

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BAZI ALKANNA TÜRLERİNİN
EKSTRE VE FRAKSİYONLARININ
DNA TOPOİZOMERAZ I İNHİBİSYONU
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sinem Melek Nalbantoğlu

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 06.07.2006

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erdal BEDİR

Bornova-İzmir

Sinem **Melek NALBANTOĞLU** tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “**Bazı *Alkanna* Türlerinin Ekstre ve Fraksiyonlarının DNA Topoizomerez I İnhibisyonu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **06.07.2006** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı

.....

Raportör Üye

.....

Üye

.....

ÖZET

BAZI *ALKANNA* TÜRLERİNİN EKSTRE ve FRAKSİYONLARININ DNA TOPOİZOMERAZ I İNHİBİSYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nalbantoğlu, Sinem Melek

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Erdal BEDİR

Temmuz 2006, 138 sayfa

Bu çalışmada, *Alkanna* türleri metanolik ekstralarının (*A. tubulosa*, *A. cordifolia*, *A. tinctoria*, *A. hirsutissima*, *A. orientalis*), MTT testi kullanılarak 5 kanser (K-562, MCF-7, HL-60, SaOs-2, Hep-3B) ve 2 normal hücre hattına karşı (L929, Vero) sitotoksik etki taramaları yapılmıştır. Yüksek sitotoksosite gösteren *Alkanna* türleri, süper sarmal plazmid DNA gevşeme testi ile DNA Topoizomeraz I inhibisyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Türler arasında *A. cordifolia* 8 µG/mL'den 32 µG/mL'ye kadar artan dozlarda kültüre hücre hatlarına karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Önemli sitotoksosite ve DNA topoizomeraz I inhibisyonu gösteren *A. cordifolia*, ileri izolasyon için seçilmiştir. Ön fraksiyonlamada *A. cordifolia* metanolik ekstresi, optimum fraksiyonlama sistemini belirlemek amacıyla farklı stasyonier fazlarda (Silika jel, Karşıt faz-C18 and Sephadex LH-20) Açık Kolon Kromatografisi ve Vakum Sıvı Kromatografisi'ne uygulanmıştır. Silika jel kolondan S2, S9, S10 ve Karşıt faz-C18'den RP5, RP6, RP7, RP8 fraksiyonları, 10 ng/mL konsantrasyonda güçlü DNA topoizomeraz I inhibisyonu gösterirken, Sephadex LH-20'den elde edilen SF2 fraksiyonu inhibitör aktivite sergilememiştir.

Büyük ölçekli fraksiyonlama, normal faz silika jel kullanılarak, Biotage SP-2 Yüksek Performans Flaş Kromatografisi'nde gerçekleştirilmiştir. Çünkü aktif fraksiyonlar, silika jel ile iyi bir dağılım göstermiştir. Biotage Flaş Kromatografisi'nden İ.T.K. profillerine göre 27 alt fraksiyona ayrılan 536 fraksiyon toplanmıştır. 69-80; 81-91; 92-110 arası fraksiyonlar ve hekzan ekstresi, 10 ng/mL konsantrasyonda aktif bulunmuş iken, 1 ng/mL seviyesinde DNA topoizomeraz I inhibisyonu gözlenmemiştir.

Anahtar sözcükler: *Alkanna*, Boraginaceae, Biyoaktivite Rehberli Fraksiyonlama, DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu, Sitotoksosite, MTT.

ABSTRACT**INVESTIGATION ON DNA TOPOISOMERASE I INHIBITION
EFFECTS OF THE EXTRACTS AND FRACTIONS OF SOME
ALKANNA SPECIES****Nalbantoğlu, Sinem Melek****MSc in Bioengineering Department****Supervisor: Prof. Dr. Erdal BEDİR****July 2006, 138 papers**

In this study, methanolic extracts of the *Alkanna* species (*A. tubulosa*, *A. cordifolia*, *A. tinctoria*, *A. hirsutissima*, *A. orientalis*) were screened for cytotoxic activity against 5 cancer cell lines (K-562, MCF-7, HL-60, SaOs-2, Hep-3B) together with 2 normal cell lines (L929, Vero) by using MTT Test. *Alkanna* species which exhibited promising cytotoxicity were evaluated for their DNA topoisomerase I inhibition potentials by means of Supercoil Plasmid DNA Relaxation Assay. Among the species, *A. cordifolia* has shown inhibition effect against cultured cell lines at the doses ranging from 8 µG/mL to 32 µG/mL. *A. cordifolia* exerting significant cytotoxicity and DNA topoisomerase I inhibition was selected for further purification. In preliminary fractionation, methanolic extract of *A. cordifolia* was subjected to different stationary phases (Silica gel, RP-C18 and Sephadex LH-20) by using Open Column Chromatography and Vacuum Liquid Chromatography (VLC) to determine optimum fractionation system. Fractions S2, S9, S10 from silica gel column and RP5, RP6, RP7, RP8 obtained from RP-C18 exhibited strong DNA topoisomerase I inhibition at 10 ng/mL concentration, whereas SF2 obtained from Sephadex LH-20 showed no inhibitory activity.

Since the active fractions were spread out well by silica gel, scale-up fractionation was performed on Biotage SP-2 High Performance Flash Chromatography by using normal phase silica gel. Biotage Flash Chromatography yielded total of 536 fractions which were pooled into 27 subfractions based on their Thin Layer Chromatography profiles. Fractions 69-80; 81-91; 92-110 and hexane extract were active at 10 ng/mL while no DNA topoisomerase I inhibition was observed at 1 ng/mL.

Key words: *Alkanna*, Boraginaceae, Bioassay Guided Fractionation, DNA Topoisomerase I Inhibition, Cytotoxicity, MTT.

TEŞEKKÜR

Üç boyutlu bilimsel alt yapısıyla saygıdeğer bilim adamı sevgili öğretmenim
sayın Doç. Dr. Erdal Bedir,

Tez yürütücümüz sayın Doç. Dr. Kemal Korkmaz,

Tez çalışmamı birlikte yürüttüğüm, değerli yorumlarıyla kaliteli sonuçlar
elde ettiğim sevgili ikinci danışmanım sayın Prof. Dr. Zeki Topçu,

Soru işareti taşıdığım tüm noktalarda pozitif enerjisi ile desteğini aldığım
sayın Doç Dr. Bahattin Tanyolaç,

Çalışmalarımın yürütülmesinde imkan ve desteklerini esirgemeyen Ege
Üniversitesi Bilim – Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
(EBİLTEM) Müdürü ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr.
Fazilet VARDAR SUKAN,

Maddi desteğini aldığım TÜBİTAK ile manevi güçlerini aldığım dostlarım
ve laboratuvar arkadaşlarım,

ve

Biricik NALBANTOĞLU ailesi,

Hepinize sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri grubu desteği ile SBAG-3134
numaralı ve ‘Genotoksik antikanser ekstrelerin elde edilmesi, hücresel
mekanizmalara ve apoptoz yollarına olan etkilerinin araştırılması’ isimli

proje kapsamında yürütülmüştür.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VIII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVII
TABLolar DİZİNİ.....	XXII
GRAFİKLER DİZİNİ.....	XXIII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Kanser ve Oluşum Mekanizmaları	4
2.2. Kanser Kemoterapisinde Kullanılan İlaçlar (Antineoplastikler) ve Etki Mekanizmaları	6
2.2.1. Antineoplastik İlaçlar.....	6
2.2.1.1. Alkilleyici Ajanlar.....	7
2.2.1.2. Antimetabolitler	11
2.2.1.3. Hormonlar ve Hormon Antagonistleri	12
2.3. Bitkisel Kaynaklı İlaçlar	12
2.4. Kemoterapi İlaçları ile Doğal Ürünlerin Karşılaştırılması	17
2.5. Antikanser Tedavide Doğal Ürünler ve Etki Mekanizmaları	18
2.5.1. İmmün Sistem Stimülasyonu ile Kanser İnhibisyonu	18

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.5.2. Dolaylı Olarak Kansere Hücrenin Bileşenlerini	
Etkileyerek Hücre Gelişiminin İnhibisyonu	19
2.5.2.1. DNA nükleotidlerini Hedefleyen Doğal	
Ürünler	19
2.5.3. Hücrenin Proliferasyonunun Direkt İnhibisyonu	21
2.5.3.1. Mitozu Hedefleyen Doğal Ürünler	24
2.5.3.2. Mikroorganizma Kaynaklı Doğal	
Ürünler ve Etki Mekanizmaları.....	29
2.5.4. DNA Polimeraz α Enzimini Hedefleyen Doğal	
Ürünler	32
2.5.5. DNA Topoizomeraz Enzimlerini Hedefleyen	
Doğal Ürünler	33
2.5.5.1. DNA Molekülünün Üçüncül Yapısı ve	
Bu Yapıdaki Değişmeler	33
2.5.5.2. DNA Replikasyonu.....	36
2.6. Topoizomeraz I Enzimi İnhibisyonu Yolu ile Tümör	
Oluşumunun Baskılanması	47
2.7. Antikanser İlaç Geliştirme Araştırmalarında Kamptotesin	
Kullanılarak Yapılan Topoizomeraz I İnhibisyonu	
Çalışmaları	50
2.8. Antikanser İlaç Geliştirme Araştırmalarında Naftakinonlar	
ve Türevleri Kullanılarak Yapılan Topoizomeraz I	
İnhibisyonu Çalışmaları	52

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.9. Antrakininler ve Türevleri Kullanılarak Yapılan Topoizomerez I-II İnhibisyonu Çalışmaları	65
2.10. Lapaşonlar Kullanılarak Yapılan Topoizomerez I-II İnhibisyonu Çalışmaları.....	69
2.11. Pirolizidinler Kullanılarak Yapılan Tümör Oluşumu Baskılanması Çalışmaları	76
2.12. Flavonoidler Kullanılarak Yapılan Topoizomerez I-II İnhibisyonu Çalışmaları.....	78
3. MATERYAL ve METOD.....	83
3.1. Materyal	83
3.1.1. Bitki Materyallerinin Toplandığı Lokasyonlar	83
3.1.2. Test Edilen Bitki Materyalleri	87
3.1.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon İçin Kullanılan Materyaller	87
3.1.3.1. Kromatografi Yöntemleri.....	87
3.1.3.2. Preparatif Ayırma Yöntemleri.....	88
3.1.3.3. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Sırasında Kullanılan Teknik Donanımlar	90
3.1.3.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Sırasında Kullanılan Çözümler	91
3.1.4. <i>Alkanna</i> Türleri Ekstre ve Fraksiyonlarının Hücre Kültürü'nde Sitotoksik Aktivite Testleri İçin Kullanılan Materyaller.....	94

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.4.1. Hücre Hatları	91
3.1.4.2. Hücre Kültürü Sarf Malzemeleri ve Teknik Donanımları	92
3.1.5. <i>Alkanna</i> Ekstre ve Fraksiyonlarının Topoizomeraz I Enzimi İnhibisyonu Testleri İçin Kullanılan Materyaller	93
3.1.5.1. Kimyasallar (Tamponlar ve Çözenler)	93
3.1.5.2. Teknik Donanımlar	94
3.2. Metodlar	94
3.2.1. <i>Alkanna</i> türlerinden Ham Ekstraktların Hazırlanması	94
3.2.2. Aktif Sitotoksik Bileşenlerin Fraksiyonlanması	95
3.2.3. Sitotoksik Aktivite Testi	98
3.2.3.1. Hücrelerin Üretilmesi	99
3.2.3.2. MTT Solüsyonunun Hazırlanması.....	99
3.2.4. DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu Analizi	101
3.2.4.1. Süper Sarmal Plazmid Gevşeme Analizi...	101
3.2.4.2. Jel Elektroforezi.....	102
3.2.4.3. Jellerin Boyanması.....	103
3.2.4.4. Jellerin Görüntülenmesi.....	103

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

4. BULGULAR	104
4.1. <i>Alkanna</i> Türleri Ham Ekstreleri İ.T.K. Ön Taramaları	104
4.2. <i>Alkanna</i> Türleri'nin Çeşitli Tümör Hücre Hatlarına Karşı İnhibisyon Aktivitesi	105
4.3. DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu Testi	108
4.4. Süper Sarmal Plazmid Gevşeme Testi.....	108
4.5. <i>A. cordifolia</i> Ön Fraksiyonlarının DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu	109
4.6. <i>A. cordifolia</i> İleri Fraksiyonlarının DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu	110
4.7. Kamptotesin Kullanılarak Yapılan DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu Testi	112
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	114
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	121
ÖZGEÇMİŞ	138

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Nitidin, lapaşol ve elliptisin'in kimyasal yapısı	16
Şekil 2.2. Elliptinyum asetat'ın kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.3. 4-İpomeanol'ün kimyasal yapısı	20
Şekil 2.4. Elefantopin, bakkarin ve bruseantin'in kimyasal yapıları	21
Şekil 2.5. Hücre siklusu	22
Şekil 2.6. Hücre siklusuna spesifik olan antineoplastikler	23
Şekil 2.7. Kamptotesin, irinotekan, topotekan, taksol ve taksoter'in kimyasal yapıları	25
Şekil 2.8. Podofillotoksin'in kimyasal yapısı	26
Şekil 2.9. Maytansin'in kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.10. Vinkristin ve vinblastin'in kimyasal yapısı	28
Şekil 2.11. Klinik olarak kullanılan antrasiklin antitümör ilaçlar.....	30
Şekil 2.12. Kumarin'lerin kimyasal yapısı	31
Şekil 2.13. Nalidiksik asid'in kimyasal yapısı.....	32
Şekil 2.14. Homoharringtonin ve harringtonin'in kimyasal yapısı	33
Şekil 2.15. Negatif ve pozitif süper dönüm oluşumu.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.16. Kapalı halkasal DNA molekülünde topolojik izomerlerin birbirine dönüşümü ve molekülde çözülme.....	35
Şekil 2.17. DNA helikazlar ile replikasyon çatalında çözülme.....	37
Şekil 2.18 DNA giraz ATP reaksiyonu	38
Şekil 2.19. DNA ligaz, ligasyon reaksiyonu	39
Şekil 2.20. DNA topoizomera I reaksiyon mekanizması	41
Şekil 2.21. Tip II topoizomera I (ör: DNA Giraz) etki mekanizması.....	42
Şekil 2.22. <i>E. coli</i> replikasyon çatalı	43
Şekil 2.23. ‘Double Strand Passage’ ya da ‘çift zincir geçişi’ mekanizması ile süper sarmal DNA gevşemesi	44
Şekil 2.24 Tip IB enzim dönen mekanizması.....	45
Şekil 2.25. Süper sarmal DNA’da nicked form ve lineer form.....	49
Şekil 2.26. Elektroforez sisteminde DNA formlarının ayrılması.....	49
Şekil 2.27. Topoizomera I zehirleri etki mekanizması	50
Şekil 2.28. Topotekan bağı Topo I-DNA kompleksi	51
Şekil 2.29. Diospirin’in kimyasal yapısı	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.30. Test edilen 14 bileşiğin kimyasal yapısı ve topoizomerez I'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC)	55
Şekil 2.31. Naftazarin'in kimyasal yapısı	56
Şekil 2.32. Alkanin ve Şikonin'in kimyasal yapıları	57
Şekil 2.33. Alkanin ve Şikonin'in bilgisayar bazlı moleküler modelleri	58
Şekil 2.34. Florokinolonların kimyasal yapısı	63
Şekil 3.1. <i>A. tubulosa</i> herbaryum kaydı	84
Şekil 3.2. <i>A. orientalis</i> herbaryum kaydı	84
Şekil 3.3. <i>A. hirsutissima</i> herbaryum kaydı	85
Şekil 3.4. <i>A. tinctoria</i> herbaryum kaydı	85
Şekil 3.5. <i>A. cordifolia</i> herbaryum kaydı	86
Şekil 3.6. <i>A. cordifolia</i> C. Koch ve Rize Cimil Vadisi (Kaçkarların Batı Ucu)	86
Şekil 3.7. <i>Alkanna</i> türleri ham ekstreleri	95
Şekil 4.1. <i>Alkanna</i> türleri ön İ.T.K taramaları	104
Şekil 4.2. <i>Alkanna</i> türlerinin Topoizomerez enzimi inhibisyonu	109

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.3. <i>A. cordifolia</i> silika jel ve karşıt faz (C-18) fraksiyonlarının Topo I inhibisyonu	110
Şekil 4.4. Hekzan ekstreleri (Biotage) DNA topoizomerez I inhibisyonu	111
Şekil 4.5. Hekzan ekstreleri (Biotage) DNA topoizomerez I inhibisyonu	112
Şekil 4.6. Kamptotesin'in DNA topoizomerez I inhibisyonu	113

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Alkilleyicilerin sınıflandırılması	7
Tablo 2.2. Antimetabolitlerin sınıflandırılması	11
Tablo 2.3. Hücre siklusunu hedefleyen antibiyotikler	29
Tablo 2.4. Polifenolik bileşiklerin Topoizomeraz I enzimi zehirlleme ve interkalasyonu	81
Tablo 3.1. Hücre kültürlerinde kullanılan vasat miktarları.....	93
Tablo 4.1. Çeşitli kanser hücre hatlarına karşı <i>Alkanna</i> ekstresinin antiproliferasyon etkisi	105

GRAFİKLER DİZİNİ**Grafik****Sayfa**

Grafik 4.1. Hücre hatlarına karşı *Alkanna* türlerinin IC₅₀ değerleri 106

Grafik 4.2. Flash kromatografiden elde edilen 111-120 ve 336-403 arası fraksiyonların sitotoksik aktivitesi 107

1.GİRİŞ

Bugün çağımızın öldürücü hastalığı olan kansere karşı yapılan klasik tıbbi ilaç tedavilerinde kalıcı ve iyileştirici sonuçlar alınamaması ve gücünü bitkilerden alan alternatif tedavinin uygulanması sonucunda kanser türlerinde tedavi başarı oranının artması, bilim dünyasını kanserin yaşama olan olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için doğal kaynaklara yöneltmiştir.

Biyoaktif bitkiler üzerinde günümüzde yapılan araştırmaların büyük bölümü esas olarak kanser tedavisine yöneliktir. Son 40 yıl içerisinde keşfedilen ve geliştirilen taksol, etopozit ve vinkristin gibi bitkisel kaynaklı antikanser ilaçların süregelen başarısı bu eğilimin devam edeceğini göstermektedir.

Kamptotesinler (topotekan, irinotekan), epipodofilotoksinler (etopozit), mitoksantron ve doksorubisin gibi klinik olarak kullanılan birçok antikanser ajanın topoizomeras inhibitörü olması, DNA topoizomeras I ve II'nin antikanser ilaç dizaynı ve geliştirilmesinde ilgilenilen hedefler haline gelmesine neden olmuştur. Bu nedenle, kanser hücrelerinin üremesini durduran yüksek biyolojik çeşitliliğe sahip uygun bitkisel kaynakların değerlendirilebilmesine yönelik etkin stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu yollardan biri de, bitki ekstraktlarının hızlı kimyasal ve biyolojik taramalarının bir arada yapılmasıdır. Boraginaceae bitkilerinden elde edilen aktif maddeler için yapılan araştırmalar bahsedilen mekanizmaya dayalı olarak yüksek sitotoksik aktivite sergileyen (hücrenin apoptoza yönlendirilmesinden sorumlu) naftakinon ve β -lapaşon grubu bileşiklerin

izolasyonu sonucu (Chenna ve ark., 2001; Neves-Pinto ve ark., 2002), bu bileşiklerin potent DNA topoizomeraaz enzimleri inhibitörü olarak doğadan elde edilmelerini sağlamıştır (Li ve ark., 1993; , Cho J. S. ve ark., 1996, Frydman ve ark., 1997). Devam eden yıllarda hem doğal kaynaklardan elde edilmiş hem de sentez yolu ile hazırlanmış birçok naftakinon ve β -lapaşon türevi bileşik sitotoksik etkileri yönünden incelenmiş ve incelenmeye devam edilmektedir (Chenna ve ark., 2001; Neves-Pinto ve ark., 2002; Sanchez ve ark., 2000; Pink ve ark., 2000). Boraginaceae bitkilerinin de naftakinon bileşikleri yönünden zengin olması bilim adamlarını bu familyaya yöneltmiş ve antikanser özellikteki bileşikler bilime kazandırılmıştır (Gaddipati ve ark., 2000; Gu ve ark., 2002; Shen ve ark., 2002).

Boraginaceae familyası üyelerinden *Alkanna* Tausch, Türkiye florasında 34 tür ve 40 taksa içeren küçük bir cinstir (Davis, 1978). Cinsin tamamı neredeyse endemiktir (32 endemik tür), bu nedenle Anadolu'nun *Alkanna* türlerinin gen merkezi olduğu söylenebilir.

Alkanna cinsi üzerinde gerçekleştirilen fitokimyasal araştırmalar çeşitli flavanoidlerin (El Sohly ve ark., 1997), yağ asidlerinin (Papageorgiou ve Assimopoulou, 2003), pirolizidin alkaloidlerinin (Roeder ve ark., 1984 ve 1992) ve naftakinonların (Afzal ve Muhammad, 1983; Papageorgiou ve ark., 1977, 1979, ve 1980b) tanımlanmasına olanak sağlamıştır. *Alkanna* türlerinden elde edilen naftakinon türevlerinin biyolojik aktivite çalışmaları antimikrobiyal ve yara iyileştirme özellikleri ile birlikte DNA topoizomeraaz I inhibisyonunu ortaya koymuştur (Papageorgiou ve ark., 1978, 1979; Kourounakis ve ark., 2002).

Bu önemli biyolojik aktivitenin tanımlanması ışığında amacımız, *Alkanna* cinsinden sitotoksosite taramaları sonunda aktif olarak tespit edilen türlerin saptanarak, bu türlerin topoizomeraz I enzimi inhibisyonu yoluyla tümör oluşum ve devamlılığının supresyonunun belirlenmesidir.

“Aldığın ilaç besinin, aldığın besin de ilacın olsun”

Hippocrates

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Kanser ve Oluşum Mekanizmaları

Sağlıklı bir dokuda hücreler arası iletişim, iki şekilde (indirekt ve direkt) meydana gelmektedir. İndirekt iletişim, hormon ve büyüme faktörleri gibi haberci moleküller tarafından sağlanmakta iken direkt iletişim, hücreden hücreye gerçekleşmektedir. Hücreler arasında gerçekleşmekte olan bu iletişim hücrenin devamlılığı açısından önem arz etmektedir. Hücrenin genetik şifresinde (DNA'sında), iç veya dış streten kaynaklanan bir hasar sonucunda hücre, komşularıyla arasındaki yakın iletişimi kaybetmekte ve anormal sinyal transdüksiyonu sonucu kendine has ortamı oluşturmaktadır. Bu durum hücreler arası iletişimde kanserleşme öncesi basamağı oluşturan bir karışıklığa yol açmaktadır. Kanserleşmeye başlayan hücrenin çevresi düzenleyici kontrol mekanizmalarından farklı olarak bir ilerletici ajan içermekte ve hücrenin proliferasyonunu stimüle ederek sürekli kardeş hücrelere bölünmesine neden olmaktadır. İlerletici ajan, inflamasyon gibi doğal bir süreçten ya da vücuda yabancı bir kimyasaldan kaynaklanabilmektedir (**Boik, 2001**).

Bu genetik düzensizlikler sonucunda, hücrenin self-stimülasyonu gerçekleşmekte ve otonom kanser hücresi oluşmaktadır. Oluşan kanser hücresi, kendi proliferasyonunun stimülasyonu için bir ilerletici ajana ihtiyaç duymamaktadır. Çünkü hücre proliferasyonu için gerekli büyüme faktörü gibi proteinleri kendisi oluşturmaktadır (**Boik, 2001**).

Kanser hücresi popülasyonu sırasıyla, immün hücrelerin fonksiyonunu bozan immünsüpresif bileşikler üreterek immün sistemden kaçınmakta, vücut içinde farklı koşullarla karşılaştığında mutasyona uğramakta ve yeni kan damarlarının büyümesini (anjiogenez) indükleyerek invazyon ve metastaz yapmaktadır. Bu karakteristiklerin oluşumu ile kanser hücresinde başlangıç ve ilerlemeden sonraki üçüncü basamak olan ileri gelişme (kontROLSÜZ proliferasyon+kontROLSÜZ yayılma) başlamaktadır (**Boik, 2001**)

Kanser hücresinin oluşum ve yayılma basamakları antikanser stratejileri belirleyebilme konusunda bilim adamlarına yol göstermektedir. Kanser hücresinin inhibisyonunda doğal ürünlerin sahip olduğu antitümör etki mekanizmaları son dönemde çok dikkat çekmektedir (**Boik, 2001**).

Potansiyel antikanser ilaçların sentezleri, nitrojen mustardlarının, kimyasal savaş ajanlarının antilösemik özelliklerinin 1940’larda keşfi ile başlamıştır ve devam eden yıllarda birçok sentetik türev hazırlanmıştır. National Cancer Institute (NCI) programındaki araştırmacıların tanımlamalarına göre; bir **sitotoksik** ajan, tümör hücrelerine in vitro toksiktir ve bu toksisite in vivo’da tümör hücrelerine transfer olursa, ajanın **antitümör** aktiviteye sahip olduğu söylenebilmektedir. **Antikanser terimi** de, klinik denemelerde tümör hücrelerine toksik olan materyeller için kullanılmaktadır. Antikanser bileşiklerin (doğal ve sentetik) aktivitesi, biyolojik alkilasyon kapasiteleri ile ilişkilidir. Başarılı bir antikanser ilaç, normal hücrelere mümkün olduğunca az yan etki oluşturarak, kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemeli veya öldürmelidir (**Evans, 1999**).

2.2. Kanser Kemoterapisinde Kullanılan İlaçlar (Antineoplastikler) ve Etki Mekanizmaları

Genel anlamda **kemoterapi**, vücudu istila eden mikroorganizma, parazit veya zararlı hücreleri konakçıya zarar vermeden öldüren veya üremesini ve çoğalmasını durduran tedavi şeklidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar genellikle etki yaptıkları mikroorganizmanın cinsine göre sınıflandırılmaktadır: (**Kayaalp, 2003**).

1. Antibakteriyeller
2. Antihelmintikler
3. Antimalaryaller
4. Antiamibikler
5. Antivirütikler
6. Antineoplastikler

2.2.1. Antineoplastik İlaçlar

Tanımlanan antitümör ajanların, hızlı büyüyen tümörlere karşı etkili iken, yavaş büyüyen tümörlere karşı daha az etkili olduğu bildirilmiştir. Yavaş büyüyen tümörlerin büyüme ve bölünmeleri, kemik iliği ve gastrointestinal epitelyum gibi hızlı proliferen olan normal insan dokularından daha yavaş olmaktadır. Bu dokular böylelikle uygulanan ilaçtan kaynaklanan toksik etkilerden zarar görmektedirler. Bu sebepten dolayı daha fazla spesifiteye ihtiyaç vardır ve ilaç diğer normal dokulara zarar vermeden seçici ve spesifik olarak etkilemelidir.

Tümör tiplerinde, heterojenite, nüfuz edebilme, boyut ve diffüzlük açısından olduğu kadar büyüme hızı açısından da fark olması ilaçlara olan sensitivitede büyük farklar yaratmaktadır. Bu karakteristiklere dayanarak, yetişkinlerde genellikle akciğer, göğüs ve kolon solid tümörlerinin, kemoterapiye zayıf cevap verdiği söylenebilmektedir (**Evans, 1999**).

Antitümör ajanların etkilediği temel biyolojik mekanizmaların bilinmesi, analiz programlarının hedefi olmuştur. Gözlemler, spesifik enzim sistemleri üzerine bileşiklerin nükleik asid veya diğer hücre komponentlerine bağlanma gibi etkilerine yoğunlaşmıştır (**Evans, 1999**).

2.2.1.1. Alkilleyici ajanlar

Elli yıldan fazla süredir, nitrojen mustardlarının kullanılmaya başlanmasıyla (*N,N*-bis(2-kloroetil) aminler), DNA alkilleyici ajanlar kanser kemoterapisinde önemli rol oynamışlardır. Terapide kullanılan ilk nitrojen mustardı mekloretoamin ve tablo 2.1’de gösterilen benzer bileşikler klorambusil, melfalan ve siklofosamid bildirilmiştir (**Denny, 2001**).

Tablo 2.1. Alkilleyicilerin sınıflandırılması (Kayaalp, 1987).

Azotlu hardallar (nitrojen mustard)	Nitrozoüreler	Triazen ve hidrazin türevleri	Etileniminler ve metilaminler	Alkil sülfonatlar
Siklofosamid Mekloretoamin Klorambusil Melfalan Ifosfamid	Streptozosin Karmustin(BCNU) Lomustin(CCNU) Semustin	Dakarbazin Prokarbazin	Aziridin (tiotepa, tiofosfamid) Altretamin (hekzametilmelamin)	Busulfan

Alkilleyiciler, en eski ve en çok kullanılan ön ilaçlar olarak bulunmakta ve hücre siklusunun G1 ve S fazlarına daha fazla etkili olmaktadır. Kanseri hücrede önce etilenimonyum daha sonra da pozitif yük içeren karbonyum türevlerine dönüşerek, negatif yüklü nükleik asitlerden oluşan DNA'nın nükleofilik gruplarına kovalent bağlarla bağlanmaktadırlar (**alkilleme**). Bağlanma iki şekilde olmaktadır:

1. DNA'ya tek noktadan bağlanma
2. DNA'ya çift noktadan bağlanma (alkilleyiciler).

Sonuçta; oluşan karbonyum, iki DNA zincirindeki guaninler arasında çapraz bağlanma oluşturarak, DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozmaktadır (**Kayaalp, 1987**).

Örnek olarak, daunorubisin ve doksorubisin gibi ilaçların, hidrojen bağları ile nonkovalent kompleksler oluşturdukları bildirilmiştir. Bu nonkovalent kompleksler, DNA sarmalının dizili baz çiftleri arasında interkalasyon yoluyla veya major veya minör oluğa bağlanma yoluyla meydana gelmektedir.

Majör ve Minör Oluk: DNA zincirlerinin birbirinden ayrıldığı ve tekrar yakınlaştığı yerler “**majör ve minör oluk**” olarak adlandırılmaktadır. B DNA 'da majör oluğun, minör oluktan daha derin ve daha geniş olması, moleküllerle etkileşiminde daha açık bir pozisyon oluşturmaktadır. Herbir oluk için baz çifti düzenlenmesi spesifik olmakta ve her biri farklı hidrojen bağ verici ve alıcıları içermektedir. İlaç ve proteinler gibi moleküller bu bölgelere bağlanmaktadırlar. Farklı DNA bazları ve bu bazların dizileri arasında ilaç molekülleri seçici bir şekilde

ayrılabilirler (<http://www.personal.leeds.ac.uk/chemistry>; Stryer et al., 2002).

Tipik bir oluk bağlanıcı ilaç, kendisini hidrojen bağları ve Van Der Waals etkileşimleri arasında tutmaktadır. AT baz çiftleri arasındaki minör oluk, bu ilaçlar için mükemmel bir bağlantı bölgesi olarak bildirilmiştir. Örneğin, Distamisin A ve Netropsin'in, DNA zincirini hidrate eden su molekülleri ile yer değiştirerek minör oluğa bağlandıkları bildirilmiştir. Netropsin'in NH gruplarının, bitişik bazlarda bulunan timin O₂ ve adenin N₃'e bağlanarak, molekülün minör oluk uzunluğu boyunca oturduğu belirtilmiştir (<http://www.personal.leeds.ac.uk/chemistry>; Kopka et al., 1985).

İnterkalasyon: DNA heliksinin uzaması ve fosfat iskeletinin perturbasyonu olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak 1961 yılında Lerman tarafından gösterilmiş ve DNA sarmalının deformasyonuna sebep olduğu ve molekülün yapı ve fonksiyonunu değiştirdiği düşünülmüştür (<http://www.personal.leeds.ac.uk/~chm3gmn/chemistry.html>; Faddeeva and Beliaeva, 1991).

Bis-interkalasyon: İki tane düzlemsel aromatik sistem içeren bir molekül için DNA zinciri ile iki defa interkalasyon oluşturmak da mümkündür. Buna '**bis-interkalasyon**' denilmekte ve bir interkalatörün yaptığından daha fazla sarmal açılması (2 kere) meydana gelmektedir. Örnek olarak ekinomisin potent doğal antibiyotiği verilmiştir.

Çoğu interkalatör ilaç, bir veya fazla düzlemsel aromatik halka içermektedir. DNA replikasyonu ve transkripsiyonunun etkin inhibitörleri olarak tercihen CG sekansında olmak üzere pürin-pirimidin basamağında

interkalasyon gözlenmektedir (<http://www.personal.leeds.ac.uk/~chemistry.html>; Temperini C et al., 2003).

İnterkalatör ilaçlar, birleşik aromatik heterosiklik iken, minör oluk bağlanıcıları ise, birlesik olmayan aromatik heterosiklik olarak bildirilmişlerdir.

İnterkalatör ilaçların toksisitesini azaltmak için ciddi araştırmalar yapılmıştır. İlacın fosfolipid kılıf ile sarılması veya tedavinin, toksisiteyi azaltan başka bir ilaç ile kombine edilmesi yaklaşımlardan biri olmuştur. Bu ilaçlarda diğer bir problem, vücudun bunlara direnç geliştirebilmesi olarak gösterilmiştir. Örneğin glutatyon seviyesinde bir artış olması, ilacın etkinliğinde müthiş bir azalma yapmaktadır (**Cancerquest [Online]. 2003. [Accessed 6/12/2004]).**

Tüm DNA alkilleyici ajanlar gerekli olarak yüksek kimyasal reaktiviteye sahip olmaktadır. Tüm reaktivite nitrojen temelinde gerçekleşmekte ve aromatik mustardlar üzerinde elektron veren substitüentler reaktiviteyi arttırmakta iken, ilacın diğer selüler nükleofillerle özellikle proteinler ve düşük molekül ağırlıklı tiollerle reaksiyonu, reaktiviteyi azaltmaktadır. Bu durumun, alkilleyicileri hücresel rezistans mekanizmalarına savunmasız hale getirdiği bildirilmiştir (ör: artmış glutatyon seviyeleri) (**Denny, 2001).**

Bu ilaçların hücrede meydana getirdikleri değişiklikler hücrelerin X ışınlarına maruz kalması durumunda ortaya çıkan değişikliklere çok benzediğinden bu ilaçlara ‘**radyomimetik ilaçlar**’da denilmektedir. X ışınlarına duyarlı tümörler, bu ilaçlara da oldukça duyarlı olarak gösterilmişlerdir. Radyomimetik ilaçlar doku toksisitesinde artış sağlamaları

dolayısıyla, radyoterapi ile aynı zamanda kullanılmamaları gerektiği bildirilmiştir (**Kayaalp, 1987**).

