesteron Asetat (MPA) Tedavisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı, İstanbul, (2003).
- [66] Oktar, N., Topçuoğlu, N., Yılmaz, B., Demirtaş, E., Özkınay, F., Gündüz, C., Kosova, B., “Suppression of malignancy with differentiating agent İn human brain tumors multicellular spheroids”, *NOROL. BIL. D.*, 16:1, (1999).
- [67] Grobber, B., Deyn, P.P., Slegers, H., “Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion”, *Cell Tissue Res*, (2002) 310: 257-270.
- [68] Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W., “Differentiated rat glial strain in tissue culture”, *Science*, (1968) 161: 370-371.
- [69] Babich, H., Reisbaum, A.G., Zuckerbraun, H.L., “*In vitro* response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol”, *Toxicol Lett*, (2000) 114: 143-153.
- [70] Osborn, A.G., Blaser, S.I., Salzman, K.L., Beyin 1, Rayegan Koç, E., Altın, L., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, (2001) 120-122.
- [71] New, P., “Cyclooxygenase in the treatment of glioma: Its complex role in signal transduction”, *Cancer Control*, (2004) 11: 152-164.
- [72] Tuna, S., Gemcitabine, Vinorelbine, Vioxx (Rofecoxib) ve DMSO'nun C6 Glial Tümör Hücre Kültürlerinde Hücre Büyümesi Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, (2005).
- [73] Ergüven, M., Suramin'in C6 Gliomadaki Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, (2004).