Tüm antineoplastiklerin mutajenik ve karsinojenik etki potansiyeli bulunmaktadır. Alkilleyici ajanlarla, özellikle prokarbozin, klorambusil ve melfalan kullanımında sıklıkla gözlenmektedir (**Kayaalp, 1987**).

2.2.1.2. Antimetabolitler

Neoplazmaların tedavisinde kullanılan antimetabolitler, DNA, RNA, proteinler ve diğer temel hücre bileşenlerinin sentez ve değişik basamaklarında substrat veya koenzim olarak rol oynayan doğal metabolitlerin analogları olarak gösterilmektedirler. Örneğin tablo 2.2’de verilmiş olan 6-merkaptopürin, tümör hücresinde DNA ve RNA sentezini bozarak etki yapmış ve S fazına etkili olarak bulunmuştur. Döneme özgü ilaçlar olarak, hızlı çoğalma dönemindeki tümörlerde daha fazla etkili bulunmuşlardır. En önemli toksik etkileri kemik iliği ve barsak epitelyumunda gösterilmiştir. Fötüse, gebeliğin bütün dönemlerinde zararlı etkileri bulunmuştur (**Kayaalp, 1987**).

Tablo 2.2. Antimetabolitlerin Sınıflandırılması (Kayaalp, 1987).

Folik asid antimetabolitleri	Pürin antimetabolitleri	Pirimidin antimetabolitleri
Metotreksat	6-merkaptopürin Tioguanin Fludarabin	5-florourasil Floksuridin Sitarabin Gemsitabin Kapesitabin Raltitrekset Kladribin

Antimetabolit kemoterapötiklerden, metotreksat'ın bazı bazların sentezi için gerekli olan folat aktivitesini inhibe ederek, sitarabin'in DNA polimeraz inhibisyonu yaparak ve 5-florourasil ve hidroksiüre'nin DNA sentezi inhibisyonu sonucu olarak nükleotid üretimini engelleyerek bu etkiyi gosterdikleri bilinmektedir.

2.2.1.3. Hormonlar ve Hormon Antagonistleri

Çoğalmayı baskılayıcı şekilde etkili olan ilaçlardır. Uzun süre, yüksek dozda kullanılmaları gereklidir. Diğer antineoplastiklerle çapraz-direnç ilişkisi yoktur. Tümör kitlesinde yaptıkları ufalma, daha hızlı ve daha fazladır. Genellikle kombinasyon içinde kullanılırlar. Kemik iliğini deprese etmemeleri önemli avantajlarıdır. Örnek olarak:

- Glukokortikoidler
- Östrojenler
- Antiöstrojenler: Tamoksifen
Toremifen
Formestan
- Progestinler
- GnRH analogları
- Antiandrojenler verilmiştir.

2.3. Bitkisel Kaynaklı İlaçlar

Günümüzde, üçüncü dünya ülkelerinin %80'i, tedavide öncelikle bitkisel ürünlere başvurmaktadır. Kalan %20'si, sağlık vakalarının

%25'inde doğrudan doğal ürünlerden türevlenen farmasötiklere yönelmiştir **(Mans et al., 2000)**.

Potansiyel kemoterapötik ajanların dizaynında yeni kalıplar veya prototip ilaçlara ihtiyaç duyulmuş ve doğal kaynaklar (bitki, mikroorganizma vs.) çok büyük potansiyele sahip olmaları nedeni ile önem kazanmıştır. Bitki, mikroorganizma ve deniz hayvanlarının (mercan, denizyıldızı, marin bakteriler vs.) antitümör aktivite için geniş çapta araştırılması 1950'lerin sonlarında başlamıştır **(Evans, 1999)**.

Tıbbi bitkilerin inkar edilemez yükselişi sırasında, antikanser ilaç gelişimi göz önüne alındığında, Afrika kıtasının güneyinde yetişen tıbbi bitkilerden izole edilen bileşiklerin test edilmesi büyük ölçekli projeleri başlatmıştır **(Mans et al., 2000)**. 25 yıldır, 40 000 türü bulan 114 000 bitki örneği kök, gövde ve yaprak olmak üzere test edilmiştir **(Evans, 1999)**. Türler, etnofarmakolojik, kemosistemik ve ekolojik bilgilere ilave olarak potansiyel kimyasal kompozisyona sahip olup olmamalarına göre seçilmiştir. Test edilen ekstrelerin %4'ü tekrarlanabilir aktivite göstermiştir. Oldukça düşük konsantrasyonlarda (50 µg/mL) hücrelerin büyümesini inhibe eden ekstreler (%50), daha spesifik analiz için NCI'ya gönderilmiştir **(Mans et al., 2000)**.

Yeni ilaçların geliştirilmesinde tropikal yağmur ormanları büyük olanaklar sunmaktadır. Amazonlar, yeryüzünün 2.722.000 millik alanını kaplar ve yaklaşık olarak küresel biyoçeşitliliğin üçte birini barındırmaktadır. Bunun anlamı, saptanan 90,000 yüksek tür, taksonomik olarak karakterize edilen türlerin sadece %10'udur. Paklitaksel üreten *Taxus brevifolia*'nın tanımlandığı Amerika ve Kanada sadece 2,000 yüksek bitki

türüne sahiptir. Son beş yıl içinde, amazon bitki türlerinden 250 yeni alkaloid'in izolasyonunun bildirilmesi, kimyasal çeşitliliğin de bu bölgede yetişen bitkilerde yüksek olduğunu göstermektedir (**Mans et al., 2000**).

Bitkisel ilacın izole edilen ögesi, aynı bitkisel ilacın ham ekstresi ile aynı klinik cevabı göstermeyebilir. Sıklıkla, toplam terapötik aktivite, tek olan terapötik aktivitelerden daha fazla ya da farklı olmaktadır. Bunun sebebi, ekstrenin kompleks doğasından kaynaklanan sinerjizm veya antagonizmadır. Şu da muhtemeldir ki, bitki ekstresinin önemli biyolojik aktivite gösteren bir fraksiyonu bu aktivite ile bir ögeye sahip olmayabilmekte ya da aktivite göstermeyen bir fraksiyon, hala aktif bir öge içerebilmektedir. Bunun dışında, ham fraksiyonların, gecikmiş toksisiteye sahip ek maddeler içermesi, test hayvanlarının kontrol hayvanları ile aynı anda ölümüne sebep olmaktadır. Analizin; tanin, saponin ve steroller gibi kullanılabilecek ilaç komponentlerine dönüştürülemeyecek olan zayıf aktif bitki ürünlerinin tespitinden kaçınarak (inaktif bileşiklerden etkilenmeden), düşük konsantrasyonlardaki aktif bileşiklerin tanımlanmasında seçici, hassas ve etkili olması büyük öneme sahip olmaktadır (**Evans, 1999**).

Ekstre fraksiyonlarının antitümör aktivite analizleri in vitro sitotoksiste analizi ile yapılmaktadır. Bununla beraber, in vitro sitotoksiste, in vivo antitümör aktiviteyi tahmin etmede etkili ve güvenilir bulunmamaktadır. Bu analiz, hızlı ve ucuzdur. Sitotoksiste analizlerinde aktivite gösteren ekstreler, fraksiyonlamaya alınmakta, aktif komponentlerin izolasyon ve saflaştırılması yapılmaktadır. Alternatif olarak gösterilen bitkiler de bileşiğin zengin kaynakları olarak kabul edildiği için aynı cinsin diğer türleri veya aynı ailenin yakın benzerlikteki cinsleri de analiz edilebilmektedir (**Evans, 1999**).

Tarihte Tümör İnhibitörleri Olarak Kullanılmış Doğal Ürünler:

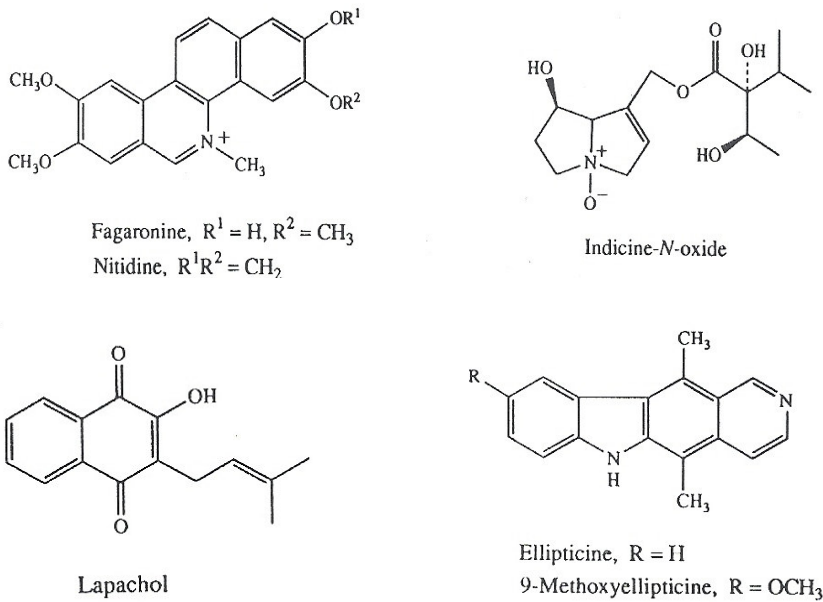
Habis hastalıklar için yüzyıllardır kullanılan bitki materyellerine örnek olarak, 2000 yılı aşkın süredir Çinliler tarafından antitümör ilaç olarak kullanılmakta olan *Podophyllum hexandrum* bitkisi kökleri ve benzer Amerikan türü May-apple (*P. peltatum*) verilebilir. Bu bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda lignanlar ve antitümör aktiviteye sahip glikozidler açısından zengin oldukları bulunmuştur. İki türün de majör ögeleri olan **podofillotoksin ve peltatinlerin** sistemik ilaç kullanımında uygunluğu kadar, podofillotoksin'in yarı sentetik iki türevi etopozid ve tenipozid de klinik denemelerde iyi sonuçlar vermiş ve tedaviye girmiştir. Galen (c. AD 180) zamanından bu yana, 'yaban yasemini'nden (*Solanum dulcamara*), elde edilen özsu, kanser, tümör ve siğillerin tedavisinde kullanılmış ve bu aktif tümör inhibitörü steroid alkaloid glikozid **β -solamarin** olarak tanımlanmıştır.

AD 970'den bu yana *Cladonia*, *Cetraria* ve *Usnea* türleri gibi çeşitli likenler kansere karşı geleneksel tedavide yerlerini almışlardır.

Yüzyıllar önce, mistletoe (*Viscum album*) antitümör aktiviteye sahip olarak bildirilmiştir. Mezereon (*Daphne mezereum*) bileşiğinin aktif antitümör komponenti, toksik dafnetoksin'e yapısal olarak çok benzer olan bir diterpen türevi **mezerein**'dir ve bazı ülkelerde kanser tedavisinde kullanılmıştır (Evans, 1999).

Tarihte kullanılan ilk antitümör doğal ürünler *Vinca* alkaloidleri vinkristin (Hodgkin's hastalığı) veya onkovin'e (*Catharanthus roseus*-Apocynaceae'den izole edilen) mekloreタミン eklenmesi sonucu prednizon ve prokarbazin ile oluşturulmuştur (Mans et al., 2000).

Antitümör aktiviteye sahip olarak; usnik asid, ellajik asid, antrakinon aloe-emodin, kinonlardan yuglon ve lapaşol, pirolizidin alkaloidleri retronesin ve monokrotalin, nitrofenantren aristoloşik asit, bufadienolid hellebrigenin asetat, *Colchicum* alkaloidleri kolşisin, demekolşin ve 3-demetilkolşisin ve bir seri kukurbitasinler bildirilmiştir. Daha sonraki tarihlerde, akronisin, elliptisin, emetin ve nitidin alkaloidleri tümör inhibitörleri olarak gösterilmiştir (Şekil 2.1) (Evans, 1999).



Şekil 2.1. Nitidin, lapaşol ve elliptisin kimyasal yapısı (Evans, 1999).

Kanser kemoterapisinde kullanılan yüksek bitki materyellerinden en başarılı olanı *Catharanthus roseus* alkaloidleri olarak gösterilmiştir. Bu bitki ile ilgili araştırmalar, kanserden çok diyabet üzerinde başarılı olduğunu göstermiştir. Antilösemik aktivite gösteren dimerik indol alkaloidlerinden vinkalokoblastin (vinblastin) ve lokokristin (vinkristin) *C. roseus*'tan

ekstrakte edilmiş ve tek başına ya da kombinasyon halinde kanser tedavisinde kullanılmıştır. Vinblastin ve vinkristin arasındaki küçük yapısal farka rağmen, bu alkaloidlere cevap veren insan neoplazma spektrumunda önemli farklar bulunmaktadır. Vinkristin gibi yüksek derecede aktif antikanser ilaçlar hücreleri sadece bölünme siklusu boyunca etkilerler. Podofilotoksin, vinblastin ve vinkristin mitotik zehirler olarak bulunmakta ve kanser ilaç kontrolünde özellikle hızlı büyüyen tümörlerde başarılı görülmektedir (**Evans, 1999**).

Son yıllarda monoklonal antikorların kullanılarak kanserli hücrelere sitotoksik ajan veya toksinlerin hedeflenmesi dikkate alınmıştır ve monoklonal antikorlara bağlı hint yağı toksini risin kullanılarak hayvan hücrelerinde başarı gözlenmiştir (**Evans, 1999**).

2.4. Kemoterapi İlaçları ile Doğal Ürünlerin Karşılaştırılması

Çoğu doğal bileşiğin kanser inhibitör etkisi doğrudan DNA hasarı üzerinden değilken, kemoterapi ilaçları için bu oldukça önemli bir mekanizmadır. Bu durumda doğal ürünler, kemoterapi ilaçlarına göre canlı hücrelerdeki DNA mutasyonlarını daha az olasılıkla indüklemekte (normal hücreleri korurlar) ve daha seçici olarak etkilemektedirler (**Boik, 2001**).

Doğal ürünlerin tek başlarına kullanımlarından çok kombinasyon halinde kullanılmaları, kanserleşme öncesi oluşumlarda daha iyi performans göstermiştir. Kombinasyon ile oluşan sinerjik etkileşimler, kullanılan her bir bileşiğin daha düşük ve güvenli dozlarda kalmasını sağlamıştır. Çoğu doğrudan etkileyen doğal ürün tek başına kullanıldığında kanser inhibisyonu için aşırı ve güvensiz doz gerektirmiştir.

Doğal ürünlerin, çoğu kemoterapi ilacından ortalama yirmibir kat daha az toksik olduğu ve en toksik doğal ürünün, en toksik kemoterapi ilacından ikiyüzyetmiş kat daha az toksik olduğu bildirilmiştir **(Boik, 2001)**.

2.5. Antikanser Tedavide Doğal Ürünler ve Etki Mekanizmaları

Antitümör doğal ürünler, hücre ölümünün engellenmesi ile hücre proliferasyonuna yönlendiren sinyallerin akışını durdurarak, kanser hücre proliferasyonunu inhibe etmektedirler. Serbest radikallerin ayrılması ile mutasyon hızlarının düşürülmesi, anormal transkripsiyon faktör aktivitesinin inhibe edilmesi, sinyal transdüksiyonunda yer alan kinaz ve diğer proteinlerin inhibisyonu, hücre siklusunun devamlılığında yer alan siklin proteinlerin inhibisyonu ve gen ekspresyonunu normalleştiren sinyalleri gönderen hücreden hücreye iletişimin arttırılmasını sağlamaktadırlar **(Boik, 2001)**.

Bu durumda, doğal ürünler antikanser etki mekanizmalarına göre;

2.5.1. İmmün sistem stimülasyonu ile kanser inhibisyonu

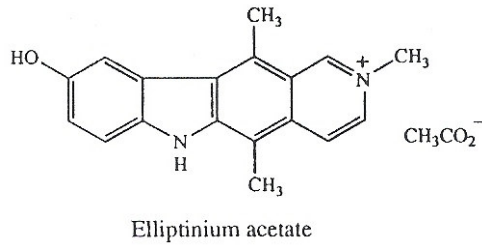
İmmün hücrelerin fonksiyonunu bozan immünsüpresif bileşiklerin baskılanması yoluyla gerçekleştirilmektedir.

2.5.2. Dolaylı olarak kanser hücrelerinin bileşenlerini etkileyerek hücre gelişiminin inhibisyonu

Kanser hücrelerinin bileşenlerinin devamlılığının baskılanması ile oluşmaktadır:

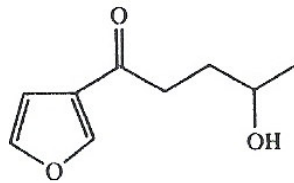
2.5.2.1. DNA nükleotidlerini hedefleyen doğal ürünler

Elliptisin; *Ochrosia elliptica* (Apocynaceae) ve bu ailenin diğer bitkilerinden **pridokarbazol alkoloidleri** olan elliptisin ve 9-metoksielliptisin ve sentetik analogları, kanserde temel inhibitörler olarak gösterilmiş ancak hemoliz ve kardiovasküler etkileri de içeren bir seri istenmeyen yan etki preklinik çalışmalarda gözlenmiştir. Elliptisin'lerin DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yapan düzlemsel moleküller olduğu ve heliksin kısmen açılmasına sebep oldukları bildirilmiştir. Açılma seviyesi ve biyolojik özellikler arasındaki doğru korelasyon, kanser hücrelerinin inhibisyonu sırasında gözlenmiştir. Elliptisin' in vivo'da daha yüksek aktivitede olan 9-hidroksielliptisin'e okside olması, yeni türevin aktif ajan olduğunu düşündürmektedir. Elliptisin ve türevlerinin zayıf su çözünürlüğü, klinik kullanımda problem oluşturmuştur. 9-hidroksielliptisin'nin suda çözülebilir 9-hidroksi-2-N-metilelliptisinyum asetat (şekil 2.2'de gösterilen elliptinyum asetat) oluşturmak için kuaternerize olması, yüksek aktif bir materyal oluşturmuştur (Evans, 1999). Elliptinyum, elliptisin'in yarı sentetik türevidir. (Mans et al., 2000). Bazı suda çözülebilir N-glikozidleri de yüksek aktivite göstermiştir (Evans, 1999).



Şekil 2.2. Elliptinyum asetat kimyasal yapısı (Evans, 1999).

4-ipomeanol; NCI’da ilgi çeken doğal ürün 4-ipomeanol, *Ipomoea batatas* ‘dan izole edilen bir toksin olup, akciğer hücrelerinde bir reaktif dialdehid vermek üzere enzimler tarafından selektif olarak okside edilir ve böylece sadece bu enzim sistemini içeren hücrelerde güçlü alkilleyici ajan olarak bulunur (Evans, 1999). Şekil 2.3’de kimyasal yapısı gösterilen 4-Ipoemanol bir antineoplastik ajan olarak klinik inceleme altında bulunmaktadır (Mans et al., 2000).

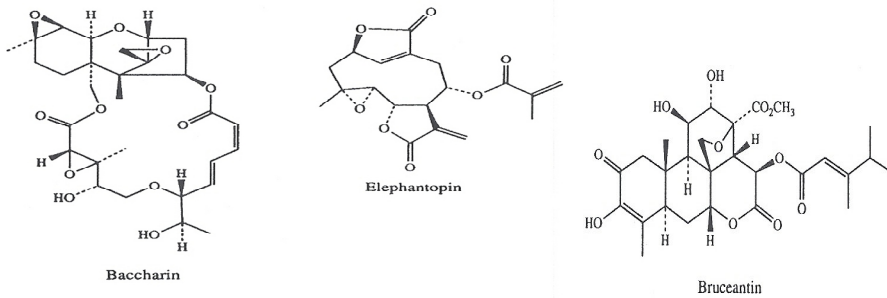


4-Ipomeanol

Şekil 2.3. 4-İpomeanol kimyasal yapısı (Evans, 1999).

Doğal tümör inhibitörlerinin yüksek çoğunluğu, alkilasyon ajanları olarak etki etmektedir. Bu özellik, onların lakton fonksiyonları ya da α,β -doymamış esterleri gibi yüksek elektrofilik merkezlere sahip olmalarıyla bağlantılıdır (örnek: şekil 2.4’de gösterilen, bruseantin, elefantopin, bakkarin). Bunlardan bazıları aynı zamanda yüksek elektrofilik epoksid

fonksiyonları içermektedirler. Şu açıktır ki, bu bileşikler hücre bölünmesini kontrol eden enzimlerde nükleofilik grupların (belki tiollerin) seçici alkilasyonu yolu ile etki etmektedir. Bileşiklerin, elektrofilik merkezlerini bozan kimyasal modifikasyona uğratılması, ürünlerde ihmal edilebilir antitümör aktivite ile sonuçlanmaktadır.



Şekil 2.4. Elefantopin, bakkarin ve bruseantin kimyasal yapıları.

Çoğu ajan hem kanserli hem de normal hücreleri öldürerek sitotoksik özelliklerini göstermektedir. Seçicilik, tümör inhibitörünün hücreye transportu, kimyasal doğası ve alkillenecek spesifik nükleofilin sterik çevresi gibi faktörlere bağlı bulunmaktadır. Büyüme düzenleyici biyolojik makromoleküller ile moleküler komplekslerin oluşturulmasında, aktif molekülün spesifik özellikleri önem taşımaktadır (Evans, 1999).

2.5.3. Hücrenin proliferasyonunun direkt inhibisyonu

Hücre proliferasyonu, hücre siklusu adı altındaki olaylar zincirinde meydana gelir. Yirmi dört saat süren siklusta G1, G2 ve M adı verilen üç kontrol noktası olmak üzere G0, G1, G2, M ve S olarak tanımlanan beş faz bulunmaktadır.

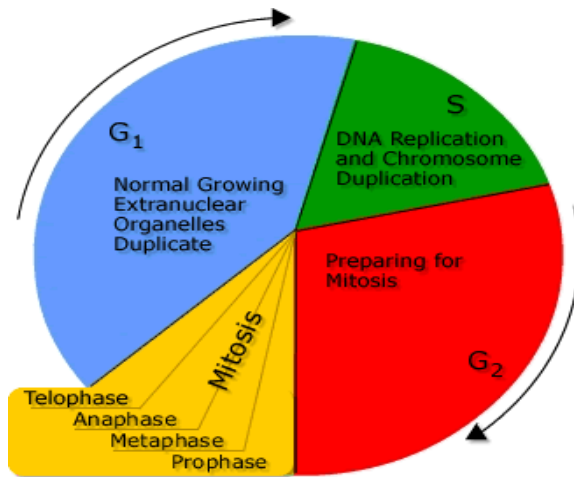
G0 fazı (İstirahat fazı): Hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanmaktadır.

G1 (gap=köprü fazı): Spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenmektedir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenmektedir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken bir çok enzim üretilmektedir.

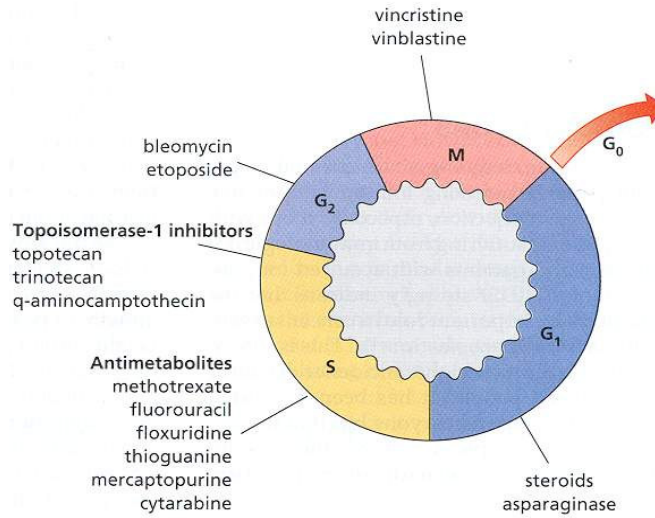
S: DNA replikasyonu yapılmaktadır. Replikasyon süresince düğümlenmiş DNA sarmalı, topoizomeraz enzimleri tarafından gevşetilmektedir.

G2: (ikinci köprü fazı), DNA sentezi ardından dinlenme fazıdır. Bu fazda yeniden hücre bütünlüğü kontrol edilmektedir.

M: Hücre bölünmekte ve hücre bütünlüğü yeniden kontrol edilmektedir (**Boik, 2001**). Mitozu takiben oluşan yeni hücreler, yeni bir siklus çevrimi için G0 veya G1 fazına girmektedirler (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hücre Siklusu



Şekil 2.6. Hücre siklusuna spesifik olan antineoplastikler. (<http://images2.clinicaltools.com>).

Hücre Siklusuna Nonspesifik Ajanlar:

- 1. Alkilasyon yapıcı ajanlar:** Klorambusil, siklofosfamid, busulfan, ifosfamid, mekloreタミン, melfalan.
 - 2. Antrasiklin antibiyotikler:** Doksorubisin, daunorubisin.
 - 3. Diğer antibiyotikler:** Daktinomisin, mitomisin, mitoksantron.
 - 4. Nitrozoüreler:** Karmustin, lomustin, streptozosin.
 - 5. Çok yönlüler:** Karboplatin, sispaltin, dakarbazin.
- (<http://www.instruct.nmu.edu>).

Böylece, tüm bölünen hücrelerin bütünlüğü hücre siklusu boyunca üç kez kontrol edilmektedir. Kontrol noktalarında DNA hasarı tespit edildiği takdirde sağlıklı hücre siklusu durdurulmakta ve lezyon tamiri başlatılmaktadır. Lezyonlar tamir edilemez durumdaysa, hücre siklusu

durmakta ve hücre hasarlı DNA ile büyümekten kaçınarak apoptoz (hasarlı hücrelerde programlı hücre ölümü) yoluyla intihar etmektedir.

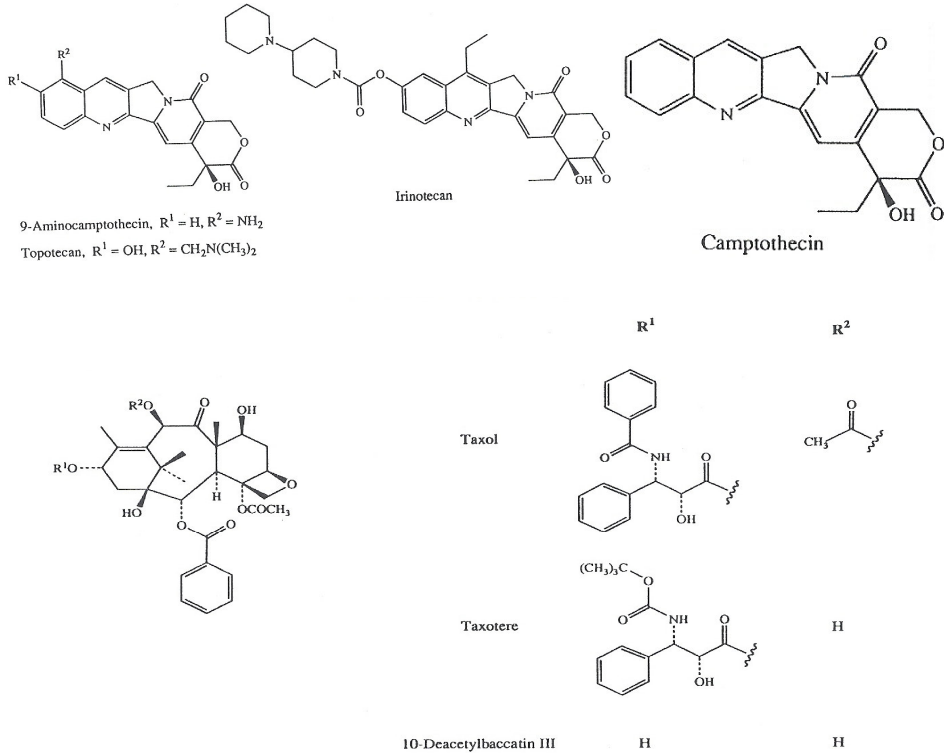
G1 kontrol noktasında p53 geninin ürettiği bir transkripsiyon faktörü olan p53 proteini ‘‘Guardian of DNA’’ yer almaktadır. Kanser hücreleri gibi hasarlı DNA içeren defektif bölgelerde tamir mümkün değilse hücre p53 proteini tarafından parçalanmaktadır. Diğer açıdan, kanser hücrelerinde sık görülen p53 mutasyonları, p53 fonksiyonlarını durdurmakta ve kanser hücre proliferasyonunun devam etmesine izin vermektedir. p53 geninin ekspresyonuna antitümör doğal ve sentetik ürünler yardım ederek DNA’nın hasara uğramasını engellemekte ve böylelikle hücre siklusunun her fazı kanser inhibisyonunda muhtemel bir hedef olmaktadır (Boik, 2001).

2.5.3.1. Mitozu Hedefleyen Doğal Ürünler

Doğal kaynaklı antitümörlerin temel etkileri, mitozun metafaz döneminde, tubulin moleküllerine bağlanarak mikrotübüllerden oluşan mitoz iğciklerinin oluşmasını önlemek şeklinde olmaktadır (epipodofilotoksinler hariç). Bu ilaçlara mitoz zehirleri, metafaz zehirleri, iğcik zehirleri adları verilmektedir. Döneme özgü (M fazı) ilaçlar olarak gösterilmişlerdir (Kayaalp, 2003).

Taksanlar: *Taxus brevifolia* ve *T. canadensis* bitkilerinin köklerinin ekstrelerinden elde edilen taksanoid grubu bileşikler, yüzyıllar boyunca Asya ve Kuzey Amerika’da yerliler tarafından kansere karşı kullanılmıştır. Taxaceae *Taxus brevifolia*, *T. canadensis* veya *T. baccata*’nın ağaç köklerinden ekstre edilen yeni taksanların (paklitaksel) ve *Camptotheca acuminata*’nın odun ve ağaç kabuklarından türevlenen kamptotesinlerin

(irinotekan, topotekan) üzerinde yapılan çalışmalar yüksek anti-solid tümör etkinliğe sahip olduklarını göstermiştir (Mans et al., 2000).



Şekil 2.7. Kamptotesin, irinotekan, topotekan, taksol ve taksoter kimyasal yapıları (Evans, 1999).

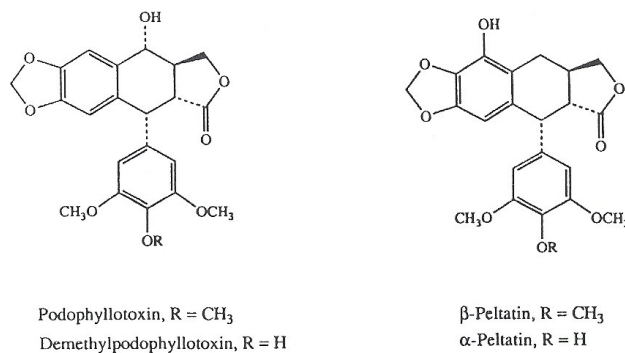
Taksol, en önemli bitki türevli antikanser ajanlardan biri olarak, Pasifik porsuk ağacı *Taxus brevifolia*'dan izole edilen bir diterpenoiddir. Taksoter olarak bilinen, taksol'ün bir yan zincir analogunun yarı sentezi ile elde edilen bileşik, suda çözünürlüğü arttırmış ve bazı denemelerde taksol'den daha iyi aktivite göstermiştir (Şekil 2.7) (Evans, 1999).

Taksol/Paklitaksel/Dosetaksel grubu mikrotübül sentezini, tubulin polimerizasyonunu artırarak (farklı bir antimitotik ajan olarak

mikrotübüllerin toplanmasını artırır ve onları depolimerizasyona karşı stabilize eder) stimüle etmektedir. Sonuçta, tubulin/mikrotübül dengesi bozulmakta ve fonksiyonel olmayan mikrotubulin meydana gelerek antineoplastik etki oluşmaktadır (**Kayaalp, 1987**).

Epipodofilotoksin (podofilotoksin/etopozid/tenipozid):

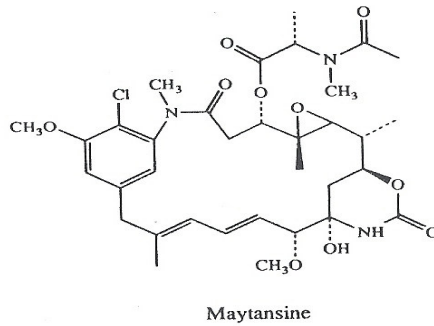
Podophyllum peltatum ve *P. emodi*, Berberidaceae'den türevlenen epipodofilotoksin türevi etopozid, bleomisin ve sisplatin ile kombine edilerek testis kanserinde güçlü tedavi oluşturmaktadır (**Mans ve ark., 2000**). G2 dönemine özgü ilaçlar olarak gösterilmektedirler. Podofilotoksin hariç mitoz zehiri olarak bulunmaktadırlar (Şekil 2.8). Küçük hücreli akciğer kanserine en etkili ilaçlardan biridir (**Kayaalp, 2003**). Podofilotoksin bir tubulin bağlanıcısı olmasına rağmen, podofilotoksin türevleri olan etopozid ve tenipozid semisentetik antikanser ajanlarının farklı etkileri görülmüştür. Bu ilaçlar, topoizomera II enzimi yoluyla DNA sentezini ve replikasyonunu inhibe etmektedirler (**Evans, 1999**).



Şekil 2.8. Podofilotoksin kimyasal yapısı (Evans, 1999).

Maytansinoid: Brezilya’da cancorosa denen *Maytenus ilicifolia*’nın alkol ekstresi veya babosa denen *Aloe vera* ya da *A. arborescens* (Liliaceae)’in aköz ekstresinde potansiyel antineoplastik aktivite görülmüş ve bu aktiviteler, tubuline etki eden maytansinoidlere veya immünomodülasyon yapan maddelerin varlığı ile nitelendirilmiştir (Şekil 2.9) (Mans et al., 2000).

Maytansin, mitoz inhibisyonu ile etkindir. Klinik denemelerde, büyük bir hayal kırıklığı ve az yararlı etki göstermiştir. Sentetik veya semisentetik türevleri ümit taşımaktadır. Maytansin’in çalışma için seçilme sebebi, bitkilerde yüksek konsantrasyonda bulunmasıdır. Şimdilerde, mikroorganizmaları kullanarak maytansinoidleri üretme fırsatı doğmuştur. *Nocardia* türleri, maytansin temel alkolü maytansinol esterlerinin bir karışımı olan ansamitosin üretmektedir. Bu bileşik, daha sonradan tüm türevlerin sentezi için bir başlangıç materyali olarak kullanılabilme özelliğine sahiptir (Evans, 1999).



Şekil 2.9. Maytansin kimyasal yapısı(Evans, 1999).

Kombretastatinler: Stilben (hidrokarbon) türevleri olarak, tubulin polimerizasyonunun inhibisyonu ve vasküler kapanışın indüklenmesi ile

2.5.3.2. Mikroorganizma Kaynaklı Doğal Ürünler ve Etki Mekanizmaları

Bu grupta çeşitli mikroorganizmaların kültürlerinden elde edilen antibiyotik antineoplastik ilaçlar yer almaktadır. Bu ilaçları, doğal kaynaklı antitümör bileşiklerin içine dahil etmek de olasıdır. Radyomimetik etki göstermektedirler. Bleomisin döneme özgü iken, diğerleri döneme özgü değildirler (Kayaalp, 1987).

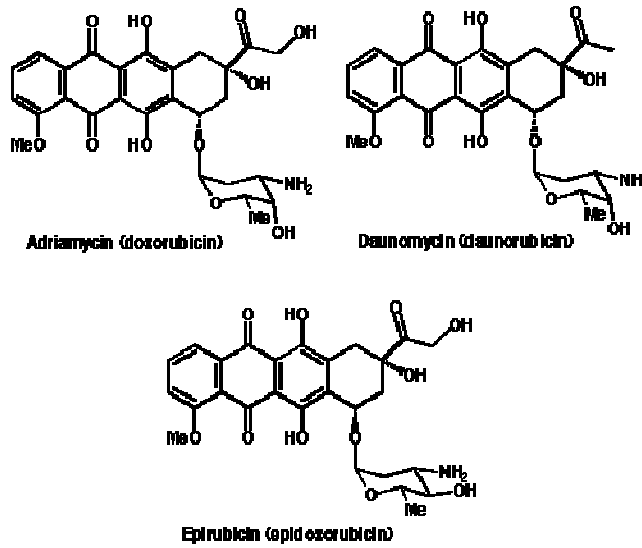
Daktinomisin ve antrasiklin: Ortak etki mekanizmasına sahiptirler. DNA çift zinciri içinde komşu guanozin-sitozin baz çiftleri arasında enine yerleşmek ve onların arasını açmak suretiyle interkalasyon yaparak DNA sentezini (replikasyonunu) ve mRNA sentezini (transkripsiyonunu) engellenmektedirler. Daunorubisin, DNA ve mRNA sentezini bozmakta ve topoizomerez II enzimine bağlanarak DNA yarılmaları (cleavage) yapmaktadır. Döneme özgü olmamasına rağmen en fazla S fazına etki yaptığı bulunmuştur. Tablo 2.3'te gösterilen antibiyotikler Doksorubisin / idarubisin / epirubisin / aklarubisin / mitoksantron, daunorubisin'e benzemektedirler (Kayaalp, 1987).

Tablo 2.3. Hücre siklusunu hedefleyen antibiyotikler (Kayaalp, 1987).

Antrasiklin türevleri	Diğer antibiyotikler
Doksorubisin	Daktinomisin
Epirubisin	Bleomisin
Aklarubisin	Mitramisin (plikamisin)
İdarubisin	Mitomisin
Mitoksantron	

Doxorubicin: DNA'ya kovalent olarak bağlanan ilaçlar, bazlara substituentlerini ekleyerek ya da DNA'nın farklı bölgeleri arasında çapraz

bağlantılar oluşturarak kullanılmaktadırlar. Doksorubisin’de ek bir etki gözlenmiştir. Çift zincirli DNA’yı kırarak lokal açılmadan kaynaklanan gerilmeyi azaltan Topozomeraz II enzimlerini inhibe etmektedir. Bu şekilde DNA iskeleti kırılmakta ve ‘‘ilaç-DNA-enzim kompleksi’’oluşarak hedef DNA ‘nın replikasyonu engellenmektedir (Şekil 2.11) (Temperini C et al., 2003).

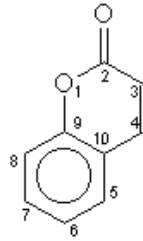


Şekil 2.11. Klinik olarak kullanılan antrasiklin antitümör ilaçlar (<http://spot.colorado.edu/>).

Bleomisin: *Streptomyces verticillus*’dan elde edilen glikopeptid yapılı bir antibiyotik olarak bildirilmiştir. Hücrelerde serbest radikaller oluşturarak, DNA zincirlerinde kırılmalara neden olmaktadır. Döneme özgü olmakla birlikte en fazla G2 fazına etkili bulunmuştur (Kayaalp, 1987).

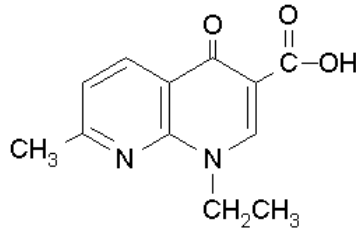
Mitramisin (plikamisin): İnterkalasyon yapmamakta, esas olarak DNA’ya bağımlı RNA sentezini inhibe etmektedir. Döneme özgü olmamakla birlikte etkinliği S döneminde daha fazla bulunmuştur.

Kumarin ilaçlar (novobiosin, kumermisin A): *Streptomyces rishiriensis* türünden aktinomisetler tarafından üretilen kumermisin A ve diğer bir antibiyotik novobiosin, Giraz tarafından yapılan ATP hidrolizinin inhibe edilmesiyle ve böylece DNA süper dönüm oluşumunun engellenmesiyle etki etmektedirler. Şekil 2.12’de kimyasal yapısı gösterilen kumarinler, ATP ile yapısal olarak benzer olmadığı halde giraz ve kumarinler arasındaki komplekslerin kristal yapı verileri, ilaçların enzim üzerinde ATP bağlanan bölgeyi içeren bir bölgeye bağlandığını göstermiş ve ‘‘kompetitif inhibitörler’’ olarak değerlendirilmiştir (Lewis ve ark., 1996; Tsai ve ark., 1997; <http://www.oup.com/uk/booksites/chapter5.pdf>).



Şekil 2.12. Kumarin kimyasal yapısı (<http://lists.man.lodz.pl/>).

Kinolonlar (nalidiksik asid, siprofloksasin): Kırılma noktasında DNA 5’ fosfata kovalent bağlanan enzim alt ünitelerini engelleyerek, giraz reaksiyonunun DNA kırılma ve yeniden birleşme basamağını engelleyerek DNA Giraz enzimi inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (Heddle ve ark., 2000). Şekil 2.13’de nalidiksik asid gösterilmiştir.

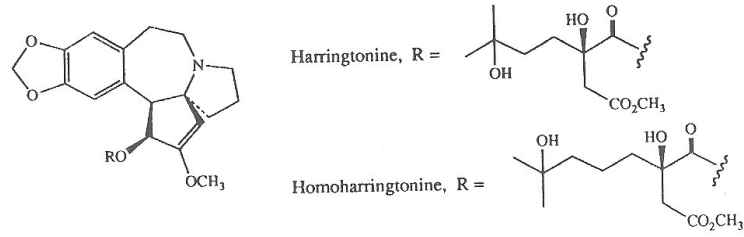


Şekil 2.13. Nalidiksik asid kimyasal yapısı (<http://www.mun.ca/>).

L-asparajinaz: *E. coli* ve *Erwinia carotovora* kültürlerinden hazırlanan bir enzimdir. Asparajin'in, aspartik asid ve amonyak'a yıkılımını katalizler. Böylece vücutta asparajin stoğunu azaltır. Halbuki bazı tür lösemilerde, malign hücrelerin canlılığını korumaları için kandan asparajin almak mecburiyetindedirler. L-asparajinaz'ın asparajin stoğunu azaltması sonucu, tümör hücresinde protein sentezi ve sonuçta DNA ve RNA sentezi yapılamaz. Döneme özgü ilaçtır ve etkinliğini G1 döneminde gösterir (Kayaalp, 1987).

2.5.4. DNA polimeraz α Enzimini Hedefleyen Doğal Ürünler:

Homoharringtonin: Çin ağacı *Cephalotaxus harringtonia* (Cephalotaxaceae)'dan izole edilen bir alkaloid olarak gösterilmekte ve DNA polimeraz α inhibisyonu yaparak tümör inhibisyonunda rol oynamaktadır (Şekil 2.14) (Mans et al., 2000).



Şekil 2.14. Homoharringtonin ve harringtonin kimyasal yapısı (Evans, 1999).

2.5.5. DNA Topoizomeraz Enzimlerini Hedefleyen Doğal Ürünler

DNA topoizomerazlar bu tezin konusunu oluşturan ana başlıklardan biri olduğu için aşağıda çok daha detaylı işlenmiştir.

DNA topoizomeraz enzimleri, kanser kemoterapisinde potansiyel hedefler olarak görülmektedir (Fujii et al., 1992). Bu enzimler, DNA'daki süper dönümlerin tipini ve derecesini değiştirerek DNA'nın üçüncül yapısında değişiklikler meydana getirmektedir (Temizkan, 1999).

2.5.5.1. DNA Molekülünün Üçüncül Yapısı ve Bu Yapıdaki Değişmeler

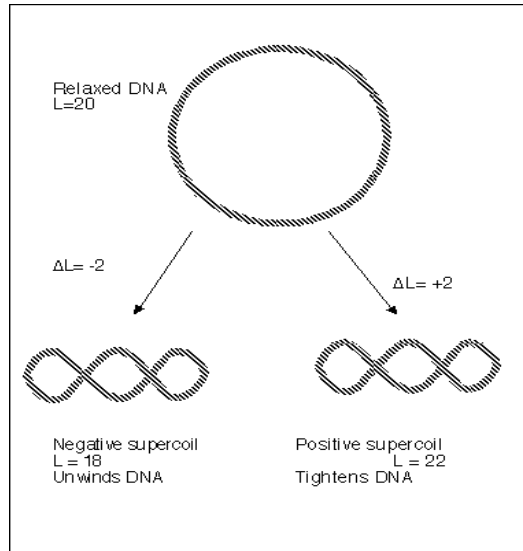
Hücrede bulunan DNA çift sarmalı genellikle kapalı, serbest uçları bulunmayan yapı şeklindedir. Bakteri ve ökaryotlardaki DNA molekülleri büyük ilmekler oluşturarak yer almışlardır (halkasal yapılar). Kapalı halkasal DNA'lardaki üçüncül yapı tipi 'süper dönümlerle oluşan kıvrımlar'dır. Bu kıvrımlar, çift sarmal yapıdaki DNA molekülünün uzayda kendi eksenini etrafında bükülmesiyle meydana gelmektedir. Her bükülüşte bir süper dönüm kıvrımı oluşur. Çift sarmalın kendisi de bükülmüş bir yapı

olduğundan meydana gelen süper dönümlerin yönüne bağlı olarak çift sarmaldaki değişiklikler:

Çift sarmalın zıt yönünde bir kıvrılma, ‘Negatif Süper Dönüm’; çift sarmaldaki iki zincirin birbiri etrafındaki dönüşünü gevşetir, böylece zincirlerin çözülmesine yardım eder. Doğadaki hemen tüm kapalı halkasal DNA molekülleri negatif süper dönümlere sahiptir. Pozitif süper dönümlere sahip değildir.

Çift sarmalın bükülme yönüyle aynı olan kıvrımlar, ‘Pozitif Süper Dönüm’; çift sarmalın daha sıkı sarılmasına sağlar (Temizkan, 1999).

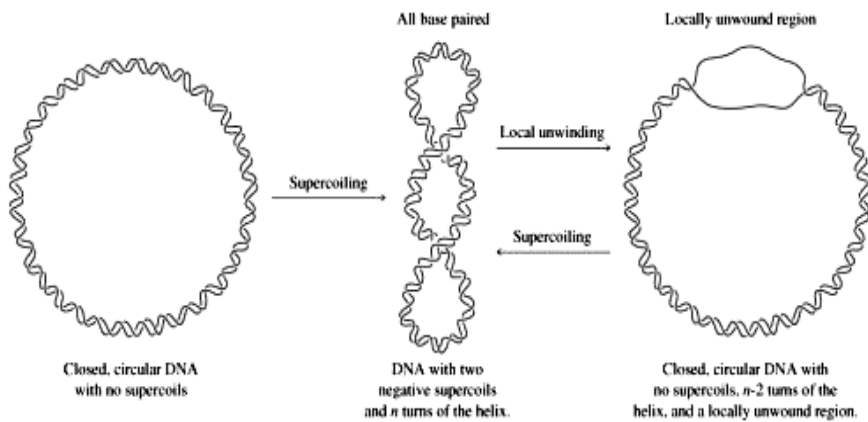
Şekil.2.15’de pozitif ve negatif süper dönüm oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Negatif ve pozitif süper dönüm oluşumu (<http://www.biochem.uwo.ca>).

DNA molekülünün, bir ya da iki zincirinde kırılmalar yaparak, bağlanma sayısını değiştiren (azaltan veya arttıran) DNA topoizomerazlar, bir topolojik izomeri diğerine dönüştürürler. Tamamen aynı diziye sahip kapalı DNA molekülleri farklı bağlanma sayısına sahip olabilirler. Şekil 2.16'da gösterildiği üzere, bağlanma sayıları dışında, diğer özellikleri aynı olan DNA moleküllerine 'topolojik izomerler' denir. Kapalı bir DNA molekülünde çift sarmalın iki zincirinin birbirine sarılma (birbirini çapraz olarak geçme) sayısı olan 'bağlanma sayısı', ancak bir enzim etkisi altında ve DNA'nın bir veya iki zincirindeki kovalent bağların kırılmasıyla değişebilir. Ayrıca, negatif süper dönüm oluşumu enerji gerektirdiğinden, süper dönümlü molekül enerjiye sahiptir. Buna bağlı olarak, DNA'nın üçüncül yapısındaki değişimler, gevşek moleküle göre daha az enerji girdisi gerektirir.

Bağlanma sayısındaki bir azalma, negatif süper dönüm oluşumunun karşılığıdır; bağlanma sayısındaki artış ise negatif süper dönümlerdeki azalmayı gösterir.

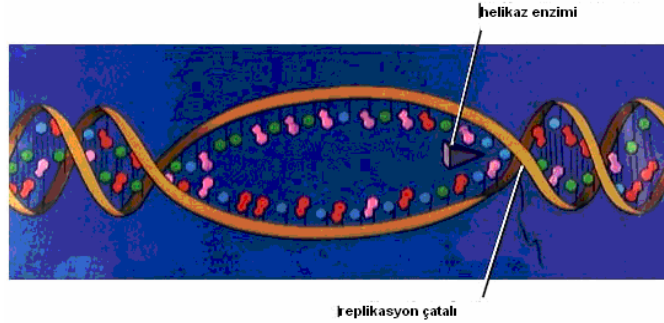


Şekil 2.16. Kapalı halkasal DNA molekülünde topolojik izomerlerin birbirine dönüşümü ve molekülde çözülme (<http://chemistry.umeche.maine.edu>).

2.5.5.2. DNA Replikasyonu

Genetik materyal olan nükleik asit moleküllerinin kendine benzer moleküller meydana getirerek çoğalmaları olayına replikasyon (kendini eşleme, sayısını katlama) adı verilir. Bu olay sonucu, hücredeki genetik materyel miktarı iki katına çıkar. Hücre bölünmesi sırasında sağlanan eşit biçimdeki paylaşım sonucunda da yavru hücreler birbirleriyle ve ana hücreyle aynı miktarda genetik materyele sahip olurlar. Replikasyonun kromozom düzeyindeki sonucu da, bir kromozomdan onun kopyası olan iki yavru kromozomun meydana gelmesidir. Bu özellik, genetik materyelin bir bireyin bütün hücrelerinde aynı olmasını ve dölden döle azalmadan sabit şekilde geçmesini sağlar (**Temizkan, 1999**).

DNA çift sarmalının replikasyonu, çok sayıda enzim aktivitesini içeren karmaşık olaylar dizisini kapsar. Replikasyon sırasında, DNA'da replikasyon geçirmeyen bölge sarmal yapısını korur. DNA replikasyonun başlayabilmesi, çift sarmal DNA'nın çözülmesini gerektirir. İki yavru molekülün olduğu replikasyon bölgesinde açılma (çözülme) meydana gelir ve bu bölgeye **replikasyon çatalı** denir. Şekil 2.17'de gösterilen çözülme, **DNA helikazlar** tarafından sağlanır. Doğrusal DNA moleküllerinde, iki zincirin çözülmesi molekülün ekseninde dönmesiyle teşvik edilir ve kolaylaştırılır. Ancak kapalı halka biçimindeki DNA moleküllerinin çözülmesinde topolojik bir sorun ortaya çıkar. Çünkü çift sarmaldeki çözülme kapalı bir molekülde negatif dönümlerin azalmasına ve giderek pozitif süper dönümlerin oluşumuna yol açar. Bu durum çatalın ilerlemesinde engelleyici etki yapar (**Temizkan, 1999**).



Şekil 2.17. DNA helikazlar ile replikasyon çatalında çözülme (<http://www.hcc.cc.il.us>).

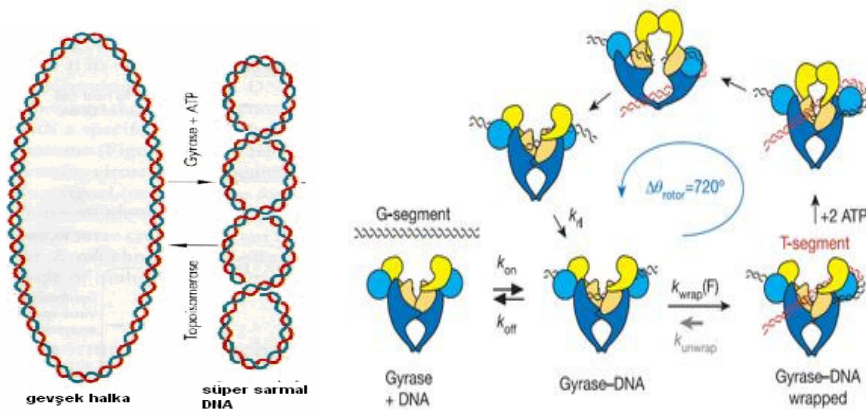
DNA giraz: Bakterilerde (*E. Coli*, vs.) bulunan ve bu sınıfta yer alan topoizomerez II enzimi, DNA giraz, istirahat halinde bulunan DNA molekülünü negatif süper sarmal haline getirir. Diğer bir ifade ile, DNA giraz enzimi, süper sarmal haline gelmeyi katalize eden bir fonksiyona sahip bulunmaktadır. Pozitif süper dönümleri yok ederek replikasyonun devamını sağlar. DNA giraz, DNA omurgasındaki fosfodiester bağlarını önce kesip sonra kapatarak pozitif süper dönümleri yok eder ve reaksiyon sırasında ATP'ye gereksinim duymaz. DNA giraz, bağlandığı DNA bölgesinde öncelikle pozitif süper dönüm yaratarak negatif süper dönüm oluşumunu teşvik eder. Daha sonra, pozitif dönümün kıvrılma noktasında iki zincirde kırılma yapar; bir başka sarmal yapıdaki bölgeyi bunun arasından geçirir. DNA giraz, bir II. Tip topoizomerez'dir. Giraz, DNA'yı süper dönümlü biçime dönüştürmek için gerekli enerjiyi ATP'nin hidrolizinden elde eder (kapalı halka biçimindeki DNA'da negatif süper dönümler meydana getirir; bu dönümler ana molekülün replikasyon çatalındaki çözülmesini teşvik eder). ATP yokluğunda ise sadece negatif süper dönümleri açabilir (Şekil 2.18) (Temizkan, 1999; Arda 1995).

DNA'da oluşan çentikler, çok kısa bir süre içinde hemen kapatılarak zararlı etki yapması önlenir. Bir molekül DNA giraz, 30 °C'de her dakikada yaklaşık 100 süper sarmal oluşturabilmektedir. Enzim, 400 000 molekül ağırlığında ve tetramerik bir yapıdadır (A₂B₂). Hücrelerde A alt ünitesinin B'den 10 defa daha fazla olduğu açıklanmıştır.

DNA giraz enziminin bakterilerde replikasyon çatalının ilerlemesinde çok önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Bu enzimin inhibisyonu, DNA'nın replikasyonunu durdurur ve bakteride ölümlere yol açar. Bu enzimin aynı zamanda transkripsiyon ve rekombinasyonda da işlevleri bulunmaktadır.

Bazı antibiyotikler DNA giraz'ı inhibe etmektedirler. Giraz A, nalidiksik asid ve oksinilik asid, B'de kumermisin ve novobiosin tarafından inhibe edilir.

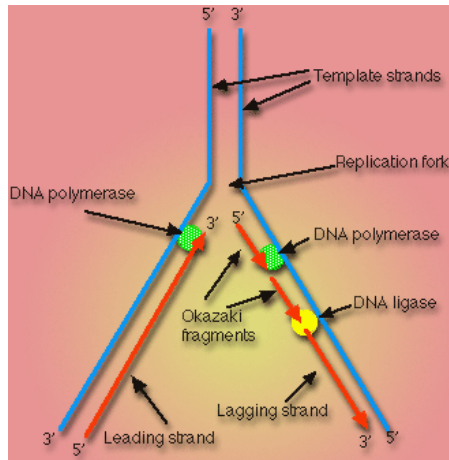
Plazmidlerde (CoIEI, pBR322), fajlarda (OX174) ve viruslarda (SV40, polyoma) süper sarmal oluşumuna rastlanmıştır (Arda, 1995).



Şekil 2.18. DNA giraz ATP reaksiyonu (<http://217.60.75.10>).

DNA polimeraz: Çözülme meydana geldikten sonra **DNA polimeraz** enzimi nükleik asit molekülünü 3' OH ucundan uzatacak bir primer (özel bir RNA polimeraz olan "**primaz**") tarafından sentez edilen) kullanarak DNA replikasyonuna devam eder. Replikasyon çatalının ana DNA molekülü boyunca ilerlemesi, molekülün iç tarafında bulunan bazların kalıp olarak kullanılabilmesini sağlamaktadır. Primer RNA zinciri, deoksiribonükleotitlerin birbirine eklenmeye başlanmasından sonra DNA polimeraz I'in 5'-3' eksonükleaz aktivitesi ile yok edilir. RNA'nın yok edilmesiyle DNA parçaları arasında kalan boşluklar DNA pol I enziminin zincir uzatma yeteneği ile doldurulur (**Temizkan, 1999**).

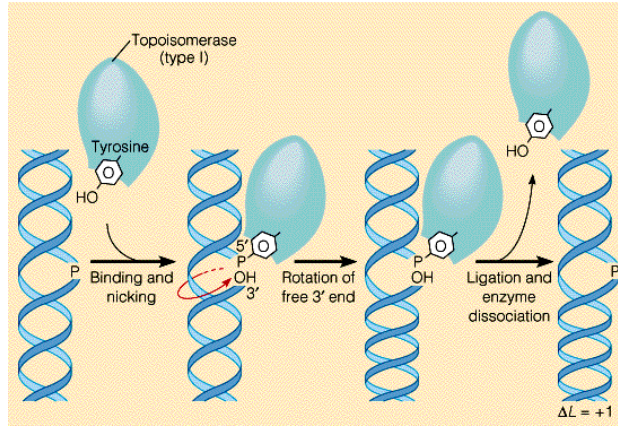
DNA ligaz: Sentez edilen DNA zinciri parçaları serbest 3'OH ve 5' PO₄ uçları arasında **DNA ligaz** enzimi tarafından şekil 2.19'da gösterildiği üzere fosfodiester bağı oluşturularak birleştirilir (**Temizkan, 1999**).



Şekil 2.19. DNA ligaz, ligasyon reaksiyonu (<http://www.bio.davidson.edu>).

DNA topoizomerazlar: Kullanılan mekanizmanın tipine göre iki sınıfa ayrılırlar:

I. tip topoizomerazlar: Yaklaşık 100 000 molekül ağırlığında olan ve monomerik bir yapıya sahip olan bu enzim, negatif süper sarmal DNA molekülünün ‘tek bir iplikçiğinde’ ve geçici bir süre için kopmalar ve tekrar birleşmeler yapar. Enzim, süper sarmal DNA’yı açarak istirahat formuna dönüştürür. Enzim, DNA iplikçiklerinden birine bağlanarak kopma (veya açılma) yapar ve ikinci sağlam DNA iplikçiğinin bu açıklıktan geçmesini sağlar. Sonra, ayrılan ‘iki uç’, enzimle hemen kapatılır. Bu açılma ve kapanma, DNA molekülünde herhangi bir zarar meydana getirmez. Topo I enzimi, pozitif süper sarmal DNA’da aynı tarzda etkili değildir. DNA topoizomeraz I, çift zincirli DNA’nın zincirlerinin gevşediği bölgeye bağlanır ve zincirlerden birinde kırılma meydana getirir. Kırığın 5’ PO₄ ucu enzimdeki bir tirozin hidroksil grubuna kovalent şekilde bağlanır (**DNA kırığının stabilizasyonu**). Enzim, kırık olmayan zinciri kırığın arasından geçirir; son olarak kırığı yeniden kapatır ve DNA’dan ayrılır. Reaksiyon mekanizması, şekil.2.20’de gösterilmiştir. Topo I, bağlanma sayısını birlik basamaklar halinde değiştirir. Enzimin, DNA’nın üçüncül yapısındaki kıvrımları açma hızı moleküldeki bağlanma sayısı azaldıkça yavaşlar. Tip I topoizomeraz, herhangi bir enerjiye (örneğin ATP) gereksinim duymadan işlevini yapar. DNA’daki fosfodiester bağımlı kendine transfer ederek bu bağdaki enerjiyi korur ve böylece reaksiyonu yürütür. Kataliz ettiği her reaksiyon çevrimi sonunda DNA’daki bir süper dönüşümü yok ederler (**Temizkan, 1999; Arda, 1995**).



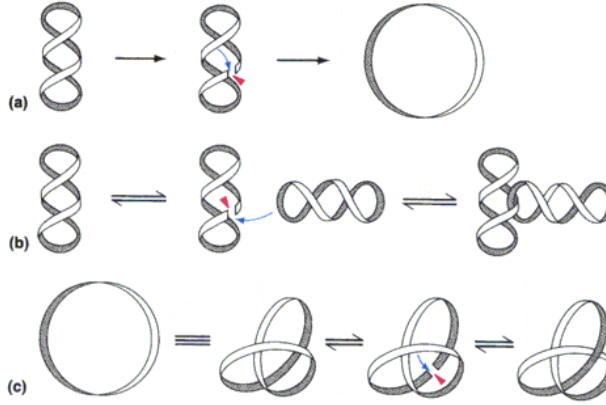
Şekil 2.20. DNA topoizomeraz I reaksiyon mekanizması (<http://oxy.edu>).

Enzim, süper dönümlü DNA'yı gevşetmenin dışında, tek zincirli bir DNA parçasını diğerinin arasından geçirerek tamamlayıcı özellikte iki tek zincirli halkanın çift zincirli bir halka biçimine dönüşümünü sağlar (çift zincirli DNA halkalarının düğümlenmesi-açılması/knotting-unknotting). Ayrıca, çift zincirli bir halkasal moleküle etki ederek bunları zincir halkaları gibi birbirine kenetleyebilir (çift zincirli DNA halkalarının katenasyon-dekatenasyonu); bu reaksiyon için moleküllerden birinin bir zincirinde kırık bulunmalıdır (Temizkan, 1999; Andersen, A.H., et al., 1996).

Ökaryotlardaki I. Tip topoizomerazlar, prokaryotlardakinden farklı olarak hem pozitif hem de negatif süper dönümleri açabilme yeteneğindedirler (Temizkan, 1999).

II. tip topoizomerazlar: DNA çift sarmalının iki zincirinde kırık oluşturur, başka bir çift sarmallı bölgeyi bu kırık uçlar arasından geçirir, kırıkları kapatır ve DNA'dan ayrılır (ATP'den enerji sağlayarak, süper sarmal DNA'nın 'her iki iplikçiğinde' kısa bir süre için kopmalar (açılmalar, çentikler) yaparak, molekülü istirahat haline getirir. Mekanizma,

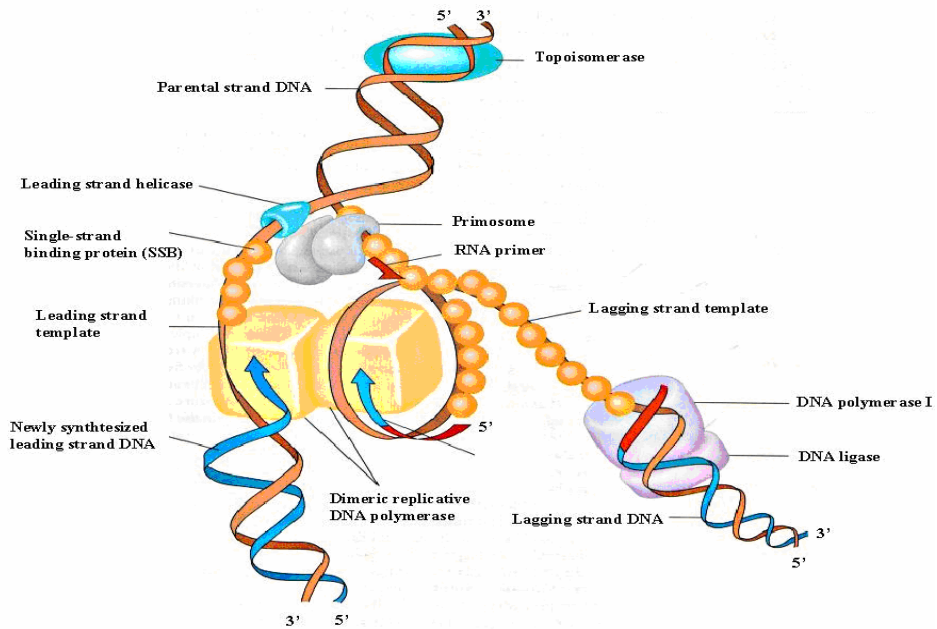
şekil.2.21’de gösterilmiştir. Reaksiyon oluşumu ATP’ye bağlıdır. Her reaksiyon çevriminde bağlanma sayısında ikilik değişme olur ve böylece negatif veya pozitif süper dönüm sayısında iki değerinde azalma meydana gelir (**Temizkan, 1999; Arda 1995**).



Şekil 2.21. Tip II topoizomerazlar (ör: DNA Giraz) etki mekanizması (<http://oxy.edu>).

DNA replikasyonu sonunda meydana gelen yavru moleküllerin ayrılması kendiliğinden olmaz. Çünkü ana DNA molekülleri birbirlerine yaklaşık 20–30 kadar dönümle bağlı kalırlar. Bu iç içe girmiş halkaların birbirinden ayrılmasında topoizomeraz II enzimi, şekil.2.21.c’de gösterilen zincir halkaları gibi birbirine kenetlenmiş çift zincirli halkaların (**knotting**) ve şekil.2.21.b’de gösterilen düğümlenmiş moleküllerin oluşumunda (veya bozulmasında) (**katenasyon/dekatenasyon**) iş görmektedir (**Temizkan, 1999**).

İlk keşfedilen DNA topoizomeraz, James Wang tarafından 1971 yılında bulunan *E. coli* kaynaklı w proteindir (Şekil 2.22) (**Wang., 1971**).



Şekil 2.22. *E. coli* Replikasyon çatallı (<http://amiga1.med.miami.edu/Medical>).

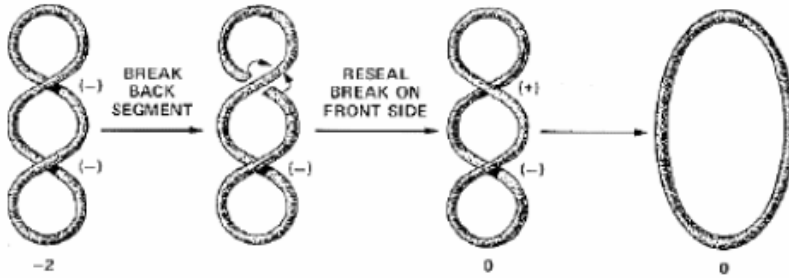
Birkaç yıl sonra DNA giraz enzimi, Martin Gellert tarafından keşfedilmiştir (Gellert et al., 1976).

Replikasyondan farklı olarak, transkripsiyonda herhangi topolojik problem olmadan ilerleme gözlenmiştir. Ancak bakterilerde transkripsiyon süper dönüm DNA oluşumuna yol açmaktadır (DNA farklı noktalara kilitlendiğinde ya da sirküler plazmid üzerindeki iki gen zıt yönlerle transkribe olduğu zaman). Transkripsiyon kompleksinin önünde pozitif süpercoil oluşurken, arkasında negatif süpercoil oluşmuştur. Denemelere göre, DNA giraz pozitif süper dönümleri gevşetmiş ve topoizomeraz I, negatif süper dönümleri gevşetmiştir (Liu and Wang, 1987).

Topoizomeraz genlerinin, kendi içlerinde süper dönüm oluşumundan etkilendikleri bildirilmiştir. Negatif süper dönüm oluşumunun

azalması, giraz genlerinin ekspresyonunu arttırmış ve topA ekspresyonunu (Topoizomerez I kodlayan gen) azaltmıştır. Bu durum bakteri hücresinde, DNA süper dönüm oluşumunun kontrolünde **homeostatik mekanizma** olduğunu göstermiştir (Lilley et al., 1996).

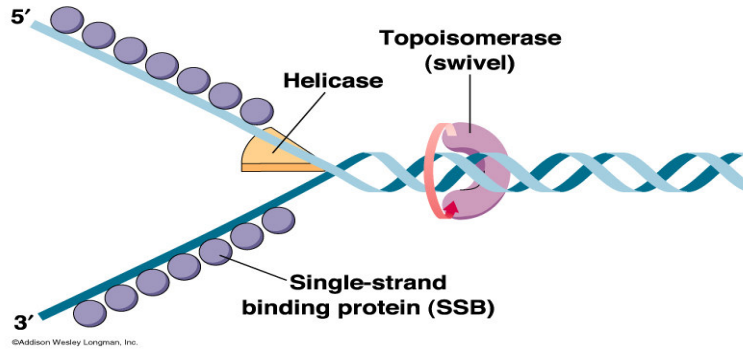
DNA topoizomerez enzim yapısının genel özelliği olan kaviterler, kırılan zincirin enzimden geçişi mekanizmasına güçlü destek sağlamaktadır. Örneğin, *E. coli* DNA topoizomerez I'in 67 kDa N-terminal fragmenti, çift zincirli DNA'nın bir segmentini barındırabilecek büyüklükte bir santral kaviteye sahiptir ve bu kavitenin açılımlında iki bölge arasında aktif kısım tirozin arabirimdir. DNA (tek veya çift zincirli) tek zincirli segmentin kırılmasından çıkan kırığı boyunca ilerleyerek enzimin iç kısmına girer (Lima et al., 1994).



Şekil 2.23. ‘Double Strand Passage’ ya da ‘çift zincir geçişi’ mekanizması ile süper sarmal DNA gevşemesi (<http://cmgm.stanford.edu>).

Redinbo ve arkadaşlarının, tip IB enzimlerin şekil 2.24 ‘de gösterilen ‘dönen mekanizma’ ile opere olduğunu belirten çalışmalarında, insan topoizomerez I enziminin 70 kDa’luk yapısının, “zincir geçişi” basamağına uygun bir kavite içermediği, onun yerine, kırılma ile 3’ fosfatın proteine kovalent bağlanmasını takiben, 5’ hidroksil ucunun DNA çift sarmalı

etrafında dönmeye uygun duruma geldiği gösterilmiştir (swivel) (Redinbo et al., 1998; Stewart et al., 1998).



Şekil 2.24. Tip IB enzim dönen mekanizması (<http://www.mun.ca>)

Bu model tip IB enzimler için bir “kontrollü rotasyon” mekanizmasını açığa çıkarmış ve mekanizmanın deneysel kanıtları aynı zamanda *Vaccinia* virüs topoizomeraz I üzerinde de gösterilmiştir (Stivers et al., 1997).

IA enzimi Revers Giraz: Tip I enzimlerinden farklı olarak, helikaz yapılarına benzeyen bir N terminal bölgesi ve *E. coli* topoizomeraz I’e denk olan bir C terminal bölgesine sahip olduğu bildirilmiştir. *E. coli* topoizomeraz I’e benzer şekilde bir zincir geçişi mekanizması ile opere olduğu ve farklı olarak pozitif süper dönüm oluşturduğu gözlemlenmiştir (Rodriguez and Stock, 2002).

Maya topoizomeraz II: Enzime bağlı olan DNA’nın 2 segmenti, bir G (GATE) segmenti (kırılan), bir T (TRANSPORT) segmenti (G segmentindeki kırık boyunca ilerleyen) içerir (Roca and Wang, 1992).

Bu yapı, çift zincirli DNA'yı barındırabilecek nitelikte büyük bir kaviteye sahiptir. Topoizomeraz II'nin bu **'iki kapılı model'**i; enzim tarafından T segmentinin yakalanması ve 2 protein kapısından geçmesi; biri kırılan G segmenti ile bağlantılı, diğeri T segmentinin proteinden çıkışının kontrolüdür. ATP operatörlü bir kıskaç, enzim dimerinin N terminal bölgesini içerir, T segmentinin başlangıç yakalanmasını etkiler. Şöyle ki bu bölge, ATP varlığında T segmentini yakalayarak dimerize olur, böylece kırılmış G segmenti boyunca ilerleyebilir (<http://www.oup.com>).

Topçu ve Castora tarafından 1995 yılında yapılan bir çalışmaya göre, DNA replikasyonu, transkripsiyon, rekombinasyon ve transpozisyonda temel rolleri olan topoizomerazlar, enzim köprülü zincir kırıklarında diğeri DNA zinciri için geçici geçiş kapısı olan kırıkları oluşturarak, DNA süper dönümlerini açar veya uzaklaştırır, DNA düğümlerini bağlar veya bağlamaz ve sirküler DNA moleküllerinin katenasyon veya dekatasyonunu yapar. 100 kDa'luk bir protein olan ökaryotik nükleer topoizomeraz I, enzimin fosfotirozin bağı ile DNA 3' ucuna kovalent bağlanarak tek ve çift zincirli DNA'nın kırılması ile pozitif ve negatif süper döngüleri gevşetir. 78 kDa'luk protein olan mitokondriyel topo I, moleküler ağırlık, pH profili, termal stabilite, kromatografik özellikler ve dimetilsülfoksit, etidyumbromid ve tripanosidal ajan berenil'e karşı sensitivite açısından nükleer akranından farklıdır. Nükleer enzimden farklı olarak, mt-topo I proteinaz sindirim modeli gösterir. Topoizomerazın tanıdığı ve etkileşime geçtiği spesifik mtDNA sekansları, standart topoizomeraz gevşeme analizi ve jel elektroforezi sonuçlarına göre; süper dönümlerin açılma hızı, substrattaki süper dönüm başlangıç sayısına bağlıdır. Aynı zamanda mitokondriyel enzim, major transkripsiyon terminasyon bölgesi ile replikasyon ağır zincir orijinini içeren mtDNA bölgelerindeki süper

dönümleri gevşetir. Dansitometrik analize göre, süper dönüm DNA'nın kaybolma hızı yani plazmidler arasındaki gevşeme hızlarında önemli bir fark görülmemiştir. Aynı mtDNA bölgeleri ile etkileşime geçme, nc-topo I tarafından değil de mt-topo I tarafından tercih edildiği gösterilmiştir. Süper dönüm DNA molekülleri uzaklaştırıldıktan sonra açık DNA molekülleri akümüle olur ve topoizomeraza bağlanmak için yarışmaya başlarlar. Topoizomerazların spesifik DNA sekansları ile etkileşimi, yine bu enzimler tarafından katalizlenen kırılma reaksiyonu analizlerinden ortaya çıkan sonuçlara dayanarak varılan fikir birliğine göre, sekansların yüksek seviyede yozlaşmış olduğu ve enzimin de bu düşünülen sekanslarla rastgele ve karmaşık olarak etkileştiği bildirilmiştir. Bir substrat DNA molekülü boyunca açıkça ayrı kırılma bölgeleri olmasına rağmen, *Tetrahymena* ribozomal RNA genlerinin yanındaki bölgenin "spesifik sekans"ı gösterdiğine dair güçlü bir önyargı oluşmuştur. Bu sekans etkileşimi, nukleolustaki (çekirdekçik) rRNA genlerinin transkripsiyonunda yer alan topoizomeraz enzimi ile ilişkilendirilmiştir. Çapraz formları oluşturabilecek intramoleküler baz çiftlenmesi için potansiyele sahip olan tek veya çift zincirli DNA bölgeleri nüklear tip I ve tip II topoizomerazlar için favori tanıma bölgeleri olarak önerilmiştir (Topçu and Castora, 1995).

2.6. Topoizomeraz I Enzimi İnhibisyonu Yolu ile Tümör Oluşumunun Baskılanması

Son 20 yıldan bu yana, topoizomeraz I- DNA kırılabilir (ayrılabilir) kovalent komplekslerini hedefleyen çeşitli topoizomeraz I inhibitörleri keşfedilmiştir (Meng et al., 2003).

Çift sarmal DNA'nın ya 1 ya da 2 zincirinin **fosfodiester** bağının kırılmasını içeren bir mekanizma ile süper dönüm DNA'nın gevşemesini kolaylaştıran topo I ve II enzimlerinin inhibisyonu, inhibitörün aktif bölgeye bağlanması veya enzim-substrat bağlanmasının değişmesi gibi enzim aktivitesini yavaşlatan konvansiyonel bir inhibisyon olarak yer almaktadır. Bu tip inhibisyon, katalitik (gevşeme) aktivitenin inhibisyonu olarak bildirilmiştir. Diğer tip topoizomeraaz inhibisyonu, enzimatik gevşemenin inhibe edilmesinden sonraki basamaklarda meydana gelmiştir. Süper dönümün gevşemesi özetle şu basamakları içerir:

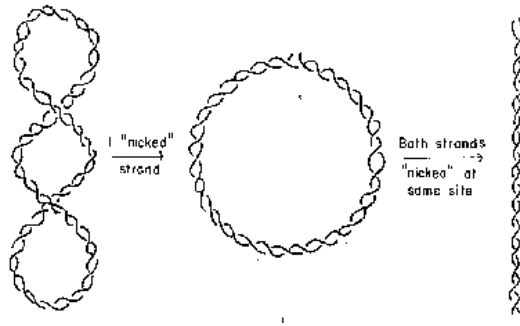
1-Enzimin, DNA reaksiyon bölgesine bağlanması.

2-Zincir kesilmesi, ardından enzimatik tirozin kalıntısının kırılan zincirin 3' ucuna kovalent olarak bağlanmasını içeren transesterifikasyon.

3-DNA zincirinin gevşemesi (unwinding=açılması), ardından kırılan zincirin religasyonu ve enzimin bir diğer gevşeme veya DNA'dan ayrılma siklusu için serbestlenmesi.

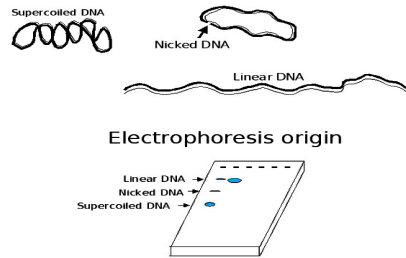
Kırılan zincir, geri dönüşümlü olarak eski haline dönebilmekte ve enzimden ayrılmayı ve religasyonu engelleyen inhibitör bileşikler tarafından stabilize edilebilmektedir. Bu tip inhibisyon, "kırılabilir kompleks stabilizasyonu" veya "zehirlenme" adı altında hücreden bağımsız bir sistemde DNA zincir çentiği-**nicking** (topo I) veya kırılması (topo II) olarak ya da hücre içinde çeşitli tiplerde kromozomal zararlar şeklinde ortaya çıkmaktadır (**Webb and Ebeler, 2004**).

Şekil 2.25’de süper sarmal DNA formunun enzim çentiği sonucu sirküler dubleks DNA haline gelmesi ve gevşeyerek linear dubleks DNA formunun oluşması gösterilmiştir.



Şekil 2.25. Süper sarmal DNA’da nicked form ve linear form (<http://www.science-projects.com>).

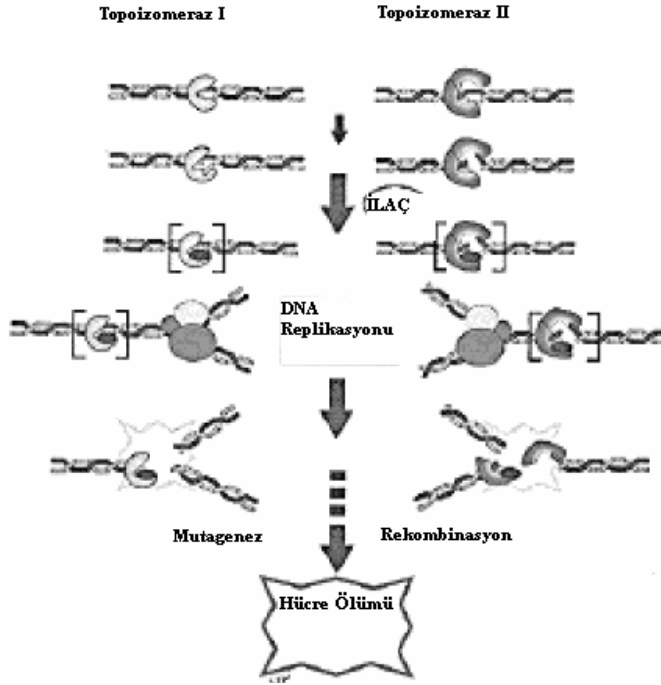
Bu bilgiye dayalı olarak DNA formlarının elektroforez jeli üzerinde kapladıkları yüzey-hacim oranına bağlı olarak hareketi ve ayrılmanması şekil 2.26 ‘da gösterilmiştir.



Şekil 2.26. Elektroforez sisteminde DNA formlarının ayrılması (<http://www.upct.es>).

Topoizomeraz zehirleri, non-tümör hücrelerde homolog ve non-homolog rekombinasyon olaylarının sıklığını arttırarak genomik stabilite üzerinde uzun dönem zararlı etkilere sahip olmuş, yaşlanma ve karsinogenez gibi hücresel proseslerde rol oynayan kromozomal değişiklikler ile

sonuçlanmıştır (Webb and Ebeler, 2004). Şekil 2.27’de tümör inhibisyonunda topoizomeraz zehirleri olarak bulunan çoğu ilaç ve antibiyotiğin, DNA replikasyonu süresince, enzim inhibisyonu ile kırık zincirlerin yeniden birleşmesini engelleyerek etki ettiği gösterilmiştir.



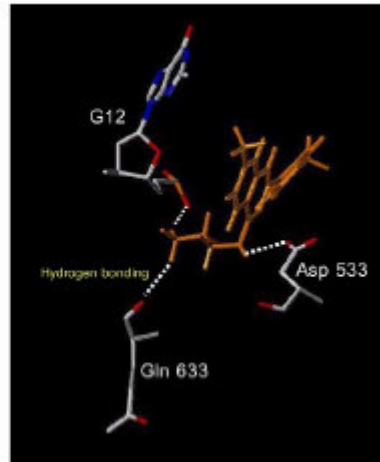
Şekil 2.27. Topoizomeraz zehirleri etki mekanizması (<http://cmgm.stanford.edu>).

2.7. Kamptotesin Kullanılarak Yapılan Topoizomeraz I İnhibisyonu Çalışmaları

Çin ağacı *Camptotheca acuminata* kök dokularından ekstrakte edilen doğal bir alkaloid olan kamptotesin, tanımlanan ilk topoizomeraz I enzimi zehiridir. Antitümör bir ajan olarak klinik kullanımda olan kamptotesin ve türevleri geniş aktivite göstermiş ancak toksisite ve düşük çözünürlük

problem oluşturmıştır. Doğal 10-hidroksikamptotesin, kamptotesin'den daha aktiftir ve Çin'de boyun ve beyin kanserlerine karşı kullanılmaktadır. Sentetik analog 9-aminokamptotesin ile suda çözülebilir türevleri **topotekan** ve **irinotekan** klinik denemelerde iyi cevaplar vermiştir (Evans, 1999; Webb and Ebeler, 2003).

Cho ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre, kamptotesin ve türevleri, kırılabilir üçlü kompleksi stabilize ederek antitümör aktivite gösterirler. Klinik olarak kullanımda olan bu ilaçlardan topotekan'ın, çift zincirli DNA ile kovalent olarak birleşen topoizomera I enzimine bağlı formu Şekil 2.28'de gösterilmiştir. Protein-ligand oluşumu, üçlü topo I-DNA-topotekan kompleksinin X ışını yapısına dayandırılmıştır. Ligand, topotekan bağlanma bölgesinin aktif kısmına manuel olarak sokulmuştur. Bileşiğin etilendiamin grubunun, Asp 533 karboksil grubu ile, Guanin 12 fosfodiester grubu ile ve Gln 633'ün amid karbonil kısmı ile güçlü hidrojen bağları oluşturduğu düşünülmüştür.



Şekil 2.28. Topotekan bağlı Topo I-DNA kompleksi

Yüksek sitotoksisiteden dolayı klinik kullanım sınırlıdır. İki suda çözülebilir kamptotesin analogu topotekan ve CPT-11, daha güvenli ve daha iyi tolere edilebilir olarak bulunmuştur.

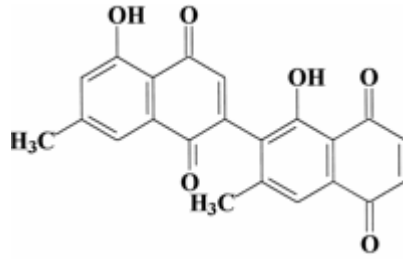
Kamptotesin, DNA topoizomeraz I inhibitörüdür ve DNA zinciri kırılmasını stimüle eder.

Diğer topoizomeraz I inhibitorleri olarak DNA minör oluk bağlanıcıları Hoechst 33258 ile DNA interkalatörleri olarak benzofenantridin alkaloidleri ve indolkarbazol türevleri belirtilmiştir. Topoizomeraz I-DNA kompleksi oluşumunu engelleyen veya ters çeviren bileşikler olarak beta-lapason, diospirin, topostatin, topostin ve flavonoidler gösterilmiştir (<http://www.pharmcast.com/index.htm>).

2.8. Antikanser İlaç Geliştirme Araştırmalarında Naftakinonlar ve Türevleri Kullanılarak Yapılan Topoizomeraz I İnhibisyonu Çalışmaları

Bitkisel dimerik bisnaftakinoid antitümör bileşik Diospirin üzerine yapılan bir çalışmada *Leishmania donovani* (parazit; tatarcıkların ısırması ile insan vücuduna geçen enfeksiyöz hastalık kalaazar'a sebebiyet verir) promastigotlarının büyümesinin inhibisyonu gösterilmiştir. Bu bileşik, parazitin DNA topoizomeraz I'in katalitik aktivitesini, enzim ile bağlanarak ve topoizomeraz I- DNA kırılabilir kompleksini stabilize ederek inhibe etmiştir.

Bu çalışmada, *L. donovani* tip I topoizomeraz'ın temel inhibitörü olarak bir dimerik naftakinon rapor edilmiştir. Şekil 2.29'de bisnaftakinon diospirin gösterilmiştir.



Şekil 2.29. Diospirin kimyasal yapısı (Ray et al., 1998).

Diospirin aracılı Topoizomeraz I Katalitik İnhibisyonu: Süper sarmal DNA'nın Mg bağımlı, ATP bağımsız reaksiyonunda, bileşik+DNA+Enzim:1µg/mL konsantrasyonda gevşeme inhibisyonu gerçekleşmiştir. Süper döngü gevşeme aktivitesinin tam inhibisyonu: 15 µg/mL diospirin konsantrasyonunda saptanmıştır. Enzim aktivitesinin inhibisyonu; DNA substratının eklenmesinden önce enzimin bileşik ile 5 dakika preinkübasyonu sonucunda daha dominant olmuştur. Doz arttıkça, inhibisyonun arttığı gözlenmiştir.

Agaroz jelin densitometrik analizi: Enzim+DNA+Diospirin eşzamanlı olarak standart analiz karışımına eklendiğinde 1 µg/mL konsantrasyonda %10 inhibisyon bulunmuştur.

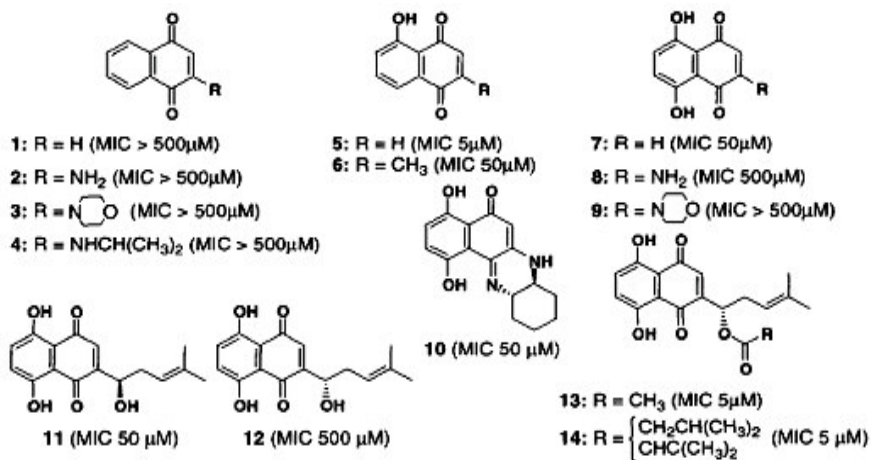
Süper sarmal DNA substratının eklenmesinden önce, enzim Diospirin ile preinkübe edildiğinde aynı konsantrasyonda %80 inhibisyon bulunmuştur. Diospirin tek başına DNA sarmalını açamamaktadır. Bunu test etmek için, süpercoil pGEM4Z, topoizomeraz I eklenmeden 200 µg/mL'ye kadar konsantrasyonda diospirin ile inkübe edilmiştir. Gevşeme olmamış, DNA'nın açılmasından dolayı herhangi DNA konformasyonel değişikliği görülmemiştir.

Diospirin, *L. donovani* topo I üzerinde daha etkili bulunmuştur, çünkü bileşik calf timus topo I'i inhibe etmek için daha yüksek konsantrasyon (50 µg/mL) gerektirir (*L. donovani* enzim inhibisyonu ile karşılaştırıldığında- 5 µg/mL). Ayrıca, *L. donovani* topo I'i inhibe eden konsantrasyondan 10 kat daha yüksek konsantrasyonda (50 µg/mL konsantrasyona kadar) alınan diospirin, *L. donovani* Topo II enziminde inhibisyon yapmamıştır. Topo II+Diospirin preinkübasyonu, enzim dekatasyon aktivitesini etkilememiştir.

DNA 3'OH ile Topo I aktif bölgesindeki tirozin grubu arasında kovalent bağ oluşumu kırılabilir kompleksi oluşturmuştur. Kamptotesin, enzimatik inhibisyon ile kırılabilir kompleksi stabilize ederek aktivite göstermektedir. Artan konsantrasyonlarda kamptotesin ile kapalı halkasal DNA, açık halkasal DNA'ya (nicked form) çevrilir. Aynı durum diospirin ile yapıldığında da gözlenmiştir. Ancak, nicked formundaki DNA'da artış bulunmuştur. Bu durumda diospirin, kırılabilir kompleksi doza bağımlı olarak stabilize etmiştir (**Ray et al., 1998; Fujii et al., 1992; Li et al., 1993**).

Naftakinonlar kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada, *Alkanna tinctoria*' dan elde edilen doğal ve sentetik (amino, alkilamino, hidroksi türevleri) naftakinon türevlerinden en az bir fenolik hidroksil grubu içerenlerin potansiyel topoizomera I inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Zn kompleksi oluşturma, enzimin çinko parmak izi bölgesi ile fenolik naftakinonların bağlandığını göstererek inhibisyon aktivitesinin artmasında önemli bulunmuştur.

Kinon türevleri, kinon-metid formasyonu nedeni ile hücrelere, redoks siklusu, arilasyon, interkalasyon, DNA zincir kırıkları oluşumu, serbest radikal ve alkilasyon oluşumu yoluyla toksik olabilmektedir. Kinon halkasının bu biyolojik aktivitesi artık özel proteinlerin inhibisyonuna da yönelmiştir. (Örneğin: bakteriyel topo II-DNA giraz (antibakteriyel), memeli topoizomerazları I-II (antitümör), HIV-1 integras ve proteinaz (antiviral)). Plumbagin-Şikonin-Naftazarin-βlapaşon, naftakinon analogları olarak gösterilmiştir. Aktivite, test edilen bileşiklerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleriyle ilişkili bulunmuştur.



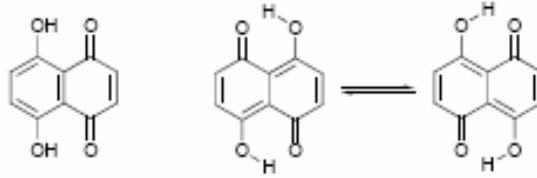
Şekil 2.30. Test edilen 14 bileşiğin kimyasal yapısı ve topoizomeraz I'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC).

Fenolik hidroksil türevli olmayan naftakinonların tamamı inaktif bulunmuşken, fenolik hidroksillerin ikisinin birden varlığı gereksiz olarak bildirilmiştir. Aromatik halka 2 pozisyonunda bir sübstitüentin varlığı, genellikle aktiviteyi etkileyici iken, amin gibi polar substitüentler aktiviteyi düşürücü bulunmuştur. Metil taşıyan bileşik 6 (plumbagin), yuglon'dan (5) daha az aktiftir. Alifatik iskeletin aktivitesi üzerinde bir α -hidroksil zincir

etkisi, stereokimyalarına bağlıdır. 13- 14 asetillenmiş analoglar en güçlü olanlardır (Şekil 2.30).

Test edilen bileşiklerin yapısal özellikleri ile biyolojik profillerinin ilişkilendirilmesinde, redoks ve kompleks oluşturma özellikleri ile interkalasyon özellikleri de göz önünde tutulmuştur.

Redoks özellikleri ile ilişki saptanamazken, şikonin ve naftazarin'in (Şekil 2.31) interkalasyon yapmadığı, plumbagin'in ise DNA'nın zayıf interkalatörü olduğu bulunmuştur. Çünkü tüm bu bileşikler, çarpıcı topo I inhibisyonu göstermiş ve aktiviteleri, açıkça, interkalasyon özellikleri ile ilişkilendirilememiştir.



Şekil 2.31. Naftazarin kimyasal yapısı (Papageorgiou et al., 1999).

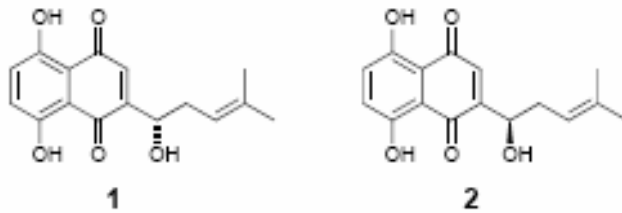
Yan yana dizilmiş fenolik hidroksil ve keto grupları ile hidroksinaftakinonların, divalent metal iyonları ile şelat oluşturup proteinin çinko parmak izi bölgesine bağlanarak topoizomeraazları inhibe etmesi sonucu, aktivitelerinin kompleks oluşturma özellikleri ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır.

Cu, Zn, ve Mg ile bileşiklerin kompleks oluşturma özelliklerinin (iyonik bağlanma) UV spektroskopik inceleme sonucunda, fenolik hidroksil türevli naftakinonların (1 ve 3) metal iyonlarıyla önemsiz etkileşim gösterdiği bulunmuştur (Topoizomeraaz İnhibisyon Analizi ile paralel

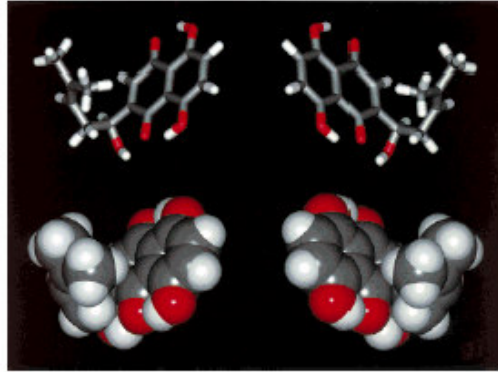
sonuçlar). Fenolik türevler 7 ve 8, Mg dışında çalışılan diğer iyonlarla şelat oluşturmuştur.

Bileşik 10, iyi bir Topo I inhibitörü olmasına rağmen, Zn ile güçlü bir etkileşim oluşturmamıştır. Bu da, onun enzim ile farklı bir etkileşimi olduğunu göstermektedir. Bileşik 9, Zn ile iyi etkileşse bile tamamen inaktif bulunmuştur.

Şekil.2.32 ve 2.33’de gösterilen şikonin 11 ve Alkanin 12, Zn ile benzer etkileşim göstermesine rağmen, inhibitör potansiyelleri önemli derecede farklıdır. Sonuç olarak metal şelatlaması önemli olmasına rağmen, olayda tek başına bir etkileşim değildir ve yan zincir stereoelektronik ihtiyaçları, etkili enzim inhibisyonunda önemli bulunmuştur (**Plyta et al., 1998**).



Şekil 2.32. Alkanin (1) ve Şikonin (2) kimyasal yapıları (Papageorgiou et al., 1999).



Şekil 2.33. Sol Alkanin (1) ve sağ Şikonin (2) bilgisayar bazlı moleküler modelleri. Renk kodları: gri, karbon; beyaz, hidrojen; kırmızı, oksijen (Papageorgiou et al., 1999).

Diğer bir çalışmaya göre, DNA topoizomeraz I, antikanser ilaçlar için bir hedef olma özelliğinin yanında, kırılma bölgesi seleksiyonunda (transkripsiyon sonrasında, transkripsiyon ürünlerinin işlenmesi sırasında anlamsız dizilerin kesilip atılması) yer alan proteinleri spesifik olarak fosforlayan intrinsik protein kinaz aktivitesine sahip bulunmuştur. Geliştirilen farklı diospirin türevlerinin (Hindistan'da yaygın, Ebenaceae ailesine ait tıbbi bir bitki olan *Diospyros montana* Roxb. köklerinden ekstrakte edilen doğal bisnaftakinoid bileşik), antitümör, antibakteriyel ve *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Tripanazoma. cruzi*, *P. Carini* ve *T. brucei brucei*'ye karşı antiparazitik etkileri keşfedilmiştir. Diospirin ve sentetik türevlerinin farklı insan tümör hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Bu ilaçların, kamptotesin bağımlı topoizomeraz I aracılı DNA kırılması ile karıştırılması, diospirin türevlerinin topoizomeraz I'de yapısal bir değişiklik meydana getirdiğini göstermiştir. Ayrıca, diospirin türevlerinin oluşturulmasıyla, insan genetik hastalıklarında bulunan hatalı kırılmaların (transkripsiyon sonrasında, transkripsiyon ürünlerinin işlenmesi sırasında anlamsız dizilerin kesilip atılması)

düzeltilmesi olanaklı hale gelmiştir. *Diospyros morrisiana*'dan ekstrakte edilen benzer bileşik izodiospirin, insan topoizomera I inhibisyonu yapmıştır. Bu çalışma ile Ray ve arkadaşlarının 1998'de diospirin ile yaptığı *L. donovani* selektif topoizomera I inhibisyonu şunu göstermiştir: Diospirin, topoizomera I ile doğrudan etkileşime geçerken DNA ile etkileşmemiştir (diğer inhibitörlerle de sık sık olduğu gibi). Izodiospirin, topoizomera I aracılı kamptotesinle indüklenmiş DNA kırılmasını antagonize etmiş ve güçlü bir şekilde enzim kinaz aktivitesi inhibisyonu yapmıştır. Diospirinlerden hiçbirinin, topoizomera I veya II ile DNA kırılmasını arttırdığı görülmemiştir. Topoizomera tarafından oluşturulan kırıkları stimüle eden referans bileşikler kamptotesin (topoizomera I için) ve etopozid (topoizomera II için) ile enzimlerin potansiyel inhibisyonu gözlenmiştir. Kamptotesin, topoizomera I-DNA kovalent komplekslerini (topoizomera I fosfotirozin-DNA araçları stabilizasyonu) stabilize etmiş ve enzim tarafından yapılan DNA kırılmasını arttırmıştır. Bu aktivite, diospirinler (en azından bazıları) tarafından antagonize edilmiştir. DNA kırıkları, nükleus, sitoplazma ve mitokondri boyunca özellikle hızlı proliferasyon olan tümör hücrelerinde, apoptotik hücre ölümüne yönlendirmiştir. Bildirilmiş olan topoizomera I inhibitörlerinin çoğunluğu, enzimin DNA'ya bir fosfotirozil ağı ile kovalent olarak bağlandığı, DNA-topoizomera I kompleksi stabilizasyonu yapmıştır. Bu ara kompleks, "zehir" olarak tanımlanan indolkarbozol ve indenoizokinolinler gibi ilaçlar veya kamptotesin tarafından selektif olarak durdurulmuştur. Diospirin, bu grup zehirlere dahil edilmemiş ve izodiospirin'e benzer şekilde enzim ile direkt etkileşim gösterdiği bildirilmiştir (Tazi et al., 2004; Hazra et al., 1984, 1987, 1994, 1995; Pal et al., 1996; Chakrabarty et al., 2002;

Adeniyi et al., 2000; Lall et al., 2003; Cushion et al., 2000; Kaneshiro et al., 2000 Yardley et al., 1996; Ting et al., 2003).

Yapılan diğ er bir çalışmada, depresyon tedavisinde kullanılan bitkisel ilaç St. John's wort (*Hypericum perforatum*)'den izole edilen hiperisin ve hiperforin bileşikleri, sitokrom P450 izoenzimleri indüksiyonu ve diğ er ilaçlarla etkileşimi üzerine ilgi uyandırmıştır. Hiperisin'in, naftadiantron yapısı, mitoksantron gibi bazı antitümör ilaçlara benzerdir. Hiperisin, DNA-topoizomeraz enzimi kovalent kompleksini (kırılabilir kompleks) stabilize etmemiş, enzimi inhibe etmiştir. Hiperisin DNA ile interkalasyon yaparak DNA'nın yapısını değişirmiştir. Böylece topoizomeraz II bağlanması ve/veya DNA kırılması engellenmiş, DNA hasarı oluşturmadan topoizomeraz II katalitik inhibisyonu meydana gelmiştir.

Miskovsky ve arkadaşları, kültürde, hiperisin'in muameleden 3,5 saat sonra kültüre hücrelerin çekirdeğinde akümüle olduğunu ve pürin N7 bölgesinde DNA ile direkt etkileşime girdiğini göstermiştir.

Stopper ve arkadaşları, diğ er bir benzer doğal ürün dihidroksiantrakinonların etkileşime girdiğini ve topoizomeraz II inhibisyonu yaptığını göstermiştir. Hiperisin, amsakrin'e dirençli lösemi hücrelerinin öldürülmesinde etkili bulunmuştur. DNA zinciri açılma çalışmasında, hiperisin'in, topo II-DNA bağlanma aktivitesini engelleyen sarmal içi gerginliği yaratmak üzere DNA ile etkileşime girdiği bildirilmiştir. Katalitik topo II inhibisyonunun bir sonucu olarak, hiperisin,

topo II zehirleri amsakrin ve etopozid ile oluşturulan topo II kovalent kırılma komplekslerinin oluşumunu antagonize etmiştir.

Bunun sonucu olarak, Peebles ve arkadaşlarına göre topoizomerez II inhibitörleri, iki grupta sınıflandırılmıştır: katalitik inhibitörler ve Topo II zehirleri.

Katalitik inhibitörler de iki alt gruba ayrılmıştır:

A) ya topo I-DNA bağlanmasını ya da DNA kırılma aktivitelerini inhibe eden basit katalitik inhibitörler (örnek: etidyum bromid, merbaron).

B) kapalı kıskaç oluşturan katalitik inhibitörler (örnek: ICRF-187 ve diğer bisdioksopiperazinler), DNA'yı kırmadan DNA üzerinde enzimi sıkıştırır, ancak DNA'dan ayrılamaz.

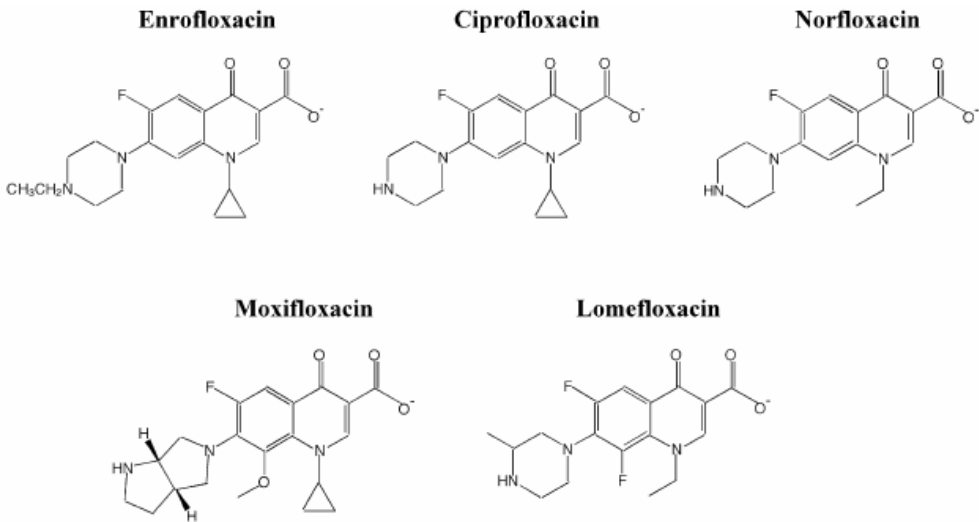
Farklı olarak "topo II zehirleri" ise DNA bağlanması ve kırılmaya izin verirler, ancak her bir kırılmış zincirin 5' fosfat ucu ile fosfotirozin bağlantısı boyunca (kırılabilir komplekste) enzim bloke edilir.

Topo II zehirleri de DNA zincirlerinin religasyon (yeniden birleşme) aktivitesini inhibe edenler ve DNA kırılma aktivitesini arttıranlar adı altında alt gruplara ayrılmışlardır. Hiperisin'in naftadiantron yapısının, topoizomerez II zehiri olan mitoksantron'un moleküler dimerine benzerliği ve benzer doğal bir bileşik olan dihidroksiantrakınonların genotoksitesitesi birlikte düşünüldüğünde, hiperisin'in DNA interkalatörü ve topo II'nin potansiyel bir inhibitörü olarak keşfedilmesi olanak bulmuştur (**Peebles et al., 2001; Miskovsky et al., 1995; Stoper et al., 1996**).

Nitiss ve arkadaşları'nın 1998 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre, DMP 840 ((*R,R*)-2,2'-[1,2-etandilbis[imino(1-metil-2,1-etandil)]-bis(5-nitro-1*H*-benz[*de*]izokinolin-1,3(2*H*)-dion] dimetansülfonat), çeşitli prelinik modellerde antitümör aktivite gösteren yeni bir bis(naftalimid) olarak bildirilmiştir. Yüksek afinite ile DNA'ya bağlandığı ve interkalasyon yaptığı bildirilmiştir. Maya ile yapılan çalışmalarda, etopozid ve amsakrin'e dirençli topoizomeraz II mutantları, DMP-840'a direnç geliştirmiş, maya topoizomeraz II eksprese eden hücreler, ilaca hipersensitif bulunmuştur. Tezat olarak, topo I delesyonları, hücreleri ilaca hipersensitif hale getirmiştir. DMP-840, diğer interkalasyon yapan topo II zehirleri gibi, topo II-DNA kırılabilir kompleksini stabilize ederek ökaryotik hücreleri öldürmüştür (**Nitiss et al., 1998**).

Diğer bir çalışmada bildirildiği üzere, poxvirüs tip IB enzimleri, bilinen en küçük topoizomerazlardır. *Vaccinia* topoizomeraz I, belirli sekans bölgelerinde spesifik olarak çift sarmal DNA'ya bağlanan (kırık zincirin 3' fosfatının enzim tirozinine bağlandığı yer) 314 aminoasid kalıntılı bir proteindir. *Vaccinia* topo I'in, N terminali DNA majör oluk ile etkileşirken, C terminalinin katalitik bölgeyi içerdiği bildirilmiştir. *Vaccinia* topo I kodlayan genin inaktivasyonu, azalan transkripsiyon sebebiyle etkinlikte düşüş ile ilişkilendirilmiştir. Buna bağlı olarak, *Vaccinia* Topo I ile etkileşen ilaçların, potansiyel etkili antiviral ajanlar olarak geliştirilebilecekleri düşünülmüştür. *Vaccinia* Topo I, kamptotesin'e direnç gösterirken, antibiyotik kumarin ilaçlar novobiosin ve kumermisin gibi bakteriyel DNA giraz inhibitörlerine karşı duyarlı bulunmuştur. Florokinolonlar, bakteriyel hücrelerde DNA giraz ve Topo IV enzimlerini hedefleyen topoizomeraz II zehirleridir. DNA- DNA giraz kompleksi ile norfloksasin etkileşiminde, norfloksasin tek zincir DNA'da tanıma yaparak

direkt olarak DNA'ya bağlanmıştır. İlacın bağlanmasının giraz varlığında artması DNA bağlanmasının enzim üzerinde kriptik norfloksasin bağlanma bölgesi açığa çıkarttığını düşündürmüştür. Şekil.2.34'de gösterilen norfloksasin, DNA bağlanması için Mg iyonları gerektirmiştir. Mg, negatif yüklü DNA fosfatları ile norfloksasin'in karbonil ve karboksil grupları arasında bir köprü görevi yapmıştır. Mg yokluğunda, norfloksasin'in DNA'ya bağlanması klasik DNA interkalasyonu ya da oluk bağlanması haricinde kısmen norfloksasin'in moleküler düzleminin heliks aksisine düşey olmasına bağlı olarak bildirilmiştir. Norfloksasin tarafından DNA açılması, önemsiz seviyede bulunmuş ve bileşiğin DNA heliksine bir eğilmeye sebep olduğu belirtilmiştir. Florokinolon, kırılabilir komplekse bağlandıktan sonra enzimde religasyonu engelleyen yapısal bir değişime sebep olmuştur.



Şekil 2. 34. Florokinolonların kimyasal yapısı (Kamau et al., 2004).

Kumarin ilaçlar novobiosin 0.5 μM ve kumermisin 0.2 μM konsantrasyonlarda topoizomerez I inhibisyonu yapmışken, enrofloksasin, ofloksasin'den daha az konsantrasyonlar gerektirmiştir (1 μM)., Enrofloksasin, yaklaşık konsantrasyonda buğday tohumu topo I inhibisyonu yapmış fakat bu konsantrasyonda insan topo I üzerine etkisi olmamıştır. Topoizomerezin DNA süper döngüsü oluşturmaları için indüklenmesinde, siprofloksasin ve norfloksasin, enrofloksasin kadar etkili bulunmuştur. Ancak yapısal benzer bileşikler olan moksifloksasin ve lomefloksasin'de eşit konsantrasyonlarda herhangi bir etki gözlenmemiştir. Kumermisin, DNA ile etkileşimini bloke ederek *Vaccinia* topo I'i inhibe etmiştir. Topo I tarafından gevşetilen DNA'nın enrofloksasin aracılı süper dönüm oluşturmalarını, kumermisin inhibe etmiştir (süper sarmal DNA gevşemesi inhibisyonu için gereken konsantrasyonlarda). Florokinolon bileşiklerinin pox virüslere karşı antiviral ajanlar olarak optimize edilmesi, smallpox'un biyolojik silah olarak kullanımında önemli bulunmuştur (**Kamau and Grove, 2004**).

Diğer bir çalışmada, biyoaktif yüksek bitkilerin biyoaktivite rehberli fraksiyonlanması sonucunda potansiyel antikanser aktiviteye sahip doğal ürünler izole edilmiştir. *S. cerevisiae* 'dan DNA tamir mekanizması yetersiz mutant mayalara karşı selektif aktivite gösteren ekstre, aktif olarak düşünülmüştür. DNA topoizomerez I geninin delesyonuyla, DNA topo ile spesifik olarak etkileşerek DNA hasarı oluşturan ajanların tanımlanması yapılmıştır. Böylelikle, rad52 suşundan rad52.topI suşuna daha fazla aktivite gösteren bir ajanın aktivitesini DNA topo II inhibisyonu yoluyla oluşturduğu bildirilmiştir. Zıt olarak, rad52'ye fazla toksisite oluşması, bir DNA topo I inhibitörünün varlığını göstermiştir. Bu çalışmada DNA'da hasar oluşturan ajanların, steroller, seskiterpenoidler, limonoidler,

pterokarpanlar, naftakinonlar, oksoaporfinler ve kumarinlere benzer şekilde yapıları olduğu bildirilmiştir. 7 naftakinon ve 2 yeni furofuranonaftakinon biyoaktif bulunmuştur. Bu naftakinonların düzlemsel yapısının, DNA interkalasyonu oluşturarak DNA’da hasara yol açtığı bildirilmiştir (Gunatilaka et al., 1994).

Unak ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre, sinkavit, selektif olarak tümör hücrelerinde akümüle olabilen ve DNA’ya kovalent olarak bağlandığında önemli DNA hasarı oluşturan K3 vitamini ‘menadion’un bir difosfat türevi olarak bildirilmiştir (Unak et al., 1993).

2.9. Antrakinonlar ve Türevleri Kullanılarak Yapılan Topoizomeraz I-II İnhibisyonu Çalışmaları

Yaygın kullanılan antrasiklin tip antikanser ilaçlar, antrakinon yapısından türerler. Bu ilaçlar, düzlemsel yapıları sayesinde DNA zincirinde interkalasyon yaparken, topoizomeraz II katalitik fonksiyonunu inhibe ederler. Doğal antrasen türevleri, 1,8-dihidroksiantrakinon (dantron), aloe-emodin ve emodin, bisbenzimid Hoechst 33342’nin DNA’ya nonkovalent bağlanmasını inhibe etmiştir. *m*-amsakrin ile karşılaştırıldığında, emodin daha güçlü bulunurken, diantron benzer etki göstermiş ve aloe-emodin daha zayıf topo II inhibisyonu yapmıştır. Topoizomeraz II katalitik aktivitesinin inhibisyonu, antrakinon indüklü genotoksisite ve mutajenisiteye katkıda bulunmuştur. Topo II’nin katalitik inhibisyonunda antrasiklinlerin DNA bağlanma bölgeleri ile Hoechst 33342 ile yarıştığı araştırılmıştır. Topo II inhibisyonu, kromozomal DNA kırılması yapmıştır. Bu bileşikler tarafından oluşturulan mutajenik DNA zararının kromozomal içeriği ve tipi ile topo II inhibisyonun uyumuna bakılmıştır.

Antrasiklin türevleri ve diğer bilinen topo II inhibitörlerinin, DNA'ya non-kovalent olarak bağlanması, etkin topo II zehirlenmesi veya inhibisyonu için önceden gerekli olmadığı ancak bunun, DNA bağlanma bölgeleri için topo II ile yarışmaya yönlendirdiği bildirilmiştir. Enzim inhibisyonu analizi için topo II ile kataliz edilen dekatasyon reaksiyonu, jel elektroforezini takiben 2,5 kilobazlık DNA monomerlerinin görünmesi ile monitorize edilmiş, topo II tarafından oluşturulan monomer DNA miktarının emodin, dantron ve aloe-emodin tarafından azaltılması, her 3 bileşiğin de bu enzimi inhibe etme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. Topo II inhibisyonunun ölçülmesinde, ürün bandın (MC) substrat banda (NW) bağlı, doz bağımlı olarak azalması densitometrik olarak imaj analizi ile ölçülmüştür.

Topo II zehirlenmesi, DNA-topo II-ilaç tarafından oluşturulan üçlü kırılabilir kompleksin stabilizasyonu ile oluşmuştur. Topo II ile etkileşim, enzim aracılı DNA kırılması ile sonuçlanmıştır. Bileşiğin genotoksik özelliği sonucunda kromozomal delesyonlar saptanmıştır (**Mueller and Stopper, 1999**).

Minör oluk ligandına bağlanan DNA interkalatörü içeren bileşikler olan kombileksinler üzerine çalışmalar sonunda, netropsin ve distiamisin A'ya yakın olarak yeni propil amin karboksamid serileri sentezlenmiştir. DNA'da spesifik sekansları tanıyarak bağlanan bileşikler oluşturmak, DNA hedeflenmiş ilaçların gelişiminde temel hedef olarak bulunmaktadır. Bu doğal antibiyotiklerin oligopirol karboksamid zinciri, bileşiklerde kombileksin denen interkalatörler gibi sitotoksik DNA ligandları için sekans selektif taşıyıcılar olarak kullanılmışlardır. C terminal ucunda bir N,N-dimetil amino-propilamid grubu ve N terminal ucunda alifatik zincir ile

bağlı bir nükleik baz, bir heterosiklik veya bir kinondan oluşan pirol karboksamid serisi olan yeni potansiyel kombineksinler bildirilmiştir. Bu amino propil amidik grubunun, distiamisin A ve netropsinde gösterilen amidin grubunun yapısal eşleniğini göstermesi gerektiği bildirilmiştir. Verilen serilerdeki yeni bileşiklerin sitotoksosite ve mekanizma açıklaması için DNA ile etkileşim sırasında DNA bağlanması, potansiyel ligandlar varlığında çift zincir DNA'nın azalan eğrisinin spektrofotometrik analizi ve florometrik titrasyonu içeren etidyum bromid ile yer değiştirme analizi yapılmıştır. 5, 20 ve 50 μM konsantrasyonda test ilaçlarının varlığında ve yokluğunda DNA-topoizomerez I inkübasyonundan sonra DNA topoizomerlerinin farklı popülasyonlardaki dağılımlarının analizi ile topoizomerez I katalitik aktivitesinin inhibisyonu belirlenmiştir. 6–9, 11, 14, 16 nolu bileşikler benzer DNA bağlanması göstermiştir. İlginç olarak, bileşiklerden yedisi, farklı konsantrasyonlarda topoizomerez I katalitik aktivitesinin nonspesifik inhibisyonunu yapmıştır. İyi DNA bağlayıcı bileşikler 11 ve 16, topoizomerez I inhibisyonu göstermemiştir. Antrakınon içeren 14 ve 15 nolu bileşikler, ileriki çalışmalar için ideal hedefler olmuştur. Tüm sonuçlara göre, sadece dimetilamino-propilamid zinciri değil aynı zamanda minimum 3 karbonilik akseptör grubunun varlığı, DNA'ya bağlanma için gerekli olarak bildirilmiştir (**Hotzel et al., 2002**).

Yapılan diğer bir çalışmada, antrasiklin aklarubisin (ACLA), etkili olarak DNA'ya bağlanan, DNA'da topo II katalitik aktivitesinin sekonder inhibisyonuna yol açan interkalatif antibiyotik ve antineoplastik bir ajan olarak gösterilmiştir. Ayrıca, kamptotesin ve türevlerine benzer şekilde topo I zehirlenmesi yapmıştır. Topo II katalitik inhibisyonu ve Topo I zehirlenmesi sonucu DNA hasarı ve sitotoksosite oluşmuştur. Çin hamster V-79 ve irs-2 nükleer ekstreleriyle yapılan çalışmada topo II katalitik

aktivitesinin ACLA ile inhibisyonunda, ilaç yokluğunda topo II aktivitesi iyileşmiş, katenasyon halindeki DNA substratının etkin dekatasyon, kapalı mini dairelerin serbestlenmesi ile gösterilmiştir (jelde). ACLA'nın artan konsantrasyonlardaki inhibisyon aktivitesi test edildiğinde, katenasyon halindeki DNA substratında ilerleyen bir artış olması doz bağımlı inhibitör etkinin görüldüğünü açıklamıştır. Denenen tüm ACLA konsantrasyonları, farklı seviyelerde topo II inhibisyonu yaparken, 1.2 ve 2.4 μM ACLA topo II tarafından katenasyon halindeki substrattan (kDNA), DNA mini dairelerinin serbestlenmesinin engellenmesinde daha etkili olmuştur. Bu şunu göstermiştir; üçten beş kata kadar enzim aktivitesinde azalma olmuştur. Hücrede protein üretimini ölçen SRB assay ile hücre hatlarında ACLA'nın doz bağımlı sitotoksik etkisi görülmüştür (radyosensitif mutantlarda sitotoksosite artmıştır). Topo II katalitik inhibitörü olan bisdioksopiperazin ICRF-193 ile sonuçlar farklı bulunmuştur. Eşit ya da ACLA'dan yüksek dozlarda dahi canlılığın sadece %20'si kaybolurken, ACLA ile sonuçlar %80'e ulaşmıştır. Ayrıca radyosensitif hücre hattında da sitotoksosite miktarında değişiklik gözlenmemiştir. İkinci sonuç, ACLA tarafından indüklenen sitotoksik etkilerden sorumlu olan tek faktörün sadece topo II katalitik inhibisyonu olmadığını göstermiştir (**Hajji et al., 2005**).

Gantchev ve Hunting'in 1997 yılında yaptıkları bir çalışmada, DNA-topo II kırılabilir kompleksi, DNA üzerinde inhibitörler tarafından engellendiği anda, transkripsiyon ve replikasyon gibi normal DNA metabolizmasının inhibisyonu ve sitotoksosite gözlenmiştir. Podofilotoksin türevi olan etopozid VP-16, topoizomeraz prosesi boyunca topo tarafından kırılan DNA zincirlerinin yeniden birleşme basamaklarını inhibe etmiştir. VP-16 hücrede enzimatik oksido redüktif transformasyonlar sonucunda orto kinon türevi VPQ ile sonuçlanmıştır. İkisi de topo II-DNA kırılabilir

kompleksinin engellenmesinde etkili bulunmuş ve bu durum E halkasındaki metoksi gruplarının aktivite için gerekli olmadığını göstermiştir. Etopozid orto kinon türevi VPQ'nun, topo II-DNA kırılma-yeniden birleşme dengesi üzerinde, VP-16'dan daha etkili olduğu gösterilmiştir. VPQ'da ikinci zincirin religasyonunun güçlü inhibisyonu, DNA'ya bağlı olan topo II'nin iki homodimeri ile VPQ'nun asimetrik olarak etkileştiğini göstermiştir. VPQ, enzimi kendi başına inaktive etmemiştir. DNA bağlanmasında, protein spesifik konformasyon oluştuğunda, VPQ'nun muhtemelen enzim-DNA bölgesinin spesifik bir bölgesi içinde kimyasal olarak etkileşim oluşturduğu belirtilmiştir (**Gantchev and Hunting, 1997**).

2.10. Lapaşonlar Kullanılarak Yapılan Topoizomerez I-II İnhibisyonu Çalışmaları

β lapaşon: Doğal lapaşon analogu β -lapaşon, kullanılmakta olan antikanser ilaçlardan kimyasal yapı açısından farklı olarak ve kamptotesin'den farklı bir etki mekanizması ile DNA topoizomerez I inhibisyonu yapmaktadır. Bu bileşik, hücre ölümüne, insan prostat kanser hücre hatlarında 8 μ M'dan az konsantrasyonda apoptoz yoluyla sebep olmaktadır. Bu etki, ilginç olarak, p53 ekspresyonundan bağımsızdır ve bcl-2'nin ektopik aşırı ekspresyonu β -lapaşon'a önemli bir direnç göstermemektedir (**Mans et al., 2000**).

Li Y. ve arkadaşlarının 2002 yılı çalışmasında, çoğu kemoterapötik ilacın normal hücrelere de toksik olması, DNA ve mikrotübüllere nonselektif zarar vererek indirekt olarak kontrol noktası aracılı apoptoz ile kanser hücrelerini öldürmesi üzerine, direkt olarak kontrol noktası regülatörlerinin aktive edilerek kanser hücrelerinin selektif

olarak öldürülmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, kanser hücrelerinde selektif olarak apoptoza yol açan β -lapaşon gösterilmiştir. Kanser hücrelerine karşı selektivite, S faz kontrol noktasının aktivasyonu ve kontrol noktası aracılı apoptozda E2F1 regülatörünün selektif indüksiyonu ile yapılmıştır. Kontrol noktaları, kanser hücrelerinde, genetik hasar sonucu deprese olmuştur. G2 kontrol noktası fonksiyonu sonlandırılarak, kemoterapiye hücresel duyarlılık artırılmaktadır.

Çoğu kemoterapötik ilaç, öncelikle kanser hücresinde olduğu kadar normal hücrede de DNA veya mikrotübül hasarı oluşturarak, kontrol noktası aracılı apoptozu indirekt olarak aktive etmektedir. Nonspesifik hasar, toksisite oluşturmakta ve kanser hücrelerine karşı limitli selektivite yapmaktadır. β -lapaşon (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafta(1,2-b)piran-5,6-dion), DNA hasarı oluşturmada hücre ölümüne yol açan geniş spektrumda aktivitesi olan bir antikanser ajan olarak belirtilmiştir. Hücre ölüm mekanizması, topoizomeraz I enziminin katalitik aktivitesinin inhibisyonu olarak bildirilmiştir. Topoizomeraz I inhibisyonu için gerekli β -lapaşon konsantrasyonu, apoptoza neden olan konsantrasyondan daha yüksek olarak bulunmuştur (Li Y. et al., 2002).

Diğer bir çalışmada antikanser aktiviteye sahip piranonaftakinonlardan eleuterin (bileşik 1-reversebl inhibitör), β -lapaşon (bileşik 2-irreversible) ve yapısal izomeri α -lapaşon (bileşik 3-irreversible) enzim katalitik siklusunun basamaklarında, topoizomeraz II inhibisyonu mekanizması incelenmiştir. Prototipik enzim zehiri etopozid, kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçta, eleuterin ve β -lapaşon, ATP varlığında DNA'dan enzimin ayrılmasını ve religasyonu indükleyerek topo II inhibisyonu yapmıştır. β -lapaşon, geri dönüşümsüz topo II inhibitörü iken, eleuterin

sadece enzim katalitik siklusunu yavaşlatmıştır. α -lapaşon, topo II-DNA nonkovalent bağlanmasını inhibe etmiş, enzim DNA'dan ayrılmadan DNA kırıklarının religasyonunu indüklemiştir. α -lapaşon, geri dönüşümsüz topo II inhibitörüdür.

Frydman ve arkadaşları 1997 yılında, bileşik 2'yi zayıf topo II inhibitörü olarak bildirmiştir. 3 nolu bileşiğin bir topo II zehiri olmadığı bildirilmiştir.

β -lapaşon gibi orto-kinonlar, α -lapaşon gibi para-kinonlardan daha iyi redoks siklusu yeteneğine sahip bulunmuştur. Bu durum, naftakinonların sitotoksik etkilerinin, topoizomerez II-DNA kompleksleri üzerindeki tiol kısımlarının alkilasyonundan kaynaklandığını göstermiştir. Diğer benzer katalitik inhibitörlerden örnek olarak aklarubisin ve akridon gösterilmiştir. Bunlar, öncelikle nonkovalent etkileşimleri inhibe ederken; merbaron, topo II aracılı DNA kırılmasını inhibe etmiştir. Staurosporin, zincir bağlanma inhibisyonu yapmıştır. Bu ajanlardan hiçbiri, topo II aracılı religasyonu indüklememiştir (**Krishnan and Bastow, 2000**).

Geçmiş çalışmalara göre, 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafta[1,2-b]piran-5,6-dion (β -lapaşon), topo I'i kamptotesin'den farklı olarak inhibe etmiştir. Tutarlı olarak, β -lapaşon, topo I aracılı DNA kırıklarına sebep olmamıştır. Ancak β -lapaşon ve menadion gibi benzer naftakinonlar, saf insan DNA topoizomerez II α varlığında DNA kırıklarına sebep olmuştur. Topo II α 'nın, β -lapaşon ve benzer naftakinonlar tarafından zehirlenmesi ATP'den bağımsız ve geri dönüşümlü kırılabilir kompleks ile meydana gelmiştir. Bir para-kinon olan menadion ve ortokinon olan β -lapaşon arasındaki yapısal benzerlik ile topo II α zehirlenmesindeki benzerlik, bu

kinonların kimyasal reaktivitelerinde ortak etki bulunduğunu bildirmiştir. Her iki kinon da merkaptoetanol ile adduktlar oluşturmuş ve β -lapaşon on kat daha reaktif bulunmuştur. Tioller ile addukt oluşturma hızları ve kinonların topo II zehirlleme aktivitesi birbiriyle bağlantılı bulunmuştur. Başlangıç çalışmalarında, β -lapaşon ve benzer naftakinonlar ilaca duyarlı ve ilaca dirençli tümör hücre hatlarına karşı (MDR1-aşırı eksprese olan hücre hatları, kamptotesin dirençli hücre hatları ve atipik multidrug rezistant CEM/V-1 hücre hattı) sitotoksik bulunmuştur (**Frydman et al., 1997**).

Yapılan diğer bir çalışmaya göre, β -lapaşon ve taksol kombinasyonu ile muamele edilmiş yumurtalık, göğüs, prostat, melanoma, akciğer, kolon ve pankreas kanser hücrelerinin ölümlerinde sinerjistik indüksiyon görülmüştür. Bu sinerjizm, programlı olmakla birlikte, taksol, β -lapaşon ile aynı anda ya da sonradan eklenmektedir. Az toksisite oluşturmuştur. Birden fazla farklı hücre siklusu kontrol noktalarını aktive eden ilaçlarla hücrelerin eş zamanlı muamelesi, çarpışan regülatör sinyal moleküllerinin üretimi, kanser hücrelerinde apoptoza neden olmuştur. β -lapaşon, geç G1 ve S fazlarında hücre siklusu gecikmelerine yol açmış ve taksol, G2/M'de hücre büyümesini durdurmuştur. Her iki ilaçla muamele edilen hücreler, apoptoza gitmeden multipl kontrol noktalarında gecikmişlerdir. Taksol, β -lapaşon muamelesinden önce eklendiğinde, sinerjizm gözlenmemiştir. Antikanser tedavinin etkinliği, doğru kombinasyona bağlı olarak bildirilmiştir. β -lapaşon ve taksol aynı dozlarda tek başlarına kullanıldığında (kombine edilmeden) aynı antitümör etkinlik görülmüştür. DNA topo I inhibitörü olan β -lapaşon, G1 veya S fazında hücre siklusu gecikmeleri yaparken, G2/M geçişinde hücrelerin ilerlemesini durduran diğer birçok DNA hasarı oluşturan ajandan farklı olarak bulunmuştur (**Li C.J. et al., 1999**).

Diğer bir çalışmada, insan prostat karsinoma hücrelerinde (PC3), kaspaz 3 (CPP32) ve NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz (NQO1)'ın, genistein ve β -lapaşon ile oluşturulan apoptoz sinyal sistemindeki rolü üzerinde durulmuştur. Genistein, kanser hücresinde büyük oranda anjiogenez inhibisyonu yapmıştır. Genistein izoflavon [4',5',]-trihidroksiizoflavon), steroid östrojenlerine benzeyen ve onların biyolojik reaksiyonlarını taklit eden fitokimyasal izoflavonoid ailesine ait ve heterosiklik, difenolik yapıya sahip olarak bildirilmiştir. Genistein, apoptoz indüksiyonu yaparak hücre siklusunun G2-M basamağında durdurulmasını sağlarken, tirozin protein kinaz ve DNA topoizomerez II inhibisyonu yapmıştır. Tirozin kinaz katalitik bölgesine bağlanma sırasında ATP ile yarışmalı inhibisyona girmiştir. Kandaki serbest ve aktif hormonların miktarını azaltarak hormon ilişkili kanser riskini düşüren sex hormon-binding globulin (SHBG) üretimini stimüle etmiştir.

Prostat kanserinde, sadece tek bir gen veya molekülün bulunmaması (heterojen olması= hormon bağımlı-bağımsız ve proliferenonprolifere), tedavinin ciddi yan etkiler içermesi tedavi sonrası tümörün yeniden büyümesi, başlangıçta androjen bağımlı olanın androjen bağımsız kanser hücresine dönüşmesi ya da nonprolifere hücrenin proliferenonprolifere hücrelerine gelişmeye başlaması, ilaçların kombinasyon halinde uygulanması gerektiğini düşündürmüştür.

β -lapaşon, kullanılmakta olan antikanser ilaçlardan farklı kimyasal yapıya sahiptir ve apoptoz indüksiyonu yaparak sitotoksite göstermektedir. Menadion gibi naftakinon ailesinin diğer üyeleri ve β -lapaşon arasında yapısal benzerlikler olması, NAD(P)H:Kinon (NQO1)'nin β -lapaşon aktivasyon veya detoksifikasyonunda yer alabileceğini önermiştir. β -lapaşon

indüklü apoptoz, göğüs ve prostat kanser hücrelerinde non-kaspaz aracılı olarak bildirilmiş ve bu bileşiğin sitotoksitesi NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz enzimi (NQO1/xip3) aktivitesine bağlı bulunmuştur. β -lapaşon, DNA tamiri inhibitörü olarak, topoizomeraz I ve II inhibisyonu yaparken, apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümü ile devam eden G1 ve/veya S fazında hücre siklusu gecikmesini indüklemiştir. β -lapaşon tarafından indüklenen apoptoz, p53 bağımsız bulunmuştur. PC3 hücreleri, kombinasyon tedavisine tek tedaviden daha iyi ve doza bağımlı olarak artan bir sonuç vererek genistein ve β -lapaşon arasındaki sinerjistik etkiyi göstermiştir. Kaspaz 3 serbestlenmesi bloke edildiğinde, genistein indüklü apoptoz azalırken, β -lapaşon indüklü apoptozda azalma gözlenmemiştir. Bu durum, genistein indüklü apoptozda moleküler yolakta CPP32'nin önemli rolü varken, β -lapaşon indüklü apoptozda herhangi bir öneme sahip olmadığını göstermiştir. β -lapaşon indüklü apoptozda majör moleküler hedef NQO1 iken, genistein- β -lapaşon birlikte kombinasyon tedavisi indüklü apoptozda yine NQO1 hedef olarak gösterilmiştir (**Diaka et al., 2004**).

Boothman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bildirdikleri üzere, β -lapaşon, DNA zinciri kırıklarının yeniden birleşmesini azaltmış, tamir süresince x ışınlarına maruz bırakılan hücrelerde "ek olarak" çift zincir kırıkları üretmiştir. Topoizomeraz I'in β -lapaşon ile etkileşimi sonucunda tamir edilebilir tek zincir DNA kırıkları, tamire dirençli çift zincir DNA kırıklarına dönüşmüştür. Böylece DNA hasarı tamiri ve neoplastik transformasyon engellenmiştir (DNA lezyonlarının tamirinde yer alan Topo I enzimlerinin inhibisyonu ile).

DNA hasarı tamir prosesleri hata eğilimlidir ve transformasyona sebep olmuşlardır. X ışınlanmış hücrelerin ilk cevabı, yaşamı kolaylaştıracak tamir proseslerini indüklemektir. X ışınlanması ve antineoplastik ilaçlar karsinojen olarak gösterilmişlerdir. DNA'ya hasar vermiş ve çeşitli lezyonlar oluşturmuşlardır. Bu hasarın büyük bir bölümü normal hücreler tarafından tamir edilirken, DNA lezyonlarının defektif veya tamamlanmamış tamiri karsinojenik olmuştur. Böyle bir durumda tümörojenik bir fenotipin oluşumu ya da hücre ölümü başlamıştır. Bu tip lezyonları taşıyan hücreler, "transformant" olarak yaşamayıp, ölümü seçmişlerdir. β -lapaşon tamir proseslerini inhibe ettiğinde, tamir edilebilir potansiyel karsinojenik DNA lezyonları ölümcül olaylar haline dönüşmüş ve böylece transforme hücrelerin sayısında azalma olmuştur.

Belirli ilaçlar, DNA tamirine müdahale ederek, genetik defekt şeklinde DNA hasarı yapan ajanların ölüm potansiyellerini arttırmıştır. Kanser eğilimli hastalıklarda defektif DNA'nın tamirinin dışında, özellikle kafein ve 3-aminobenzamid karsinojenisiteyi azaltarak, kemoterapinin etkinliğini arttırmıştır.

X ışınları ile iyonize edilmemiş CHEF/18A hücrelerinin DNA'sı 4 μ M β -lapaşon ile 5 saat muameleden etkilenmemiştir. DNA hasarı oluşturan bir ajan tarafından tek zincir DNA kırığı bir defa oluşturulduğu anda, topoizomeraz I sekans spesifik bağlanma aktivitesini kaybetmiştir. β -lapaşon varlığında, enzim, yeni oluşturulan çift zincir kırığa tutunabilmektedir (kamptotesin mekanizmasına benzer şekilde). Çift zincir kırık yanında kovalent bağlı protein, DNA lezyonu tamirini inhibe etmiş veya önemli derecede geciktirmiştir. β -lapaşon varlığında x ışınlanmış hücrelerin total DNA kırıklarında artış olmuştur.

Topo I aktivitesi hücre siklusu ile regüle olmadığı için memeli hücrelerinde durgun faz ve exponansiyel fazda, x ışınları ve β -lapaşon arasında sinerjik öldürücülük oluşmuştur.

Hiçbir tek zincir kırık olmadığında β -lapaşon x ışınlanmamış hücrelerin yaşamını azaltmamıştır.

β -lapaşon ile ön muamele, sonradan x ışınlanmış hücrelerin yaşamı üzerinde yok denecek kadar az etkiye sahip olmuştur. β -lapaşon, x ışınları ve neocarzinostatin ile sinerjik etki oluştururken, melfalan ile oluşturmamıştır çünkü melfalan bifonksiyonel alkilatördür ve kolayca tek zincir kırıklara sebep olamamaktadır (Boothman and Pardee, 1989).

2.11. Pirolizidinler Kullanılarak Yapılan Tümör Oluşumu Baskılanması Çalışmaları

Pirolizidin alkaloidleri (PA), *Leguminosae*, *Boraginaceae* ve *Asteraceae* gibi bitki türlerinde doğal olarak bulunmuşlardır. Pirolizidinler, hepatotoksik, genotoksik, sitotoksik ve pnömotoksik olarak bildirilmişlerdir (Mattocks, 1986). *Ligularia hodgsonii*'den izole edilen ve çeşitli bitki türlerinde bulunan bir PA olan Klivorin, geleneksel Çin tıbbında öksürük, hepatit ve inflamasyon için kullanılmakta olan potent toksik bir bileşik olarak belirtilmiştir. Klivorin, L-02 hücrelerinde apoptoz indüksiyonu yapmış, p53 protein ekspresyonunu azaltmış ve Bcl-2 proteini ekspresyonu üzerine etkisi bulunmamıştır. Basamaklar halindeki membran kabarcıkları, hücre büzülmesi, protein fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve DNA degradasyonu ile karakterize edilen programlı hücre ölümü olarak adlandırılan ‘‘apoptoz’’, komşu hücreler tarafından ölü hücrelerin hızlı bir

şekilde yutulması ile takip edilmektedir (**Thompson, 1995**). Bu kompleks proseste, çeşitli proteinler yer almaktadır. P53 proteini; DNA hasarı, oksidatif stres ve kemoterapötik ilaçlar gibi çeşitli hücrel ve dış stresler ile indüklenen apoptoza katkıda bulunmaktadır (**Steele et al., 1998**). Mitokondriyel dış membran, endoplazmik retikulum ve nükleer zarfın sitoplazmik kısmında yer alan 26 kDa'luk integral membran proteini olan Bcl-2 (Newton ve Strasser, 1998), apoptotik yolda yukarı efektör molekülüdür ve apoptozun potent supresörüdür (apoptoz inhibisyonu) (**Borner, 2003**). Kaspazlar, apoptotik hücre ölümüne yönlendiren biyokimyasal olayların başlamasında en önemli efektör moleküller olarak gösterilmişlerdir (**Boyce et al., 2004**). Apoptoz bozuklukları; toksin indüklü hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalık ve otoimmün bozukluklar gibi hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir (**Fadeel et al., 1999**).

Salmonella/mammalian-mikrozom testi ile Klivorin'nin mutajenik olduğu (Yamanaka ve ark.,1979) ve uzun dönem muamelesinin tümör geliştirdiği bildirilmiştir (**Kuhara et al.,1980**).

Diğer bir çalışmaya göre, hepatokarsinojenik bir pirolizidin alkaloidi olan petasitenin'in insan karsinoma hücre hattının hücre siklusu üzerine etkisi, hücreler S veya M fazında iken inhibe edilmesi şeklindedir. Sonuç olarak petasitenin toksisitesinin, karaciğer dışındaki dokularda veya kemirgenler dışındaki türlerde geliştiğini göstermişlerdir (**Mori et al., 1984**).

Denham'a göre, Pirolizidin alkaloidleri arasında hepatotoksisite, kimyasal yapıdaki küçük farklılıklarla değişiklik gösterir. Bu farklılıklar çoğunlukla makrosiklik diesterlerde belirtilmiştir. Makrosiklik diesterlerin,

glutasyon ile konjugasyon yapan yüksek reaktif pirol araçları, nükleik asitler ile kovalent bağlar oluşturmuş ve hücresel protein sentezini ve patolojik prosesi başlatan hücre replikasyonunu bozmuştur. Ayrıca, DNA zincirleri arasında çapraz bağlanma yapması, karsinogeneze yol açmıştır (Denham A. ,1996).

2.12. Flavonoidler Kullanılarak Yapılan Topoizomeraz I-II İnhibisyonu Çalışmaları

Flavonoidlerin antiviral, antiinflamatuvar, mutajenik, antimutajenik, antiproliferatif etkilere sahip doğal polifenolik bileşikler olduğu ve enzim veya sinyal transdüksiyon yollarının inhibisyonu (topoizomeraz I ve II), enzimlerin aktivasyon veya stimülasyonu, hormon antagonizm veya inhibisyonu ve oksidatif zarar oluşturdukları bildirilmiştir. Hücredeki etki mekanizmalarında potent antioksidant özellikleri ile redoks aktif metal iyonları ile şelat oluşturmaları bildirilmiştir.

Topoizomerazın nonspesifik olarak DNA'ya bağlanması, daha az fonksiyonel olan aktif enzim molekülleri ile sonuçlanmıştır. Bu durumda, yüksek miktarda BSA eklenmesi, enzimin nonspesifik bağlanma bölgeleri ile yarışmasını başlatmış, substrata girişini arttırarak enzimin serbestlenmesi (DNA'dan ayrılması) ve aktivitesinin artmasını sağlamıştır. Bazı küçük düzlemsel bileşiklerin, aköz solüsyonda, self agregasyon oluşturması, enzimin misel benzeri agregatların yüzeyinde engellenerek nonspesifik inhibisyonuna sebep olmuştur. BSA bir dereceye kadar bu prosesi bozmuştur. Böyle bir durumda, flavonoid agregasyonu seviyesinde bir azalma, nonspesifik enzim inhibisyonunu azaltmış ve aynı zamanda bileşiğin spesifik aktif nonagreg formunun konsantrasyonunu arttırmıştır.

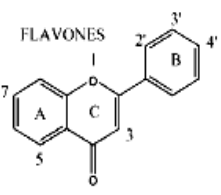
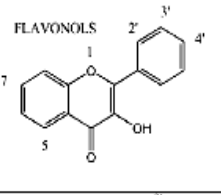
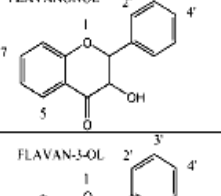
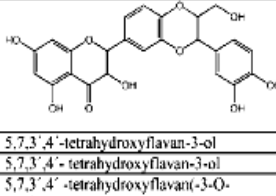
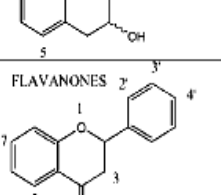
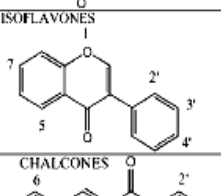
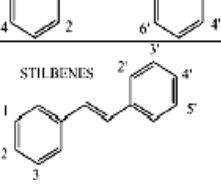
Agrege flavonoidin, etkin olarak interkalasyon veya disagregasyon yapamayacağı düşünülerek aktif flavonoidin konsantrasyonundaki artış ve topo I inhibisyonunun bastırılması ile interkalasyon aktivitesinde artış görülmüştür. Zehirlleme, aynı şekilde artmıştır, çünkü kırılabilir kompleksin stabilizasyonu, fonksiyonel topoizomerez ve non-agrege flavonoid gerektirmektedir.

Düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin, topoizomerez I-DNA kırılabilir kompleks stabilizasyonu oluşturmaları, bu bileşiklerin DNA interkalasyon aktivitesi ile ilişkilendirilmesine rağmen interkalatör bileşiklerin sıklıkla topoizomerez inhibisyonu yapamadığı bilinmektedir. Güçlü interkalatif bağlanıcılardan etidyum bromid ve klorokin zehirlleme veya katalitik aktivite inhibisyonunda tamamen etkisiz iken, en potent bilinen topo I zehirlerinden kamptotesin hiçbir zaman DNA interkalasyonu yapmamıştır. Flavonoidler için DNA interkalasyonu gereksiz bulunmuşken, topo I-DNA kırılabilir kompleksi stabilizasyonu için uygun olarak gösterilmişlerdir.

DNA'ya interkalasyon yapan flavonoidlerin tümü, etkili topo I zehirleri olarak gösterilmiştir. Bazı non-interkalatif flavonoidlerin topo I zehirlenmesi yapabildiği ancak DNA açılma derecesi ile ölçülen interkalasyon ve bileşiklerin zehirlleme potansiyeli arasında gayet zayıf bir korelasyon görüldüğü bildirilmiştir. Bu korelasyon azlığı aynı zamanda, topo I zehirlenmesi yapan interkalatör indolkarbozol bileşikleri için de belirtilmiştir. Tablo 2.1'de gösterildiği üzere, C halkasının 2 ve 3 karbonları arasında bir çift bağ içeren (çift bağ; ilacın, DNA dupleksinin bitişik bazları arasına yerleşmeye izin veren düzlemsel yapı) flavon ve flavonollerin DNA ile interkalatif bağlanma yaptığı bildirilmiştir. Kersetin'in flavanonol analogu taksifolin, çift bağ eksiği olduğu için interkalasyon yapamamış

iken, morin'in düzlemsel yapısı olduğu halde düşük pKa'dan dolayı interkalasyon yapamadığı veya topo I-DNA kompleksine bağlanamadığı saptanmıştır. Ayrıca flavon/flavonol bileşiklerinin, interkalasyon için en azından 4' pozisyonunda B halkasında bir serbest hidroksi grubuna sahip olmaları gerektiği bildirilmiştir. İnterkalasyon ve zehirlleme yapan en basit flavonoid yapısı 3',4'-dihidroksiflavon'dur. 3' hidroksi grubu, interkalatif bağlanma stabilizasyonunda veya aköz solüsyonda uygun solubilityyi oluşturmada önemli bulunmuştur. C-8 glikozillenmiş flavon, orientin, test edilen 34 bileşik içinde en potent topo I zehiri ve etkili interkalatörü iken, en etkili DNA açan bileşik, 7-O glikozid luteolin olarak gösterilmiştir. Glikozillenmiş flavon(ol)lerin, topo I ve II zehirlenmesi ve interkalasyon aktivitesinde kayıp gözlenmiştir. Rutin ve Kersitrin gibi 3 pozisyonu hidroksi grubunda glikozillenmiş flavonollerin interkalatif kapasitesindeki azalma şunu göstermiştir; 3 pozisyon hidroksi grubunda hidrojen bağlanması, interkalasyonda iyonizasyon veya izomerizasyondan daha önemli role sahip olan sterik baskılar oluşturmuştur. Kinon – semikinon formlarına dönüşen kateşol veya pirogallol içeren flavonoidler, topo II zehirlenmesinden sorumlu bulunmuşlardır. Flavonoidlerin interkalasyon yeteneği zayıf görülmüştür. Zayıf bağlanma özelliklerine sahip zayıf elektrofilik düzlemsel bileşikler olan flavonoidler, katyonik substitüentli veya addukt oluşturan reaktif elektrofilik substitüentli interkalatörlerden daha az olasılıkla mutajenik veya genotoksik olarak bildirilmişlerdir. Kersetin'in, topoizomeraaz I aracılı süper sarmal DNA gevşeme aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Luteolin'in artan konsantrasyonları ile DNA kırıkları artmıştır (Webb and Ebeler, 2004).

Tablo 2.4. Polifenolik bileşiklerin topo I enzim zehirlenme ve interkalasyonu

Structures	Common Name	Nomenclature	Poisoning ⁺ at 100µM (± SD)	Intercalation ⁺⁺
FLAVONES 	Chrysin	5,7-dihydroxyflavone	2 ⁺ (± 2.1)	0
	—	3',4'-dihydroxyflavone	21 ⁺ (± 12.7)	158 (31.8)
	Apigenin	5,7,4'-trihydroxyflavone	44 (± 8.9)	NQ
	Luteolin	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone	55 (± 8.2)	97 (5.6)
	Luteolin-4'-glucoside	5,7,3'-trihydroxy-4'-O-glucoside	19 (± 4.3)	310 (10.4)
	Luteolin-7-glucoside	5,3',4'-trihydroxy-7-O-glucoside	51 (± 14)	71 (16)
	Orientin	5,7,3',4'-tetrahydroxy-8-C-glucoside	69 ⁺ (± 5.6)	170 (14.1)
	Diosmin	5,3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone	113 ⁺ (± 4.9)	0
	—	5,7,3',4'-tetramethoxyflavone	<20 ⁺	0
	—	5,6,7,3',4',5'-hexamethoxyflavone	<20 ⁺	0
FLAVONOLS 	Fisetin	7,3',4'-trihydroxyflavonol	48 (± 1)	198 (23.6)
	Kaempferol	5,7,4'-trihydroxyflavonol	56 (± 6.2)	140 (6.3)
	Quercetin	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol	57 (± 15.6)	91 (18.2)
	Myricetin	5,7,2',3',4'-pentahydroxyflavonol	62 (± 14.9)	225 (30.5)
	Gossypetin	5,7,8,3',4'-pentahydroxyflavonol	9 ⁺ (± 4.9)	0
	Morin	5,7,2',4'-tetrahydroxyflavonol	16 (± 5.5)	0
	Rhamnetin	7-methoxy-5,3',4'-trihydroxyflavonol	<25	NQ
	Tamarixetin	4'-methoxy-5,7,3'-trihydroxyflavonol	6 (± 2.5)	0
	Rutin	5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-O-rutinoside	5 (± 1.8)	0
	Quercitrin	5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-O-rhamnoside	15 ⁺ (± 12)	0
FLAVANONOL 	(+)-Taxifolin	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanonol (2R,3R)	14 (± 9.9)	0
	Silibinin		5 (± 4)	0
FLAVAN-3-OL 	(+)-Catechin (2R,3S)	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3-ol	11 ⁺ (± 1)	0
	(-)-Epicatechin (2R,3S)	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3-ol	9 (± 5.4)	0
	(-)-Epicatechingallate (2R,3S)	5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan(-3-O-)gallate (2R,3R)	3	0
	(-)-Epigallocatechingallate	5,7,3',4',5'-tetrahydroxyflavan(-3-O-)gallate (2R,3R)	5	0
FLAVANONES 	Naringenin	5,7,4'-trihydroxyflavonone	0	0
	Hesperitin	5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavonone	4 (± 2.5)	0
ISOFLAVONES 	Genistein	5,7,4'-trihydroxyisoflavone	22 (± 9.5)	NQ
	Daidzein	4',7'-dihydroxyisoflavone	14 (± 2.1)	0
CHALCONES 	Phloretin	4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone	19 (± 2.8)	0
	Phloridzin	4,4',6'-trihydroxy-2'-glucoside	19 (± 0.7)	0
STILBENES 	<i>trans</i> -Resveratrol	1,3,4'-trihydroxystilbene	26 ⁺ (± 2.1)	0
	<i>trans</i> -Piceatannol	1,3,3',4'-tetrahydroxystilbene	23 ⁺ (± 6.4)	0

Flavanoidlerle ilgili yapılan diğ er bir çalışmada, kanserin  onlenmesi için hedeflenen topoizomeraz enzimlerinin inhibisyonunda, apigenin, ATRA (A vitamini), bosvellik asid, genistein, luteolin ve kersetin 1'den 200  M'a kadar aktif bulunmuş ve IC₅₀ değerleri 30 mM'dan fazla olarak gösterilmiştir. Bosvellik asid ve ATRA, 1 ve 10  M konsantrasyonda da etki göstermiştir. Bu bileşikler diğ er mekanizmalar yoluyla da kanser inhibisyonu yapmış ve daha az konsantrasyonlarda kullanılmışlardır. Sonuçta, bu bileşiklerden herhangi biri için in vivo'da topoizomeraz inhibisyonu öncelikli yöntem olarak gösterilmemiştir (**Boik, 2001**).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyallerinin Toplandığı Lokasyonlar

Malatya'dan *Alkanna hirsutissima*, Antalya'dan *Alkanna orientalis* spp *leucantha*, Rize Cimil'den *Alkanna cordifolia*, Denizli ve iç Ege Bölgesinden *Alkanna tubulosa* ile Ödemiş'ten toplanan *Alkanna tinctoria* türlerinin ayrıntılı lokasyonları aşağıda verilmiştir. Toplanan *Alkanna* türleri Ege Üniversitesi Botanik Bahçesi & Herbaryum Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, Ar. Gör. Serdar G. Şenol tarafından teşhis edilmiştir.

Herbaryum Kaydı	<i>A. tubulosa</i> Boiss. (Endemic-LR(lc))
Herbaryum No: EGE 3150 Lokaliite: C2 Denizli: Cankurtaran tepesi, Denizli'den Cankurtaran'a 5 km, bozkır. Habitat: Çam ağaçları, kireçtaşı meyilli, bozkır, steppe, phrygana, sürülmüş alanlar, 400-1900 m Yükseklik: 700–800 m Tarih: 15.06.2004 Leg.: S. G. ŞENOL Det.: S. G. ŞENOL	

Şekil 3.1. *A. tubulosa* herbaryum kaydı

Herbaryum Kaydı	<i>A. orientalis</i> (L.) Boiss. var. <i>leucantha</i> (Bornm.)Hub.-Mor. (Endemic- LR(cd))
Herbaryum No: EGE 2900 Lokaliite: C2 Antalya: Akdağ, Elmalı üstü, kireçtaşı, taşlı yerler Habitat: Taşlı yerler, bozkır, sl.-2450 m. Yükseklik: 1700–1900 m Tarih: Leg.: S. G. ŞENOL Det.: S. G. ŞENOL	

Şekil 3.2. *A. orientalis* herbaryum kaydı

Herbaryum Kaydı	A. hirsutissima (Bertol.)
Herbaryum No: EGE 2948 Lokale: B6 Malatya: Malatya, Dilek Belediyesi Habitat: Kuru, taşlı, eğimli, bozkır, mısır tarlası, üzüm bağları, 300-1000 m. Yükseklik: 700-900 m, Tarih: 02.08.2005 Leg.: S. G. ŞENOL Det.: S. G. ŞENOL	

Şekil 3.3. *A. hirsutissima* herbaryum kaydı

Herbaryum Kaydı	<i>A. tinctoria</i> (L.) Tausch subsp. <i>Tinctoria</i>
Herbaryum No: EGE 2820 Lokale: B1 İzmir: Bozdağ, Sardes üstü, Kırkoluk çeşmesi, şist üzeri Habitat: Kuru, taşlı, kumlu yerler, bozkır, maki, meşe ağaçları, sl.-800 m. Yükseklik: 800 m, Tarih: 10.04.2005 Leg.: S. G. ŞENOL Det.: S. G. ŞENOL	

Şekil 3.4. *A. Tinctoria* herbaryum kaydı

Herbaryum Kaydı:	<i>A. cordifolia</i> C. Koch (Endemic-LR(lc))
Herbaryum No: EGE 40727 Lokaliye: A8 Rize: Cimil Vadisi, yüksek dağ yayırları, çakıllı yamaçlar. Habitat: Kuru, taşlı yerler, 500–2000 m. Yükseklik: 1800–1900 m Tarih: 02.07.2005 Leg.: S. G. ŞENOL Det.: S. G. ŞENOL	

Şekil 3.5. *A. cordifolia* herbaryum kaydı

<i>A. cordifolia</i> C. Koch	<i>A. cordifolia</i> C. Koch
	

Şekil 3.6. *A. cordifolia* C. Koch ve Rize Cimil Vadisi (Kaçkarların Batı Ucu).

3.1.2. Test Edilen Bitki Materyalleri

1. *Alkanna hirsutissima* (kök+gövde)
2. *Alkanna orientalis* spp *leucantha* (kök+gövde)
3. *Alkanna cordifolia* (kök+gövde)
4. *Alkanna tubulosa* (kök+gövde)
5. *Alkanna tinctoria* (kök+gövde)

3.1.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon İçin Kullanılan Materyaller

3.1.3.1. Kromatografi Yöntemleri

İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K.): Kromatografik analiz yöntemlerinin tüm kontrollerinde normal faz silika jel kaplı hazır plaklar kullanılmıştır.

Kromatografi tankı: Camag, 22 x 23 x 8 cm

Adsorban: Silika Jel (Alüminyum folyo, hazır plak, Kiesegel 60 F₂₅₄, 0.2 mm, Merck, Art.5554)

Solvan sistemleri: n-Hekzan:Etilasetat (8:2)

Tatbikler: Pastör pipeti ile plağın alt ucunun 1-1.5 cm yukarısından 0.7 cm ara ile yapılmıştır.

Sürüklenme mesafesi: 7–9 cm.

Lekelerin Belirlenmesi: Plaklara, UV 254 ve 366 nm Camag UV lambası altında bakılarak UV aktif bantlar işaretlenerek belirlenmiştir. Daha sonra sülfürik asidin sudaki %20'lik çözeltisi püskürtülmüş, ardından 5–10 dakika 105–110 °C'de ısıtılarak lekeler belirlenmiştir.

İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K.): Aktivite gösteren ekstrelerde ve fraksiyonlarda bileşenlerin saptanması ve kromatografik ayrımlar için gerekli solvan sistemlerinin saptanması amacı ile İnce Tabaka Kromatografisi kullanılmıştır. Solvan sistemi olarak Hekzan:EtOAc (8:2) en uygun sistem olarak tespit edilmiştir. Silika veya RP İ.T.K. plaklarının iyi yürüme için sağ ve sol alt uçları makas ile kütleştirildikten sonra solvan sistemini içeren tanka bırakılmıştır. Plaklar tanktan alındıktan sonra kurutma makinesi ile kurutulup, 254 (sol işaretleme) ve 366 nm (sağ işaretleme) dalga boyunda incelenerek, floresan altındaki UV aktif olan bantlar işaretlenmiştir. İşaretlenen bantların belirlenebilmesi için plak, %20'lik H₂SO₄ (sülfürik asid) çözeltisi ile muamele edilip, asidinin fazlası peçete ile alındıktan sonra, ısıtıcının sıcaklığı 105-110°C'ye getirilerek, plak üzerinde renk belirinceye kadar (2–10 dakika) ısıtılmıştır.

3.1.3.2. Preparatif Ayırma Yöntemleri

Açık Kolon Kromatografisi: Ekstraksiyon sonrası İ.T.K. ile saptanan aktif bileşiklerin ön fraksiyonlama ve izolasyon aşamalarında normal faz silika jel ile doldurulmuş klasik açık kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. Fraksiyonlar, ön fraksiyonlama işlemlerinde 9-12 ml, toplanmış ve kontrolleri İ.T.K ile yapılmıştır.

Dolgu Materyali: Silika jel (Kieselgel 60, 70–230 mesh, Merck), Sephadex LH20

Solvan Sistemleri: Hekzan, Hekzan:Dietileter, Dietileter, EtOAc, Kloroform, Kloroform:Metanol, Metanol ve Su (H₂O)

Solvan sistemi oranları izolasyon işlemlerinde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Silika Jel Kolonun Hazırlanması: Yeterli miktarda solvan sistemi ile silika jel süspanse hale getirilmiş ve karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Adsorbanın üzerinde, birkaç mm yükseklikte solvan kalıncaya kadar akıtılmıştır.

Numune Tatbiki: Numune yeterli miktarda solvan içinde ultrasonik banyoda çözülerek pastör pipeti yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Madde tatbik edildikten sonra kolonun üzerine, yüzeyin bozulmasını önlemek için pamuk yerleştirilmiştir.

Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK): Bu yöntem çalışmamızda, ön fraksiyonlama ve izolasyon aşamalarında yararlanılan çok kullanışlı ve basit bir methodtur. Ekipman olarak, alt ucu G4 filtreli bir cam kolon, tabanı kesik bir nuçe erleni ve bir vakum pompasından ibaret ucuz ve basit bir sistemdir. Bu yöntemin avantajı, kullanılan solvan miktarının düşük olması nedeni ile maliyetin düşmesi ve hızlı ayırım imkanı sunmasıdır. VSK ile gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızda, adsorban olarak karışıt faz silika jel (LiChroprep C–18) materyali kullanılmıştır (25g RP, kolon boyutu 3x30cm). Bu yöntemle, elüsyona su ile başlanmış, %20, %40, %60, %70, %80, %90 MeOH:H₂O, %100 MeOH, %100 aseton, %100

kloroform ve %100 hekzan içeren solvan veya solvan karışımları ile devam edilerek fraksiyonlar toplanmıştır.

Kolonun Hazırlanması (karşıt faz materyal için): Kolon adsorban ile doldurularak, vibratör ile sıkıştırılmıştır. Yeterli miktar metanol kolondan geçirilerek adsorbanın doygunluğu sağlanmış, şartlandırma ise su ile yapılmıştır.

Numune Tatbiki: Numune, yeterli miktarda MeOH: H₂O karışımı içinde ultrasonik banyoda çözülerek, bir pipet yardımı ile kolona tatbik edilmiştir. Kolonun üzerine de yüzeyin bozulmasını önlemek için pamuk yerleştirilmiştir.

Fraksiyon Miktarı: Fraksiyonlar 50–75 ml olacak şekilde toplanmıştır.

Flash Kromatografi: Çalışmamızın ileri aşamalarında kullanılan bu yöntemde ekstraksiyon veya fraksiyon, daha önce hekzan ile şartlandırılmış olan Flash Kromatografi hazır kolonlarına (25 m-silika jel) tatbik edildikten sonra, solvan sistemleri ile gradient uygulanarak, tam otomatik olan sistemde fraksiyon toplayıcı ile gerçekleştirilmiştir. Her bir fraksiyon 9 ml olacak şekilde toplama yapılmıştır.

3.1.3.3. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Sırasında Kullanılan Teknik Donanımlar

- Liyofilizatör: Christ-ALPHA 1-4 LD
- Rotavapor: Heidolph Laborota 4001
- Ultrasonik Banyo: Ultrasonic LC30
- UV Lambası: CAMAG
- Vakum Pompası: Welch 2511

- Flash kromatografi: Biotage SP-2
- Öğütücü (karıştırıcı):
- Hassas tartı:
- Isıtıcı:
- Yürütme tankları
- Cam aletler (erlen, beher, ayırma hunileri, balon, balon joje, pipetler, mezür).

3.1.3.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlama Sırasında Kullanılan Çözümler

- Metanol, etanol, hekzan, etil asetat, kloroform, aseton, tersiyer butanol (Merck, Sigma, Panreac) ve distile su.

3.1.4. *Alkanna* Türleri Ekstre ve Fraksiyonlarının Hücre Kültürü'nde Sitotoksik Aktivite Testleri İçin Kullanılan Materyaller

3.1.4.1. Hücre Hatları

1. PC-3, (insan prostat adenokarcinoma)
2. DU-145 (insan prostat karsinom)
3. SK-BR-3 ((insan meme adenokarcinoma)
4. MDA-MB-231 (insan meme adenokarcinoma).
5. K-562 (human kronik myeloid lösemi),
6. MCF-7 (insan meme adenokarcinoma)
7. Hep-3B (insan karaciğer karcinoma),
8. SaOs2 (insan osteosarkoma),
9. HL-60 (insan promyelositik lösemi),

10. L929 (fare bağı dokusu fibroblast),

11. Vero (afrikalı yeşil maymun böbrek fibroblast)

Günlük kullanımdaki hücreler, teknisyen hataları, değişken çevre şartları, besi ortamları, saklama koşulları, kontaminasyonlar gibi nedenlerle özelliklerini değiştirebilir veya kullanılmaz hale gelebilirler. Hücre dizileri, homojen sonuç ve verimliliği arttırmak için hücre kültürlerini güvenle stoklayan hücre kültür koleksiyonuna sahip hücre bankalarından alınmıştır. Bunlar; Vero (monkey kidney primary cells), K-562 (human chronic myeloid leukemia), MCF-7 (), Hep-3B, SaOs2, HL-60 (), L929 hücre hatları Şap Enstitüsü (HUKUK cell bank) Ankara'dan ve PC-3, DU-145, MDA-MB-231 (), SK-BR-3 (human breast adenocarcinoma) and MDA-MB-231 hücre hattının elde edildiği Dokuz Eylül Üniversitesi'nden alınmıştır. Bunların dışında, American Type Culture Collection, PO Box 1549, A.B.D (ATCC) ile (ECACC) European Collection of Cell Cultures, CAMR (Centre for Applied Microbiology & Research), Salisbury, Wiltshire SP4, UK'dir.

3.1.4.2. Hücre Kültürü Sarf Malzemeleri ve Teknik Donanımları

Monolayer materyal

1. Steril pipetler
2. Steril besi ortamı (DMEM veya RPMI, %10 fetal dana serumlu, %1 L.glutamin, %1 penisilin streptomisin)
3. Steril PBS (Ca^{2+} - Mg^{2+} içermeyen fosfat buffer salin)
4. Steril 37°C ye ısıtılmış enzim solüsyonu (ör.: %0.25 tripsin sol. Ca^{2+} - Mg^{2+} 'suz PBS içerisinde) ve steril kimyasal ajan solüsyonu (%0.2 EDTA (Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit) sol. Ca^{2+} - Mg^{2+} 'suz PBS içerisinde)

5. Hücre kültür kapları
6. Üremiş monolayer hücre kültürü
7. 96 kuyucuklu plate
8. Etüv
9. Santrifüj
10. Laminar akışlı kabin

Tablo. 3.1. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Vasat Miktarları

Vasat miktarı	Hacim
5 ml	25cm ²
25 ml	75cm ²
50 ml	150cm ²
1-1,5 ml/göz	24 gözlü plate
100–150 µL/göz	96 gözlü plate
2 ml	Hücre kültürü petrisi (35 mm çapında)

3.1.5. Alkana Ekstre ve Fraksiyonlarının Topoizomerez I Enzimi İnhibisyonu Testleri İçin Kullanılan Materyaller

3.1.5.1. Kimyasallar (tampon ve çözenler)

1. 10X DNA Topo I Buffer 1mL (Takara)
2. %0,1 BSA 1 mL (Takara)
3. dH₂O
4. 0.5 µg süper sarmal (sc) pBR322 (TAKARA, Otsu-Shiga, JA)
5. sc pBR322 DNA 0,5 µg/µL, 100 µg, Fermentas
6. 1 ünite sığır timusu DNA topoizomerez I (Takara)
7. 0,5 µg etidyum bromit
8. Agaroz

9. Bromofenol mavisi (Fermentas, 6X Loading Dye Solution, 1 ml)
10. TBE tampon çözeltisi (Tris borat ve pH: 8,0'de 1 mM EDTA)
11. Metanol
12. DMSO

3.1.5.2. Teknik Donanımlar

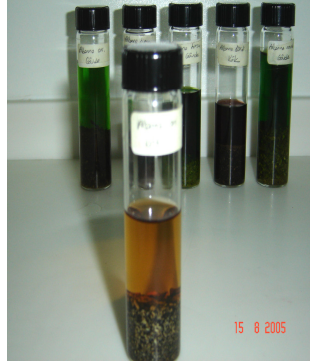
1. DNase içermeyen 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
2. Mikropipet : Thermoelectron Finnpiet
3. Santrifüj aleti : Hettich Zentrifugen, Spectrafuge-Labnet
4. İnkübatör : Thermoshake- Gerhardt laboshake
5. Elektroforez cihazı : Thermo EC250 (5 V/cm)
6. UV foto görüntüleme: Vilber. Lourmat UV
7. Çalkalayıcı : Janke-Kunkal KS 501D
8. Isıtıcı : Lab-Line Multiblok Heater 30 C
9. Fırın : Ariston

3.2. Metodlar

3.2.1. *Alkanna* türlerinden Ham Ekstraktların Hazırlanması

* Karıştırıcıda öğütölerek toz haline getirilmiş bitki materyallerinin kök ve gövde bölümlerinden 3'er gr alınarak farklı polaritede 4 çözgen ile (Hekzan, Diklorometan, Metanol ve Su) ultrasonik banyo kullanılarak oda sıcaklığında 30 dakika ekstraksiyonları yapılmıştır (Şekil 3.17). Ekstrelerin İ.T.K profillerine göre ekstraksiyon için uygun çözücü olarak metanol belirlendikten sonra büyük ölçekli ekstraksiyon işlemine geçilmiştir. Burada ilk işlem olarak toplam beş türün gövde ve köklerinin un haline

getirilmesinden sonra 2-3 gr alınarak %100 metanolde yine ultrasonik banyo ile ekstraksiyonları yapılmıştır. Ekstraksiyon çözgeni rotavaporda uçurulduktan sonra toplam on numune liyofilize edilerek ışık almayan yerde saklanmıştır.



Şekil. 3.7. *Alkanna* türleri ham ekstreleri

3.2.2. Aktif Sitotoksik Bileşenlerin Fraksiyonlanması

* *Alkanna* türleri ham ekstrelerinin yapılan hücre kültürü sitotoksik aktivite ön tarama işlemleri ve DNA topoizomeras I enzimi inhibisyonu aktivitesi ışığı altında, aktiviteden sorumlu öncü bileşiklerin tayini için *Alkanna cordifolia* C. Koch türünün ileri fraksiyonlamasına gidilmiştir. Çalışma, solvan ekstraksiyonu, İnce Tabaka Kromatografisi, Açık Kolon Kromatografisi (Silika jel; sephadex LH-20; RP), Vakum Sıvı Kromatografisi (VSK), Flash Kromatografi ve Size Exclusion yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kromatografik sistemler içinde hangi adsorbanın [Silika jel, RP-C(18)] ve hangi çözgen sisteminin eluent olarak kullanılacağına küçük ölçekli ön denemeler yapılarak karar verilmiştir.

* *Alkanna cordifolia* C. Koch türünün kurutulmuş olan kökleri öğütücü ile toz haline getirildi. Toplam olarak 442,55 gr öğütülmüş kök elde edildi. Bunun 8,66 gr'ının metanol-kloroform (1:1) karışımı ile sonikatörde 35 °C sıcaklıkta 4 saat süreyle ekstraksiyonu yapıldı. Filtrasyon sonrası, ekstrenin rotavaporda 45 °C 'de çözgeninin uzaklaştırılmasının ardından liyofilize edilen materyal, hassas tartıda 181,4 mg olarak tartıldı. Elde edilen 181,4 mg ham ekstre, Vakum Sıvı Kromatografisi yöntemi kullanılarak fraksiyonlandı. VSK ile gerçekleştirdiğimiz çalışmalarımızda, adsorban olarak karışıt faz silika jel (LiChroprep C-18) materyali kullanıldı (25g RP, kolon boyutu 3x30cm). Bu yöntemle, elüsyona su ile başlanarak, %20, %40, %60, %70, %80, %90 MeOH:H₂O, %100 MeOH, %100 aseton, %100 kloroform ve %100 hekzan içeren solvan veya solvan karışımları ile devam edilerek buradan, 50–75 ml hacimde olacak şekilde toplam 14 fraksiyon toplandı. 13 dışındakilerin hepsi hücre kültürü sitotoksik aktivite testine verildi. RP5, RP6, RP7 ve RP8 olarak adlandırılan fraksiyonlar, DNA topoizomera I enzimi inhibisyonu testinde yer aldı.

* Geriye kalan 433,89 g lık öğütülmüş kuru kökün %100 metanol ile oda sıcaklığında önce sonifikasyon sonra mikser ile 3 kez 20'şer dakika olmak üzere ekstraksiyonu yapıldı. Ekstre, erlene aktarıldıktan sonra dipte kalan tortu filtre edilip, süzüntü balona alınarak, çözgen rotavaporda 46 °C'de uçuruldu. Ardından liyofilize edilen materyal, hassas tartıda 10,91 gr ham ekstre olarak tartıldı.

* Ekstraksiyon sonrası İ.T.K. ile saptanan aktif bileşiklerin ön fraksiyonlama ve izolasyon aşamalarında normal faz silika jel ile doldurulmuş klasik açık kolon kromatografisinden yararlanılmıştır.

* 10,91 gr ham ekstre olarak elde edilen liyofilize materyalin 294,3 mg'ı silika jel adsorbanı kullanılarak, 128,3 mg'ı Sephadex (LH-20) sabit faz materyali kullanılarak Açık Kolon Kromatografisine uygulandı.

* Silika jel A.K.K'ya uygulanan 294,3 mg ham ekstre metanol ve kloroform içerisinde çözülerek tartılan 40 gr silika jel kolondan sırasıyla %100 hekzan, %50 Hekzan:Dietileter, %100 dietileter, %100 kloroform, %80, %60, Kloroform:Metanol ve %100 metanol'den geçirilerek elüe edildi. Buradan toplam 14 fraksiyon alındı. İ.T.K.'da aktif bileşiklerin bulunduğu düşünülen 4-8 arası fraksiyonlar birleştirilip rotavaporda uçurulduktan sonra liyofilize edildi. DNA topoizomerez I enzimi inhibisyonu testinde; 4-8 arası fraksiyonlar S2 olarak, bitkinin ham ekstresi S1 olarak, kolondan alınan 9 ve 10 numaralı fraksiyonlar da S9 ve S10 olarak yer aldı.

* 30 gr Sephadex LH-20 A.K.K'ya uygulanarak Size Exclusion yapılan 128,3 mg ham ekstre, %100 MeOH ile kolondan elüe edildi. Toplanan 11 fraksiyon, çözgenleri uçurulduktan sonra liyofilize edildi. 2 numaralı fraksiyon, DNA topoizomerez I enzimi inhibisyonu testinde SF2 olarak yer aldı.

* Kalan 10,49 gr'lık ham ekstre, suda süspande edildikten sonra ayırma hunisinde su ile çözüldükten sonra, 600 mL hekzan ile partisonlandı. Aynı işlem iki kez daha tekrarlandıktan sonra hekzan fazları bir kapta, su fazları ise ayrı bir kapta toplandı. Ayırma hunisinden toplanan hekzan fazları rotavaporda 46 °C'de uçurulup, liyofilize edildi. Liyofilize edilen materyal hassas tartıda 1,29 gr olarak tartıldı.

* Ön fraksiyonlama işlemleri sonunda ‘silika jel’in en uygun dolgu materyali olduğu tespit edilmiş ve ekstrenin geri kalan kısmının ölçek büyütülerek kromatografik ayrımında Biotage Flash Kromatografisi’nden yararlanılmasına karar verilmiştir.

* 1,29 gr ham hekzan ekstresi, silika jel içeren hazır kolona (25 m) yüklenmiş ve %100 hekzan, %20 EtoAC, %50 EtoAC, %65 EtoAC, %80 EtoAC, %100 EtoAC, %40 MeOH, %100 MeOH solvan sistemi kullanılarak Biotage Flash Kromatografi sistemi ile fraksiyonlama gerçekleştirildi. İ.T.K profilleri göz önüne alınarak toplanan 500 fraksiyon, 27 grup altında birleştirildi ve rotavaporda çözümleri uzaklaştırıldı. Yapılan sitotoksik tarama çalışmaları sonunda, aktif olduğu belirlenen fraksiyonlardan; Frs: 69-80, Frs: 81-91, Frs: 92-110 ve ham ekstre, DNA topoizomera I enzimi inhibisyonu yeteneklerinin saptanması için test edildi. Liyofilize edilen fraksiyonlar, DNA topoizomera I inhibisyonu testi için etanolde çözülerek, 20 µL hacminde ve 10 µg/mL konsantrasyonda – 20 °C’de saklandı.

3.2.3. Sitotoksik Aktivite Testi

K-562, MCF7, HL 60, SaOs-2, Hep3B kanser hücre hatları ile L929 ve Vero normal hücre hatlarına karşı *A. hirsutissima*, *A. cordifolia*, *A. orientalis*, *A. tubulosa* ve *A. tinctoria* kök ve gövde bölümlerinden elde edilen ekstre ve fraksiyonlar ile 72 saat 37°C’de, 4-32 µg/mL dozlarında hücre kültürü yapıldı.

3.2.3.1. Hücrelerin Üretilmesi

% 10 fetal sığır serumu (Gibco, USA), 100 IU/mL penisilin and 100 lg/mL streptomisin ile RPMI-1640 (Sigma, USA) içinde hücreler 5 mL besi ortamı içinde 75 cm² flaskta (37 °C, % 5 CO₂) üretildi. Kültür kabı soğuk PBS ile yıkandı (4 °C). 500 µL tripsin-EDTA eklenip 5 dakika etüvde bekletildi. 10 mL besi ortamı ile süspanse edildi. 15 mL santrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler 10 mL besi ortamı ile resüspanse edildi. Canlılık ve hücre yoğunluğu tripan mavisini ile belirlendi (900µL hücre+100µL tripan mavisini). Hücreler 6*10⁴ hücre/mL olacak şekilde besi ortamı ile dilüe edildi. Hücreler 100 µL/kuyucuk (her kuyucukta 6.000 hücre olacak biçimde) 96 kuyucuklu plaklara (plate) dağıtıldı. Monolayer kültürler 1 gün etüvde tutunması için inkübasyona bırakıldı (%5 CO₂, 37 °C).

3.2.3.2. MTT solüsyonunun hazırlanması:

MTT stok solüsyon (5 mg/mL): 50 mg MTT, 10mL PBS' te çözdürüldü (Genellikle 50 mL PBS içinde 0,25 gr MTT çözdürülür). 1 mL eppendorf tüplerine dağıtıldı. Tüm bu işlemler karanlıkta yapıldı. Eppendorf tüpler alüminyum folyoya sarılıp, +4 °C buzdolabına kaldırıldı.

MTT Çalışma Solüsyonu (0.5 mg/mL):

MTT stok solüsyon 1:9 oranında besi ortamı ile dilüe edildi.

METOD: Bu hücre proliferasyonu analizi, canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz tarafından tetrazolyum tuzunun 3-(4,5dimetil

tiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromid (MTT, Sigma Chemicals), mavi formazan ürününe dönüşmesine dayalıdır. Bu metodta İşlemlerin tümü karanlıkta yapıldı. Plaklardaki (plate) besi ortamı boşaltıldı. 100µl/kuyucuk MTT çalışma solüsyonu eklendi. 4 saat 37 °C, %5 CO₂ inkübe edildi. Ardından solüsyon boşaltıldı. 200µl DMSO eklenerek oluşan formazan kristalleri çözüldü. Mavi formazan kristalleri miktarı 570–690 nm’de microplate reader (Versamax, Tunable microplate reader, USA) ile okutuldu. Her bir hücre hattı için varolan hücrelerin sayısı ile MTT formazan ürünü miktarı arasında güçlü korelasyon saptandı.

Bu yöntem kullanılarak 5 adet *Alkanna* türünün (*A. tubulosa*, *A. cordifolia*, *A. hirsutissima*, *A. orientalis*, *A. tinctoria*) kök ve gövdelerinin metanol, metanol:kloroform ve hekzan ekstraktları 4-32µg/mL konsantrasyonlarda MTT testine tabii tutuldu (K-562; MCF-7; HL-60; SaOs-2; Hep-3B; L929; Vero). Pozitif kontrol olarak CHX kullanıldı. Ekstreler 1 mg/mL olacak biçimde metanolde çözüldü. Tüm deney gruplarına eşit miktarda ilave edilen metanol miktarı köre de ilave edildi. *A. cordifolia* türünden elde edilen fraksiyonların MTT denemeleri 10 µg/mL konsantrasyonlarda PC-3, DU-145, SK-BR-3 MDA-MB-231 hücrelerine karşı gerçekleştirildi. Pozitif kontrol olarak etopozid (40µM) kullanıldı. Hücre canlılığı $100 \times \frac{A_{\text{treatment}}}{A_{\text{control}}} (\%)$ formülüne göre hesaplanarak, sonuçlar Microsoft Excel Programı’nda istatistiksel açıdan değerlendirildi.

3.2.4. DNA topoizomeraz I inhibisyonu analizi

3.2.4.1. Süper Sarmal Plazmid Gevşeme Analizi:

Öncelikle 1,5 mL ependorf tüpü içine *A. cordifolia*'nın metanol veya etanolde çözölmüş olan 10 µG/mL konsantrasyondaki ekstresi metanol veya DMSO ile 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 oranlarında dilüe edildi. Bunun üzerine DNA topoizomeraz I inhibisyonu reaksiyon karışimleri hazırlandı.

20 µL olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımında, ekstre miktarı reaksiyon karışımının 1/10'unu oluşturmaktadır. Bundan sonra öncelikle, ependorf tüp içinde substrat solüsyonu hazırlandı. -20 °C 'de saklanan plazmid DNA ve tampon çözeltileri önce ısıtılarak buzdan çözölmeleri sağlandı. Ependorf tüpte bulunan ekstrenin üzerine eklenen substrat solüsyonu, 2 µL 10X Topo I buffer (35 mM Tris-HCl, (pH: 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5mM DTT, 5 mM spermidin) ve 2 µL %0,1 BSA, 12 µL dH₂O ve 1 µL 0.5 µg süper sarmal (sc) pBR322 (TAKARA, Otsu-Shiga, JA) DNA'sından oluşturuldu. Bu noktada mikropipet ile iyi karışma için arka arkaya pipetaj yapıldı. En son olarak DNA topo I enzimi eklendi. -20 °C 'den alınarak, ısıtıcı üzerinde 1 dakika kadar buzunun çözölmeleri beklendi. Burada amaç, enzimin önceden konularak dekompoze ve denatüre olmasını önlemektir. Bu karışımın üzerine eklenmek üzere hazırlanan enzim solüsyonunda da aynı şekilde 2 µL 10 X Topo I buffer (35 mM Tris-HCl, (pH: 8.0), 72 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5mM DTT, 5 mM spermidin) ve 2 µL %0,1 BSA kullanılırken farklı olarak 15 µL dH₂O ve 1 ünite dana timus DNA topoizomeraz I kullanıldı. Yeniden tampon eklenmesinin sebebi, mümkün olabilecek pipetaj hatalarını azaltmak ve

enzimin stabilizasyonunu ve pH dengesini sağlamaktı. Bu noktada enzimden dolayı mümkün olduğunca hızlı ve hassas olarak buz üzerinde çalışıldı. Tekrar dikkatlice pipetaj yapıldı. İyi karışım için 1000 rpm’de 5 saniye santrifüj yapıldı. Hazır olan reaksiyon karışımı DNase içermeyen 1,5 mL mikrosantrifüj tüpleri içine koyuldu ve 37 °C inkübatöre 30 dakika beklendi.

3.2.4.2. Jel Elektroforezi

İnkübatörden alınan reaksiyon tüplerinden her biri içine agaroz jel üzerinde elektrik akımlı ortamda DNA bantlarının fotoğraf filminde görünür olmasını sağlayan 6 µL bromofenol mavisi (Fermentas, 6X Loading Dye Solution, 1 ml) eklendi. Boya ile reaksiyon karışımının homojen dağılımı için parmakla palpasyonu ardından 1000 rpm’de 5 -6 saniye santrifüjü yapıldı. 45 mM Tris borat ve pH: 8,0’de 1 mM EDTA içeren TBE tampon çözeltisinden %1 agaroz jel hazırlandı. Bu amaçla, 20 örnek için; 1 gr agaroz, 100 mL tampon çözelti içinde karıştırıldıktan sonra 100 °C fırında 15 dakika kaynatılarak 40 °C’ye kadar soğuması beklendi.. Daha sonra jel elektroforez kasalarına döküldü ve taraklarla örnek sayısı kadar kuyucuk açıldı. Reaksiyon tüplerinden her biri içine 6 µL bromofenol mavisi eklenerek toplam karışım 26 µL yapıldı ve elektroforez kasalarına her örnek hacminden sabit olmak üzere mikropipet ile 10 µL alınarak hassas bir şekilde kuyucuklara yüklendi. DNA gevşeme ürünlerinin dikey elektroforez (5 V/cm) (Thermo EC250) cihazında 100 veya 120 voltta serbest akımda yaklaşık olarak 120–180 dakika sürede ayrılması sağlandı.

3.2.4.3. Jellerin Boyanması

Elektroforez işleminden sonra tanktan alınan jelin gevşeme ürünlerinin boyanması için bir kap içinde 6 μL etidyum bromit (EtBr) boyası (0.5 $\mu\text{g/mL}$), 200 mL saf suya eklendi. Jel, kabın içine dikkatlice yerleştirilerek (kırılmadan) boyanın homojen dağılımı için 30 dakika çalkalayıcıya bırakıldı. Daha sonra alınan jelin üzerindeki fazla boyanın uzaklaştırılması için (fotoğraf filmi çekilirken parlama yapmaması için) jel yeniden saf su ile çalkalandı.

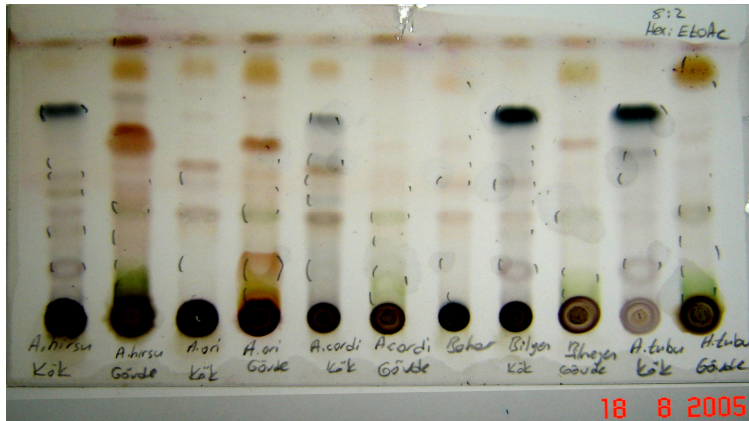
3.2.4.4. Jellerin Görüntülenmesi

Fluoresan ışıktaki görünür olmasını sağlayan Etidyum bromit ile boyanmış jeller ultraviyole ışık altında görünür hale getirildi. Daha sonra fotoğrafları jel görüntüleme sistemi ile çekilerek kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1. *Alkanna* Türleri Ham Ekstreleri İnce Tabaka Kromatografisi Ön Taramaları

Çalışılan *Alkanna* türlerinde (*A. tubulosa*, *A. cordifolia*, *A. hirsutissima*, *A. tinctoria*, *A. orientalis*) aktivite gösteren ekstre ve fraksiyonlarda bileşenlerin saptanması ve kromatografik ayırmalar için gerekli solvan sistemlerinin saptanması amacı ile gerçekleştirilen İnce Tabaka Kromatografisi ön tarama profilleri biyoaktivite rehberli izolasyon için göz önüne alınmıştır. *Alkanna* türleri metanolik ekstreleri İ.T.K profilleri Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Ekstrelerin İ.T.K profillerine göre ekstraksiyon için uygun çözücü olarak metanol belirlenmiştir.



Şekil 4.1. *Alkanna* türleri ön İ.T.K taramaları. Soldan sağa: 1 *A.hirsutissima* kök 2. *A.hirsutissima* gövde, 3. *A.orientalis* (kök), 4. *A.orientalis* (gövde), 5. *A.cordifolia* (kök), 6. *A. cordifolia* (body), 7,8,9 bilinmeyen, 10. *A. tubulosa* (kök), 11. *A. tubulosa* (gövde).

4.2. *Alkanna* Türlerinin Çeşitli Tümör Hücre Hatlarına Karşı İnhibisyon Aktivitesi

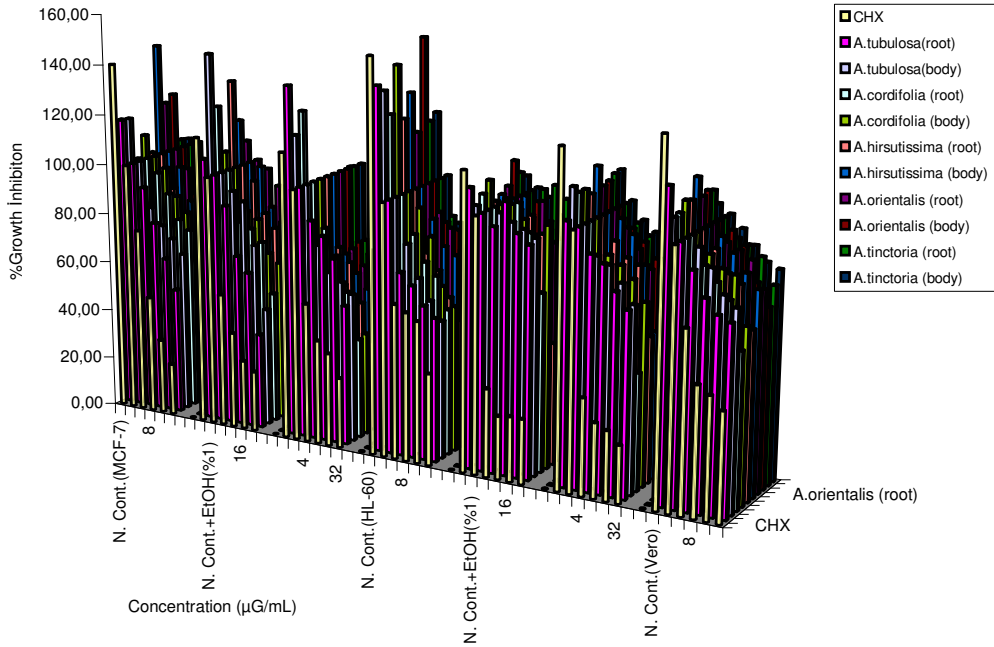
Sitotoksik Aktivite Bulguları: Sitotoksikite çalışmaları, bu proje kapsamında yürütülen başka bir tezin konusunu oluşturduğu için ayrıntıya girilmeden Bölüm 4.2’de bu sonuçlar tablo ve grafik olarak bütünlüğün sağlanması açısından sunulmuştur.

5 kanser hücre hattı (K-562, MCF-7, HL-60, SaOs-2, Hep-3B) ve 2 normal hücre hattı (L929, Vero), 72 saat 37⁰C’de, 4–32 µG/mL dozlarında, *Alkanna* türleri kök ve gövde ekstraktları ile muamele edilmiştir. Doz bağımlı olarak sitotoksik aktivite gözlenmiştir (Tablo 4.1).

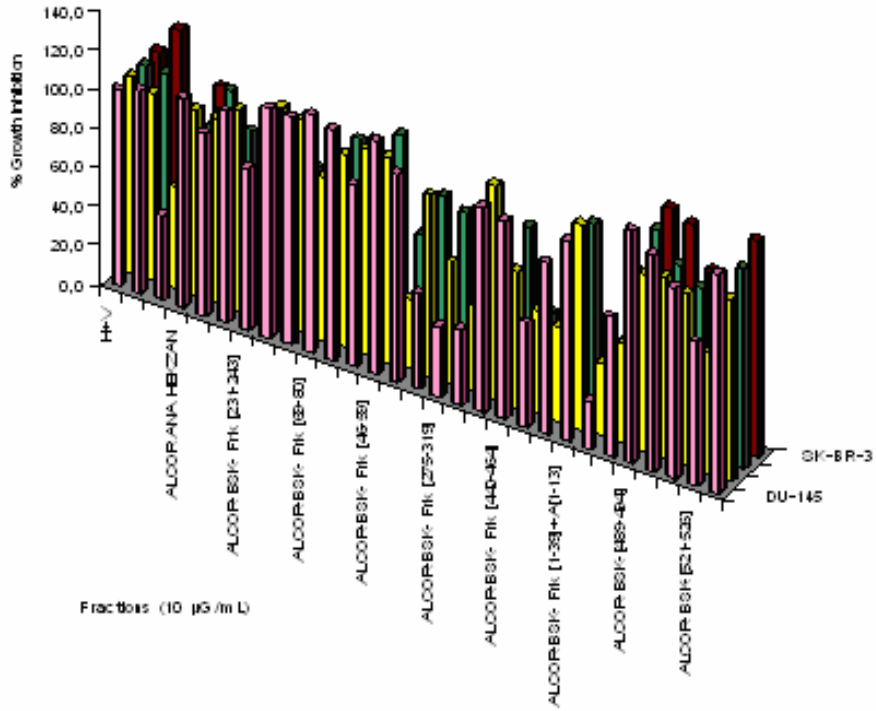
Tablo 4.1. Çeşitli kanser hücre hatlarına karşı *Alkanna* ekstresinin antiproliferasyon etkisi (NT: test edilmemiş) **IC₅₀ (µG/mL) Değerleri**

Türler	<i>K-562</i>	<i>MCF-7</i>	<i>HL-60</i>	<i>SaOs-2</i>	<i>Hep-3B</i>	<i>L929</i>	<i>Vero</i>
<i>A.tubulosa</i> (kök)	32	8	>32	>32	>32	>32	>32
<i>A.tubulosa</i> (gövde)	NT	>32	>32	>32	>32	>32	>32
<i>A.cordifolia</i> (kök)	32	>32	>32	32	>32	32	>32
<i>A.cordifolia</i> (gövde)	>32	>32	>32	32	>32	>32	>32
<i>A.hirsutissima</i> (kök)	>32	16	32	32	>32	>32	>32
<i>A.hirsutissima</i> (gövde)	NT	>32	>32	32	>32	>32	>32
<i>A.orientalis</i> (kök)	NT	>32	>32	>32	>32	>32	>32
<i>A.orientalis</i> (gövde)	>32	32	>32	>32	>32	>32	>32
<i>A.tinctoria</i> (kök)	>32	32	>32	32	>32	>32	>32
<i>A.tinctoria</i> (gövde)	>32	>32	>32	32	>32	>32	>32

MCF-7; 8 $\mu\text{G/mL}$ değeri ile duyarlı bir hücre hattı olarak görülmüştür. Diğer hücrelerin IC_{50} değerleri, 16–32 $\mu\text{G/mL}$ arasında değişmektedir. L929 ve Vero hücre hattında 32 $\mu\text{G/mL}$ 'den yüksek IC_{50} değeri bulunmuştur. Bu noktada, *Alkanna* türleri nontümör hücre hatlarına sitotoksik değildir. *Alkanna* türlerinin gövde kısımları, 32 $\mu\text{G/mL}$ 'de tüm hücre hatlarına karşı sitotoksik etki göstermemiştir (Şekil 4.2). *A. cordifolia* köklerinin hekzan ekstresi Flash kromatografi'den toplanan 27 altfraksiyondan 8'i, önemli sitotoksikite göstermiştir. DU-145, MDA-MB-231, PC-3, SK-BR-3.A hücre hatlarına karşı IC_{50} değerleri 1 ve 10 $\mu\text{G/mL}$ arasında bulunmuştur (Şekil 4.3).



Grafik 4.1. K-562, MCF-7, Hep-3B, SaOs2, HL-60, PC-3, DU-145, MDA-MB-231, SK-BR-3, L929, Vero hücre hatlarına karşı *Alkanna* türlerinin IC_{50} değerleri.



Grafik 4.2. Flash kromatografiden elde edilen 111–120 ve 336–403 arası alt fraksiyonların DU–145, PC–3, SK-BR- 3, MDA-MB–231 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitesi (Pembe: DU-145; Sarı: MDA-MB-231; Kırmızı: SK-BR3; Yeşil: PC-3 Hücreleri).

Alkanna tubulosa gövdesi ve *Alkanna hirsutissima* gövdesi dışında hücre kültürü ortamında yüksek sitotoksik aktivite gösteren ekstrater numaralandırma sırasıyla:

1-*Alkanna tubulosa* kök

3- *Alkanna cordifolia* kök

4- *Alkanna cordifolia* gövde

9- *Alkanna tinctoria* köklerinin ekstreleri alınarak DNA topoizomeraz I inhibisyonu ile süper sarmal plazmid DNA'sı gevşeme testi yapılmıştır.

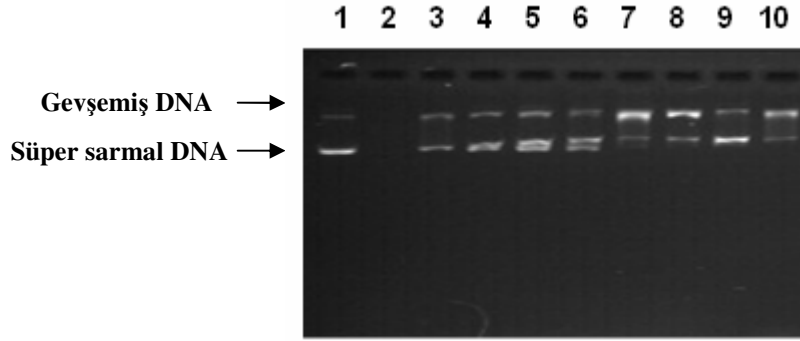
4.3. DNA topoizomeraz I İnhibisyonu Testi

Dört türün de 50 µL hacminde 2 mg/mL konsantrasyonda metanolik ekstrlerinin 25 µL metanol eklenerek dilüsyonları yapılmış ve 1 mg/mL konsantrasyonda ekstreler elde edilmiştir.

4.4. Süper Sarmal Plazmid Gevşeme Testi

Elektroforez sonrası UV ışığı altında gevşeyen DNA ve süper sarmal DNA tarafından verilen floresans miktarı ile DNA'ya bağlanan etidyum bromid arasındaki ilişki, ürün ve substrat olarak karşımıza çıkmıştır. Şekil 4.2'de, enzimin katalitik aktivitesi ile süper sarmal plazmid substratının, gevşeyen ürününe dönüşümü gösterilmiştir. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak süper sarmal substrat ve gevşemiş ürünü rahatlıkla ayırılabilir. Çünkü DNA'nın gevşeyen topolojik izomerleri, süper sarmal türlere göre jel üzerinde daha yavaş hareket etmektedir. Süper sarmal halde olan substrat, gevşeyen ürün ile aynı molekül ağırlığına sahip olmasına rağmen, daha az yüzey-hacim alanı kaplaması dolayısıyla jelde hızlı hareket etmektedir. Sonuç olarak ekstreler tarafından Topoizomeraz I enziminin inhibisyonu en fazla 4 ve 9 numaralı ürünlerde (4- *Alkanna cordifolia* gövde; 9- *Alkanna tinctoria* kök) görülmüştür. Fotoğrafta ilk sıra, enzim içermeyen kontrol, ikinci sıra enzim içeren kontrol (supercoil relaxation), 3-6 arası (3 ve 6 dahil) 2 mg/ml konsantrasyonda olan sırasıyla 1-3-4-9

numaralı ekstrere, 7-10 arası (7 ve 10 dahil) 1 mg/ml konsantrasyonda olan sırasıyla 1-3-4-9 numaralı ekstrere olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.2. *Alkanna* Türlerinin Topoizomeraz Enzimi İnhibisyonu

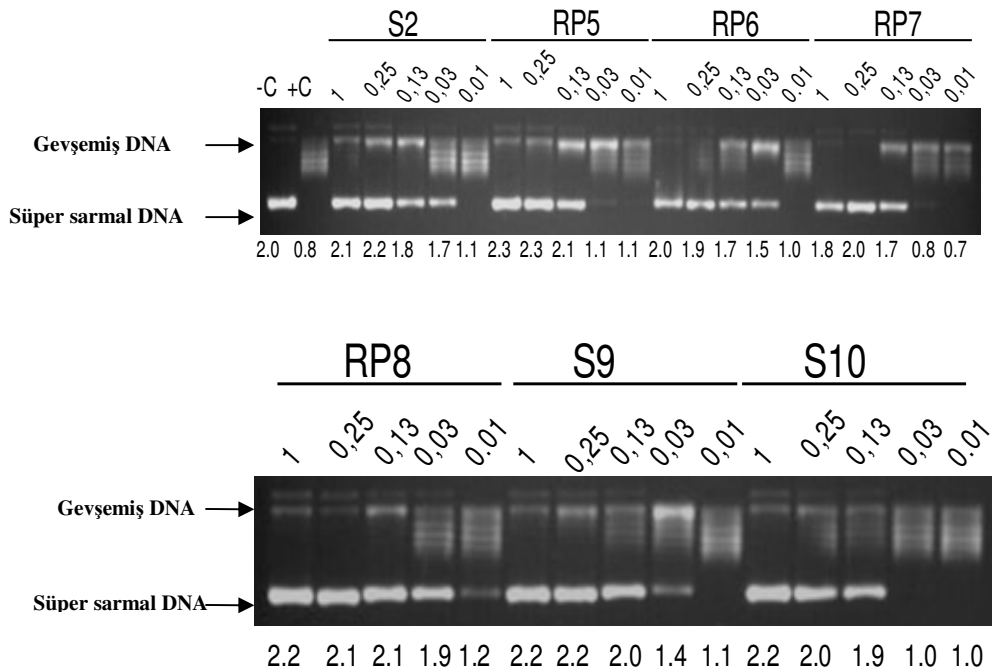
Bununla birlikte ‘Süper Sarmal Plazmid DNA Gevşeme Testi’ çalışması sonucunda 1 mg/mL konsantrasyonda yüksek DNA topoizomeraz I inhibisyonu aktivitesi ve hücre kültüründe 5 kanserli (K-562, MCF-7, HL-60, SaOs-2, Hep-3B) ve 2 normal hücre hattına (L929, Vero) karşı 4–32 µg/mL’ye kadar artan doz oranında yüksek sitotoksik aktivitesi sebebiyle *Alkanna cordifolia* türünün ileri fraksiyonlamasına gidilmiştir.

4.5. *A. cordifolia* Ön Fraksiyonlarının DNA Topoizomeraz I İnhibisyonu

Alkanna cordifolia metanolik ekstresinin ön fraksiyonlaması sırasında silika jel’den alınan S1, S2, S9 ve S10 olarak isimlendirilen fraksiyonlar, RP-C(18)’den alınan RP5, RP6, RP7 ve RP8 fraksiyonları ve Sephadex (LH-20)’den alınan SF2 isimli fraksiyon, metanolde çözölmüş ve 10 µg/ml konsantrasyonunda topoizomeraz I inhibisyonu testi yapılmıştır. S1 ve SF2 fraksiyonları aktif bulunmadığı için çalışmadan çıkarılmış, geriye

kalan silika jel fraksiyonları S2, S9, S10 ile karşıt faz (C-18)'in RP5, RP6, RP7 ve RP8 isimli fraksiyonları DMSO ile bire bir dilüsyonları hazırlanarak her biri için sırayla 1.0, 0.25, 0.13, 0.03 ve 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarda topoizomerez I inhibisyonu taraması yapılmıştır.

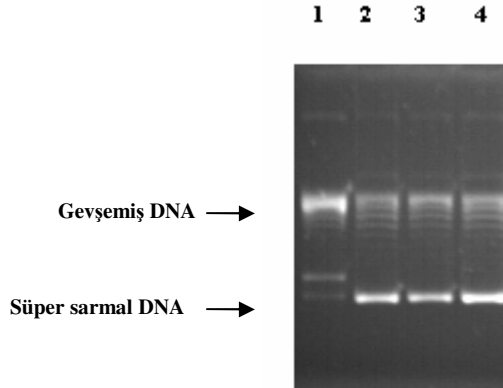
Şekil 4.3'de görüldüğü gibi, 30 ng/mL'de inhibisyon aktivitesi gözlenirken, 10 ng/mL'de bu aktivite kaybolmuştur. Buradan da aktif konsantrasyonun bu aralıkta bulunduğu sonucu çıkarılmıştır.



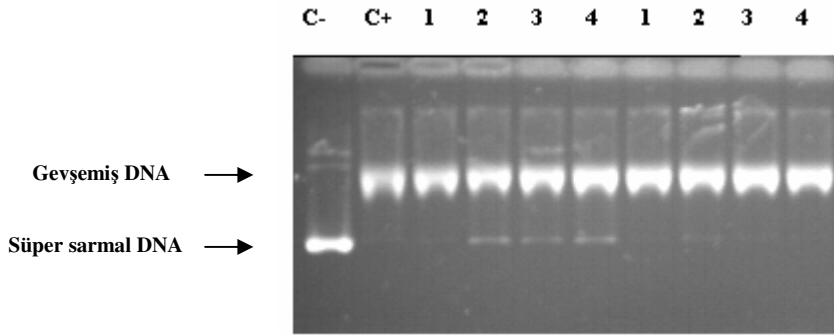
Şekil 4.3. *A.cordifolia* silika jel ve karşıt faz (C-18) fraksiyonlarının Topo I inhibisyonu

4.6. *A. cordifolia* İleri Fraksiyonlarının DNA topoizomerez I İnhibisyonu

Flash Kromatografiden alınan *A. cordifolia* hekzan ekstresi fraksiyonları; **1:** Frs. 69-80; **2:** Frs. 81-91; **3:** Frs. 92-110; **4:** hekzan ekstresi, etanolde çözülmüş ve 20 µL hacimde ve 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. 1, 2, 3 ve 4 numaralı fraksiyonların her biri DMSO ile yapılan dilüsyonlar sonucunda 0,1 µg/mL (Şekil 4.4); 0,01 ve 0,001 µg/mL konsantrasyonlarda (Şekil 4.5) hazırlanarak test edilmiştir. DNA topoizomerez I inhibisyonu sonucu olarak, 0,1 µg/mL konsantrasyonda 1 nolu örnek zayıf aktivite gösterirken, diğer fraksiyonların aktivitelerinin 0,01 µg/mL’de sürdüğü fakat 0,001 µg/mL konsantrasyonda kaybolduğu saptanmıştır. Buradan aktif konsantrasyonun 10 ng/mL ile 1 ng/mL arasında bulunduğu sonucuna varılmıştır.



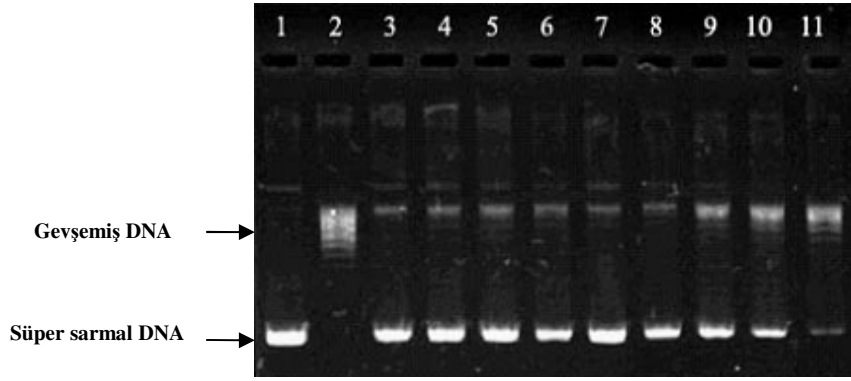
Şekil 4.4. Hekzan ekstraktları (Biotage) DNA topoizomerez I inhibisyonu



Şekil 4.5. Hekzan ekstreleri (Biotage) DNA topoizomerez I inhibisyonu

4.7. Kamptotesin Kullanılarak Yapılan DNA topoizomerez I İnhibisyonu Testi

DNA topoizomerez I inhibisyonu yaptığı bilinen kamptotesin ile oluşturulan karşılaştırma analizinde 1 ünite topoizomerez I enzimi, pBR322 ve değişen konsantrasyonlarda kamptotesin ile yapılan çalışma Şekil. 4.8’de gösterilmektedir. İlk sıra pBR322, ikinci sıra 1 ünite DNA topoizomerez I ile birlikte pBR322, 3–11 arası sıralar ise 1 ünite DNA topoizomerez I ile birlikte pBR322 reaksiyon karışımında 1.0’den 0,0006 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ’ye kadar azalan konsantrasyonlarda kamptotesin içeren örneklerdir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kamptotesin'in DNA topoizomeraz I inhibisyonu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde hızlı ilerleme halinde olan kansere karşı verilen mücadelede, önemli biyoaktif moleküllerin keşfi adına Anadolu'nun gen merkezi olarak gösterilen *Alkanna* türlerinden yeni antitümör özellikteki bileşiklerin hücresel ve moleküler düzeyde etkilerinin geniş çapta araştırılması amacıyla başlatmış olduğumuz TÜBİTAK SBAG-3134 numaralı projemiz kapsamında *Alkanna hirsutissima*, *Alkanna cordifolia*, *Alkanna tubulosa*, *Alkanna orientalis* ve *Alkanna tinctoria* türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Toplanan bitkisel materyallerden hazırlanan ekstreler hücre kültüründe 5 kanser (K-562, MCF-7, HL-60, SaOs-2, Hep-3B) ve 2 normal hücre hattına (L929, Vero) karşı 4-32 µG/mL doz aralığında test edilmiştir. Anlamlı sitotoksik etki gösteren ve Süper Sarmal Plazmid DNA Gevşeme ön taraması sonucunda 1 mg/ml konsantrasyonda DNA topoizomeraz I enzimi inhibisyonu yaptığı saptanan *Alkanna cordifolia* türünün kökleri aktiviteden sorumlu öncü bileşiklerin keşfi için biyoaktivite rehberli izolasyon çalışmalarına alınmıştır.

Alkanna cordifolia metanolik ekstresinin ön fraksiyonlaması sırasında silika jel'den alınan S1, S2, S9 ve S10 olarak isimlendirilen fraksiyonlar, RP-C(18)'den alınan RP5, RP6, RP7 ve RP8 fraksiyonları ve Sephadex (LH-20)'den alınan SF2 isimli fraksiyon, metanolde çözülmüş ve 10 µg/ml konsantrasyonunda topoizomeraz I inhibisyonu testi yapılmıştır. S1 ve SF2 fraksiyonları aktif bulunmadığı için çalışmadan çıkarılmış, geriye kalan silika jel fraksiyonları S2, S9, S10 ile karışıt faz (C-18)'in RP5, RP6,

RP7 ve RP8 isimli fraksiyonları DMSO ile bire bir dilüsyonları hazırlanarak her biri için sırayla 1.0, 0.25, 0.13, 0.03 ve 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarda topoizomerez I inhibisyonu taraması yapılmıştır. 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de inhibisyon aktivitesi gözlenirken, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'de bu aktivite kaybolmuştur. Buradan da aktif konsantrasyonun mililitrede 10 ile 30 nanogram arasında olduğu sonucuna varılmıştır.

A. *cordifolia*'nin ileri fraksiyonlaması (büyük ölçekli fraksiyonlama), normal faz silika jel kullanılarak, Biotage SP-2 Yüksek Performans Flaş Kromatografi'de gerçekleştirilmiştir. Çünkü aktif fraksiyonlar, silika jel ile iyi bir dağılım göstermiştir. Biotage Flaş Kromatografi'den elde edilen toplam 536 fraksiyon İ.T.K. profillerine göre 27 alt fraksiyona ayrılmıştır. 69–80, 81–91, 92–110 arası fraksiyonlar ve hekzan ham ekstresi, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda aktif bulunmuş iken, 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seviyesinde DNA topoizomerez I inhibisyonu gözlenmemiştir. Buradan aktif konsantrasyonun 10 ng/mL ile 1 ng/mL arasında bulunduğu tesbit edilmiştir.

DNA topoizomerez I inhibisyonu yaptığı bilinen kamptotesin ile aynı zamanda karşılaştırma analizi gerçekleştirilmiştir. 1 ünite topoizomerez I enzimi, pBR322 ve değişen konsantrasyonlarda kamptotesin ile yapılan taramada inhibisyonun 0,0006 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'ye kadar indiği saptanmıştır.

Rothenberg'e göre (1997), klinik olarak değerlendirilen tüm topo I inhibitörleri, kamptotesin analoglarıdır.

Liu ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada, kamptotesin'in, topo I enziminin DNA zinciri kırılma/yeniden birleşme reaksiyonunda yeniden birleşme basamağını bloke ederek topo I

inhibisyonu yaptığı ve bunun sonucunda kırılabilir kovalent komplekste akümülyasyon (birikme; stabilizasyon) meydana geldiği bildirilmiştir. Hücre öldürmede kamptotesin'in primer mekanizmasının, ilerleyen replikasyon çatalları ve topo I kırılabilir (ayrılabilir) kompleksleri arasında potansiyel ölümcül ayrılmalar yarattığı ve S fazına spesifik olduğu bulunmuştur.

Jensen ve Sehested'e göre (1997), DNA topoizomera hedefleyen ilaçlar; enzim-DNA ayrılabilir (kırılabilir) kompleksini stabilize ederek DNA kırıklarına yol açan enzim zehirleri ya da DNA kırıklarına sebep olmadan her iki DNA zincirinin de bütün halde kaldığı enzimin katalitik siklusu basamaklarında etki eden katalitik inhibitörlerdir. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda yer alan ekstre ve fraksiyonların, kamptotesinden farklı şekilde, enzim zehiri olarak değil, enzim katalitik aktivitesi inhibisyonu yaptığı düşünölmektedir.

Ray ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptığı bir çalışmaya göre, antikanser aktiviteye sahip bir bisnaftakinon olan diospirin, süper sarmal DNA'nın Mg bağımlı, ATP bağımsız reaksiyonunda, süper döngü gevşeme aktivitesinin tam inhibisyonu, 15 µg/mL diospirin konsantrasyonunda saptanmıştır. Enzim aktivitesinin inhibisyonu, DNA substratının eklenmesinden önce enzimin bileşik ile 5 dakika preinkübasyonu sonucunda daha baskın olmuştur. Doz arttıkça, inhibisyonun arttığı gözlenmiştir. Enzim+DNA+Diospirin eşzamanlı olarak standart analiz karışımına eklendiğinde 1 µg/mL konsantrasyonda %10 inhibisyon bulunmuştur. Süper sarmal DNA substratının eklenmesinden önce, enzim Diospirin ile preinkübe edildiğinde aynı konsantrasyonda %80 inhibisyon bulunmuştur.

Fujii ve arkadaşlarının 1992 yılında yaptıkları bir çalışmada, bitkiden elde edilen naftakinon yapısına sahip plumbagin ve şikonin'in in vitro'da memeli topoizomera II aracılı kırılmayı indüklediği bildirilmiştir. Topo II naftakinon karışımı 65 °C'de DNA kırılmasında azalma yapmıştır. Bu da, bu naftakinonlar tarafından indüklenen topo II aracılı DNA kırılması mekanizmasının kırılabilir kompleks oluşumu ile ilgili olduğunu göstermiştir. Naftakinon yapısına sahip lawson ve lapaşol, topo II aracılı DNA kırılmasını indüklememiştir. DNA açılma testinde; şikonin, lawson ve lapaşol'ün DNA'ya interkalasyon yapmadığı görülürken; plumbagin ve 2-metil-1,4-naftakinon'un (VK3) DNA'ya interkalasyon yaptığı bildirilmiştir. Agaroz jel testi ile plumbagin ve şikonin varlığında süper sarmal DNA'nın kırılarak linear form DNA'nın doz bağımlı arttığı ve görünür olduğu belirtilmiştir. Naftakinonların topo II aracılı DNA kırılma aktivitesinin diğer biyolojik aktivitelerle bağlantılı olup olmadığını anlamak için sitotoksisite ölçümü yapılmış ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Sitotoksisite değerleri %50 inhibitör konsantrasyon olarak plumbagin için 0,26; şikonin için 0,063 ve VK3 için 0,11 µg/mL olarak verilmiştir. Lapaşol ve lawson'un sitotoksik aktivitesi plumbagin'den düşük bulunmuştur (1,4 ve 18,5 µg/mL) (topo II aracılı DNA kırılma aktivitesi 100 µg/mL'den büyük). Topo II aracılı DNA kırılma veya interkalasyon aktivitesi göstermeyen lapaşol ve lawson, önemli antimikrobiyal aktivite göstermiştir (*B. subtilis* ve *P. vulgaris*'e karşı). Topo II aktif ilaçlar plumbagin, şikonin ve VK3, non-topo II aktif ilaçlar lawson ve lapaşol ile karşılaştırıldığında, daha fazla sitotoksik ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sonuç olarak topo II aktif naftakinon yapısına sahip ilaçlar (plumbagin, şikonin ve VK3) arasında, topo II aracılı DNA kırılma aktivitesi kantitatif olarak sitotoksisite ile korelasyona sahip değildir. Bu

noktada, farklı substitüentlere sahip bu bileşiklerin hücrelerde permeabilite ve metabolik inaktivasyonunun farklı olabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmalarımız sırasında ise, farklı olarak topoizomera I enzimi kullanılmış ve ekstrelerde sitotoksikite değerleri 8–32 µg/mL arasında bulunurken, ön fraksiyonlama işlemleri sonunda elde edilen silika jel ve karışık faz fraksiyonlarının 0.03-0.01 µg/µL konsantrasyonda DNA topoizomera I inhibisyonu yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca ileri fraksiyonlama işlemleri sonunda ele geçen sitotoksik aktivitesi yüksek fraksiyonlardan 69–80 düşük DNA topoizomera I inhibisyonu gösterirken, Frs. 81–91, 92–110 ve hekzan ham ekstresi yüksek enzim inhibisyonu göstermiştir. Buradan hareketle, sitotoksik etkinin farklı mekanizmalar ile gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.

Evans'a göre (1999), bitkisel ilacın izole edilen ögesi, aynı bitkisel ilacın ham ekstresi ile aynı klinik cevabı göstermeyebilir. Sıklıkla, toplam terapötik aktivite, tek olan terapötik aktivitelerden daha fazla ya da farklı olmaktadır. Bunun sebebi, ekstrenin kompleks doğasından kaynaklanan sinerjizm veya antagonizmadır. Şu da muhtemeldir ki, bitki ekstresinin önemli biyolojik aktivite gösteren bir fraksiyonu bu aktivite ile bir ögeye sahip olmayabilmekte ya da aktivite göstermeyen bir fraksiyon, hala aktif bir öge içerebilmektedir. Bu bilgiler ile bağlantılı olarak, DNA topoizomera I inhibisyonu çalışmamızda, bitkinin ham ekstresi ve toplanan fraksiyonları arasında fark edilir inhibisyon aktivitesi değişimi gözlenmiştir.

Boik'e göre (2001), çoğu doğal bileşiğin kanser inhibitör etkisi doğrudan DNA hasarı üzerinden değilken, kemoterapi ilaçları için bu oldukça önemli bir mekanizmadır. Bu durumda doğal ürünler, kemoterapi

ilaçlarına göre canlı hücrelerdeki DNA mutasyonlarını daha az olasılıkla indüklemekte (normal hücreleri korurlar) ve daha seçici olarak etkilemektedirler. Doğal ürünlerin tek başlarına kullanımlarından çok kombinasyon halinde kullanılmaları, kanserleşme öncesi oluşumlarda daha iyi performans göstermiştir. Kombinasyon ile oluşan sinerjik etkileşimler, kullanılan her bir bileşiğin daha düşük ve güvenli dozlarda kalmasını sağlamıştır. Çoğu doğrudan etkileyen doğal ürün tek başına kullanıldığında kanser inhibisyonu için aşırı ve güvensiz doz gerektirmiştir.

Doğal ürünlerin, çoğu kemoterapi ilacından ortalama yirmibir kat daha az toksik olduğu ve en toksik doğal ürünün, en toksik kemoterapi ilacından ikiyüzyetmiş kat daha az toksik olduğu bildirilmiştir.

Sonuç olarak elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenlerde DNA topoizomera I enzim inhibisyonunun 0.01 ile 0.001 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğu tesbit edilirken, klinikte kanser tedavisinde kullanılan kamptotesin'in yapılan testler sonunda 0.0006 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda aktivite gösterdiği bulunmuştur. Buradan hareketle aktif fraksiyonlar içindeki etkidenden sorumlu bileşiklerin saflaştırıldığı takdirde kamptotesin'in etkin konsantrasyonundan daha düşük seviyelerde (yüksek aktivite) enzim inhibisyonu görüleceği sonucuna varılmıştır. Bu projenin ilerleyen safhalarında etkidenden sorumlu bileşiklerin saflaştırılarak bu yargımızın doğruluğunun ortaya konulması planlanmıştır.

Bununla beraber bu çalışma ile elde edilen bulgular ışığında bazı kanser türlerinin iyileştirilmesinde kullanılabilecek biyolojik kaynaklı, özgül, kemoterapötiklerin hazırlanması yönünde önemli bir gelişme yaratılmış olacaktır. Böylesi maddelerin potansiyel ticari ederi ülkemiz için

büyük önem taşımaktadır. Ayrıca yapılan çalışma ile oluşacak bilgi birikimi, metot ve altyapı, benzer birçok doğal ürün için potansiyel antikanser etki araştırmalarında da kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adeniyi BA, Fong HH, Pezzuto JM, Luyengi L, and Odelola HA, 2000, Antibacterial activity of diospyrin, isodiospyrin and bisisodiospyrin from the root of *Diospyros piscatoria* (Gurke) (Ebenaceae). *Phytother Res* 14: 1121-117pp.
- Afzal, M., Muhammad, N., 1983, Shikonin α, β -dimethylacrylate: a component of *Alkanna hirsutissima*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(2), 411-412.
- Arda M., 1995, Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları (3), 3. Baskı, 432s.
- Berger J.M., Gamblin S.J., Harrison S.C. and Wang J.C., 1996, Structure at 2.7 Å resolution of a 92K yeast DNA topoisomerase II fragment, *Nature*, 379: 225-232pp.
- Borner, 2003, The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions, *Molecular Immunology*, 39: 615–647pp.
- Boyce M., Degterev A. and Yuan J., 2004, Caspases: an ancient cellular sword of Damocles, *Cell Death and Differentiation*, 11: 29–37pp.
- Boik, J., 2001, Natural Compounds in Cancer Therapy, Oregon Medical Pres, 1 st ed., 521pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Boothman D.A. and Pardee A.B., 1989, Inhibition radiation-induced neoplastic transformation by β -lapachone, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Cell Biology, 86: 4963-4967pp
- Cancerquest [Online]. 2003. [Accessed; 6.12.2004].
- Classen S., Olland S. and Berger J.M., 2003, Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100: 10629-10634pp.
- Champoux J.J. and Dulbecco R., 1972, An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA- a possible swivel for DNA replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:143-146pp.
- Chakrabarty S, Roy M, Hazra B, and Bhattacharya RK, 2002, Induction of apoptosis in human cancer cell lines by diospyrin, a plant-derived bisnaphthoquinonoid and its synthetic derivatives. *Cancer Lett* 188: 85-93pp.
- Chenna D. H. P, Doctorovich B. V., Baggi F. R., Garland T. M., Burton G., 2001. Preparation and Cytotoxicity toward Cancer Cells of Mono (arylimino) Derivatives of β -Lapachone. *J. Med. Chem.* 44, 2486-2489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cho J. S., Kashiwada Y., Bastow F. K., Cheng C. Y., Lee K. H., 1996, Antitumor agents. 164⁺. Podophenazine, 2'', 3'-dichloropodophenazine, benzopodophezine, and their 4β-p-Nitroaniline derivatives as novel DNA topoizomerase II inhibitors, *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1396-1402.
- Cho W.J., Min S.Y., Le T.N. and Kim T.S., 2003, Synthesis of New 3-Arylisoquinolinamines: Effect on Topoisomerase I Inhibition and Cytotoxicity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 4451-4454pp.
- Cushion MT, Collins M, Hazra B, and Kaneshiro ES, 2000, Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 713-719pp.
- Davis, P. H., 1978, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh, Edinburg University Press.
- Dennis R.A. Mans, Adriana B. da Rocha, Gilberto Schwartzmann, 2000, Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds, *The Oncologist*, 5(3), 185-198pp.
- Denham A., 1996, Using herbs that contain pyrrolizidine alkaloids, *Eur J Herb Med*, 2(3):27-38pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Denny W.A., 2001, DNA Minor Groove Alkylating Agents, *Current Medicinal*
- Diaka J.K., Saddler-Shawnette S., Aller A. and Brown J., 2004, Potential mechanism of phytochemical-induced apoptosis in human prostate adenocarcinoma cells: Therapeutic synergy in genistein and β -lapachone combination treatment, *Cancer Cell International*, 4:5pp.
- ElSohly, H. N., El-Feraly, F. S., Joshi, A. S., Walker, L. A., 1997, Antiviral flavonoids from *Alkanna orientalis*, *Planta Medica*, 63(4), 384.
- Evans W.C., 1999, Trease and Evans' Pharmacognosy, Chapter 26.
- Faddeeva MD, Beliaeva TN, 1991, [DNA intercalators: their interaction with DNA and other cell components and their use in biological research] [Article in Russian] *Tsitologiya*, 33(10):3–31pp.
- Fadeel B., Orrenius S. and Zhivotovsky B., 1999, Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266: 699–711pp.
- Frydman B., Marton LJ., Sun JS., Neder K., Witiak DT, Liu LF., 1997, Induction of DNA topoisomerase II-mediated cleavage by β -lapachone and related naphthoquinones, *Cancer Research*, 57: 620-627pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Fujii N, Yamashito Y, Arima Y, Nagashima N and Nakano H, 1992, Induction of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by the plant naphthoquinones plumbagin and shikonin, *Antimicrob Agent Chemother* 36: 2589-2594pp.
- Gaddipati JP, Mani H, Shefali, Raj K, Mathad VT, Bhaduri AP, Maheshwari RK, Inhibition of growth and regulation of IGFs and VEGF in human prostate cancer cell lines by shikonin analogue, 2000, *Anticancer Res*, 20(4):2547-2552pp.
- Gantchev T.G. and Hunting D.J., 1997, Inhibition of the Topoisomerase II-DNA Cleavable Complex by the ortho-Quinone Derivative of the antitumor drug etoposide (VP-16), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237: 24-27pp.
- Gellert M., Mizuuchi K., O'Dea M.H. and Nash H.A., 1976, DNA Gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA, *Proc., Natl. Acad. Sci.. USA*, 73:3872-3876pp.
- Gunatilaka L.A.A., Kingston D.G.I., and Johnson R.K., 1994, Mechanism based isolation and structures of some anticancer active natural products, *Pure&Appl. Chem.*, 66: 2219-2222pp.
- Hajji N., Mateos S., Pastor N., Dominguez I., Cortes F., 2005, Induction of genotoxic and cytotoxic damage by aclarubicin, a dual topoisomerase inhibitor, *Mutation Research*, 583: 26-35pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Hazra B, Saha AK, Ray R, Roy DK, Sur P, and Banerjee A, 1987, Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81: 738-741pp.

Hazra B, Pal S, Ghosh R, and Banerjee A, 1994, Studies on changes in tumour-inhibitory activities through structural modification of a diospyrin derivative. *Med Sci Res* 22: 621-623pp.

Hazra B, Sur P, Sur B, Banerjee A, and Roy DK, 1984, Studies on the biological activity of diospyrin towards Ehrlich ascites carcinoma in Swiss A mice. *Planta Med* 58: 295-298pp.

Hotzel C., Marotto A. and Pindur U., 2002, New propylamine oligopyrrole carboxamides linked to a heterocyclic or anthraquinone system: synthesis, DNA binding, topoisomerase I inhibition and cytotoxicity, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(2): 189-197pp.

<http://www.oup.com/uk/booksites/content/0198506554/chapter5.pdf>.

<http://www.pharmcast.com/index.htm>

http://images2.clinicaltools.com/images/wasinothier_putinrightfolder/cellcycle.gif

<http://www.instruct.nmu.edu/nursing/asanford/Pictures/cellcycle2.jpg>).

<http://spot.colorado.edu/~kocht/Anthracycline.drugs.GIF>

<http://lists.man.lodz.pl/pipermail/chemfan/att-2936/coumarin.bmp>).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/NalidixicAcid_N8878.GIF

<http://www.biochem.uwo.ca/undergrad/381a/is/Lecture2L.GIF>

<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Supercoil.jpg>

http://www.hcc.cc.il.us/divisions/ms/biol/biol116/116LecGuidesAndSupplementals/Functions%20of%20DNA/Supplements/10_9.jpg

<http://217.60.75.10/lt/Biologi/images/Image11aplasm.jpg>

http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Durnbaugh/dna_replication.gif

<http://oxy.edu/departments/biology/Stillman>

<http://oxy.edu/departments/biology/Stillman>

<http://amiga1.med.miami.edu/Medical>

<http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Handouts/Topoisomerase.pdf>

<http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBiol17/1712.JPG>

<http://www.science-projects.com/supercoil.GIF>

<http://www.upct.es/~genetica/prv2/ADN-conformaciones.jpg>

<http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Topoisomerase.pdf>

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

<http://www.personal.leeds.ac.uk/~chm3gm/chemistry.html>

<http://www.ctf.edu.tr/farma/kemoterapotikler.pdf>.

http://home.caregroup.org/clinical/altmed/interactions/Herb_Groups/Hepatotoxic.htm

Jensen PB and Sehested M., 1997, DNA topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors: a new strategy to improve the antitumor selectivity of etoposide, *Biochem Pharmacol.*, 54(7):755-759pp.

Ji L.L., Zhang M., Sheng Y.C. and Wang Z.T., 2005, Pyrrolizidine alkaloid clivorine induces apoptosis in human normal liver L-02 cells and reduces the expression of p53 protein, *Toxicology in vitro*, 19(1):41-46pp.

Kamau E. and Grove A., 2004, Fluoroquinolone-Dependent DNA supercoiling by Vaccinia Topoisomerase I, *J. Mol. Biol.* 342: 479-487pp.

Kaneshiro ES, Sul D, and Hazra B, 2000, Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on ubiquinone biosynthesis in *Pneumocystis carinii* organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 14-18pp.

Kayaalp, S.O., 1987, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1, Dördüncü baskı, Toraman ve Ulucan Matbaası, Ankara, 1028s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Krishnan P. and Bastow K.F., 2000, Novel Mechanisms of DNA Topoisomerase II Inhibition by Pyranonaphthoquinone Derivatives- Eleutherin, α Lapachone, and β Lapachone, *Biochemical Pharmacology*, 60: 1367-1379pp.
- Kopka M. L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R. E., 1985, The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin, *Biochemistry*, Vol,82: 1376-1380pp.
- Kourounakis, A. P., Assimopoulou, A. N., Papageorgiou, V. P., Gavalas, A., Kourounakis, P. N., 2002, Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and on inflammation - a preliminary pharmacochemical investigation, *Archiv der Pharmazie*, 335(6), 262-266.
- Kuhara K., Takanashi H., Hirono I., Furuya T. and Asada Y., 1980, Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from *Ligularia dentata*, *Cancer Letters*, 10: 117–122pp.
- Lall N, Das Sarma M, Hazra B, and Meyer JJM, 2003, Antimycobacterial activity of diospyrin derivatives and a structural analogue of diospyrin against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 51: 435-438pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lewis R.J., Singh O.M.P., Smith C.V., Skarynski T., Maxwell A., Wonacott A.J. and Wigley D.B., 1996, The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by x-ray crystallography, *EMBO J.*, 15: 1412-1420pp.
- Li C.J., Li Y.Z., Pinto A.V., and Pardee A.B., 1999, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23): 13369-13374pp.
- Li CJ, Averboukh L and Pardee AB, 1993, β -Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem*, 268: 22463-22468pp.
- Li Y., Sun X. J., LaMont T., Pardee A.B., and Li C.J., 2002, Selective killing of cancer cells by β -lapachone: Direct checkpoint activation as a strategy against cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5): 2674-2678pp.
- Lilley D.M.J., Chen D. and Bowater R.P., 1996, DNA supercoiling and transcription: topological coupling of promoters, *Quart. Rev. Biophys.*, 29: 203-225pp.
- Lima C.D., Wang J.C. and Mondragon, A., 1994, Three dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of E. coli DNA Topoisomerase I, *Nature*, 367: 138-146pp.
- Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP, 2000, Mechanism of action of camptothecin, *Ann N Y Acad Sci.*, 922: 1-10pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Liu L.F., and Wang J.C., 1987, Supercoiling of the DNA template during transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7024-7027pp.
- Mattocks A.R., 1986, Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids, Academic Press, London.
- Meng LH, Liao ZH, and Pommier Y, 2003, Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer chemotherapy. *Curr Topics Med Chem* 3: 305-320pp.
- Michael R. Webb and Susan E. Ebeler, 2004, Comparative Analysis of topoisomerase IB inhibition and DNA intercalation by flavonoids and similar compounds: structural determinates of activity, *Biochem. J.*, 384: 527-541pp.
- Michael R. Webb and Susan E. Ebeler, 2003, A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation, *Analytical Biochemistry*, 321: 22-30pp.
- Miskovsky P, Sureau F., Chinsky L. Turpin PY., 1995, Subcellular Distribution of hypericin in human cancer cells, *Photochem Photobiol* 62: 546-549pp.
- Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, Bunai Y, Yamada K, Hirono I., 1984, Some toxic properties of a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, petasitenine, 9(2):143-149pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mueller S.O., Stoper H., 1999, Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells, *Biochimica et Biophysica Acta* 1428: 406-414pp.
- Muller SO, Eckert I, Lutz WK, Stoper H., 1996, Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloë-emodin and danthron in mammalian cells: topoisomerase II mediated? *Mutation Research* 371: 165-173pp.
- Neves-Pinto C, Malta VR, Pinto Mdo C, Santos RH, de Castro SL, Pinto AV., A trypanocidal phenazine derived from beta-lapachone, 2002, *J Med Chem*, 45(10):2112-2115pp.
- Nitiss J.L., Zhou J., Rose A., Hsiung Y., Gale K.C., and Osheroff N., 1998, The Bis(naphthalimide) DMP-840 Causes Cytotoxicity by Its Action against Eukaryotic Topoisomerase II, *Biochemistry*, 37(9): 3078 – 3085pp.
- Pal S, Banerjee A, Hazra B, Ray R, and Bhattacharya DK, 1996, Pharmacological studies on the effect of the treatment of Swiss A mice with diospyrin, a tumour-inhibitory plant product and its synthetic derivatives. *Phytother Res* 10: 393-397pp.
- Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Couladouros E.A., Herworth D. and Nicolaou K.C., 1999, The chemistry and biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38:270-300pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Papageorgiou, V. P., 1977, A new pigment of *Alkanna tinctoria* having naphthaquinone structure, *Planta Medica*, 31(4), 390-394.
- Papageorgiou, V. P., 1978, Study on the structure of the components of *Alkanna tinctoria* Tausch, *Chimika Chronika*, 7(2), 45-54.
- Papageorgiou, V. P., 1978, Wound healing properties of naphthaquinone pigments from *Alkanna tinctoria*, *Experientia*, 34(11), 1499-1501.
- Papageorgiou, V. P., 1979, 5,8-Dihydroxynaphthoquinone derivatives, Addn. of Ger. Offen. 2,700,448. Application: DE 78-2829744 19780706 (Patent).
- Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A., 2003, Lipids of the hexane extract from the roots of medicinal boraginaceous species, *Phytochemical Analysis*, 14(4), 251-258.
- Papageorgiou, V. P., Digenis, G. A., 1980, Isolation of two new alkannin esters from *Alkanna tinctoria*, *Planta Medica*, 39(1), 81-84.
- Papageorgiou, V. P., Mellidis, A. S., Sagredos, A. N., 1980, Study on the antibiotic fraction of *Alkanna tinctoria* Tausch, *Chimika Chronika*, 9 (1), 57-63.
- Papageorgiou, V. P., Winkler, A., Sagredos, A. N., Digenis, G. A., 1979, Studies on the relationship of structure to antimicrobial properties of naphthaquinones and other constituents of *Alkanna tinctoria*, *Planta Medica*, 35(1), 56-60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Pink J. J., Planchon M.S., Tagliarino C., Varnes E.M., Siegel D., Boohman A. D., 2000. NAD (P) H: Quinone Oxidoreductase Activity is the Principal Determinant of β -Lapachone Cytotoxicity. *The Jour. Of Biol. Chem.* 275:8, 5416-5424.
- Peebles K.A., K. Baker R.K., Kurz E.U., Schneider B. J. and Kroll D.J., 2001, *Biochemical Pharmacology*, 62(8):1059-1070pp.
- Plyta Z.F., Li T., Vassilios P. Papageorgiou, Antonios S. Mellidis, Andreana N. Assimopoulou, Emmanuel N. Pitsinos and Elias A. Couladouros, 1998, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 8(23): 3385-3390pp.
- Ray S., Hazra B., Mittra B. , Das A., and Hemanta K. Majumder, 1998, Diospyrin, A Bisnaphthoquinone: A Novel Inhibitor of Type I DNA Topoisomerase of *Leishmania donovani*, 54 (6): 994-999pp.
- Redinbo M.R., Stewart L., Kuhn P., Champoux J.J. and Hol W.G.J., 1998, Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA, *Science*, 279: 1504-1513pp.
- Roca J. and Wang J.C., 1992, The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases, *Cell*, 71: 833-840pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Rodriguez A.C. and Stock D., 2002, Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA., *EMBO J.*, 21: 418-426pp.
- Roeder, E., Wiedenfeld, H., Schraut, R., 1984, Pyrrolizidine alkaloids from *Alkanna tinctoria*, *Phytochemistry*, 23(9), 2125-2126.
- Rothenberg ML., 1997, Topoisomerase I inhibitors: review and update, *Ann Oncol.*, 8(9): 837-855pp.
- Steele R.J., Thompson A.M., Hall P.A. and Lane D.P., 1998, The p53 tumour suppressor gene, *British Journal of Surgery*, 85: 1460–1467pp.
- Stewart L., Redinbo M.R., Qiu X., Hol W.G.J. and Champoux J.J., 1998, A model for the mechanism of human topoisomerase I, *Science*, 279: 1534-1540pp.
- Stivers J.T., Haris T.K. and Mildvan A.S., 1997, Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation, *Biochemistry*, 36: 5212-5222pp.
- Stryer et al., 2002, Biochemistry, 5th Edition. New York: WH Freeman and Company, Section 21. 7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Tazi J., Bakkour N., Soret J., Zerki L., Hazra B., Laine W., Baldeyrou B., Lansiaux A., and Bailly C., 2005, Selective Inhibition of Topoisomerase I and Various Steps of Spliceosome Assembly by Diospyrin Derivatives, *Mol Pharmacol* 67: 1186-1194pp.
- Temizkan G., 1999, II. Moleküler Genetik, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 399s.
- Temperini C et al., 2003, The crystal structure of the complex between a disaccharide anthracycline and the DNA hexamer d(CGATCG) reveals two different binding sites involving two DNA duplexes. *Nucleic Acids Research*, 31(5), 1464–1469pp.
- Thompson C.B., 1995, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, 267:1456–1462pp.
- Ting CY, Hsu CT, Hsu HT, Su JS, Chen TY, Tarn WY, Kuo YH, Whang-Peng J, Liu LF, and Hwang J, 2003, Isodiospyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor. *Biochem Pharmacol* 66: 1981-1991pp.
- Tsai F.T.F., Singh O.M.P., Skarzynski T., Wonacott A.J., Weston S., Tucker A., Paupit, R.A., Breeze, A.L., Poyser, J.P., O'Brien, R., Ladbury J.E. and Wigley, D.B., 1997, The high resolution crystal structure of a 24- kDa gyrase B fragment from E.coli complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin, *Prot. Struct. Funct. Eng.*, 28: 41-52pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Unak T., Unak P., 1993, Synkavit and its direct labelling with iodine-125, as a potential anti-cancer drug, *Nucl Med Biol.*, 20(7):889-894pp.
- Wang J.C., 1971, Interaction between DNA and an E.coli protein w., *J. Mol. Biol.*, 55:523-533pp.
- Yardley V, Snowdon D, Croft S, and Hazra B, 1996, In vitro activity of diospyrin and derivatives against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytother Res* 10: 559-562pp.
- Topçu Z. and Castora F.J. , 1995, Mammalian mitochondrial DNA topoisomerase I preferentially relaxes supercoils in plasmids containing spesific mitochondrial DNA sequences, *Biochimica et Biophysica Acta* 1264: 377-387pp.

ÖZGEÇMİŞ

Sinem Melek Nalbantoğlu, 1982 yılında Bursa’da doğdu. İlköğretim eğitimini İzmir Karşıyaka C.İ.O’da, lise eğitimini Atakent Anadolu Lisesi’nde aldı. 2000 yılında, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler ve Genetik bölümüne girdi. 2004 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Anabilim dalında Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladı.