

**BURÇAK YEŞİLTEPE**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2006**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

*COLCHICUM BIVONAE* GUSS. TOHUMLARININ  
ALKALOİTLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

ECZ. BURÇAK YEŞİLTEPE

DANIŞMAN  
PROF. DR. NURHAYAT SÜTLÜPİNAR

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2006



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**COLCHICUM BIVONAE GUSS. TOHUMLARININ  
ALKALOİTLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

*Bu tezi iyi ve kötü zamanlarımda hep yanımda olan aileme ithaf ediyorum...*

**ECZ. BURÇAK YEŞİLTEPE**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. NURHAYAT SÜTLÜPİNAR**

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL-2006**

**TEZ ONAYI**


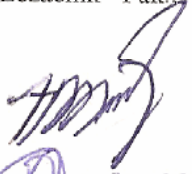



Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Prof.Dr.Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Farmakognozi  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( x ) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Farmakognozi Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Burçak YEŞİLTEPE  
Tez Başlığı : *Colchicum bivonae* Guss. Tohumlarının Alkaloidleri Üzerinde Araştırmalar  
Sınav Yeri : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi C Blok Seminer Salonu  
Sınav Tarihi : 04.08.2006 11:00

**Tez Sınav Jürisi**

- 1.Prof Dr Nurhayat SÜTLÜPİNAR, (Tez Danışmanı) İstanbul Üniv., Eczacılık Fak. Farmakognozi ABD. 
- 2.Prof Dr Ali H MERİÇLİ, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakognozi ABD. 
- 3.Prof Dr Günay SARIYAR, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakognozi ABD. 
- 4.Prof Dr Afife MAT, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakognozi ABD. 
- 5.Doç Dr Emine AKALIN URUŞAK İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmasötik Botanik ABD. 

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Burçak YEŞİLTEPE



*BU TEZİ İYİ VE KÖTÜ ZAMANLARIMDA HEP YANIMDA OLAN AİLEME İTHAF EDİYORUM...*

## TEŞEKKÜR

*Yüksek lisans tezimin hazırlanması için gerekli olanakları sağlaması ve NMR sonuçlarımın değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı, Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Ali Hikmet Meriçli'ye içten teşekkürlerimi sunarım.*

*Bu tezin oluşmasında değerli fikirlerini, bilgilerini ve deneyimlerini esirgemeyen, her aşamada bana destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurhayat Sütlüpnar'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Botanik bölümü hazırlamama katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Emine Akalın'a, MTT sitotoksik aktivite tayininde büyük yardımlarından dolayı sayın Uzm. Bio. Belkıs Atasever'e, NMR çekimlerdeki yardımlarından dolayı sayın Uzm. Ecz. Tuba Şerbetçi'ye, farmakolojik bölüme olan katkılarından dolayı sayın Uzm. Ecz. Zeliha Pala'ya, BSL testini öğrenmemde yardımcı olan sayın Ecz. Selay Yörükeş Mercan ve Ecz. A Derya. Yılmaz'a teşekkürü bir borç bilirim.*

*Anabilim dalımızın değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve çalışanlarına her anlamda destek ve moral kaynağı oldukları için ayrıca teşekkür ederim.*

*Tezin ilk aşamasından başlayarak bitişine kadar her konuda yardımlarına başvurduğum ve destek aldığım değerli Uzm. Ecz. Sevdâ Pırıldar'a, koşulsuz desteklerini esirgemeyen sevgili aileme ve sonsuz yardımlarıyla her zaman yanımda olan değerli Uzm. Ecz. Ulaş Sözer'e en içten teşekkürlerimi sunarım.*



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-536/21102004 no'lu proje olarak desteklemiştir.



Fotoğraf: Uzm. Ecz. Ebru Özdemir

***Colchicum bivonae* Guss.**

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	iii
BEYAN.....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	X
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xiv
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xv
ÖZET .....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Botanik Bölüm .....	3
2.1.1. Liliaceae .....	3
2.1.3. <i>C. bivonae</i> Guss. ....	4
2.1.3.1. Botanik özellikleri:.....	5
2.1.3.2. Çiçekli olduğu aylar .....	5
2.1.3.3. Yetiştirme ortamı .....	5
2.1.3.4. Yetiştirildiği yükseklik .....	5
2.1.3.5. Türkiye’de yayılışı .....	6
2.1.3.6. Dünya’da yayılışı .....	6
2.1.3.7. Materyalin toplandığı bölgeler ve toplanma tarihleri.....	6
2.2. Kimyasal Bölüm .....	7
2.2.1. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Kimyası .....	7
2.2.2. <i>Colchicum</i> Türlerinin Kimyasal Bileşimi .....	7
2.2.2.1. Tropolon Halkası Taşıyan <i>Colchicum</i> Alkaloitleri .....	7
2.2.2.2. Tropolon Halkası Taşıyan Diğer Nötral ve Fenolik Alkaloitler .....	9
2.2.2.3. Tropolon Halkası Taşımayan <i>Colchicum</i> Alkaloitleri: .....	11
2.2.3. Sentetik Tropolon Alkaloitleri: .....	13
2.2.4. Tropolon Alkaloitlerinin Yapı-Aktivite İlişkileri .....	14
2.2.5. Kolşisinin Biyosentezi .....	16

2.2.6.Tropolon Alkaloitlerinin Teşhisi.....	19
2.3.Farmakolojik Bölüm .....	21
2.3.1.Tropolon Alkaloitlerinin Tedavide Kullanılışları .....	22
2.3.1.1.Akut Gut Atakları ve Profilaksisi.....	22
2.3.1.2.Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) ve Profilaksisi .....	23
2.3.1.2.1.FMF’te Kolşisinin Etkilerinin Aşamaları.....	23
2.3.1.3.Behçet Hastalığı .....	24
2.3.1.4.İleri Sistemik Skleroz.....	25
2.3.1.5.Primer Safra Sirozu .....	25
2.3.1.6.Karaciğer Sirozu: .....	25
2.3.1.7.Alkolik Siroz: .....	26
2.3.1.8.Hodgkin Lenfoma: .....	26
2.3.1.9.Kronik Lenfoit Lösemi:.....	26
2.3.1.10.Kanser: .....	27
2.3.1.11.Palmoplanter Püstüloz:.....	27
2.3.1.12.Sedef Hastalığı (Psöriyazis): .....	27
2.3.1.13..Eklem Kireçlenmesi (Kondrokalsinoz):.....	27
2.3.1.14.Ateroskleroz: .....	28
2.3.1.15.Diğer Rahatsızlıklar .....	28
2.3.2.Tropolon Alkaloitlerinin Geleneksel Tıbbi Kullanılışları.....	29
2.3.3.Tropolon Alkaloitlerinin Diğer Kullanılışları .....	29
2.3.4.Kolşisinin Farmakokinetiği.....	29
2.3.4.1.Emilim.....	29
2.3.4.2.Dağılım.....	30
2.3.4.3.Metabolizasyon .....	32
2.3.4.4.Eliminasyon .....	32
2.3.5.Yan Etkileri .....	33
2.3.6.Toksisitesi .....	35
2.3.7.Kolşisin İntoksikasyonunun Klinik Belirtileri .....	36
2.3.8.Kontraendikasyonları .....	37
2.3.9.İlaç Etkileşimleri .....	37
2.3.10.Uyarılar .....	38
2.3.11.Kullanım Şekli ve Doz Ayarlaması .....	39

2.3.12.Etki Mekanizmaları .....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1.Deneysel Bölüm.....	41
3.1.1.Materyal .....	41
3.1.2.Fitokimyasal Ön Denemeler .....	41
3.1.3.Miktar Tayini Yöntemleri .....	43
3.1.3.1.Su Miktar Tayini .....	43
3.1.3.2.Total Alkaloit Miktar Tayini .....	43
3.1.4.Alkaloitlerin Tüketilmesi .....	44
3.1.5.Nötral (A) ve Bazik (B) Ekstrelerin Elde Edilişi .....	44
3.1.6. Nötral ve Bazik Ekstrelerinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması:.....	45
3.1.7.Sitotoksik Aktivite Testleri .....	47
3.1.7.1.Brine Shrimp Letalite Testi (2, 56) .....	47
3.1.7.2. MTT Yöntemi ile Hücre Kültürleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Tayini* .....	48
4. BULGULAR.....	51
4.1.Tohum Ekstrelerinde Yapılan Kimyasal Ön Çalışmaların Bulguları .....	51
4.2.Miktar Tayini Çalışmalarının Bulguları.....	51
4.2.1.Su Miktar Tayini Sonuçları.....	51
4.2.2.Total Alkaloit Miktar Tayini Bulguları:.....	51
4.3. Nötral ve Bazik Ekstrelerinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması: .....	54
4.5. Elde Edilen Maddelerin <sup>1</sup> H NMR Spektrumları: .....	66
4.5.Metanol Ekstreleri ile Nötral ve Bazik Ekstrelerin Kromatografik olarak Karşılaştırılması .....	72
4.5.Sitotoksik Aktivite Testleri Sonuçları.....	73
4.5.1.Brine Shrimp Letalite Testi.....	73
4.5.2. MTT Yöntemi ile Hücre Kültürleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Tayini Sonuçları .....	74
5. TARTIŞMA .....	78
KAYNAKLAR .....	80
ÖZGEÇMİŞ .....	89

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Nötral ve fenolik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri.....	8
Tablo 2-2 Bazik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri.....	9
Tablo 2-3 Kolşisin intoksikasyonunun klinik belirti ve iyileşme aşamaları .....	37
Tablo 2-4 Kolşisin ile etkileşime giren maddeler .....	38
Tablo 3-1 İ. T. K. uygulamalarında kullanılan sistemler.....	46
Tablo 4-1. <i>Colchicum bivonae</i> örneklerinde yapılan ön deneme sonuçları.....	51
Tablo 4-2. <i>Colchicum bivonae</i> örneklerinde yapılan su miktar tayini sonuçları.....	51
Tablo 4-3 UV spektrofotometresinde ölçülen absorbans değerleri .....	52
Tablo 4-4 Ab B 05 ekstresinin kromatotron yöntemi ile alınan fraksiyonları.....	61
Tablo 4-5 <i>Colchicum bivonae</i> tohumlarından elde edilen maddelerin Rf değerleri.....	65
Tablo 4-6 BSL sonucu; 3 ayrı konsantrasyonda 3'er denemede hayatta kalan larva sayıları.....	73
Tablo 4-7 HL 60 serisi ile sitotoksik aktivite testinin, T-student testi kullanılarak (kolşisin ile karşılaştırma yapılarak) hesaplanan istatistiksel verileri .....	75
Tablo 4-8 K 562 serisi ile sitotoksik aktivite testinin T-student testi kullanılarak (kolşisin ile karşılaştırma yapılarak) hesaplanan istatistiksel verileri	77
Tablo 5-1 <i>Colchicum bivonae</i> tohumlarının metanol ekstraktlarından elde edilen maddeler ve miktarları .....	79

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1 Kolşisinin standart eğrisi .....	52
Şekil 4-2 Ab N 90 1. Preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	54
Şekil 4-3 Ab N 90 2. Preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	55
Şekil 4-4 Kloroform: Aseton: Dietilamin (70:20:10) sistemi.	56
Şekil 4-5 Ab B 90 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	57
Şekil 4-6 Etilasetat: İzopropanol: Amonyak (80:15:5).	58
Şekil 4-7 Ab N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	59
Şekil 4-8 Ab.8 N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve ayırımı .....	59
Şekil 4-9 Ab 2N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	60
Şekil 4-10 A (Kolşisilin), B (2 <sup>1</sup> N), C (Kolşisin), D ( 8 <sup>1</sup> N), E (Demekolsin), F (9 N)..	61
Şekil 4-11 Ab B 05 kromatotron fraksiyonlarının kromatogramı	62
Şekil 4-12 TS N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	63
Şekil 4-13 TS B 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı .....	64
Şekil 4-14 A (Kolşisin), B (8 N), C (Demekolsin), D (9 N), E (7 B).....	65
Şekil 4-15.Demekolsinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	66
Şekil 4-16 2-demetildemekolsinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	67
Şekil 4-17Kolşisinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	68
Şekil 4-18 N-deasetilkolşisinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	69
Şekil 4-19 N-deasetil-N-formilkolşisinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	70
Şekil 4-20 2,3-didemetilkolşisinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	71
Şekil 4-21 <i>Colchicum bivonae</i> ekstrelerinin kromatografik karşılaştırılması .....	72
Şekil 4-22 HL 60 hücre serisi üzerinde konsantrasyonlara göre sitotoksisite oranları...	74
Şekil 4-23 K 562 hücre serisi üzerinde konsantrasyonlara göre sitotoksisite oranları ...	76

**SEMBOLLER / kısaltmalar listesi****Kodlama:**

Bolu, Abant'tan toplanan (1990) tohum örneği: Ab 90

Bolu, Abant'tan toplanan (2005) tohum örneği: Ab 05

Tekirdağ, Saray'dan toplanan (2005) tohum örneği: TS 05

Bolu, Abant 1990 Metanol Ekstresi: Ab m e 90

Bolu, Abant 2005 Metanol Ekstresi: Ab m e 05

Tekirdağ, Saray 2005 Metanol Ekstresi: TS m e 05

Bolu, Abant1990 Nötral Ekstre (A ekstresi): Ab N 90

Bolu, Abant 1990 Bazik Ekstre (B ekstresi): Ab B 90

Bolu, Abant 2005 Nötral Ekstre (A ekstresi): Ab N 05

Bolu, Abant 2005 Bazik Ekstre (B ekstresi): Ab B 05

Tekirdağ, Saray Nötral Ekstre (A ekstresi): TS N 05

Tekirdağ, Saray Bazik Ekstre (B ekstresi): TS B 05

**MTT Yönteminde Kullanılan Kısaltmalar:**

Bolu, Abant 2005 Metanol Ekstresi: BVT-A

Tekirdağ, Saray 2005 Metanol Ekstresi: BVT-T

Kolşisin: K



## ÖZET

Yeşiltepe,B. (2006). *Colchicum bivonae* Guss Tohumlarının Alkaloitleri Üzerinde Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Türkiye, tohum ve yumru ekstraktları tedavide büyük önem taşıyan *Colchicum* türleri için, kaynak açısından en zengin ülkelerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bitki taşıdığı tropolon sınıfı alkaloitleri nedeniyle gut, ailesel Akdeniz ateşi, Behçet hastalığı, siroz, lenfoit lösemi, Hodgkin, psoriasis gibi hastalıkların iyileştirilmesinde ve biyokimya, insan genetiği, immün kimyası üzerindeki araştırmalarda önemli bir yere sahiptir. Dünyada bu alkaloitler açısından kaynak olarak ülkemizde yetişmeyen *Colchicum autumnale* türü kabul görmektedir. Ancak *C. autumnale* drog gereksinimini yeterince karşılayamadığından ilaç sanayince yeni kaynaklar aranmaktadır. Bu nedenle ülkemizde yetişen *Colchicum* türleri üzerinde İ. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda başlatılan çalışmalar sonucunda Türkiye'deki *Colchicum* türlerinin *C. autumnale* ile karşılaştırılabilecek oranda bu alkaloitleri içerdiği görülmüştür. Ülkemizde yetişen bir tür olan *Colchicum bivonae* yumrularının alkaloitleri daha önce yapılan bir doktora çalışmasında ayrıntılı şekilde incelenmiştir. Bu tez çalışmasında ise *C. bivonae* türünün tohumlarının kimyasal açıdan daha kapsamlı olarak araştırılması planlanmıştır.

Bu araştırmada, iki ayrı yöreden toplanan (Bolu, Abant; Tekirdağ, Saray) *C. bivonae* tohumları kromatografik olarak ve sitotoksik aktivite açısından (Brine Shrimp Letalite Testi-BSL, MTT Sitotoksik Aktivite Testi) karşılaştırılmıştır. Ayrıca preparatif İ.T.K. ve kromatotron yöntemleri ile her iki örnekten madde izolasyonları da yapılmıştır.

Sonuç olarak Abant'tan toplanan örnekten demekolsin, 2-demetil demekolsin, kolşisin, N-deasetilkolşisin, N-deasetil-N-formilkolşisin 2,3-didemetilkolşisin ve kolşisilin izole edilirken, Saray'dan toplanan örnekten ise sadece demekolsin ve kolşisin izole edilmiştir. Bolu, Abant örneği, MTT Sitotoksik Aktivite Testinde HL 60 hücre serisi üzerinde Tekirdağ, Saray örneğine göre daha aktif, Tekirdağ, Saray örneği ise aynı testte K 562 hücre serisi üzerinde Bolu, Abant örneğine göre daha aktif çıkmıştır. BSL testinde ise Abant örneği, Saray örneğine göre daha toksik özellikte çıkmıştır. Her iki örneğin de yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Colchicum bivonae*, demekolsin, kolşisin, sitotoksik aktivite, tropolon alkaloitleri.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-536/21102004 no'lu proje olarak desteklemiştir.

## ABSTRACT

Yeşiltepe B. (2006) Investigations on the Alkaloids of the Seeds of *Colchicum bivonae* Guss. Istanbul University Institute of Health Science Department of Pharmacognosy. Master Thesis. Istanbul

Turkey is one of the richest countries for the genus *Colchicum*. These species which contain tropolonic alkaloids have great importance in treatment of diseases such as gout, familial Mediterranean fever, Behcet's disease, cirrhosis, lymphoid leukemia, Hodgkin, psoriasis and in investigations of biochemistry, human genetics, immunochemistry. Although not growing in our country, *Colchicum autumnale* is the main source of these alkaloids all over the world. But because of the insufficiency of *C. autumnale*, medicinal industry looks for new resources. As a result of this, the researches on *Colchicum* species which grow in Turkey, have been started in Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy and it has been found that all Turkish species have tropolonic alkaloids as in *C. autumnale*. In a PhD thesis, only the corms of *C. bivonae* which grows in our country were studied. Due to the importance of the seeds on medicine, we aimed extensive investigations on the seeds of this species which is the richest part for the chemical aspects.

The seeds were collected from two different regions (Bolu, Abant and Tekirdağ, Saray). Their alkaloidal extracts were compared in chromatographic methods and for the cytotoxic activity (Brine Shrimp Lethality-BSL Test, MTT Cytotoxic Activity Test). Also quantification and preliminary analysis were carried on.

As a result of this study, from the seed samples of Abant (Ab 05) demecolcine, 2-didemethyldemecolcine, colchicine, N-deacetylcolchicine, N-deacetyl-N-formylcolchicine, 2,3-didemethylcolchicine, colchiciline and from the samples of Saray (TS 05) only demecolcine and colchicine were isolated. Ab 05 was more potent than TS 05 on HL 60 cell line, but TS 05 was more potent than the other on K 562 cell line in MTT Cytotoxic Activity Test Also in BSL test Ab 05 were more toxic than TS 05. It was found that both samples had high cytotoxicity.

**Key Words:** *Colchicum bivonae*, demecolcine, colchicine, cytotoxic activity, tropolone alkaloids.

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T-536/21102004

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Colchicum* türlerinin tıbbi amaçlı olarak tedavide kullanımı çok eski dönemlere dayanmaktadır. *Colchicum* cinsi, Dünya üzerinde tümü Kuzey Yarıküre’de olmak üzere Avrupa, Anadolu ve Orta Asya’ya kadar geniş bir yayılım gösterir.

Ülkemizde yaklaşık olarak 40 *Colchicum* türünün yetiştiği bilinmektedir (12, 22). Dolayısıyla Türkiye *Colchicum* türleri açısından en zengin ülkelerden biri olarak kabul edilir (54).

Bu bitkiden elde edilen droglar uzun süre “colchicum”, “hermodaktil”, “sürinjan” ve “ephemeron” adları altında kullanılmıştır. M. S. 1. yy’da yaşayan Dioscorides, *Colchicum* türlerinin zehirli bir doğaya sahip olduğunun farkında idi ve gutta kullanımından bahsetmişti. *Colchicum*, adını bu bitkinin bulunduğu yerlerden biri olan Karadeniz bölgesindeki Kolşis (Colchis, Colchia) yöresinden almıştır (29; 39; 41, kaynak: 73 p.1)

Halen tedavide *C. autumnale* türünden elde edilen tohum (Colchici semen) ekstreleri kullanılmaktadır. Farmakopelerde yumrularından (Colchici cormus) elde edilen ekstrelerinin de kullanılabileceği belirtilen *Colchicum* türlerinin başlıca etken maddeleri tropolon sınıfı alkaloidlerdir. Bu maddeler içerisinde en önemli olan ve bitkide yüksek oranda bulunanı ilk olarak 1820’de izole edilen ancak tüm yapısı 1950’de aydınlatılan “kolşisin” dir. Yüzyıldan uzun zaman boyunca *Colchicum autumnale* bitkisinin aktif bileşiğinin yalnızca kolşisin olduğu düşünülmüş, ancak daha sonra yapılan çalışmalar yeni tropolonik alkaloidlerin keşfini getirmiştir. Diğer alkaloidlerin çoğu 1965 yılından önce keşfedilmiştir (15). Bu alkaloidler gut, ailesel Akdeniz ateşi, Behçet hastalığı, siroz, miyeloid lösemi, Hodgkin hastalığı, psöriazis gibi pek çok hastalığın tedavisinde ve ayrıca biyokimya, insan genetiği, bağışıklık sistemi kimyası üzerindeki araştırmalarda önemli bir yere sahiptir.

Kolşisinin gut hastalığı üzerinde spesifik etkisi bulunmaktadır (3). Akut gutta semptomları % 60-75 oranında oldukça hızlı bir şekilde yok ettiği bilinmektedir (32). Aynı zamanda seçici olmayan antimitotik ajandır. Hücrelerin bölünmesini sağlayan mitotik uzamanın normal fonksiyonunu önleyerek metafaz aşamasını durdurur (3, 11). Bu olay hücrede kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar ve poliploid yapılar ortaya çıkar. Bu özellik ilk olarak 1899’da Pernice tarafından ortaya çıkarılmıştır. Daha

sonraları bu etki 1930'da yeniden keşfedilmiş ve kolşisin'in bitki ve hayvan hücrelerinde bu aktivitesi üzerine önemli çalışmalar yapılmasına ve tıp ile biyoloji dallarında bu özellikten yararlanılmasına fırsat doğurmuştur (32). Kolşisin, tıpkı *Vinca* alkaloidleri ve podofilotoksin gibi mikrotübülleri teşkil eden bir protein olan tübülün'e akovalan olarak bağlanan doğal ürünlerden biridir ve polimerizasyonu bloke ederek mikrotübül fonksiyonuna dayanan hücresel olayları inhibe eder. Aynı şekilde demekolsin ve deasetilkolşisin de iyi inhibitördürler (24, 27). En önemli biyolojik etki olarak kolşisin bu yolla mitozu durdurur (15).

Aynı zamanda antitümöral etkiye sahip olan kolşisin, in vitro olarak 1/100 milyon seyreltmede bile hücre bölünmesini durduran en kuvvetli mitotik zehirlere dendir. Ancak bu maddenin tedavi ile letal dozu aralığının yakın olması, kanser tedavisinde kullanımını önlemekte ise de; tedavide yararlanılabilecek maddelerin araştırılmasında, kolşisin "model bileşik" olarak önemini halen korumaktadır.

*Colchicum* türlerinin diğer bir ana alkaloidi olan "demekolsin" in kolşisinden daha az toksik ve kolşisin gibi iltihap önleyici tesirde olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, kolşisinden hareketle sentezlenen "tiyo" türevlerinin (örn. "tiyokolşikozit") ise tedavide miyorelaksan olarak kullanılmaktadır (35, 66).

Dünyada bu alkaloidler açısından kaynak olarak ülkemizde yetişmeyen *Colchicum autumnale* türü kabul görmektedir. Ancak *C. autumnale* drog gereksinimini yeterince karşılayamadığından ilaç sanayince yeni kaynaklar aranmaktadır. Bu nedenle ülkemizde yetişen *Colchicum* türleri üzerinde İ. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda başlatılan çalışmalar sonucunda (6) Türkiye'deki bazı *Colchicum* türlerinin *C. autumnale* ile karşılaştırılabilecek oranda bu alkaloidleri içerdiği görülmüştür. Bu kapsam içerisinde anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada *C. bivonae* tohumlarının demekolsin açısından en zengin türlerden olduğu belirlenmiştir (74). Bununla birlikte bir doktora tezinde *Colchicum bivonae* türünün alkaloidleri açısından sadece yumruları çalışılmıştır (61). Tedavide asıl kullanılan kısımların tohumlar olduğu göz önünde bulundurularak, bu çalışmada tohumların tropolon alkaloidlerinin incelenmesi ve ayrıca ekstrelerin sitotoksitesite açısından da değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1..Botanik Bölüm

#### 2.1.1. Liliaceae (22)

Çok yıllık (bazen tek yıllık) genellikle rizomlu, kormuslu, soğanlı ya da tuberli; nadiren de dikenli, tırmanıcı bitkilerdir. Yapraklar tabanda ya da gövdede (nadiren sapsız karşılıklı iki sıra üzerinde ve tabanlarıyla birbirlerini örter vaziyette sık dizilişli), bazen de ovat ya da linear yaprağa benzer şekillerdeki gövdelerde (kladotlar) pullara indirgenmiştir. Çiçek durumu birleşik salkım (panikula), salkım, şemsiye ya da yalancı şemsiye şeklinde veya çiçekler tektir. Periant iki sıralı (nadiren iç sıranın ortadan kalkması ile tek sıralı); segmentler (4 -) 6 ( - 8) adet, serbest ya da birleşik, genellikle petalimsidir. Stamenler (4 -) 6 ( - 10) adettir. Nektaryumlar perdelerin üzerinde, tabanda ya da periantta bulunur. Ovaryum 3 gözlü, daima üst durumlu (nadiren perigin disk ile birlikte) stiluslar 1-3, nadiren 5, basit ya da lopludur. Meyva bir kapsula ya da bakkadır. Tohumlar yuvarlak, 3 yüzlü ya da tabla şeklindedir.

#### 2.1.2. *Colchicum* L \* (12)

Çok yıllık bitkilerdir. Toprakaltı gövdesi tunikalı bir kormus şeklinde, bazen uzamış, yatay rizoma benzer stolonlu çıkıntılı olan sürünücü gövdeler şeklinde (soboller); tunikalar zarımsı, kağıtsı veya derimsi, genellikle tüpsü, kalıcı bir 'boyun' şeklinde uzar. Gelişen yapraklar ve çiçek durumu zarımsı bir kın içinde (katafil) yer alır. Yapraklar tabanda, kısmen çiçek açma evresinde (sinantus) veya çiçeklenmeden sonra (histerantus), bazen çiçekler solduğunda (subsinantus) meydana gelir. Çiçekler tek veya demet halinde bulunur; her biri küçük brakteli ve çok kısa saplıdır. Çiçek sapı kapsüllerin olgunlaştığı sırada uzar. Periant çan, huni, rotat ya da stellat şekillerinde, morumsu kırmızı, pembe veya beyaz renklidir, bazen tesellat olabilir. Periant parçaları 6 adet, tabanda iki eşit veya hemen hemen eşit seriler halinde tüp şeklinde birleşmiş;

\* *Colchicum* cinsi son yayınlarda Colchicaceae familyasına dahil edilmektedir.

parçaların tabanı kulakçıklı, boğaz bazen (filament tabanlarının oluşturduğu) bir 'filament kanalı' ile çıkıntılı, çıkıntılar çıplak veya kısa tüylüdür. Stamenler periant parçalarının tabanına doğru birleşmiş, 1 veya 2 sıralı; filamentler ince, bazen tabanda kalınlaşmış; anterler filamentlerin tepesine sırtından bağlı, oynak (Türkiye'deki türlerde), iç yüzünden açılır. Stiluslar 3 adet, serbest, stigmalar nokta şeklinde veya stilus boyunca tek taraflı olarak aşağıya doğru uzanır, ovaryum toprak altındadır. Meyve septisit kapsül, 3 gözlü; tohumlar çok sayıda, yuvarlağa yakın veya yuvarlaktır.

### 2.1.3. *C. bivonae* Guss. in Adnot. Cat. Pl. Bocc. 5 (1821)

Syn: *C. latifolium* Sibth & Sm, *C. visianii* Parl, *C. bowlesianum* B.L, *C. sibthorpii* sensu B.L.



***Colchicum bivonae*.Guss. çiçekli ve meyvalı hali; kormusu ile birlikte**

(Fotoğraflar: Uzm. Ecz. Ebru Özdemir)

### 2.1.3.1. Botanik özellikleri:

Kormus 2,5 – 5 (-6) x 2,5 - 4 cm boyutlarında, ovat ve hemen hemen yuvarlak arası; dıştaki tunika orta esmerlikte, iç kısmı kırmızımsı kahverenginde, kağıtsı ile hafif derimsi arası, tepesi kısa bir boyundan ibaret, 1-2 cm'dir. Yapraklar (4-) 5 - 9 (-11) adettir ve bitki çiçeklendikten sonra gelişir (histerantus), hafif dik, dilsî veya linear-lanseolat, (12-) 20 - 30 x (1-) 2 - 3 (-4,5) cm, tepesi yuvarlak veya obtus (bazen akuta yakın), tüysüzdür. Çiçekler 1 - 4 (-6), kampanulat (çan şeklinde) ile geniş kampanulat arasındadır. Periant parçaları pembe-mor, kuvvetli tesellat, bazen tabanı beyaz, dardan geniş değişen eliptik şekilde, bazen obovat-eliptik, (4-) 5,5 - 7 (-8,5) cm x (8-) 20 - 30 (-35) mm boyutlarında, tepesi yuvarlak veya hemen hemen akut, bazen kukulatalı, filament kanallarının çıkıntıları boyunca kısa yumuşak tüylüdür. Filament (1-) 1,5 - 2,5 cm tüysüz; anterler morumsu siyah veya morumsu-kahverenginde, 7 - 9 (-12) x 2 - 3 mm boyutlarında; polenler parlak sarıdır. Stilus yay şeklinde kıvrık ve tepede az şişkin, stigmalar (2-) 3-4 mm aşağı doğru daralarak bağlanmıştır. Kapsül oblong – elipsoit, 3,5 - 4 x 2 - 2,5 cm boyutlarında, orta esmerlikte, tüysüz, tepesi akuttur.

### 2.1.3.2.Çiçekli olduğu aylar

(Ağustos-) Eylül – Ekim (-Aralık)

### 2.1.3.3.Yetişme ortamı

Seyrek *Quercus* veya *Fagus* ormanlarının açıklıklarında, *Pinus*, seyrek *Quercus coccifera* çalılıkları arasında, dere kenarlarında yetişir

### 2.1.3.4.Yetiştği yükseklik

50- 1350 m.

### **2.1.3.5.Türkiye’de yayılışı**

Batı Türkiye, Adalar. A1(E) Tekirdağ: Saray, T. Baytop (İSTE 26731, çiçek)! A1(A) Çanakkale: Ezine’den Çanakkale’ye doğru giderken 14 km.lik mesafe boyunca, T. Baytop (İSTE 26754, çiçek). Balıkesir: Marmara, B. Mater (İSTE 36297, çiçek)! A3 Bilecik: Bilecik’ten Vezirhan’a doğru giderken 10 km.lik mesafe boyunca, Mathew 9502 (yaprak, cult. K, çiçek). Bolu: Abant Gölü yakınları, T. Baytop İSTE 32340, yaprak ve meyva)! B1 Çanakkale: Dikili Çanakkale arası Küçükkuyu’dan 2-3 km sonra, 240 m, Brickell 1834 (yaprak ve meyva).

### **2.1.3.6.Dünya’da yayılışı**

Midilli Adası, Sicilya, İtalya, Korsika, Sardunya, Yugoslavya, Yunanistan, Bulgaristan. Akdeniz elementi

### **2.1.3.7. Materyalin toplandığı bölgeler ve toplanma tarihleri:**

Bolu-Abant Gölü çevresi -16.06.1990 ve 20.07.2005 (İSTE 61483); Tekirdağ-Saray Güngörmez Köyü Mezarlığı arkası - 21.05.2005 (İSTE 81713)



## 2.2.Kimyasal Bölüm:

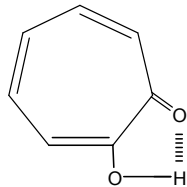
### 2.2.1. *Colchicum* Alkaloitlerinin Kimyası

Yunan tıbbında Dioscorides'in *Colchicum*'u tıbbi amaçla kullanımından sonra yapılan daha ileri çalışmalarda Geiger ve Hesse (1833), Oberlin (1857), Zeisel (1883), Houdé ve Laborde (1884) kristalize kolşisinin  $C_{22}H_{25}NO_6$  olarak doğru moleküler yapısını ve zayıf asitlerle hidrolizi sonucu oluşan kolşiseinle ilişkisini aydınlatmışlardır (15). Kolşisin ilk olarak 1820'de Pelletier ve Caventou tarafından izole edilmiş ve yapısı 1945'te Dewar tarafından aydınlatılmıştır (50, 59) Tüm *Colchicum* türlerinden pek çok tropolon alkaloidi elde edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır. Bununla birlikte bir kısmının yapısı halen bilinmemektedir. 1948'den bu yana kromatografik yöntemlerin bulunması ve geliştirilmesinden sonra 30'dan çok tropolon alkaloidinin yapısı aydınlatılmıştır (70). Kolşisinden daha az toksik olup daha fazla veya ona eşit derecede aktif olan türevler bulmak için yapılan çalışmalar devam etmektedir.

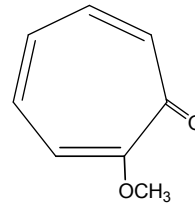
### 2.2.2. *Colchicum* Türlerinin Kimyasal Bileşimi

#### 2.2.2.1. Tropolon Halkası Taşıyan *Colchicum* Alkaloitleri:

Kolşisin [*N*-5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo (a) heptalen-7-il-(*S*)-asetamit] ve analogları tropolon halkası taşırlar (15). Bu yapılara tropolonoit yapı denir. Tropolon yapısı bu alkaloitlerin C halkasıdır.

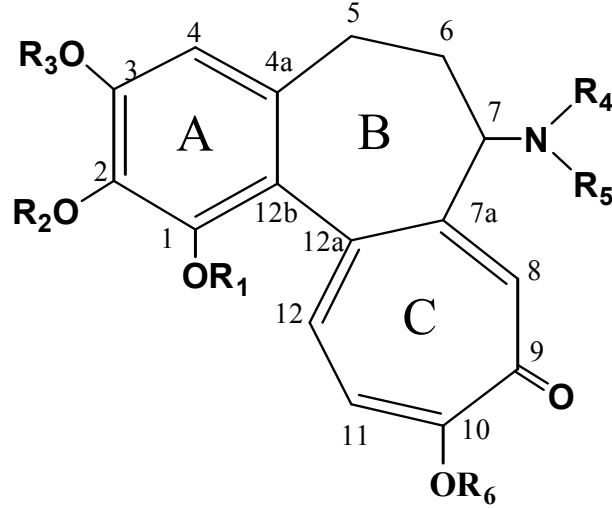


Tropolon  
(Sikloheptatrienolon)



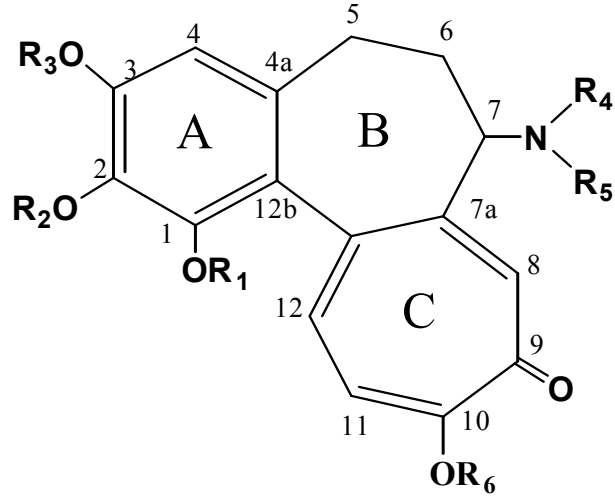
Tropolon metil eter

**Tropolon Alkaloitlerinin Kimyasal Formülleri (3, 21, 51, 61)**



**Tablo 2-1 Nötral ve fenolik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri**

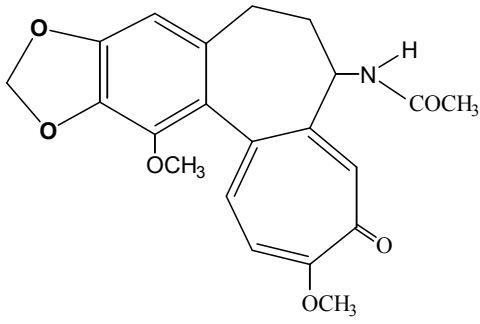
<i>Nötral ve Fenolik Alkaloitler</i>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>
Kolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2-demetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
3-demetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2,3-didemetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
N-deasetilformil kolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CHO	CH <sub>3</sub>
2-demetil-N-formil-N-deasetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CHO	CH <sub>3</sub>
3-demetil-N-formil-N-deasetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>
2-asetil-2-demetil kolşisin	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Kolşikozit	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
N-metilkolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Kolşisein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	H
2-demetilkolşisein	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	H
3-demetilkolşisein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	H
N-deasetil-N-formil kolşisein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CHO	H
N-asetildemekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
N-formildemekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Kolşifolin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
2-demetilkolşifolin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>



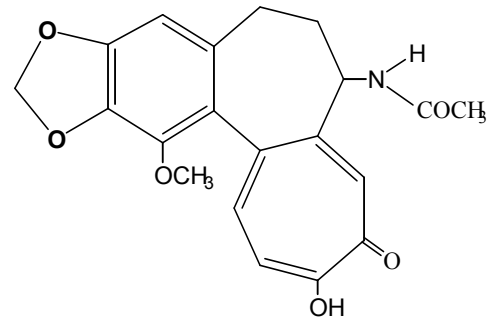
**Tablo 2-2 Bazik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri**

<i>Bazik Alkaloitler</i>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>
N-deasetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
3- demetil-N-deasetil kolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
2- demetil-N-deasetil kolşisin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
2,3-didemetil-N-deasetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
N-deasetilkolşisein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
Demekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
3-demetildemekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2-demetildemekolsin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Demekolsein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
N-metil demekolsein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
N-metildemekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
2,3-didemetil demekolsin	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

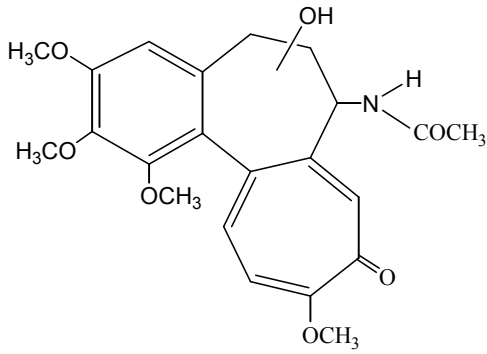
### 2.2.2.2.Tropolon Halkası Taşıyan Diğer Nötral ve Fenolik Alkaloitler :



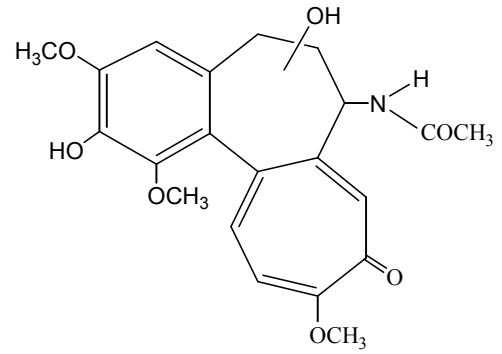
Kornigerin



Kornigerein



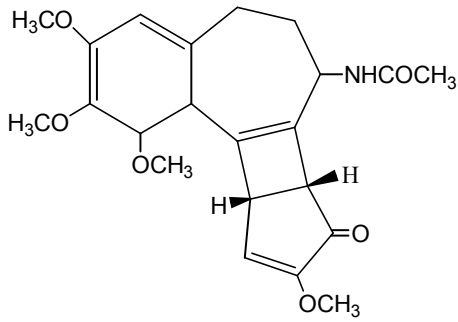
Kolşisilin



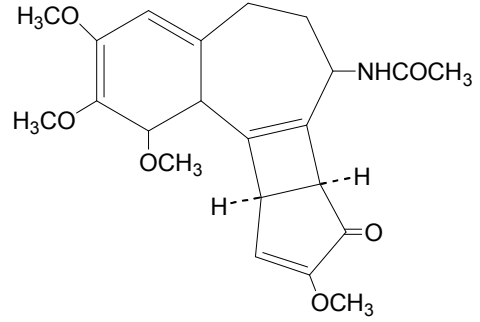
2-demetilkolşisilin

Kolşisin ve türevleri ışığa karşı hassastır ve ultraviyole ışığa maruz kaldıklarında  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$ -lumikolşisinden oluşan kolşisin izomerleri karışımı meydana gelir. Bu

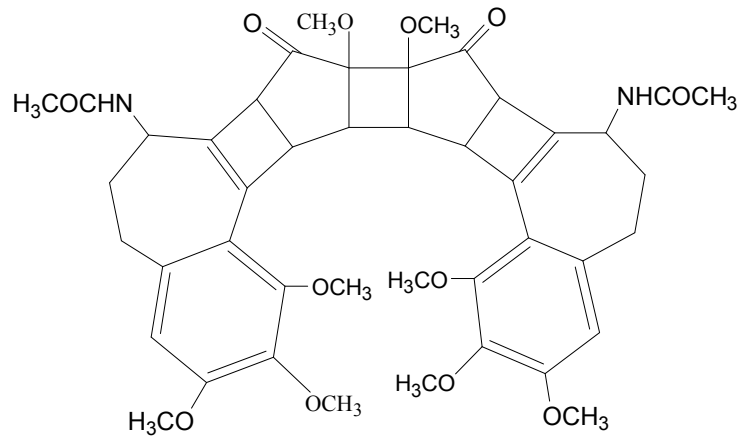
fotoizomerler tropolonoit yapıda değildirler ve tübüline bağlanmazlar. Bunlarda en çok ortaya çıkan ve üstünde çalışılan  $\beta$ -lumikolşisin (46, 51, 82).



$\beta$ - Lumikolşisin



$\gamma$ - Lumikolşisin



$\alpha$ - Lumikolşisin

### 2.2.2.3. Tropolon Halkası Taşımayan *Colchicum* Alkaloidleri:

Fenetiltetrahydroizokinolin bazları

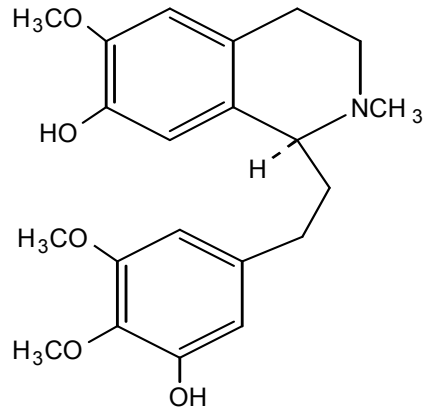
Androsimbin alkaloitleri

Dihidro ve tetrahidro androsimbin alkaloitleri

Homoproporfin alkaloitleri

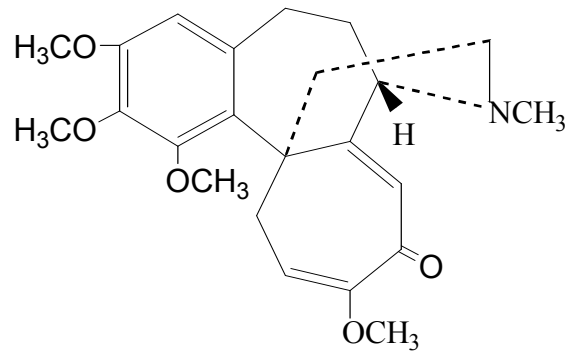
Homoaporfin alkaloitleri

Benziltetraizokinolin-İzokoridin alkaloitleri

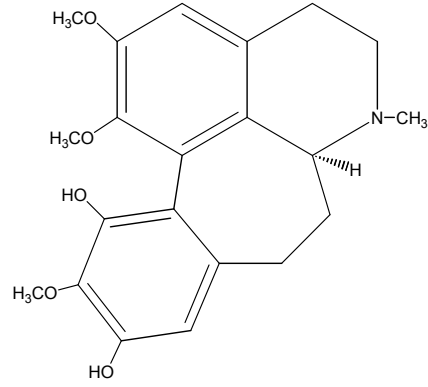


Autumnalin

(fenetiltetrahidrobenzilizokinolin alkaloidi)



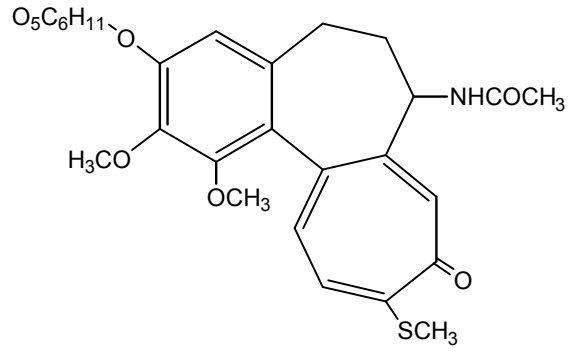
Androsimbin (32)



Baytopin (homoaporfin alkaloidi) (75)

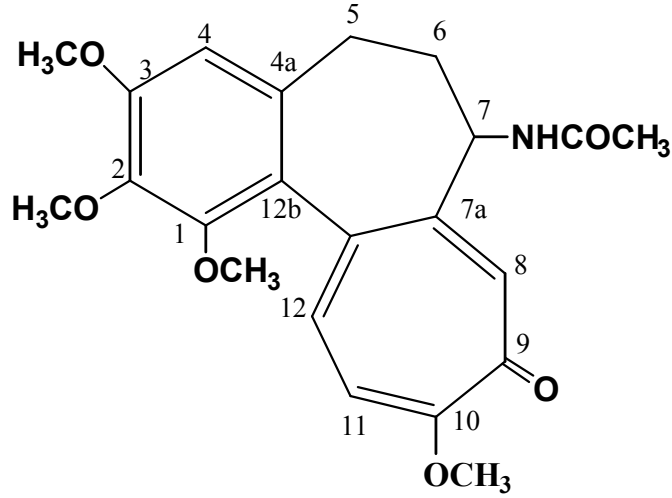
### 2.2.3.Sentetik Tropolon Alkaloidleri:

Tiyokolşisin ve türevi alkaloidler



Tiyokolşikozit

### 2.2.4. Tropolon Alkaloidlerinin Yapı-Aktivite İlişkileri: (15)



KOLŞİSİN

1- Sadece a *S*-konfigürasyonlu biaril sisteme sahip bileşikler aktiftir. Konfigürasyonu a *R*'ye dönüştürmek bu etkiyi yok eder. Rasemik karışımlar saf a *S* izomerlerden daha düşük aktiviteye sahiptir (13, 59)

2- Aromatik A halkasının süstitüsüyonu, örneğin kolşikozit ve 3-demetilkolşisinin O-glikozitinin inaktif olmasından dolayı kritiktir (71, 73, 84).

3- A halkasında aromatik süstitüsüyon biyolojik aktivite üstünde oldukça yüksek bir etkiye sahiptir

4- Yapılan bazı çalışmalar sonucu tübüline bağlanmada 3-demetil kolşisinin oldukça aktif ve kolşisinden daha az toksik olabileceği gözlenmiştir (17).

5- Kolşisinin A halkası analogu olan meskalin ve N-asetilmeskalin de, mikrotübülleri kısmen inhibe etmektedir. Bundan yola çıkarak yapılan çalışmalarda, kolşisinin tübüline C'nin yanı sıra, A halkasından da bağlandığı belirlenmiştir (4, 9, 19). Tüm bu veriler kolşisinin etkisinin C halkası ve onun yan zincirli türevleri ve A halkasına dayandığını da göstermektedir (51).



**6-** Kolşisindeki C-1, C-2, C-3 ve C-10 ve *N*-asetilkolşisinil metil eterdeki C-1, C-2, C-3 ve C-9 metoksi grupları molekülün proteinlere bağlanmasında oldukça önemlidir. Bu metoksilerin çıkarılması veya fenolik gruplara dönüştürülmesi kolşisitte olduğu gibi proteinlere bağlanma potansiyelinde düşmeye yol açar (59).

**7-** *N*-açıl bileşiklerin *N*-deasetil türevlerine göre hem tübüline bağlanma hem de antitümör etki açısından daima daha aktif olduğu belirlenmiştir (73).

**8-** C-7 amido grubunda asit artığı zincirinin uzaması aktiviteyi azaltır. En yüksek etkiyi *N*-deasetil-*N*-formilkolşisin gösterir. Amino grubunda bir asit artığı olan bileşikler ile azotta ayrıca bir metil grubu taşıyanların LD<sub>100</sub> ve terapötik indeksi birbirinin aynısıdır (69, 73).

**9-** Kolşisinoit ve allo-türevlerindeki 7- asetamido grubu tübüline bağlanmada etkisizdir (69).

**10-** Demekolsinin açıl türevleri *N*-metildemekolsine göre daha aktiftir.

**11-** B halkası tübüline bağlanmada etkili olmayabilir. Fakat bununla ilgili bir çalışmada kolşisinin sadece B halkasında küçük sübstitüentler bulunduğu zaman tübüline bağlanmanın daha hızlı geliştiği gözlenmiştir (65). B halkası ilaç-tübülün etkileşmesinde bir role sahip değilse bile taşıdığı sübstitüentler bağlanma özelliklerinin belirlenmesinde önemlidir (51).

**12-** Kolşifolinin *N*-metil, *O*-etil ve *O*-açilli türevleri de kolşifolin ve kolşisin kadar aktiftir

**13-** Tropolon ve tropolon metil eter tübülünün polimerizasyonunu bloke eder. [<sup>3</sup>H] Tropolon metil eter her bir tübülün molekülünde tek bir bölgeye bağlanır ve bu bağlanma aynı bölgeye bağlandığı düşünülen kolşisin vb. maddeler tarafından inhibe edilebilir (69).

**14-** 10-Tropolon metil esterin túbülin molekülüne bağlandığı ve *in vitro* olarak túbülinin polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (12).

**15-C-10'**daki metoksi grubunun amino veya tiyo eter grupları ile yer değiştirmesi aktivitede önemli bir değişime sebep olmaz (59).

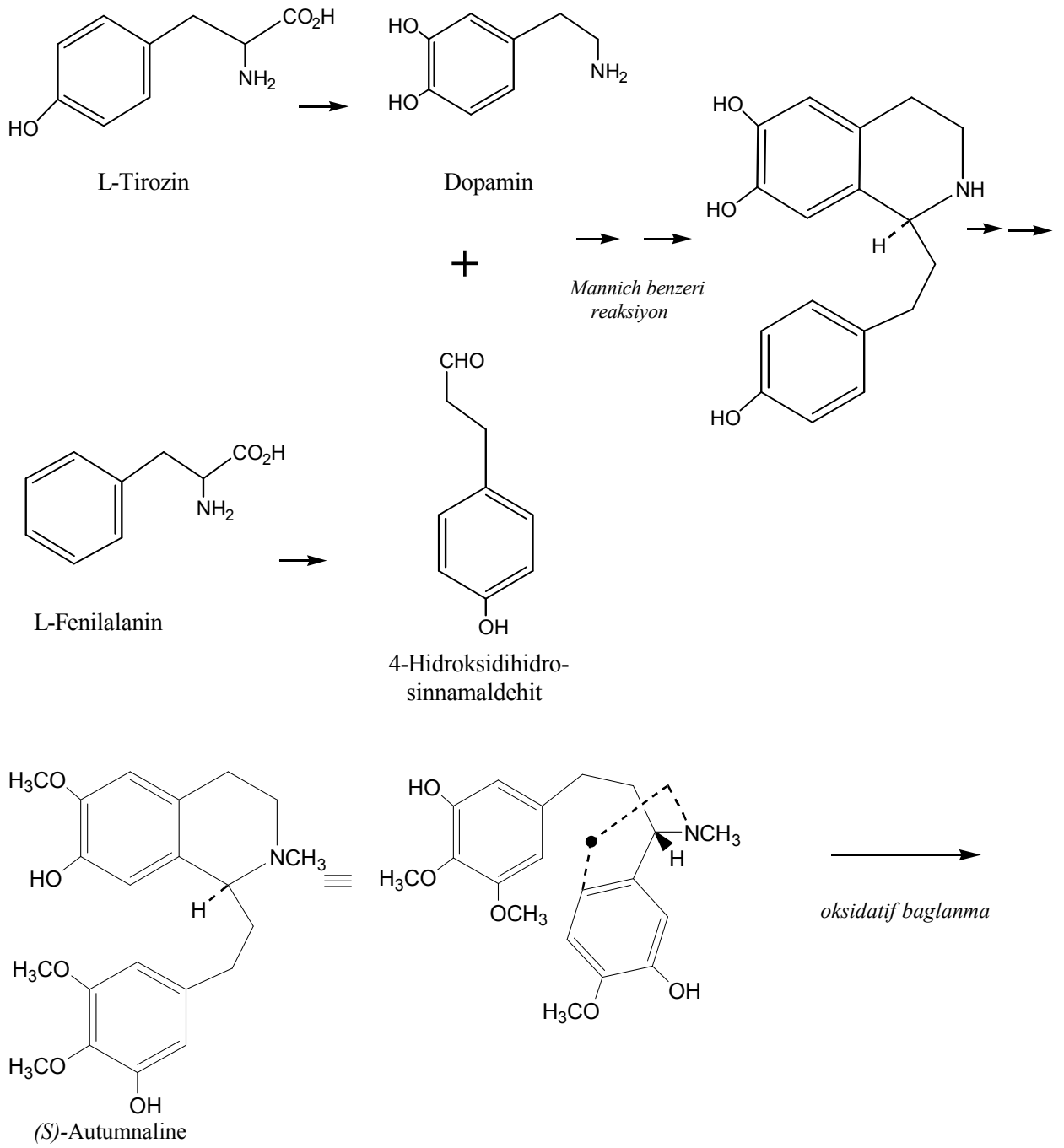
**16-** İzokolşisinler ve 10-CH<sub>3</sub> sübstitüenti yerine 10-OH olan, keto enoller, yani kolşiseinler inaktiftir.

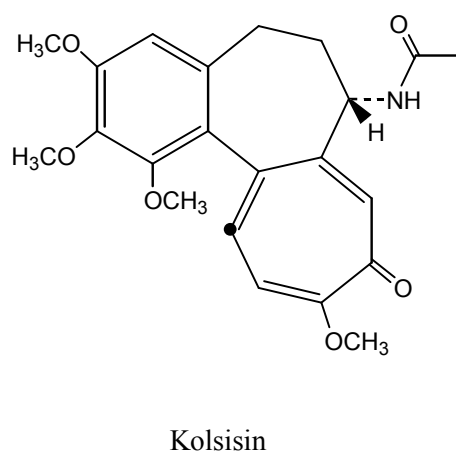
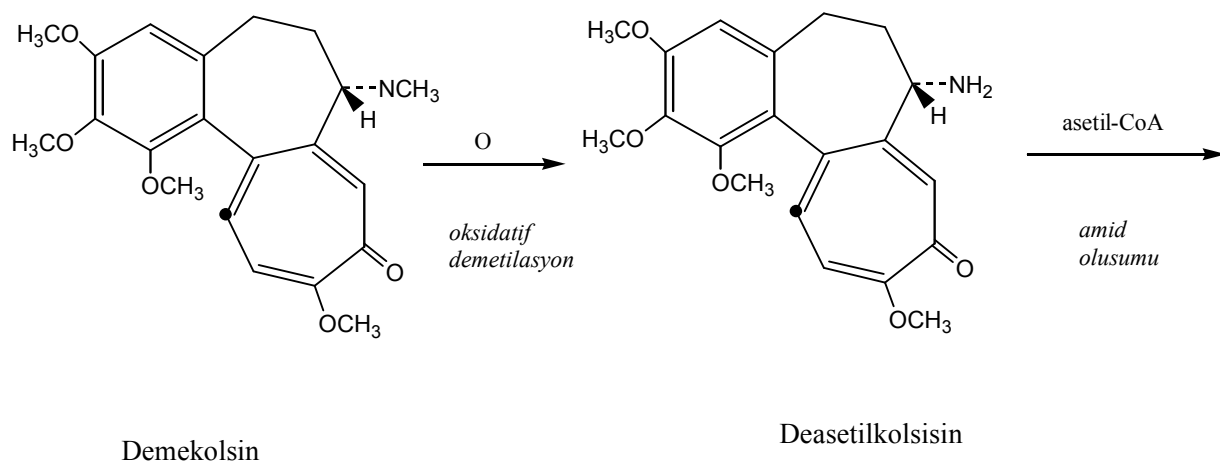
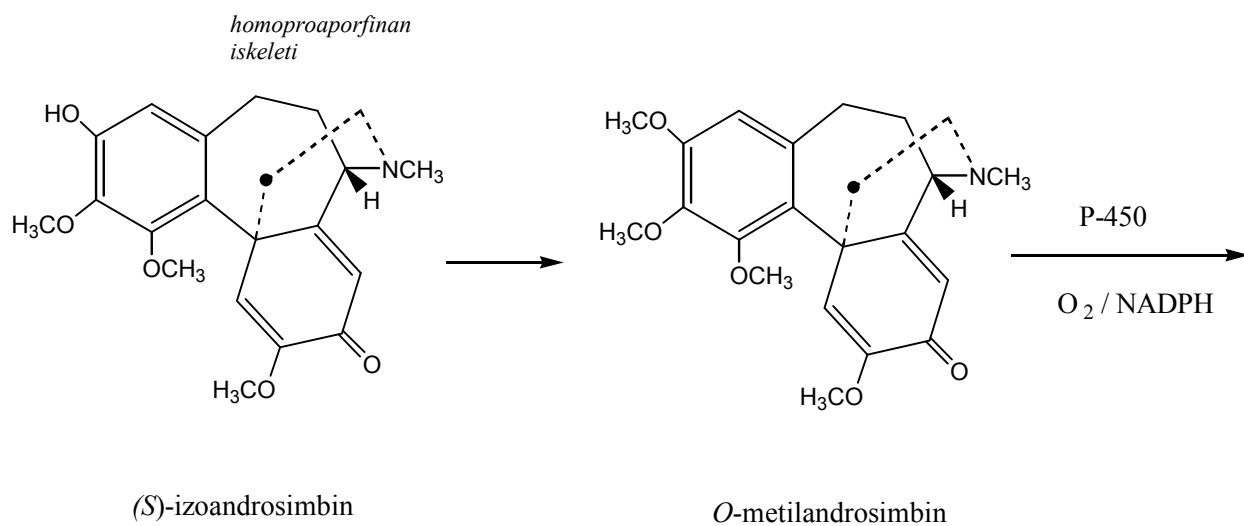
**17-** Oksikolşisin, epoksikolşisin ve lumikolşisin inaktiftir (69)

#### **2.2.5.Kolşisinin Biyosentezi:**

Kolşisinin total sentezi 1959 yılına kadar tam olarak gerçekteştirilememiş, fakat bundan sonra çalışmalarda ilerleme kaydedilmiştir (32). İlk biyosentez çalışmaları 1960'ta Leete ve Battersby tarafından gerçekteştirilmiştir (49) Biyosentezin fenetilizokinolin alkaloidlerine giden ilk aşamalarını Herbert ve grubu aydınlatmışlardır (42). Fakat bu ilk aşamalarda hidroksilasyon ve metilasyon olaylarının gerçekteşme yolları halen soru işaretleri taşımaktadır (60).

**Biyosentez Şeması (25, 60, 61, 67, 73)**





### 2.2.6.Tropolon Alkaloitlerinin Teşhisi: (73)

1- Tropolon alkaloitleri, dilüe asit veya alkalilerle hidroliz sonucu kolşisein türevini meydana getirirler. Fenolik tropolon yapısında olan bu maddeler  $FeCl_3$  ile zeytin yeşili renk verirler. Kloroformda bu renk kırmızıdır, lumi türevleri ise bu reaksiyonu vermezler (Oberlin-Zeisel Reaksiyonu) (20, kaynak: 73 p. 17).

2- Alkaloit çözeltisine birkaç damla mineral asit eklenirse koyu sarı renk oluşur, bu renk nitrik asitle önce yeşil-mavi sonra kırmızımsı sarı ve sonuçta renksiz olur (18, 32).

3- Kolşisinin etanoldeki çözeltisine  $FeCl_3$  eklenirse kırmızı renk açığa çıkar (86).

4- Tropolon alkaloitleri konsantre  $H_2SO_4$  ile 48 saat kalıcı sarı renk, lumitropolon türevleri ise anında mor-kırmızı veya turuncu renk verirler (70).

5- Kolşisin  $H_2SO_4$  ile ısıtılınca kırmızıya dönüşen sarı renk verirler (40, kaynak: 73 p.19).

6- C-7'de amit grubu taşıyan tropolon alkaloitleri Dragendorff belirteci ile turuncu renk verirler.  $\beta$ - ve  $\gamma$ - lumikolşisin ise bu belirteçle zamanla kızılkahveye dönen siyah renk alırlar (70).

7- Tropolon alkaloitleri Carr-Price belirteci (antimontrikloritin kloroformdaki çözeltisi) ile sarı renk verirler (68, kaynak: 73 p. 19).

8- Kolşisin, Wagner belirteci ( $I_2 / KI$ ) ile hafif asitli ortamda kahverengi bir çökelti verir (20, kaynak: 73 p. 17).

9-  $UV_{254}$  nm'de tropolon alkaloitleri koyu menekşe renk verirler.  $UV_{366}$  nm'de kolşisin alkaloitleri bej, demekolsin alkaloitleri kahverengi ve lumi türevleri ise gri renk alırlar (70).

**10-** C-2 ve C-3'te serbest fenolik grup içeren tropolon alkaloidleri, gün ışığında silikajelde sarı renk verirler (68, kaynak: 73 p. 19).

### 2.3.Farmakolojik Bölüm\*

*Colchicum* türlerinin tıbbi kullanımından ilk olarak M. S. 1. yy'da Pedanius Dioscorides tarafından yazılmış olan "Materia Medica" da bahsedilmiştir (39). Eski Arap metinlerinde *Colchicum* türlerinden elde edilen ekstrater, gut hastalığındaki kullanımı için tavsiye edilmiştir. Gut tedavisi için ayrıca Tralles'li Alexander tarafından 6. yy'da kullanılmıştır (28, 50). Ancak Orta Çağda zehirli özelliklerinden korkularak çok az kullanılmıştır. (29, 46). 1763'de Baron Von Storck tarafından gutta oluşan podagra (ayak başparmağında tipik gut nodülü) kullanılışı ile birlikte daha çok ödem ve nonromatoid durumlardaki kullanılışından bahsedilmiştir. Daha sonraları 1820'de gut tedavisinde en etkili ilaç olarak tekrar ortaya çıkmıştır (10). Kolşisin ilk olarak 1820'de Pelletier ve Caventou tarafından izole edilmiş (50), ancak yapısı ilk kez 1945'te Dewar tarafından aydınlatılabilmektedir (51). Mitoz bölünmeyi –metafaz aşamasında- durdurduğu 1889'da Pernice tarafından kayda alınmış, fakat biyolojik önem taşıyan tübülün-inhibitör etkisi 1930'ların ortalarına kadar dikkate alınmamıştır. Kolşisin antitümöral ajan olarak araştırılmış, fakat tümör seçiciliğinin olmadığı belirlenmiştir (50). Fakat daha az toksik olan deasetilkolşisin ileri kanserlerin tedavisi için halen araştırılmaktadır (59) 1972 yılında Goldfinger, devamlı olarak günde 0,6-1,8 mg uygulayarak kolşisinin 5 hastadan 3'ünde abdominal ağrı krizlerini önlediğini belirlediği zaman Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) için yeni bir çağ başlamıştır. 1972'den beri FMF profilaksisinde en etkili tedavi aracı olarak popülaritesini korumaktadır (9, 50).

Bununla birlikte diğer kolşisin analogları (demekolsin gibi) kronik miyeloid lösemi ve malign lenfomada kullanılmıştır (3). Kolşisinin gut tedavisindeki terapötik etkisi objektif olarak ilk kez 1987'de çift-kör, plasebo kontrollü 43 hastadan oluşan bir çalışma (önce 1 mg, sonrasında cevap alınana veya toksisite oluşana kadar her 2 saatte bir 0,5 mg'lık dozlar halinde kolşisin uygulanmıştır) ile kanıtlanmıştır (1) Ayrıca kolşisin FMF tanısını çarpıcı bir şekilde değiştirmektedir; çünkü amiloidozları önemli derecede önleme yeteneğine sahiptir ve hastalığın gerilemesini sağlar. Kolşisin kortikosteroid ve immünsupresanlarla yapılan hatalı tedavileri düzeltmek amaçlı da kullanılabilmektedir (50).

\* Literatürlerde tedavide aktif olarak kullanılan kolşisin ile ilgili bilgiler bulunduğundan bu bölümde daha çok kolşisinin farmakolojisine değinilmiştir.

### 2.3.1.Tropolon Alkaloitlerinin Tedavide Kullanılışları (50)

#### 2.3.1.1.Akut Gut Atakları ve Profilaksisi:

Gut, ürik asit metabolizmasının bozukluğu sonucu oluşan hiperürisemi hali ve akut artrit nöbetleri ile kendini gösteren kronik bir hastalıktır. Zamanla eklemler ve yumuşak dokularda monosodyum urat kristalleri birikmesine ve idrar yollarında urat taşı oluşumuna neden olabilir. Gut hastalığının tanımı ilk olarak M.Ö. 5 yy.da yapılmıştır. Hipokrat, zengin beslenme alışkanlığı ile ilişkilendirilen bu hastalığı ilk olarak “Kralların hastalığı” olarak nitelendirmiştir. 40 yaşının üstündeki erkeklerde iltihaplı artrit en büyük sebebidir ve klinik olarak bu hastalığa sıklıkla rastlanır. Akut gut, monosodyum urat kristallerinin birikmesine cevap olarak gelişen yoğun bir iltihap halidir. Semptomları aniden başlayan ağrılar, sınırlı hareket ve etkilenen eklemlerde yanmadan ibarettir (44, 45). Kolşisin gut artritinde seçici olarak antienflamatuar etki gösterir. Akut gut artriti, periartriküler dokuda çöken urat kristallerinin granülositler tarafından fagosite edilmesiyle başlar; fagositoz sonucu lizozomlar parçalanır, proenflamatuar maddeler ortama salıverilir ve fagositlerin metabolizmaları hızlı olduğu için fazla laktik asit oluşur. Böylelikle ağrı meydana gelir. Kolşisin, urat kristallerinin fagositozunu engelleyerek dokunun asitleşmesini, bu sayede yeniden kristallenmeyi ve lökosit (Polimorfonükleer lökositler-PMNL) göçünü önler. Lökositlerin hareketinin önlenmesinin, hücre içindeki mikrotübüllerin, kolşisin tarafından parçalanmasına bağlı olduğu sanılmaktadır. Kolşisin’in granülositlerde, artrit oluşmasına katkıda bulunan bir glikoprotein yapısını ve salgılanmasını inhibe etmek suretiyle de antiartritik etki yaptığı ileri sürülmüştür. Akut nöbet başladıktan sonra kolşisin ne kadar erken verilmeye başlanırsa o derece çabuk ve başarılı olunur. Nöbetin ilk birkaç saati içinde tedaviye başlanırsa olguların aşağı yukarı % 95’inde tedavi başarılı olur. İlacın gut artriti için spesifik olması nedeniyle artrit türünü saptamakta diyagnostik önemi vardır (44). Ayrıca deasetilmetilkolşisin, trimetilkolşisinoinik asit ve deasetiltiyokolşisinin de yapı olarak kolşisine benzediklerinden kolşisine eşit dozlarda, kolşikozit ise -daha düşük olsa da- antigut etki gösterirler (51).



### 2.3.1.2.Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) ve Profilaksisi:

FMF, soğuğa karşı aşırı hassasiyet, değişik tipte nöropatiler veya değişik organlarda amiloid birikimleri (kan damarlarının duvarlarında fibril tabakalarından oluşan patolojik ekstraselüler birikimler) ile ilişkili, kalıtım yoluyla geçebilen amiloidoz tipi bir hastalıktır (76). Hastalığın patojenezi tam olarak bilinmemekle beraber en sık rastlanan klinik olgu, tekrarlayan akut karın ağrısı ile birlikte vücut sıcaklığının yükselmesi şeklindedir (50). Kolşisin FMF hastalığının başlıca ilacıdır, atakların sıklığında gözlenebilir bir azalma (% 90'ın üzerinde hastada) ve tamamen durma sağlar (52). Ayrıca kolşisin'in FMF'li hastaları, amiloidozdan koruduğu kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışma primer amiloidozlu hastalarda da iyileşmeyi artırdığını gösterir (51). Abdominal ağrı epizotlarını önleme ve aşırı derecede amiloidoz oluşumuna engel olma konusunda tek ilaçtır. Bu hastalıktaki etkisinin PMNL'lerin kemotaksisini düşürmesi, kemotaktik faktörlerin ve süpresör T-lenfosit fonksiyonunun yeniden düzenlenmesini azaltmasından ileri geldiği belirtilmektedir.

#### 2.3.1.2.1.FMF'te Kolşisinin Etkilerinin Aşamaları

- Abdominal ağrıların profilaktik tedavisi

Goldstein ve Schwabe çapraz geçişli bir yöntemle günde 1,8 mg kolşisini oral yolla 3 hafta boyunca, sonrasında ise aynı miktar plaseboyu yine 3 hafta boyunca veya bunları tam tersi sıra ile uyguladığı 10 hastayı değerlendirmiş ve kolşisin kullanan grupta epizot sayısında ciddi oranda azalma tespit etmiştir. Tedavi gören hastaların % 80'inde, plasebo alanların ise % 10'unda ağrılı epizotlara rastlanmamıştır (38, kaynak: 50 p. 296). Zemer ve arkadaşları tarafından yapılan çapraz değişimli bir çalışmada ise 22 hasta 2 hafta boyunca günde 1 mg p.o. kolşisin almış, sonraki 2 hafta boyunca ise plasebo (veya tam tersi sıra ile) almıştır. Tedavinin ilk haftasında kolşisin alanlarda ataklar önemli derecede seyrek görülmüştür (83 kaynak: 50 p. 297). Bu ve benzeri çalışmalar kolşisinin ağrı epizotlarını önleyici etkisini kesinleştirmektedir. Daha uzun süren çalışmalarda (1-4 yıl, ~ 60 hasta) günde 0,5-1,5 mg kolşisin kullanan hastaların oldukça büyük bir çoğunluğu asemptomatiktir. Ancak akut epizot bir kez ortaya çıktıktan sonra kolşisin etkisizdir veya hasta tedaviye uymayınca ağrı hızla yeniden ortaya çıkar. Profilaktik tedavi 1-3 yılda son bulur ve bununla ilgili yapılan bir çalışmada 84 hastanın 50'sinde ağrılı ataklar önlenmiş, 28'inde ağrı sıklığı ve şiddeti azalmıştır

- Amiloidozun önlenmesi

Zemer ve arkadaşlarının kolşisini günde 1 veya 2 mg'lık dozlar halinde devamlı olarak uygulaması, ilacın amiloidozu önlediğini göstermiştir. 1070 hasta ile yürütülen bu çalışmada 960'ında tedaviye başlandığı anda amiloidoz artışına rastlanmamıştır. Başka bir deneyde ise kolşisin alan 135 çocuğun % 2,3'ünde amiloidoz gelişmiştir

- Amiloidoz semptomlarının giderilmesi

1997 yılında yaptıkları çalışmada Ravid ve arkadaşları 3 hasta üzerinde 30 hafta boyunca günlük 1,5 mg kolşisin uygulamasından sonra nefrotik semptomların gerilediğini ve renal fonksiyonların iyileşme gösterdiğini görmüşlerdir.

- Böbrek naklinden sonra amiloidoz oluşumunun engellenmesi

Günlük 1,5 mg kolşisin, nakledilmiş organda amiloid artıklarına bağlı olarak FMF oluşumunu engellemek veya ekstra renal bölgelerde ilerlemesini önlemek amacıyla immünosupresanlarla birlikte hastaya verilebilir.

### 2.3.1.3.Behçet Hastalığı

Behçet hastalığı genellikle Orta Doğu ve Japonya'da rastlanan sistemik bir vaskulittir (kan damarlarının iltihabı). Bukkal ve genital aft tipi ülserler, deri ile ilgili çeşitli lezyonlar, körlüğe yol açabilen uvea (gözün iris, silier cisim ve damar tabakasını içine alan orta kısmı) iltihabı, artrit, tromboflebit, nörolojik ve gastrointestinal oluşumlar ve arteriyel anevrizmalar ile karakterizedir. Patojenezi tam olarak bilinmemektedir. Kolşisin Behçet hastalığı tedavisinde, PMNL'lerin kemotaksisini azaltıp veya normale döndürüp, yine fagositozu bloke ederek etki gösterir (23, 43) Özellikle mukozal lezyonlar ve ön kısımda görülen uveitte etkili olduğu düşünülmektedir ve uzun süreli uygulamalar bunu doğrulamıştır. Matsumura ve Mizushima yaklaşık 2 yıl, Behçet hastalığı olan 12 hastaya günde 1 mg kolşisin vermiş ve 8-9 ay sonunda oküler belirtiler 7'sinde yok olmuş, büyük kısmında aft ve eklem ağrıları hafiflemiştir. 157 hastanın yer aldığı kontrolsüz bir çalışmada, 1 yıl boyunca günde 1 mg kolşisin uygulanarak etkisine bakılmış ve hastaların 104'ünde oküler gelişim gözlemlenmiştir (53, kaynak: 50 p.306). Bu hastalığın tedavisinde kolşisin etki / toksisite oranı en iyi olan ilaç gibi görünmektedir ve immünosupresif bir ajanla beraber kullanılması tavsiye edilmektedir.

#### **2.3.1.4.İleri Sistemik Skleroz:**

Akciğerler ve sindirim kanalı başta olmak üzere tüm organlara kolajen geçişi ve kolajenin aşırı derecede birikiminden kaynaklanan sistemik bir patolojik durumdur. Hastalığın gelişiminin önceden tahmin edilmesi ve değerlendirilmesinin objektif bir şekilde yapılması zordur. Kolşisin, fibroblastların fonksiyonel anomalilerini ve bu hastalıkta şüphelenilen kolajen sentezini engellemek için kullanılmıştır. İlaç ayrıca bu hastalıktan kaynaklanan deri altı kireçlenmesinde de aktif olabilir. Böylelikle sistemik sklerozun ilerlemesini organlarda yerleşmeden önce yavaşlatarak belli sayıda hastada yaşam kalitesini artırabilir

#### **2.3.1.5.Primer Safra Sirozu:**

Bu hastalık interlobular safra kanalına karşı T lenfositlerine bağlı olarak gelişen ataklar ile karakterizedir. Safra kanallarının yıkımı ve giriş yolları ile hepatik parenkimada fibroz doku oluşumundan dolayı uzun bir zaman sonra siroz ortaya çıkar. Tedavi, safra kanallarının bozulmasını ve onu takiben kolestaz oluşumunu engellemek amaçlıdır. Kolşisin bu hastalıkta monosit ve lenfosit fonksiyonlarını normalleştirir, böylelikle fibroblastların proliferasyonunu durdurur. Hastalık esnasında artan tümör nekroz faktörünün sentez ve salgılanmasını önemli derecede azaltarak etkili olur (9).

#### **2.3.1.6.Karaciğer Sirozu:**

Karaciğer sirozu, patolojisi hepatik parenkimal hücre yıkımı, birleşik doku oluşumu ve nodüler rejenerasyondan ibaret olan, ölüm oranı yüksek bir hastalıktır. Kolşisin karaciğer koruyucu bir ilaçtır ve bu hastalıkta antienflamatuvar, antifibrotik ve kollajen miktarını azaltan ilaç olarak kullanılmaktadır. Kolşisin kollajenin hücrelerarası hareketini engeller ve sirozlu hastalarda serum bilirubin ve albumin değerlerini düzeltir ve protrombin süresini kısaltır (30, 48) 14 yıldan uzun bir zamandır karaciğer sirozu olan 100 hasta takip edilmiştir. Randomize, çift-kör, plasebo kontrollü çalışmada 54 hastaya kolşisin, 46'sına plasebo verilmiştir. İlk grupta iyileşen hastalar, ikinciye nazaran daha fazladır. Kolşisin alan hastaların % 50'den fazlası doku gelişmesi

göstermiş, plasebo grubunun 14'ünde histolojik gelişmeye rastlanmamıştır. Ayrıca *in vitro* deneylerde kolşisin kolajenaz sentezini stimüle eder (79).

#### **2.3.1.7.Alkolik Siroz:**

Sıklıkla kronik alkolizm sonucu olarak ortaya çıkan sirozdur. Hafif fibrozis ve yağlı değişim sonucu karaciğer büyümesi meydana gelir (76). Kolşisin anti-fibroz özelliğinden dolayı bu hastalıkta uzun süreli kullanılabilir. Sirozun erken dönemlerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte alkolik sirozda kolşisin klirensi azalmıştır. Kolşisin potansiyel olarak bu patolojide kullanılabilir.

#### **2.3.1.8.Hodgkin Lenfoma:**

Bu rahatsızlık, 1832 yılında Sir Thomas Hodgkin tarafından tanımlanmıştır. Lenf dokuları ve lenf bezlerinin kötü huylu hastalığıdır. Belirtileri ise ağrısız ve lastik kıvamında lenf düğümü büyümesi (lenfadenopati), yüksek ateş, gece terlemeleri, kilo kaybı, kuvvetsizlik ve iştahsızlıktan ibarettir (5, 80). Kolşisin antimitotik ve buna ek olarak ağrı kesici, ateş düşürücü etkilerinden dolayı bu hastalıkta kullanılmıştır.

#### **2.3.1.9.Kronik Lenfoit Lösemi:**

Kronik lenfoit lösemi, küçük, olgun görünümlü, uzun ömürlü lenfositlerin sistemik olarak çoğalmasıyla karakterize bir hastalıktır (47). Kolşisin *in vitro* olarak düşük konsantrasyonda (0,1 mg/ml) malign lenfositleri, normal lenfositlere etki etmeden yok edebilmektedir. Bu özelliğinden hastalığın teşhis ve tanısında faydalanılabilir. Dirençli kronik lenfoit lösemili 14 hastaya, 2-3 mg doz ile başlayıp tümör yeniden oluşana, yan etkiler ortaya çıkana veya bunlar olmasa da hastalık ilerleyene kadar, i.v. kolşisin uygulanmıştır. 2 hastada adenopati ve dalak büyümesi azalmış, 7 hastada hastalık durdurulmuştur. Bununla birlikte, birbiriyle kıyaslanamayan sonuçlar ve yan etkiler kolşisin kullanımını sınırlamaktadır

**2.3.1.10.Kanser:**

Radyoterapi gören gutlu hastalarda kolşisinin olumlu etkileri görülmüştür. İleri meme kanserli, cerrahi müdahalede bulunmuş ve radyoterapi görmüş 90 kadın 5 yıl sonra yapılan bir çalışmada, ameliyattan önce ve sonra kolşisin türevlerini kullanmış ve her 6 ayda bir kolşisin preparatı alan 55 kadında tedavi, bunların uygulanmadığı diğerlerine göre daha iyi olmuştur (85). N-deasetil kolşisin daha az toksik olduğu ve bu sebeple daha yüksek dozlarda kullanılabilirdiğinden dolayı umut verici görülmektedir.

**2.3.1.11.Palmoplanter Püstüloz:**

Bu hastalıkta avuç içlerinde ve ayak tabanlarında püstüller meydana gelir. Etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Bu püstüller PMNL'lerin kemotaksisini artıran faktörler içerir ve kolşisin bu kemotaksiyi inhibe ederek hastalıkta etkili olabilir

**2.3.1.12.Sedef Hastalığı (Psoriasis):**

Psoriasis, deride malpigyan tabakanın (bazal tabaka) epidermal hücrelerinin çalışmasının gittikçe yavaşlaması sonucu oluşan bir hastalıktır. Klinik olarak özellikle dirsek ve dizlerin doğrultucu kaslarının yüzeyinde gümüşümsü, dökülen pullar oluşur. Kolşisin, mitozu ve PMNL'lerin kemotaksisini inhibe edici özelliklerinden dolayı hastalığın ince psoriyatik plakları ile kronik aşırı formlarının tedavisinde başarılı olmuştur. Fakat lokal irritasyon ve ilacın deriden emiliminin ölçülememesinden dolayı lokal kolşisin tedavisinden vazgeçilmiştir, oral yolla kullanılmaktadır. Tüm bunlarla birlikte kronik psoriasisde ve kalın plaklarda tam olarak etki gösterememiştir (78).

**2.3.1.13..Eklem Kireçlenmesi (Kondrokalsinoz):**

Eklemlerde çöken kalsiyum pirofosfat, PMNL'ler tarafından fagosite edilir, böylelikle PMNL'ler ve monositler için kemotaktik faktörlerin serbestlenmesi uyarılır. Kolşisin bu hastalığın akut formlarında etkilidir, ayrıca uzun dönemde hastalığın tekrarlamasını azaltır. Kolşisin romatolojik rahatsızlıklarda kesin önlem amacı ile i.v. yolla uygulanır.

### 2.3.1.14.Ateroskleroz:

Kolşisin burada etkili olabilir çünkü çeşitli aterojenik maddelerin (düşük yoğunluklu lipoproteinler, fibrinojen, kolajen, katekolamin, serin) salgılanmasını ve guanilat siklazı inhibe, adenilat siklazı aktive eder. Arter duvarlarındaki elastik liflerin sayısını artırabilir.

### 2.3.1.15.Diğer Rahatsızlıklar

Kolşisin antienflamatuvar etkilerden dolayı cilt rahatsızlıklarında, ciddi dermatitlerde kullanılmaktadır. Çünkü kolşisin uygulanmış bütün cilt rahatsızlıkları lökositlerin birikmesi ve kemotaksisinin artması ile karakterizedir. Bu sebepten dolayı ilaç yararlı görünmektedir.

Dermatit herpetiformis, skleroderma ve *Condiloma acuminatum* rahatsızlıklarında etkili olduğu görüşleri vardır. Bunlardan başka dermatomiyozis, Paget kemik rahatsızlığı, psödogut, malarya, refraktör idiyopatik trombositopenik purpura, retinal hastalıklar ve fibromatozda yararlı olduğu düşünülmektedir.

Dermatomiyosit kalsinozunda kolşisinin belki de antienflamatuvar aktivitesinden dolayı etkili olduğu düşünülmektedir. Genellikle deride lokalize olan ve dokusal olarak, abnormal PMNL'lerin küçük damarların duvarlarından süzülmesi ile karakterize olan lökositoklastik vaskulitte ve peristaltizmi stimüle etme yeteneğinden dolayı kronik konstipasyonda etkili olabilir. 15'i idiyopatik lökositoklastik vaskulitli 26 hastada yapılan bir deneyde 17 hasta tedaviye tamamen cevap vermiştir ve kolşisin kesildiğinde 16 hastada belirtiler yeniden oluşmuştur (14, kaynak: 50 p. 321)

Sarkoidozda ise kolşisin antienflamatuvar etkisinden dolayı kullanılabilir. Bu iltihaplanma çeşitli organları tutan, eklem iltihaplarını da içeren patolojik bir durumdur. Daha az rastlanan kullanılışlar; porfiria, çok odaklı tekrarlayan periostoz (kemik yüzeyinden dışa doğru olan kemiksi büyüme), kriyoglobulinemi, T-hiper İg sendromu, veziküler ve vezikül oluşumuna neden olan hastalıklar, Sweet sendromu, aftlar, nüks eden romatizmalar, disk rahatsızlıkları, venöz trombozlar ve lenf damarlarının tıkanması, akut ve tekrarlayan perikarditler, amfizemdir ve tekrarlayan polikondrit'te de (51) etkili olabileceği düşünülmüştür.

### 2.3.2. Tropolon Alkaloitlerinin Geleneksel Tıbbi Kullanılışları

Bitkinin toksisitesinden dolayı halk arasında akut gut ve Ailevi Akdeniz Ateşi dışında dahili kullanımı seyrekdir. Fakat ilaç önceleri deri tümörlerinde, kondiloma, psöriazis, nekrotik vaskulit, tendovajinit, gastro intestinal sistem iltihapları, Behçet hastalığı, karaciğer sirozu, akut ve kronik lösemide; ayrıca bit, astım, ödem ve romatizmada kullanılmıştır (34). Önceleri halk arasında romatizma ağrılarını dindirmek için bir tutam acı çiğdem (*Colchicum* sp.) tohumu 2-3 diş sarımsak ile havanda dövülür, elde edilen sulu kısım bir tülbente emdirilir ve tülbent de ağrıyan bölgeye sarılarak pansuman yapılırdı (8).

### 2.3.3. Tropolon Alkaloitlerinin Diğer Kullanılışları

Kolşisinin mitoz inhibisyonu, bitki genetiği araştırmalarında ve yetiştirme programlarında, kromozom sayısını iki katına çıkarma özelliğinden dolayı önemlidir (64). Bunun sonucunda haploit bir hücreden diploit ve ileri aşamada poliploit hücreler meydana gelir. Bu özelliğinden tarım alanında da yararlanılarak daha büyük çiçek, meyva veren bitkiler elde edilebilmektedir (7, 77).

### 2.3.4. Kolşisinin Farmakokinetiği (9, 50)

Kolşisinin farmakokinetiği iki ayrı proteinden etkilenmektedir. Bunlar: tübülün ve P-glikoproteindir. Tübülün, bir araya gelerek hücre bölünmesinde son derece önemli olan mikrotübülleri meydana getiren protein olup kolşisin için spesifik hücre içi reseptörüdür ve bu maddenin kandaki eliminasyon yarı-ömrünü düzenler. P-glikoprotein ise hücresel taşıyıcı proteindir yani kolşisinin absorpsiyonunu dokulara dağılımını, safra ve böbrekten eliminasyonunu düzenler. Kolşisinin terapötik indeksi oldukça dardır, bu nedenle optimum tedavi düzeyini ayarlamak zordur (51).

#### 2.3.4.1. Emilim

Kolşisin'in emilimi oran ve miktar açısından çeşitli farklılıklar gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışmada 10 sağlıklı genç erkeğe <sup>14</sup>C ile işaretlenmiş 1 mg kolşisin oral yolla uygulanmış ve her biri için plazma düzeyleri ince tabaka kromatografisi (İTK) ile belirlenmiştir. Kolşisin'in 30. ve 120. dakikalar arasında

verdiği pike göre plazma konsantrasyonu yaklaşık 3 ng/ml'dir. Bununla birlikte bireyler arasında pik süresinde ve pik konsantrasyonlarında büyük farklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar gastrointestinal mukozanın çeşitliliği, emilim bölgesindeki pH farkları, gastrik doluluk veya boşluk, intestinal motilite veya bağırsaklarda bağlandığı maddelerden kolşisinin serbestlenme oranı faktörleri ile açıklanabilmektedir. Diğer bir radyoimmünoassay'de 1 mg kolşisin oral yolla alındıktan sonra 6 ng/ml pik plazma konsantrasyonu belirlenmiştir (51). Emilim bölgesi tam olarak bilinmemekle beraber ilacın ileuma ulaştığı düşünülmektedir. Çünkü kronik kolşisin doz aşımında bağırsakların bu kısmının fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar .

Wallace ve Ertel sağlıklı gönüllülerde 1 mg i.v. uygulamadan sonra pik plazma konsantrasyonunun ortalama 0,32 µg/ 100 ml olarak göstermişlerdir (81) Yapılan farklı bir deneyde solüsyon formun oral uygulamasından sonra pik plazma konsantrasyonları (Cmax) 6,5 ng/ml; biyoyararlanım ise % 47 olarak ölçülmüştür. Çoğu gönüllüde uygulandıktan sonra 6 saat içinde ikinci bir pik ortaya çıkmıştır. Tahminen 2. bir absorpsiyon olayı olduğu veya ilacın enterohepatik siklusa girdiği düşünülmektedir Bu ikinci absorpsiyon süreci ilkinden belirli bir biçimde daha uzundur (33) Oral uygulamadan sonra T max'ın 1-3 saat olduğu ve tablet ile solüsyon emiliminin benzer olduğu belirlenmiştir. Tek doz uygulamadan sonra, absorpsiyon oranı doza bağımlıdır. Bireyler arası değişkenlikler fazladır.

#### **2.3.4.2.Dağılım**

Yapılan bir çalışmada 2 mg'lık tek doz intravenöz uygulamadan sonra 4 ayı hasta grubunda kolşisin'in plazma düzeyleri İTK ve inen usül kağıt kromatografisi ile saptanmıştır. Eliminasyon yarı ömürleri ve dağılım hacimlerinin (Vd) yaklaşık sonuçları sırasıyla şu şekildedir: Normal renal ve hepatik fonksiyonlara sahip olan ve hiperürisemik olmayan hastalardan oluşan 1. grupta 19 dk ve 2 L/kg ; gut hastalarından oluşan 2. grupta 29 dk ve 2 L/kg ; çeşitli böbrek hastalıklarına sahip bireylerden oluşan 3. grupta 40 dk ve 1,8 L/kg; çeşitli karaciğer hastalıklarına sahip bireylerden oluşan 4. grupta ise 9 dk ve 1 L/kg). Kolşisinin model bağımsız farmakokinetiği üzerinde yapılan randomize, çapraz geçişli bir çalışmada oral yolla 3 farklı kolşisin dozundan (0,5 ; 0,1 ve 1,5 mg'lık) sonra 9 sağlıklı erkek gönüllü üzerinde farmakokinetik parametreler ölçülmüştür. Oral uygulamayı takiben dağılım hacmi (V<sub>d</sub>) 11,4 – 14,9 L/kg olarak



çıkıştır. Bu deneyden çıkan sonuca göre çalışılan doz aralığı ile kolşisinin farmakokinetiği doğru orantılıdır (37). Diğer bir çalışmada ise 14 gün boyunca çok dozlu olarak kolşisin 1,0 mg'lık oral solüsyon veya tablet halinde ve 0,5 mg'lık i.v. olarak 6 bireye uygulanmıştır. İ.v. enjeksiyondan sonra ( $V_d$ ) yaklaşık 419 L, sistemik klirens (Cl) 8,5 L/sa ve  $t_{1/2}$  57,8 saat olarak çıkıştır (33). Radyoaktif kolşisin'in dağılımı ile ilgili hayvan deneylerinde ilacın böbrekte, dalakta ve karaciğerde konsantrasyonları yüksek çıkıştır. Fakat kalpte, iskelet kaslarında ve beyinde ilaca rastlanmamıştır. Periferal lökositlerde intravenöz enjeksiyondan 10 dk. sonra kolşisin konsantrasyonu 4,3 ng/ml ile pik vermiş ve 1,8 ile 2,3 ng/ml arasında 24 saat boyunca sabit kalmıştır. İlaç lökositlerde ve ürinde basit bir i.v. dozundan sonra 9. gün sonuna kadar tespit edilebilir.

Yapılan bir çalışmada 12 sağlıklı erkek gönüllüde; kaplanmış tablet (A) ve oral solüsyon (B) olmak üzere iki ayrı kolşisin formülasyonunun 1'er mg'lık tek dozlarının biyoyararlanımı ve farmakokinetiği değerlendirilmiştir. Spesifik bir radyoimmünoassay; kanda 72 saat sonuna kadar ve idrarda 96 saat sonuna kadar olan kolşisin kinetiklerini belirlemede kullanılmıştır. Ortalama pik plazma konsantrasyonları 1,15 (A) ve 1,13 (B) saatte 4,15 (A) ve 4,88 (B) ng/ml'ye ulaşmıştır. Ortalama yarı ömürleri 9,31 (A) ve 10,57 (B) saattir. Kolşisin'in tam bir farmakokinetik analizi için i.v. uygulamadan sonra çoğu çalışmada olduğu gibi 72 saat beklemek gerekmektedir. Kolşisinin oral uygulamasından sonra dağılım hacmi 4,25 L/kg olarak hesaplanmıştır. Bu, ilacın dokuya yoğun bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Plazmada kolşisinin % 50'sinin proteinlere bağlandığı bilinmektedir. Ayrıca i.v. uygulamadan 10 gün sonra lökositlerde kolşisin tespit edilmiştir. Yapılan son çalışmalar biyoyararlanımın % 25-50 olduğunu göstermiştir (9). Lökositlerdeki konsantrasyon plazmadakinden 5 - 10 kat daha fazladır. Bundan başka, sağlıklı farelere uygulanan dozun % 40'ına dalakta rastlanmıştır (51). Tedavi kesildikten sonra, kolşisin idrarda 7-10 gün, lökositlerde 10 gün kalır. Dağılım hacmi oldukça yüksektir (500- 900 L) ve bu molekülün dokuya güçlü bir şekilde bağlandığını gösterir.

### 2.3.4.3. Metabolizasyon

Kolşisin eski bir ilaç olmasına rağmen metabolizması ve atılımı hakkında çok az bilgi mevcuttur. Başlıca karaciğerde oksidatif demetilasyona uğradığı bilinmektedir (51). Yapılan hayvan deneylerine göre büyük ihtimalle önce safradan atılımının, daha sonra bunu takiben karaciğerde sitokrom P 450 sistemi tarafından demetilasyon olayının gerçekleştiği tahmin edilmektedir (26). Kolşisinin memelilerde 4 ana metabolizasyon ürünü, değiştirilmiş Udenfriend redoks sistemi ile tespit edilmiştir. Buna göre majör metabolitler 2-demetilkolşisin, 3-demetilkolşisin, kolşisein ve kolşinaldır (15). Kolşisin metabolitlerinin onun biyolojik etkisiyle ilişkisi açık değildir. Safra ve intestinal salgıda hem kolşisinin (ilacın kendisinin) hem de metabolitlerinin yüksek oranda bulunması enterohepatik sıklusa girdiğini göstermektedir.

### 2.3.4.4. Eliminasyon

Kolşisin'in eliminasyonu büyük oranda inaktif metabolitler halinde safra yolu ile olmaktadır. metoksi grubunun karbonu işaretlenmiş kolşisin emilim, biyoyararlanım ve atılımı ölçmek için kullanılmıştır (59).

Kolşisin ve metabolitleri idrar ve safra içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Safradaki büyük bir miktarı enterohepatik sıklusa girer. Ayrıca bu durum, doz aşımının toksik etkilerini ve günlük dozu alan hastalarda gastrointestinal yan etkilerin sıklıkla görülmesini açıklamaktadır. % 10-20'sinin sağlıklı bireylerde idrar içinde atılmasına rağmen, karaciğer hastalarında ilacın karaciğer tarafından alınması eliminasyonu azalmakta ve büyük bir çoğunluğu idrar ile atılmaktadır (51). Çünkü hasarlı karaciğer hücreleri kolşisini kandan alamaz, bu sebeple kolşisin düzeyleri yüksektir ve renal atılımı hızlıdır. Bir çalışmada FMF'li böbrek ve karaciğer hasarlı olanlarda klirensin önemli derecede azaldığı görülmüştür (9). Kolşisin safra ve böbrek yolları ile atıldığı için, safra kesesi ve böbreklerde eliminasyondaki herhangi bir bozukluk toksisite ile sonuçlanabilir.(51).

Üriner atık i.v. dozdan 2 saat sonra % 20, 24 saat sonra % 30 olarak hesaplanmıştır. 7-10 gün sonra idrarda küçük, fakat ölçülebilir miktarlara rastlanmıştır. Kolşisin'in safra yoluyla atılımı ile ilgili olarak farklı hayvan türleri üzerinde çalışılmıştır. Sıçanlarda [<sup>3</sup>H] kolşisin'in i.v. olarak uygulanmasından sonra %68'i 48 saat içinde feçes ile atılmıştır. 2 saat içinde % 50'sine safrada rastlanmıştır. Bunun

yarısı kolşisin, geriye kalanı demekolsin ve diğer polar metabolitlerdir. Hamsterlarda, köpek ve tavşanlarda yapılan deneylerde ise çeşitli safra atılım miktarları gözlemlenmiştir (sırası ile % 32, 20 ve 16; 51).

Eliminasyon yarı ömrü, bunu değerlendirmek için kullanılan tekniğe ve ilacın verilmiş zamanına göre değişir (radyoimmunoassay ile yapılmış bir denemede kolşisin ve metabolitleri için  $t_{1/2} = \sim 51$  saat, nonmetabolize kolşisin için 20 saat, metabolize kolşisin için 1 saat olarak ölçülmüştür); sağlıklı bireylerde 14 ile 30 saat arasında değişmekte olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan bir çalışmada yarı ömür ( $t_{1/2}$ )  $\sim 15,5 - 19$  saat; oral uygulamayı takiben sistemik klirens (Cl)  $\sim 32 - 40$  L/sa; renal klirens  $\sim 4 - 5$  L/sa olarak ölçülmüştür (37). Başka bir çalışmada ise total klirens  $\sim 38$  L/sa ve renal klirens  $\sim 4$  L/sa çıkmıştır, bu da ekstrarenal eliminasyonun üstünlüğünü gösterir.

### **2.3.5. Yan Etkileri (50, 51)**

En çok görülen yan etkiler sindirim sistemi ile ilgili, nöromusküler, hematolojik ve kütanöz yan etkilerdir. Kolşisine bağlı şiddetli yan etkiler ve hatta ölüm uygulama şeklinin değil, doz aşımının bir sonucudur. Yan etkiler daha çok hastanın hepatik ve/veya renal yetmezliğinin olduğu durumlarda görülür. Doza bağımlı gastrointestinal semptomlar, nöromiyopati, yanlış uygulanan i.v. dozun yol açtığı kemik iliği supresyonu, yine i.v. uygulamada damardan dışarı çıkmasından dolayı oluşan doku nekrozu, sitopeni, yayılmış intravasküler, renal bozukluk, ölümle sonuçlanabilen paralizi ve pıhtılaşma rastlanabilen diğer yan etkilerdir (45). Tüm bunlara ek olarak kolşisin diğer antiinflamatuarlara göre daha seyrek yan etkilere sahiptir.

#### **2.3.5.1. Gastrointestinal Yan Etkileri**

Hastaların % 80'inde ortaktır. Mide bulantısı, kusma ve karın ağrısını takip eden diyareden ibarettir. Bunlar terapötik dozda hafif, maksimum dozda daha şiddetli olmaktadır. Yan etkiler i.v. kullanımda daha seyrekdir. Bu etkiler kolşisinin prostoglandin sentezini uyarmasından kaynaklanabilir. Daha ciddi bir toksisiteden kaçınmak için bu semptomlar ortaya çıkar çıkmaz kolşisin tedavisi kesilmelidir. Günde 3 mg (total doz 12-21 mg) olarak ölen 5 hastada ölümler gastrointestinal sistem yan etkileri, sepsis, kanama ve akut renal yetmezlikten kaynaklanmıştır.

Uzun süreli akut gut tedavilerinde yağlı dışkılama, malabsorbsiyon ve intestinal enzim aktivite bozuklukları görülebilir. İnsan mukozal fonksiyonundaki değişiklikler, açık gut semptomları olmasa dahi, uzun süreli uygulamalarda gözlemlenmiştir. Bunlar mukozal hücre toksisitesinin sonuçlarıdır.

Oral kolşisin uygulanan (günde 1 mg- yetişkin- renal ve hepatik fonksiyonları normal) 10 hastadan 8'inde istenmeyen gastrointestinal sistem etkileri ortaya çıkmıştır. Bu etkiler genellikle önce diyare, sonra mide bulantısı, kusma ve karın ağrısı şeklinde gelişmiştir. FMF'te kolşisin intestinal permeabiliteyi artırır ve laktozun malabsorbsiyonunu önemli derecede yükseltir.

### **2.3.5.2.Kas ve Nörolojik Sistem Üzerine Yan Etkileri**

Kolşisin miyopati ve nöropatisi sıklıkla görülen etkilerdir. Nöromiyopati uzun süreli kolşisin kullanımında, normal dozlarda veya diğer organ bozukluklarına eşlik eden akut intoksikasyon da gelişebilir. Kas zayıflıkları ve duyu semptomları da rastlanan diğer yan etkilerdir.

Kas ve nörolojik sistem ile ilgili yan etkiler tedavi sırasında veya intoksikasyon sonucu ortaya çıkar ve birkaç hafta sonra son bulur. Bu etkilerin ortaya çıkması hafif renal yetmezliklerde kolaylaşır. Semptomlar proksimal kas zayıflıkları, bazı küçük distal duyu bozuklukları, osteotendon refleksi kaybı ve kas enzimlerinin yükselmesi şeklinde olur. Kolşisinin kesilmesiyle semptomlar azalmaya başlar

### **2.3.5.3.Hematolojik Yan Etkileri**

Kemik iliği depresyonu, kısmen akut intoksikasyon da görülebilir. Hiposelüler kemik iliğinin, akut gut artritlerinde terapötik dozların i.v. olarak verilmesinden sonra gözlemlendiği tespit edilmiştir. Kemik iliği depresyonu doz aşımından veya intoksikasyondan 3-8 gün sonra görülür.

Hematolojik etkiler genellikle sindirim, kas ve nörolojik sistem etkilerinden önce ortaya çıkar. Agranülositoz, veya anormal farklı kan sayımı riski uzun süreli adapte kolşisin tedavisinde genellikle düşer. 5 yıla kadar kolşisin kullanmış hastalarda aplastik anemiye yakalanma sıklığı yüksektir.

#### **2.3.5.4.Deri Üzerine Yan Etkileri**

Ortaya çıkan allerjik reaksiyonlar genellikle ürtikerdir. Ekzema, dermatit, bül, epidermoliz, purpura, kutanöz vaskulit ve belirli kızarıklıklar şeklinde bildirilmiştir. Geri dönüşümlü alopesi, intoksikasyonda klasik bir reaksiyondur ve nadiren uzun süreli adapte dozlarda ortaya çıkar.

#### **2.3.5.5.Üreme Üzerine Yan Etkileri**

Spermatojenez, erkek ve dişi doğurganlığı ve fetus üzerinde yapılan çalışmaların çoğu doğurganlığı etkilenen FMF hastaları ile yapılmıştır. Erkeklerde spermatojenez yetersizliği ve libido azalmasına yol açmış ve spermatojenez yetersizliği tedavi kesildiğinde ortadan kalkmıştır..Kolşisin sperm penetrasyonunu etkilediği daha önceden rapor edilmiştir. Hayvan deneylerinde yine molekülün çok yüksek dozlarda potansiyel teratojen etkisi olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte hamilelik esnasında kolşisin tedavisine devam edilmesi tercih edilir, fakat fatal karyotipi belirlemek için amniyo sıvısı örneği almak gerekir. İlacı alan ve süt veren annelerin uygulamadan 8 saat sonra emzirmeleri önerilir. Kolşisin çocuğun normal gelişimini önlemez ve FMF olup tedavi görmeyen çocuklara oranla tedavi görenler daha normal gelişirler.Yapılan bir çalışmada kolşisin tedavisi gören 62 Behçet hastası erkeğin 23'ünde oligosperma, 2 tanesinde ise azosperma meydana gelmiştir.

#### **2.3.5.6.Diğer Yan Etkileri**

Kolşisin idrar kesesinin geçirgen epitelinin bölünmesini inhibe eder. Birden çok nedenli renal yetmezliklerde intoksikasyon görülebilmektedir. Ayrıca hipotermi, diyabet, kanda yağ abnormalitesi, düşük libido, enjeksiyon bölgesinde flebit rastlanan diğer yan etkilerdir.

#### **2.3.6.Toksisitesi (50)**

Kolşisin düşük güvenlik aralığına sahiptir. Ölümcül doz aralığı oldukça geniştir. 0,5 mg/kg bir tek doz ile zehirlenme belirtileri gelişebilirken, 0,8 mg/kg'dan yüksek doz ile 72 saat içinde ölüm meydana gelebilir. Toksisitede sindirim ile ilgili belirtiler uygulamayı takiben ilk 6 saat içinde görülür; bu etkiler genel olarak şiddetli diyare,

karın ağrısı, hipovolemiye varan tekrarlayan kusmadan ibarettir. Hipotermi, çizgili kas iltihabı ve bundan kaynaklanan renal yetmezlik, medullar yetmezlik, yaygın intravasküler koagülasyon, metabolik asidoz, piramidal nekroz, elektrolit dengesizliği ve multiviseral fonksiyon bozuklukları da bunların yanı sıra ortaya çıkar. Kolşisin özellikle ilk 36-54 saat içinde kalbe direkt toksik etki gösterir. Solunum bozukluğu ile ilgili belirtiler ise hipoperfüzyon, solunum kaslarının paralizisi, boşluklarda ya da alveollerde ödem gelişimi şeklindedir. İntoksikasyon tedavisi semptomatiktir ve ilacın dağılım hacminin yüksek olması sebebiyle ölüm oranı yüksektir.

### **2.3.7.Kolşisin İntoksikasyonunun Klinik Belirtileri**

Zehirlenme belirtileri terapötik dozlarda bile ortaya çıkabilir. Böbrek ve karaciğer hasarları, saç dökülmesi, periferik sinir iltihabı, miyopati ve kemik iliği hasarı semptomları ile beraber (lökeni, trombositopeni; megablastik anemi ve daha seyrek aplastik anemi); uzun süreli kullanımlarda ortaya çıkabilir. Kolşisin intoksikasyonunun klinik belirtileri aşamalarına göre tablo 2-3'de gösterilmiştir. Akut toksik dozun alınmasından 3-6 saat sonra ağızda yanma, yutkunma zorluğu ve susama ortaya çıkar. 12-14 saat sonra mide bulantısı, çeşitli mide ağrıları, hipotansiyon, spazmlar ve ileri paralizisi ortaya çıkar. İleri derecede yorgunluk, asfiksi (soluk alamama) ve dolaşım kollapsını takiben ölüm meydana gelir (9). Kolşisinin fatal dozu 7-200 mg arasındadır. Zehirlenme tedavisi gastrik lavaj ve tuzlu bir purgatif (sodyum sülfat gibi) uygulamasından sonra semptomatik olarak devam eder (konvülsüyonda diazepam, bağırsak spazmında atropin) ve tedavi muhtemel intübasyon ve oksijen verilmesini de içerir (34).

**Tablo 2-3 Kolşisin intoksikasyonunun klinik belirti ve iyileşme aşamaları (9)**

<b>Faz I</b>	<b>Faz II</b>	<b>İyileşme</b>
karın ağrısı mide bulantısı kusma diyare dehidrasyon	renal bozukluk solunum bozukluğu kardiyak bozukluk pansitopeni metabolik asidoz elektrolit dengesizliği yaygın intravasküler koagülasyon konvülsiyonlar koma	lökositoz alopesi

### **2.3.8.Kontraendikasyonları**

Kolşisin renal veya hepatik fonksiyon bozukluğu olan bireylerde dikkatli kullanılmalıdır (45).

### **2.3.9.İlaç Etkileşimleri**

Kolşisin siklosporin etkileşimi intoksikasyona yol açabilir. Ayrıca kolşisin sitokrom P-450 inhibitörleri ile de etkileşime girer (50).

Kolşisin tedavisi, diğer bileşiklerin ve ilaçların bağırsaklarda emilimini değiştirir. Yapılan bazı hayvan deneylerine göre kolşisin sıçana intraperitoneal olarak uygulanmış ve küçük intestinal lümeden izoniazid, kinidin ve sülfisoksazol'ün emilimini geciktirmiştir. Kobayların bağırsak mukozasında B<sub>12</sub> vitamininin malabsorbsiyonunu artırmıştır. Oral uygulamalarda, tedavi edilmemiş hastalarla karşılaştırıldığında FMF'li hastaların oldukça büyük bir yüzdesinin laktoz intoleransını artırır. Kolşisin karaciğerde sitokrom P(CYP)-450 sisteminin CYP3A4 izoformu tarafından demetilasyona uğradığından dolayı bu enzim tarafından metabolize olan diğer ilaçlar ve bileşiklerle birarada verildiğinde etkileşime girme olasılığını yükselir ve yüksek toksik etkilerin meydana gelme riski artar (9, 50).

**Tablo 2-4 Kolşisin ile etkileşime giren maddeler (9)**

<b>CYP3A4 Sübstratları</b>	<b>CYP3A4 İnhibitörleri</b>
Kolşisin	Diltiazem
Östrojen	Gestoden
Steroidler	Greyfurt suyu *
Dapson	Ketokonazol *
Diltiazem	Eritromisin *
Eritromisin	
Lidokain	
Lovastatin	
Midazolom	
Kinidin	
Testesteron	
Toleandomisin *	
Nifedipin	
Verapamil	

\*Bu maddeler CYP3A4 izoformu üzerinde spesifik bir inhibitör etkiye sahiptir

Sitokrom P-450 ile yarışan moleküller (simetidin, eritromisin, siklosporin) veya P-glikoprotein'i durduran moleküller (siklosporin), ayrıca hepatik ve renal klirensini düşürerek kolşisin'le etkileşime girebilirler (50).

### **2.3.10.Uyarılar**

Karaciğer rahatsızlıklarında, böbrek yetmezliklerinde ve ileri yaştaki hastalarda kolşisin dozu azaltılmalıdır. Bireyde renal klirens 10 ml/dk. ise, alternatif bir ilaç düşünülmelidir (50).

İlaca başladıktan sonra ağrı kesilene veya gastrointestinal toksik belirtiler ortaya çıkana kadar aynı doz iki saatte bir tekrarlanır. Genellikle 4-10 mg'lık toplam doz ağrıyı geçirmeye yeterlidir. Eğer gastrointestinal belirtiler ağrı kesilmeden önce belirmiş ve kür başarısız olmuşsa ilaç kesilir; en az üç günlük bir aradan sonra ikinci küre başlanabilir (44).



### 2.3.11.Kullanım Şekli ve Doz Ayarlaması (51)

Oral uygulamalarda önden 1,2 mg'lık bir doz, daha sonra her 1-2 saatte bir tekrarlanarak ağrı zayıflayana kadar veya karın ağrıları/diyare gelişene kadar uygulanmalıdır. İntra venöz uygulandığında ise 2 mg'lık doz 6 saatte bir 2 kez 1'er mg'lık olarak uygulanır. Profilaksi için ise 0,6-1,2 mg/d uygulanır(45) Küçük profilaktik dozlar, istenmeyen yan etkiler oluşmadan akut atağın sona ermesine yardımcı olabilir. Dozaj, gözlemlenen yan etkiler meydana gelmeden, atakları önleyecek şekilde ayarlanır.

İ.v. uygulama yolu cevabın çabuk olmasından ve gastrointestinal rahatsızlıkların daha az görülmesinden dolayı bazen tercih edilir. Ağrının ve iltihabın azalması genellikle ilaç oral yoldan uygulandıktan 24-48 saat sonra, intra venöz yoldan uygulandıktan sonra ise 6-12 saat sonra görülür.

Çocuklarda doz ayarlaması kiloya göre yapılır. Ataklar kontrol altına alınamazsa doz günde 2,0 mg'a çıkartılabilir. Toksikiteden kaçınmak için günde 2,0 mg'dan yüksek bir doz kısa bir süre verilmelidir. İlacın kesilmesi çoğu hastada hastalığın yeniden ortaya çıkmasına neden olur.

### 2.3.12.Etki Mekanizmaları (50)

Kolşisin pek çok etki mekanizmasına sahiptir, ancak bunlar oldukça karmaşık olmakla birlikte tam olarak bilinmemektedir. Bilinen etki mekanizmaları ise şu şekilde açıklanabilir:

Kolşisin, sürekli dinamik dengede duran tübülün proteinlerinin mikrotübülleri oluşturacak şekilde birleşmelerini bloke eder. Bunu tübülüne birebir bağlanarak gerçekleştirir (24, 27). Ayrıca kolşisin, podofillotoksin ve vinblastin gibi tübülüne nonkovalent bağ ile bağlanır; bu da polimerizasyonu önler (18). Eritrositler hariç tüm hücre tipleri (sinir hücreleri, silli hücreler, lökositler ve sperm kuyruklarında bulunan organellere geniş oranda dağılmıştır) hücre fonksiyonu ve bölünme için gerekli olan mikrotübülleri içerir. Bir araya gelemeyen mikrotübüllerin sayısının azalması tübülün mRNA'sının sentezini durdurur. Yani kolşisin mitotik inhibitördür. Mitotik uzamada rol alan tübülün proteinlerine bağlanarak bunların polimerizasyonunu ve mikrotübüllerde toplanmasını önler. Mitoz bölünme boyunca, kromozomlar bu mikrotübüllerin yardımı ile bölünüp, tekrar tübülüne dönüşürler (29).

Kolşisinden başka demekolsin ve deasetilkolşisin de iyi inhibitörlerdir (18). Bu antimitotik etki ilk olarak Sicilya'lı patolojist Pernis tarafından 1889'da tanımlanmıştır. Tübülün inhibisyonu; hücrelerin formunun ve ultra yapısının değişikliği, uyarılmasından bağımsız olarak hücrelerin hareketinin inhibisyonu, mitokondriyal yapının değişmesi, hücre bölünmesi sırasında iğ ipliklerinin inhibisyonu, kromozom dağılımının düzensizleşmesi, lökositlerde ve makrofajlarda reseptörün hareketliliğinin inhibe edilmesi, pinositozun inhibisyonu, lizozomların hareketliliğinin ortadan kalkması ve böylece degranülasyonlarının ve kemotaktik faktörlerin salınımının yok olması, salgı granüllerinin hareketliliğinin azalması, kollajen sentezinin ve kollajenazın stimülasyonunun inhibisyonu, azalan siklik AMP, trombosit salgılanmasının inhibisyonu, prostaglandin sekresyonunun uyarılması, polimorfo nükleer lökositlerin ve monositlerin kemotaksisinin ve hareketliliğinin azalması ve böylece fagositoz azalması, Arthus reaksiyonunun inhibisyonu, mast hücrelerinden histamin salınımının inhibisyonunu gerçekleştirir. Lizozom degranülasyonunun bloke edilmesi ve Arthus reaksiyonunun durdurulması olayları kolşisinin antienflamatuar etkisine neden olmaktadır. Kolşisinin mikrotübüller üzerindeki etkisi ile ilgili olmayan diğer özellikleri aksonal taşımının inhibisyonu, sinaps morfolojisinin değişimi, nörotransmitterlerin inhibisyonu, DNA sentezinin inhibisyonu, lenfoblastların ve mitojen varlığında non-lenfoit hücrelerin proliferasyonunun azalması, hücre füzyonunun inhibisyonu, kalsiyum akışını değiştirerek platelet agregasyonunun azalması, membran bileşenlerinin yatay hareketliliğinin değişmesi ve membran akıcılığının azalması; yüksek konsantrasyonlarda insülin ve parathormon salınmasının *in vitro* inhibisyonu olaylarını gerçekleştirmesi şeklindedir. Bunlarla birlikte immünoregülatör özellikler, FMF'te ve safra sirozunda düzgün çalışmayan supresör T-hücreleri fonksiyonunun yeniden yapılandırılması şeklinde açıklanabilir. Bir de immünosupresif etkiye sahiptir. Kolşisin, immünglobulin A nefropatisini deneysel olarak engeller.

Bunların yanında lökosit üzerindeki en güçlü etkisi kemotaksizdir ve antienflamatuar aktivitesinin bu inhibitör etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Kolşisin polimorfonükleer hücreler tarafından sitokin üretimini düzenler. Etkisi lökositlerdeki konsantrasyonuna ve lökositlerin aktif iltihaplardaki rolüne bağlı olabilir (9).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. DeneySEL Bölüm

##### 3.1.1. Materyal

Çalışmada kullanılan *Colchicum bivonae* Guss. bitkisi, meyvalı olduğu dönemde Bolu-Abant Gölü çevresinden 16.06.1990 (İSTE 61483) ve 20.07.2005 tarihlerinde; ayrıca Tekirdağ-Saray Güngörmez Köyü Mezarlığı arkasından 21.05.2005 (İSTE 81713) tarihinde toplanmıştır. İki ayrı yöreden toplanan tohum örnekleri ile kromatografik karşılaştırma yapılarak çalışılmıştır.

Bitkiler toplandıktan sonra tohum örnekleri ayrılmış, önce oda sıcaklığında, daha sonra 60° C' lik hava sirkülasyonlu etüvde kurutulmuştur. İki ayrı yörenin örneklerine şu şekilde kod verilmiştir:

Bolu, Abant'tan toplanan (1990) tohum örneği: Ab 90

Bolu, Abant'tan toplanan (2005) tohum örneği: Ab 05

Tekirdağ, Saray'dan toplanan (2005) tohum örneği: TS 05

##### 3.1.2. Fitokimyasal Ön Denemeler

###### 3.1.2.1. Alkaloit Aranması

1 g toz edilmiş numune, 10 ml % 3'lük sülfürik asit çözeltisiyle bir süre ısıtılarak tüketilmiş, soğuduktan sonra süzölmüştür. Süzöntü, üzerine 5 ml % 10'lük amonyak çözeltisi ilave etmek suretiyle kalevilendirilmiş ve ayırma hunisine alınarak 10 ml eterle tüketilmiştir. Ayrılan eterli çözelti su banyosu üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

Kalan bakiye 10 ml % 3'lük sülfürik asit ile çözülmüş, bu asitli çözeltide alkaloit teşhisi özel belirteçlerle yapılmıştır.

- 1) Bouchardat Belirteci: Esmer kırmızı çökelek
- 2) Dragendorff Belirteci: Turuncu kırmızı çökelek
- 3) Mayer Belirteci: Süt rengi çökelek

### **3.1.2.2.Flavon Türevlerinin Aranması**

5 g toz edilmiş örnek üzerine 100 ml sıcak su konulup, karışım 5 dakika sıcak su banyosunda tutulmuş ve soğuduktan sonra pamuktan süzölmüştür. Bu infüzyonda flavon, antrasen, saponin ve tanen türevleri aranmıştır.

5 ml infüzyon üzerine 5 ml Shibata belirteci (1 k derişik hidroklorik asit, 1 k su, 1 k etanol) ve biraz magnezyum talaşı ilave edilmiştir. Kırmızı, turuncu veya mor bir rengin meydana gelip gelmediğı gözlemlenmiştir.

### **3.1.2.3.Antrasen Türevlerinin Aranması**

10 ml infüzyon üzerine 5 damla derişik sülfürik asit konulup, 15 dakika sıcak su banyosunda tutularak glikozitler hidroliz edilmiştir. Karışım soğuduktan sonra 5 ml benzen ile çalkalanmıştır. Benzenli tabaka bir pipet yardımıyla başka bir tüpe aktarılmış ve üzerine 3 ml % 10'luk amonyak çözeltisi ilave edilmiştir. Kırmızı bir rengin meydana gelip gelmediğı gözlemlenmiştir.

### **3.1.2.4.Saponin Türevlerinin Aranması**

10 ml infüzyon bir deney tüpüne konmuş ve tüp baş parmak ile sıkıca kapatıldıktan sonra yatay olarak 30 saniye kuvvetle çalkalanmış ve dinlenmeye bırakılmıştır. 15 dakika bekletildikten sonra tüpte en az 1 santimetre yükseklikte bir köpük kalıp kalmadığı gözlemlenmiştir.

### **3.1.2.5.Tanen Türevlerinin Aranması**

10 ml infüzyon üzerine 2 ml tuzlu jelatin çözeltisi (sodyum klorür ile doyurulmuş % 1'lik jelatin çözeltisi) ilave edilmiş, krem renkli bir çökeleğın oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir.

### **3.1.2.6.Gallik ve Kateşik Tanenlerin Ayrılması**

5 ml infüzyon üzerine 3 damla % 5'lik demir (III) klorür çözeltisi ilave edilmiştir. Mavi-siyah (gallik tanen) veya esmer zeytin yeşili ( kateşik tanen ) bir rengin oluşup oluşmadığı gözlenmiştir.

10 ml infüzyon üzerine 5 ml hidroklorik asitli formol (Stiasny belirteci) (% 30 formol 2 k + derişik HCl 1 k) konulmuş ve karışım 80 °C civarına kadar ısıtılmış bir su banyosunda 30 dakika tutulmuştur. Parçalar halinde bir çökelek bulunup bulunmadığına bakılmıştır.

Karışım tamamen soğuduktan sonra berrak olarak süzölmüş, süzöntüden 3 ml alınmış, sodyum asetat ilavesiyle doyurulmuştur. Doymuş çözelti üzerine 3 damla seyreltik demir (III) klorür çözeltisi konmuş, mavi-siyah bir renk veya çökelek bulunup bulunmadığına bakılmıştır.

### **3.1.3.Miktar Tayini Yöntemleri**

#### **3.1.3.1.Su Miktar Tayini**

Etüvde ısıtılarak sabit ağırlığa getirilmiş cam tartı kabı içine 1 g kaba toz edilmiş tohum örneği konulmuş ve tam olarak tartılmıştır. 2 saat 100-105 °C'lik etüvde tutularak kurutulmuş, bir desikatörde soğutulduktan sonra tartılmıştır.

#### **3.1.3.2.Total Alkaloit Miktar Tayini**

İki ayrı yörenin örneklerinden paralel olarak total alkaloit miktar tayini yapılmıştır. 2005'te toplanan Abant örneğinin 46,77 g'ı, Tekirdağ-Saray örneğinin ise 32,6 g'ı bir kartuş içerisinde Soxhlet apareyinde önce metanolle (Merck) 6 saat tüketilerek ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstrelerin, alçak baskıda kuruluğa kadar çözücüsü distillenmiş ve bakiye ultrasonik banyoda metanolde çözündürölüp kantitatif siyah bantlı süzgeç kağıdından süzölerek balonjojede 100 ml'ye tamamlandı. 100 ml'ye tamamlanmış metanollü ekstreden 100 µl alınıp 10 ml'ye tamamlanmıştır ve bu çözeltilerin 352 nm'de UV spektrofotometresinde absorbansları ölçölerek standart kolşisin eğrisi yardımıyla kolşisin üzerinden hesaplanmış total tropolon alkaloitleri konsantrasyonu saptanmıştır. Her örnek için 5 kez tekrarlanan absorbans ölçömlerinin ortalama değerleri alınarak total alkaloit yüzdesi hesaplanmıştır.

2 mg kolşisin (Fluka 27650) 400 µl metanolde çözündürülerek % 0.5'lik stok kolşisin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35'er µl (2,5 ; 5 ; ; 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 µg/ml maddeye karşılık gelen değerler) alınarak saf metanolle hepsi 10'ar ml'ye tamamlanmış ve 352 nm'de absorbansları ölçülerek standart kolşisin eğrisi hazırlanmıştır.

### 3.1.4. Alkaloitlerin Tüketilmesi

Toz edilmiş tohum örnekleri bir kartuşa alınarak Soxhlet apereyinde 30-45° C'de öncelikle yağlı maddelerden arındırmak amacı ile petrol eteri ile tüketilmiştir. Petrol eteri ekstresi susuz sodyum sülfattan geçirilerek rotavaporda vakumsuz olarak kuruluğa kadar distillenmiştir. Daha sonra kurutulan tohumlar tekrar apareye alınmış ve bu sefer tüm alkaloitler ekstreye geçecek şekilde metanol ile tüketilmiştir. Böylelikle metanol ekstresi elde edilmiştir. Metanol ekstreleri aşağıdaki gibi kodlanmıştır:

Bolu Abant 1990 Metanol Ekstresi: Ab m e 90

Bolu Abant 2005 Metanol Ekstresi: Ab m e 05

Tekirdağ Saray 2005 Metanol Ekstresi: TS m e 05

### 3.1.5. Nötral (A) ve Bazik (B) Ekstrelerin Elde Edilişi

Elde edilen metanol ekstresi 30°C'de alçak baskıda kuruluğa kadar distillenmiş, daha sonra su ile çözülen ekstrenin pH'sı % 3'lük sülfürik asit ile 3-4'e ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan ekstre bir ayırma hunisine alınıp sulu kısımda alkaloit kalmayana kadar kloroform ile tüketilmiştir. Daha sonra kloroformlu kısımlar alınıp önce su ile yıkandıktan sonra susuz sodyum sülfattan geçirilip süzölmüş ve alçak baskıda 30-35° C'de kuruluğa kadar distillenmiştir. Elde edilen kloroform ekstresi nötral ekstre dir ( A Ekstresi ).

A ekstresi elde edildikten sonra geriye kalan asitli sulu kısmın pH'sı amonyak çözeltisi ile 8-9'a ayarlanmış ve tekrar kloroform ile tüketilmiştir. Kloroformlu kısımlar alınıp su ile yıkanmış ve susuz sodyum sülfattan geçirilmiştir. Süzöldükten sonra alçak baskıda 30-35° C'de kuruluğa kadar distillenmiştir. Bu sefer elde edilen ekstre bazik ekstre dir ( B Ekstresi ).

Bu aşamadan sonra çalışılmış olan A ve B ekstreleri aşağıda görüldüğü şekilde kodlanmıştır:

Ab m e 90 Nötral Ekstre (A ekstresi): Ab N 90

Ab m e 90 Bazik Ekstre (B ekstresi): Ab B 90

Ab m e 05 Nötral Ekstre (A ekstresi): Ab N 05

Ab m e 05 Bazik Ekstre (B ekstresi): Ab B 05

TS m e 05 Nötral Ekstre (A ekstresi): TS N 05

TS m e 05 Bazik Ekstre (B ekstresi): TS B 05

### **3.1.6. Nötral ve Bazik Ekstrelerinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması:**

Ab N 90, Ab B 90, Ab N 05, TS N 05, TS B 05 ekstreleri Tablo 3-1'de gösterilmiş olan çözücü sistemleri ile Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck hazır plaklar kullanılarak preparatif İ.T.K. ile ayrılmıştır. Daha sonra ortaya çıkan bantlar UV<sub>254,366</sub> lambası altında kontrol edildikten sonra Kloroform:Metanol (sırası ile 9:1, 8:2) karışımı ile elüe edilmiş ve çözücüleri kuruluğa kadar vakum altında uçurulmuştur. Elde edilen maddelerin saflık kontrolleri, birkaç çözücü sistemi kullanılarak İ.T.K. ile yapılmıştır. Saf olanlar, şahitlerle İ.T.K.da kontrol edilmiş, daha sonra 400 Mhz Mercury-Vx 400 BB cihazı ile <sup>1</sup>H NMR analizleri ile yapı tayinleri gerçekleştirilerek teşhis edilmiştir. Ab B 05 ise kromatotron ile fraksiyonlara ayrılmış, bu fraksiyonlar İ.T.K ile kontrol edilmiş ve benzer olanları birleştirilerek, birden çok leke verenlerdeki istenen maddeler preparatif İ.T.K yöntemi ile izole edilmiştir.

**Tablo 3-1 İ. T. K. uygulamalarında kullanılan sistemler**

Çözücü Sistemleri		Belirteçler
1. Sistem	Benzen: Etilasetat: Dietilamin: Metanol (50:40:10: 8)	Carr-Price Belirteci
2. Sistem	Benzen: Etilasetat: Dietilamin (50:40:10)	
3. Sistem	Kloroform: Aseton: Dietilamin (70:20:10)	
4. Sistem	Kloroform: Aseton: Dietilamin (50:40:10)	
5. Sistem	Kloroform: Aseton: Amonyak (50:50:10)	
6. Sistem	Kloroform: Aseton: Amonyak (40:60:10)	
7. Sistem	Etilasetat: İzopropanol: Amonyak (80:15:5)	

**3.1.6.1.Ab N 90**

Farklı maddeler elde etmek amacı ile 2 ayrı sistem ile preparatif İ.T.K. yapılmıştır.

## 1. Preparatif İ.T.K.:

İlk uygulamada Ab N 90 ekstresi 1. sistem kullanılarak ayrılmıştır.

## 2. Preparatif İ.T.K.:

İkinci uygulamada ise ekstre, daha fazla leke veren 4. sistem kullanılarak ayrılmıştır.

**3.1.6.2Ab B 90.**

Ab B 90, 3. sistemde preparatif İ.T.K. ile ayrılmıştır.

**3.1.6.3.Ab N 05**

Ab N 05, 4. sistem kullanılarak preparatif İ.T.K. ile ayrılmıştır.

**3.1.6.4.Ab B 05**

Ekstre kromatotron ile ayrıldı. Uygun fraksiyonlara preparatif İ.T.K. uygulandı



### 3.1.6.5.TS N 05

Eksreye tablodaki 3. sistem ile preparatif İ.T.K. uygulanarak gerekli ayırım sağlanmıştır.

### 3.1.6.6.TS B 05

Eksreye tablodaki 5. sistem ile preparatif İ.T.K. uygulanarak gerekli ayırım sağlanmıştır.

## 3.1.7.Sitotoksik Aktivite Testleri

### 3.1.7.1.Brine Shrimp Letalite Testi (2, 56)

2005 yılında toplanan Ab ve Ts örneklerinden hazırlanan metanol ekstraheleri ve şahit madde olarak kolşisinden (K), 1, 10, 100 µg/ml (ppm) olmak üzere 3 ayrı konsantrasyonda, her bir ekstreten 3'er adet 0.5 ml'lik metanol çözeltileri hazırlanmış ve çözeltiler kuruluğa kadar uçurulmuştur. *A. salina* larvalarına yaşama ortamı oluşturmak amacı ile 3,8 g deniz tuzu 100 ml distile suda çözündürülmüştür. Hazırlanan tuzlu suyun 25 ml'si, ortasında bölme olan bir tarafı aydınlık, diğer tarafı karanlık olan, yarım kapaklı bir kaba konmuştur. Sonrasında bir tutam *A. salina* yumurtası kabın karanlık olan bölümünde tuzlu suyun üstüne serpiştirilmiştir. Kap kesintisiz ışık kaynağı altında 48 saat bekledikten sonra olgunlaşan yumurtalardan çıkan larvalar aydınlık bölmeye geçiş yapmıştır. Her bir numune şişesine, bir de kontrol amaçlı olarak boş bir şişeye 5'er ml tuzlu su eklenmiş ve 10'ar adet larva sayılarak pastör pipeti yardımı ile tüm şişelere konmuştur. Şişeler ağızları açık halde kesintisiz ışık kaynağı altında 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda her numune ve bir kontrol şişesinde yaşayan larvalar sayılmıştır. Bu veriler yardımı ile Finney bilgisayar programında LD<sub>50</sub> (larvaların % 50'sini öldüren doz) değerleri kaydedilmiştir.

### **3.1.7.2. MTT Yöntemi ile Hücre Kültürleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Tayini\***

Oda sıcaklığında kurutulmuş metanol ekstraktları liofilize edilip desikatörde bekletildikten sonra 10' ar mg tartılarak 1'er ml dimetil sülfoksitte (DMSO, Sigma D-5879) çözüldü ve %10 FCS (Foetal Calf Serum, Sigma Cat. No: F 4135) içeren IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma Cat.No: I 2510) ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonlar (500, 100, 50, 10, 1, 0,1 µg/ml) hazırlandı.

#### **3.1.7.2.1.Hücre Kültürlerinde Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması**

17,7 g IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma Cat. No: I 2510) 100 ml distile suda çözülerek üzerine 100 ml distile suda çözülmüş 3,024 g sodyum bikarbonat (Sigma Cat. No: S 5761) ve 100 ml distile suda çözülmüş 0,3 g L-glutamin (Sigma Cat. No: G 3226) eklendi. Toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklenerek 0,45 µm çapında steril filtreden (Millipore Cat. No: XX1004704) geçirildi. Hazırlanan stok medyuma 50 mg/litre olacak miktarda Gentamisin (Genta®) eklendikten sonra küçük hacimlere (100-200 ml) ayrılarak deneyler süresince +4 °C' de saklandı ve kullanılacağı zaman % 10 FCS (Foetal Calf Serum, Sigma Cat. No: F 4135) eklendi.

#### **3.1.7.2.2. Süspansiyon Kültürlerinin Hazırlanması:**

Süspansiyon kültürleri için 50 ve 250' ml lik kültür flaskları (Nunc®) kullanıldı. Besi ortamı olarak % 10 FCS ilave edilmiş IMDM kullanıldı. Kültür flaskları % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, (NuAire US) nemli ortamda, 37 °C' de belli aralıklarla pasaj yapılarak inkübe edildi.

#### **3.1.7.2.3.Lösemik Hücre Serilerinin Hazırlanması**

Bu çalışmada, ATCC'den (American Type Culture Collection) ve farklı laboratuarlardan elde edilen lösemik hücre serileri (HL60 ve K562), laboratuarda birkaç kez % 10 FCS içeren IMDM ile pasaj yapıldıktan sonra kullanıldı.

\* Bu deney İ. Ü. Tıp Fakültesi, Temel Bilimler, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir

#### 3.1.7.2.4.Hücre Sayımı ve Canlılık Tayini

Bu amaçla, her bir örnekten 10 µl alınıp, üzerine 10 µl % 4' lük Trypan-blue (Sigma Cat. No: T 8154) eklendikten hemen sonra Neubauer lamında 10 x 40 büyütme ile sayım yapıldı. Özellikle kültür çalışmalarında ve flow sitometrik çalışmalarda sadece canlı hücrelerin sayısı dikkate alınacağından, hem kültür öncesi hem de süspansiyon kültüründen alınan hücrelerin sayımında, boya almamış ve düzenli hücre morfolojisi gösteren hücreler dikkate alındı.

#### 3.1.7.2.5. MTT Yönteminin Uygulanması (36, 58).

Bu çalışmada her bir metanol ekstresinin 6 ayrı konsantrasyonu (500, 100, 50, 10, 1, 0,1 µg/ml), 96 kuyucuklu kültür plaklarına, her bir konsantrasyondan üçer kuyucuk olacak şekilde, 10'ar µl konuldu. Ayrıca kontrol grubu olarak 3 kuyucuğa 10'ar µl ekstre içermeyen medyum konuldu.

Bütün kuyucuklara hazırlanan hücre süspansiyonundan 90'ar µl ekildi. İşlem sonunda bütün kuyucuklarda toplam 100 er µl hücre süspansiyonu oldu. Bu şekilde hazırlanan hücre kültür plakları iki gün, 37 °C'de nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub> li steril etüvde saklandı. Bu süre sonunda, plaktaki bütün kuyucuklara 10'ar µl MTT (5 mg MTT/ml PBS) eklendi ve tekrar aynı etüvde 4 saat bekletildi. Daha sonra kültür plağı etüvden sarımadan çıkarıldı ve kuyucukların diplerinde çökmüş olarak bulunan hücrelere zarar vermeden kuyucukların üst kısmından 80'er µl süpernatant mikropipetle çekilip atılarak yerine 180 µl isopropanol solusyonu (pH:5,5) eklendi. Mikrokültür plakları, formazanın daha iyi çözülebilmesi için, bir gece karanlık odada bekletildi. ELISA pleyt okuyucuda 620 nm referans dalga boyuna göre 540 nm' de okundu. Deney ve kontrol gruplarının ortalama absorbans (OA) değerleri karşılaştırılarak, aşağıdaki formül ile sitotoksite indeksi (SI) hesaplandı.

$$SI = 1 - [OA (\text{deney}) / OA (\text{kontrol})] \times 100$$

Ekstre konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin güvenilir olduğunu test etmek amacıyla konsantrasyonları hazırlarken kullanılan DMSO'nun ekstreler ile tamamen aynı şekilde altışar konsantrasyonları hazırlandı ve aynı yöntemle sitotoksik etkileri ölçüldü.

Ayrıca hücrelerin % 50'sini öldüren letal konsantrasyonu (LK) hesaplamak için grafiklerdeki % 50 sitotoksite indeksine en yakın ekstre konsantrasyonları baz alınarak orantı ile LK hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1.Tohum Ekstrelerinde Yapılan Kimyasal Ön Çalışmaların Bulguları

**Tablo 4-1.** *Colchicum bivonae* örneklerinde yapılan ön deneme sonuçları

		Ab 05	TS 05
Alkaloit		+	+
Flavon		-	-
Tanen	Gallik tanen	-	-
	Kateşik tanen	-	-
Antrasen		-	-
Saponin		-	-

### 4.2.Miktar Tayini Çalışmalarının Bulguları

#### 4.2.1.Su Miktar Tayini Sonuçları

**Tablo 4-2.** *Colchicum bivonae* örneklerinde yapılan su miktar tayini sonuçları

	Ab. 05	T.S. 05
Su ( % )	3,1	6

#### 4.2.2.Total Alkaloit Miktar Tayini Bulguları:

İki ayrı yöreden 2005 yılında toplanan örneklerin metanol ekstrelerinin 352 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri aşağıda belirtilmiştir:

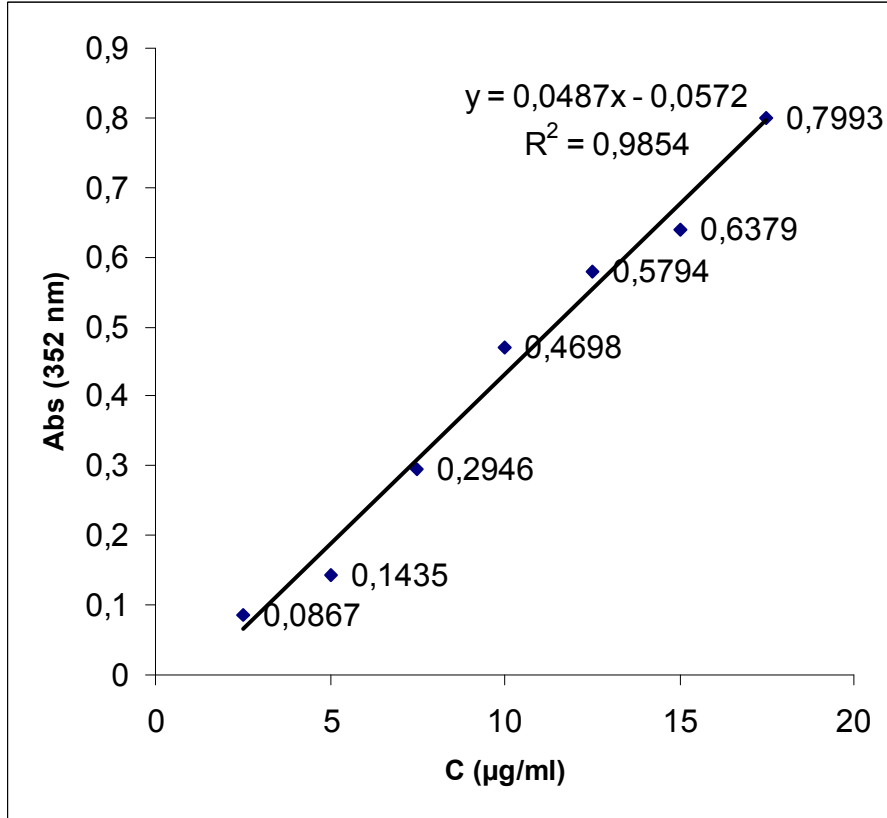
$$A(\text{Ab m.e. 05}) = 1,8527$$

$$A(\text{Ts m.e. 05}) = 1,3830$$

7 ayrı konsantrasyonda kolşisinin absorbens değerleri ölçülerek (Tablo 4-3) kolşisinin standart eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4-1).

**Tablo 4-3 Kolşisin için UV spektrofotometresinde ölçülen absorbens değerleri**

Konsantrasyon ( µg/ml )	Ortalama absorbens
2,5	0.0867
5	0.1435
7,5	0.2946
10	0.4698
12,5	0.5794
15	0.6379
17,5	0.7993



**Şekil 4-1 Kolşisinin standart eğrisi**

Kolşisinin standart eğrisine göre konsantrasyon hesabı;  $y = 0,0487 x - 0,0572$  ( $R^2 = 0,9854$ ) formülü ile yapılmıştır. Bu formül ile belirlenen sonuçlar aşağıda gösterilmiştir:

**Ab m e için x değeri ( $C_{Ab}$ ):**

$$0,0487 x = 1,8527 + 0,0572$$

$$x = 39.2177 \mu\text{g/ml}$$

**Ab m e'nin total alkaloit miktarı:**

% 0,84

**TS m e için x değeri ( $C_{Ts}$ ):**

$$0,0487 x = 1.3830 + 0,0572$$

$$x = 29.5729 \mu\text{g/ml}$$

**TS m e'nin total alkaloit miktarı:**

% 0,91

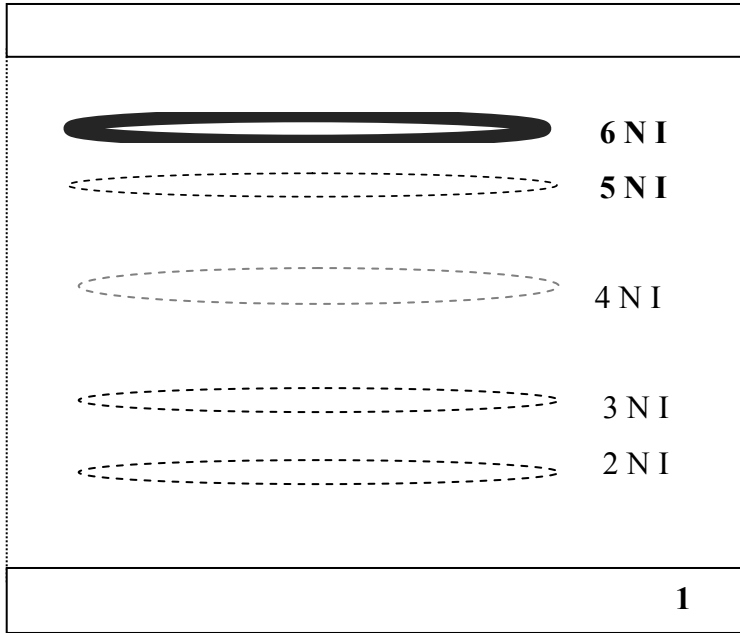
### 4.3. Nötral ve Bazik Ekstrelerin Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması:

Ab 90 tohum miktarı **22,1 g**; Ab 90 m e miktarı **3,7 g**; Ab 05 tohum miktarı **46,8 g**; Ab 05 m.e. miktarı **6,5 g**; TS 05 tohum miktarı **32,6 mg**; TS 05 m. e. miktarı: **5,3 g** olarak tartılmıştır.

#### 4.3.1.Ab N 90

1. Preparatif İ.T.K: (kullanılan ekstre miktarı:**15,7 mg**)

Benzen:Etilasetat:Dietilamin:Metanol (50:40:10:8) sistemi ile ilgili kromatogram Şekil 4-2'de gösterilmiştir.



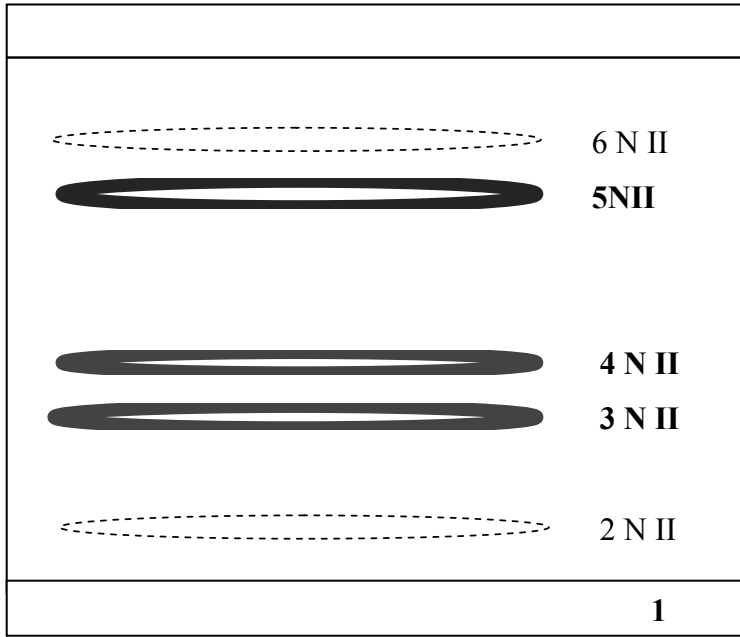
**Şekil 4-2 Ab N 90 1. Preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı**

Buna göre 3 N I, 5 N I ve 6 N I bantları alınmış, 3 ayrı sistemde (Tablo 4'deki 2, 3 ve 4. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır. 6 N I dışındakilerin miktarları düşük olduğundan ve saf olmadıklarından dolayı, yalnızca 6 N I bantı değerlendirilmiş, tekrar İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 6 N I'in (4,4 mg) "**demekolsin**" olduğu düşünülmüş ve bu tespit <sup>1</sup>H proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-15)



2. Preparatif İ.T.K: (kullanılan ekstre miktarı: **230 mg**)

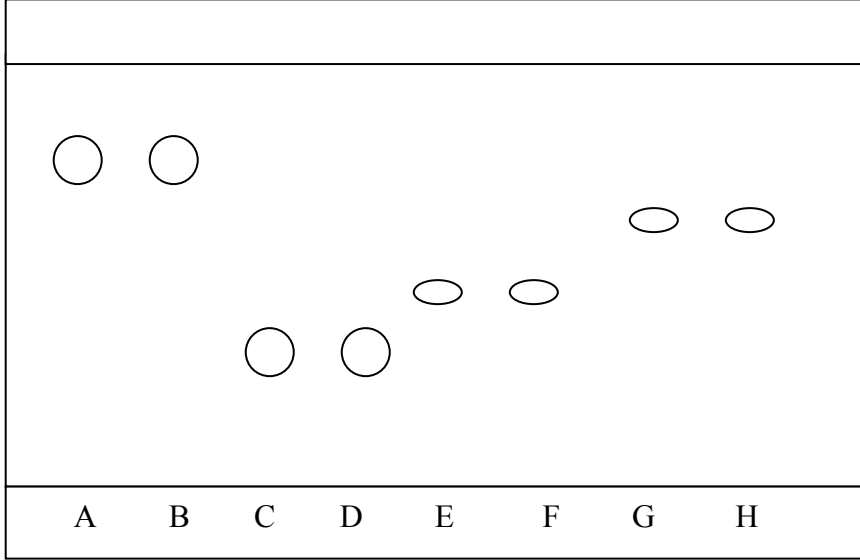
Kloroform: Aseton: Dietilamin (50:40:10) sistemi ile ilgili kromatogram Şekil 4-3'te gösterilmiştir



**Şekil 4-3 Ab N 90 2. Preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayırımı**

Buna göre 3 N II, 4 N II, 5 N II ve 6 N II bantları alınmış, 3 ayrı sistemde (Tablo 4'deki 3, 4 ve 5. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır. 6 N II saf olmadığından ve tekrar uygulanan ayırma yöntemlerine rağmen saf elde edilemediğinden değerlendirilmemiştir. 3 N II, 4 N II ve 5 N II bantları ise elde edilerek İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 3 N II'nin (3,4 mg) "**N-deasetilkolşisin**", 4 N II'nin ( 2,3 mg) "**N-deasetil-N-formilkolşisin**" ve 5 N III'ün (~30 mg) "**kolşisin**" olduğu düşünülmüş ve bu tespit <sup>1</sup>H proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-17, Şekil 4-18, Şekil 4-19).

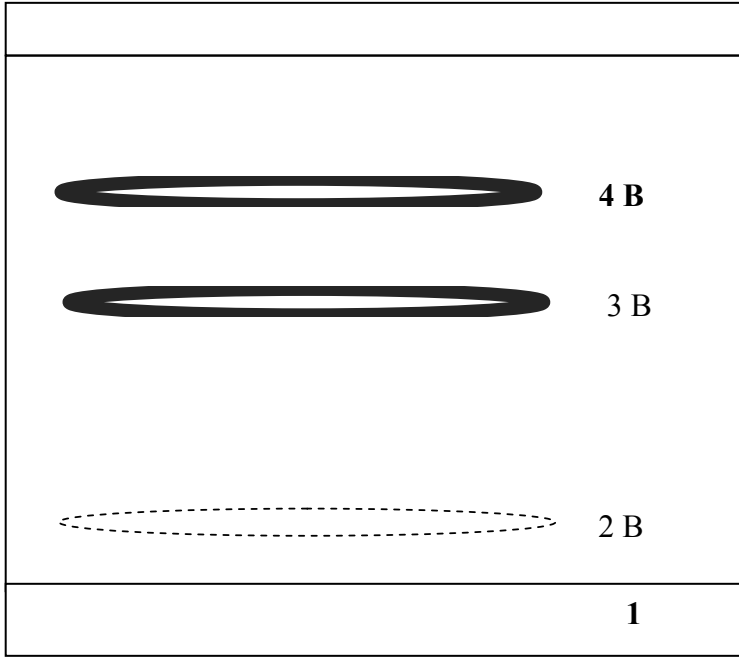
Şahit maddelerle karşılaştırma:



**Şekil 4-4 Kloroform: Aseton: Dietilamin (70:20:10) sistemi. A (demekolsin), B (6 N I), C (N-deasetilkolşisin), D (3 N II), E (N-deasetil-N-formilkolşisin), F (4 N II), G (kolşisin), H (5 N II)**

#### 4.3.2. Ab B 90 (kullanılan ekstre miktarı: 48 mg)

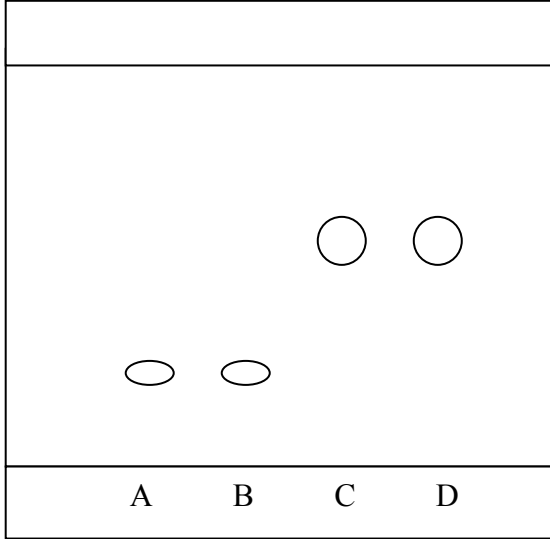
Kloroform: Aseton: Dietilamin (70:20:10) sistemi ile yapılan preparatif İ.T.K. kromatogramı Şekil 4-5'te gösterilmiştir.



Şekil 4-5 Ab B 90 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı

Buna göre 2 B, 3 B ve 4 B bantları alınmış, 3 ayrı sistemde (tablo 4'deki 1,2 ve 3. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır. Buna göre saf görünen 3 B ve 4 B elde edilerek İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 3 B'nin (8,9 mg) “**2-demetildemekolsin**”, 4 B'nin ise (8,8 mg) “**demekolsin**” olduğu düşünülmüş ve bu tespit <sup>1</sup>H proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-15, Şekil 4-16).

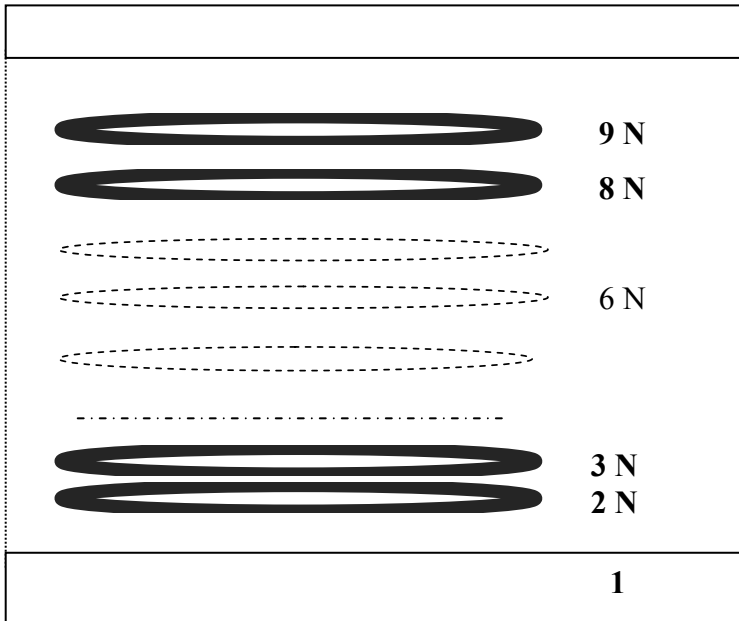
Şahit maddelerle karşılaştırma:



Şekil 4-6 Etilasetat: İzopropanol: Amonyak (80:15:5). A (2-demetildemekolsin), B (3 B I), C (Demekolsin), D (4 B I)

#### 4.3.3.Ab N 05 (kullanılan ekstre miktarı: 375,5 mg)

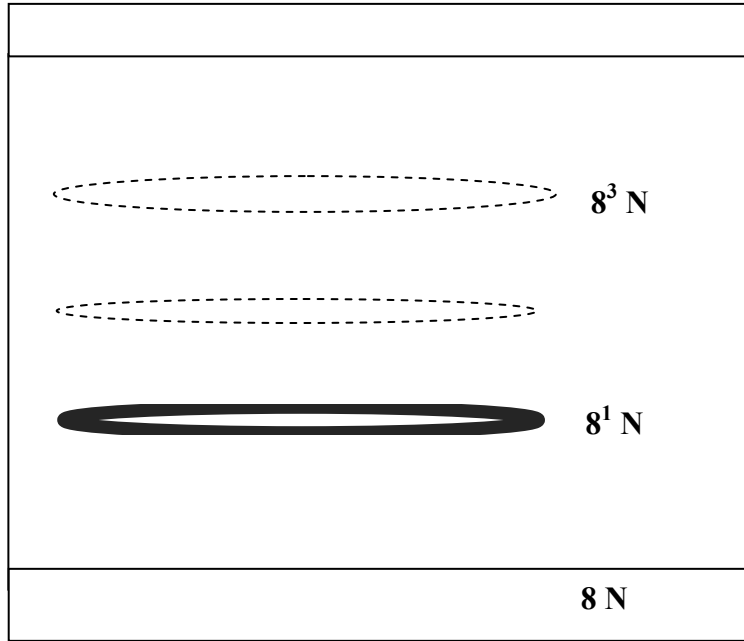
Kloroform: Aseton: Dietilamin (50:40:10) sistemi ile yapılan preparatif İ.T.K. kromatogramı Şekil 4-7’de gösterilmiştir.



**Şekil 4-7 Ab N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı**

2 N , 3 N, 8 N ve 9 N bantları alınmış, 3 ayrı sistemde (Tablo 4'deki 4,5 ve 6. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır. Buna göre tek leke vermeyen 2 N ve 8 N bantlarını saflaştırmak üzere tekrar preparatif İ.T.K. yapıldı. Diğer bantlardan 3 N (8,1 mg) elimizde bulunan hiç bir şahit madde ile. ortak leke vermedi. Anack  $^1\text{H}$  proton NMR analizi sonucu “**2,3-didemetilkolşisin**” olarak tespit edildi. 9 N (50 mg) ise İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak “**demekolsin**” olduğu düşünülmüş ve bu tespit  $^1\text{H}$  proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-15, Şekil 4-20).

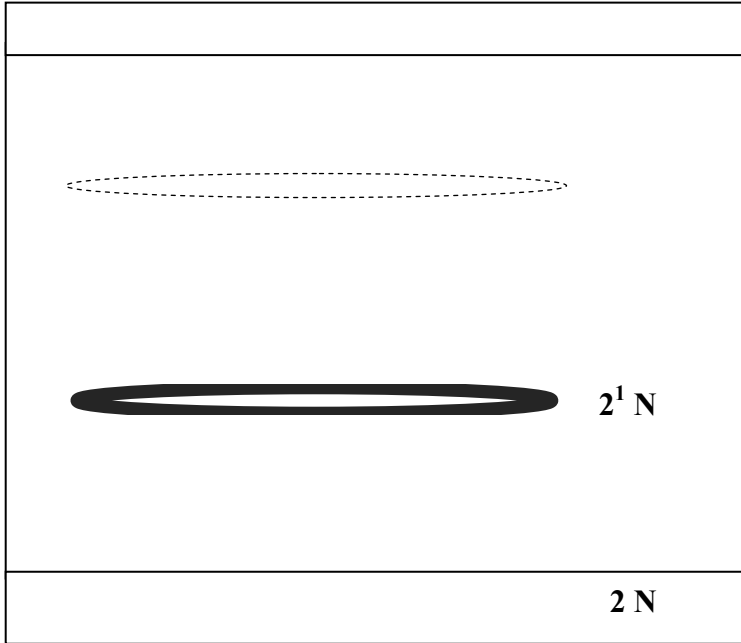
8 N bantının Kloroform: Aseton: Amonyak (40:60:10 damla) sistemi ile preparatif İ.T.K kromatogramı Şekil 4-8'de gösterilmiştir.



**Şekil 4-8 Ab.8 N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı**

$8^1$  N ve  $8^3$  N bantları elde edildikten sonra 3 ayrı sistemde (tablo 4'deki 4,5 ve 6. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır,  $8^3$  N'nin saf olmadığı anlaşılmıştır ve madde miktarı az olduğundan tekrar ayırma yoluna gidilmemiştir.  $8^1$  N (19,6 mg) ise İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak “**kolşisin**” olduğu düşünülmüş ve bu tespit  $^1\text{H}$  proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-17).

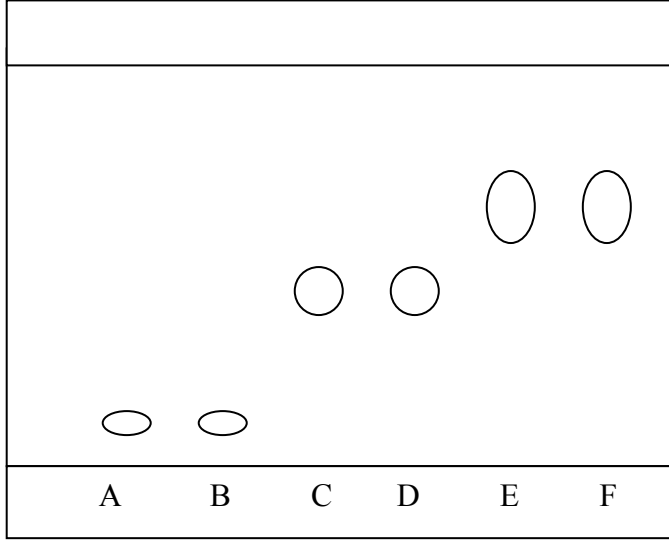
2 N bantının Kloroform: Aseton: Amonyak (50:50:10 damla) sistemi ile preparatif İ.T.K. kromatogramı Şekil 4-9’da gösterilmiştir.



**Şekil 4-9 Ab 2N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstrenin uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı**

2<sup>1</sup> N bantı elde edildikten sonra 3 ayrı sistemde (tablo 4’deki 4, 5 ve 6. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır ve saf olduğu anlaşılınca İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 2<sup>1</sup> N’nin (3,1 mg) “**kolşisilin**” olduğu düşünülmüş, ancak bu tespit <sup>1</sup>H proton NMR spektrumu iyi olmadığından İ.T.K. teşhisi ile yetinilmiştir.

Şahitlerle karşılaştırma:



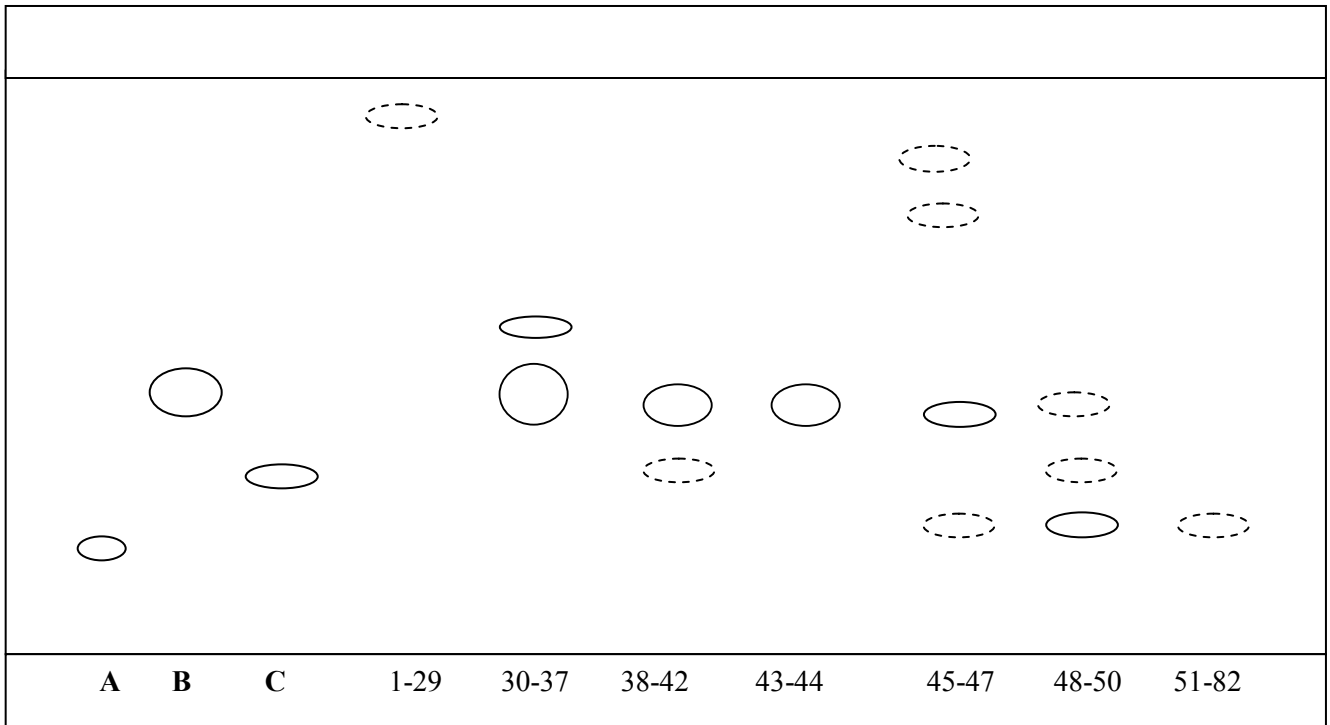
Şekil 4-10 A (Kolşisilin), B (2<sup>1</sup> N), C (Kolşisin), D ( 8<sup>1</sup> N), E (Demekolsin), F (9 N).

#### 4.3.4. Ab B 05 (kullanılan ekstre miktarı: 208,3 mg)

Ekstre, Silicagel 60 PF<sub>254</sub> (gibslı) kullanılarak kromatotron ile ayrıldı. Bu ayırım petrol eteri-kloroform-metanol karışımının değişen oranları ile yapıldı. Fraksiyonlar 25'er ml olarak alındı.

Tablo 4-4 Ab B 05 ekstresinin kromatotron yöntemi ile alınan fraksiyonları

Fraksiyon	Çözücü	Bakiye	Ayrılan Madde
1-29	Petrol eteri (100 ) Petrol eteri-Kloroform (50:50)	7,1 mg	–
30-37	Petrol eteri-Kloroform (50:50) Petrol eteri-Kloroform (30:70)	115,1 mg	Demekolsin (83 mg)
38-42	Petrol eteri-Kloroform(20:80) Petrol eteri-Kloroform (10:90)	3,1 mg	–
43-44	Petrol eteri-Kloroform (10:90)	1,6 mg	–
45-47	Kloroform (100)	10 mg	–
48-50	Kloroform (100) Kloroform-Metanol (98:2)	12,1 mg	3-demetildemekolsin (8,7 mg)
51-82	Kloroform-Metanol (98:2) Metanol (100)	32,3 mg	–



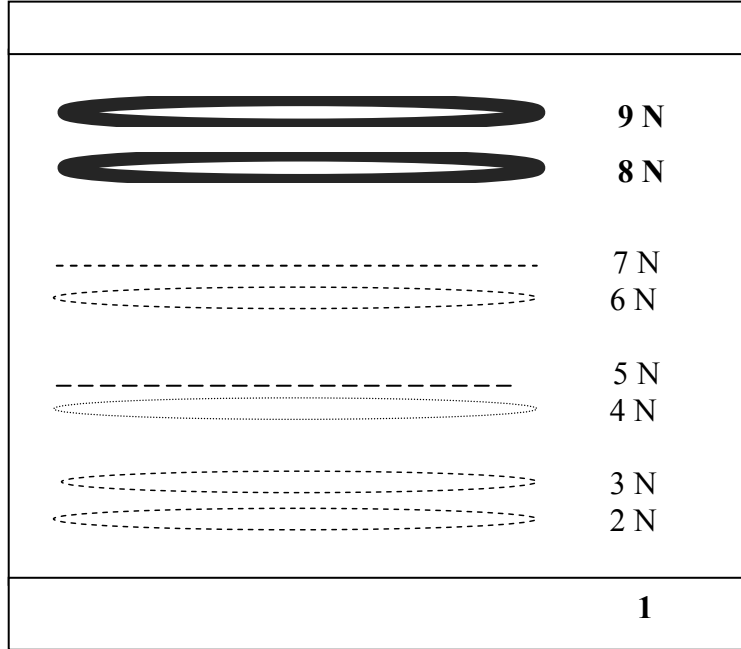
Şekil 4-11 Ab B 05 kromatotron fraksiyonlarının kromatogramı (Kloroform: Aseton: Dietilamin 50: 40: 10 sistemi) A (2-demetil demekolsin), B (demekolsin), C (kolşisin)

Kromatotron sonucunda elde edilen fraksiyonlardan saf olmayanlarına preparatif İ.T.K. uygulandı. Bunlardan 30-37 fraksiyonu Benzen: Etilasetat: Dietilamin (50:40:10) sisteminde, 48-50 fraksiyonu ise Kloroform. Aseton: Dietilamin (70: 20: 10) sisteminde preparatif İ.T.K. ile saflaştırıldı, 3 ayrı sistemde (Tablo 4'e göre 4, 5 ve 7. sistemler) saflık kontrolleri yapıldı. Sonuç olarak elde edilen bantlar şahit maddelerle İ.T.K.da kontrol edildi ve 30-37 fraksiyonunda “**demekolsin**“, 48-50 fraksiyonunda ise “**2-demetildemekolsin**“ olduğu düşünülmüş ve bu tespit  $^1\text{H}$  proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-16, Şekil 4-15).



#### 4.3.5.TS N 05 (kullanılan ekstre miktarı: 158 mg)

Ekstreye Kloroform: Aseton: Dietilamin (70:20:10) sistemi ile preparatif İ.T.K. uygulanmıştır. Kromatogram Şekil 4-12’de gösterilmektedir.

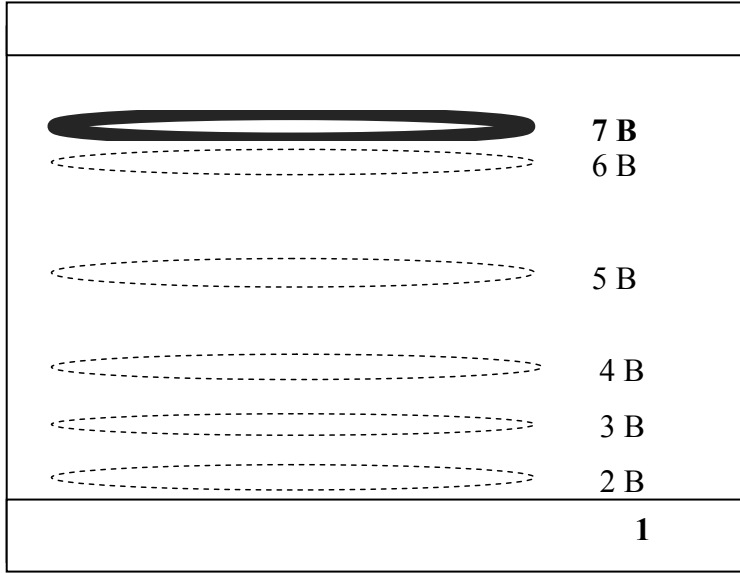


**Şekil 4-12 TS N 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstre uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı**

8 N ve 9 N bantları elde edilmiş, 3 ayrı sistemde (Tablo 4’deki 4,5 ve 6. sistemler) İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır. Buna göre saf oldukları belirlenen 8 N ve 9 N bantları İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 8 N’nin (7 mg) “**kolşisin**”, 9 N’nin ise (56 mg) “**demekolsin**” olduğu düşünülmüş ve bu tespit <sup>1</sup>H proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-15, Şekil 4-17).

#### 4.3.6.TS B 05 (kullanılan ekstre miktarı: 56,6 mg)

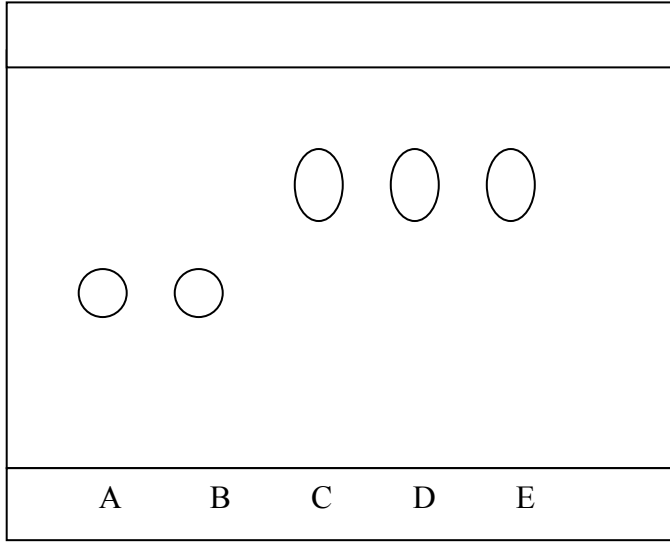
Ekstreye Kloroform: Aseton: Amonyak (50:50:1) sistemi ile preparatif İ.T.K. uygulanmıştır. Kromatogram Şekil 4-13’de gösterilmektedir.



**Şekil 4-13 TS B 05 preparatif İ.T.K. yönteminde ekstre uygulandığı plak ve maddelerin ayrımı**

7 B bantı elde edilmiş, 3 ayrı sistemde (Tablo 4’deki 2, 3 ve 5. sistemler) maddenin İ.T.K. ile saflık kontrolleri yapılmıştır. Buna göre saf olduğu belirlenen 7 B İ.T.K. ile şahit maddelerle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak 7 B’nin (28,6 mg) “**demekolsin**” olduğu düşünülmüş ve bu tespit  $^1\text{H}$  proton NMR analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4-15).

Şahitlerle karşılaştırma:



Şekil 4-14 A (Kolşisin), B (8 N), C (Demekolsin), D (9 N), E (7 B)  
Kloroform: Aseton: Amonyak (5:5:1)

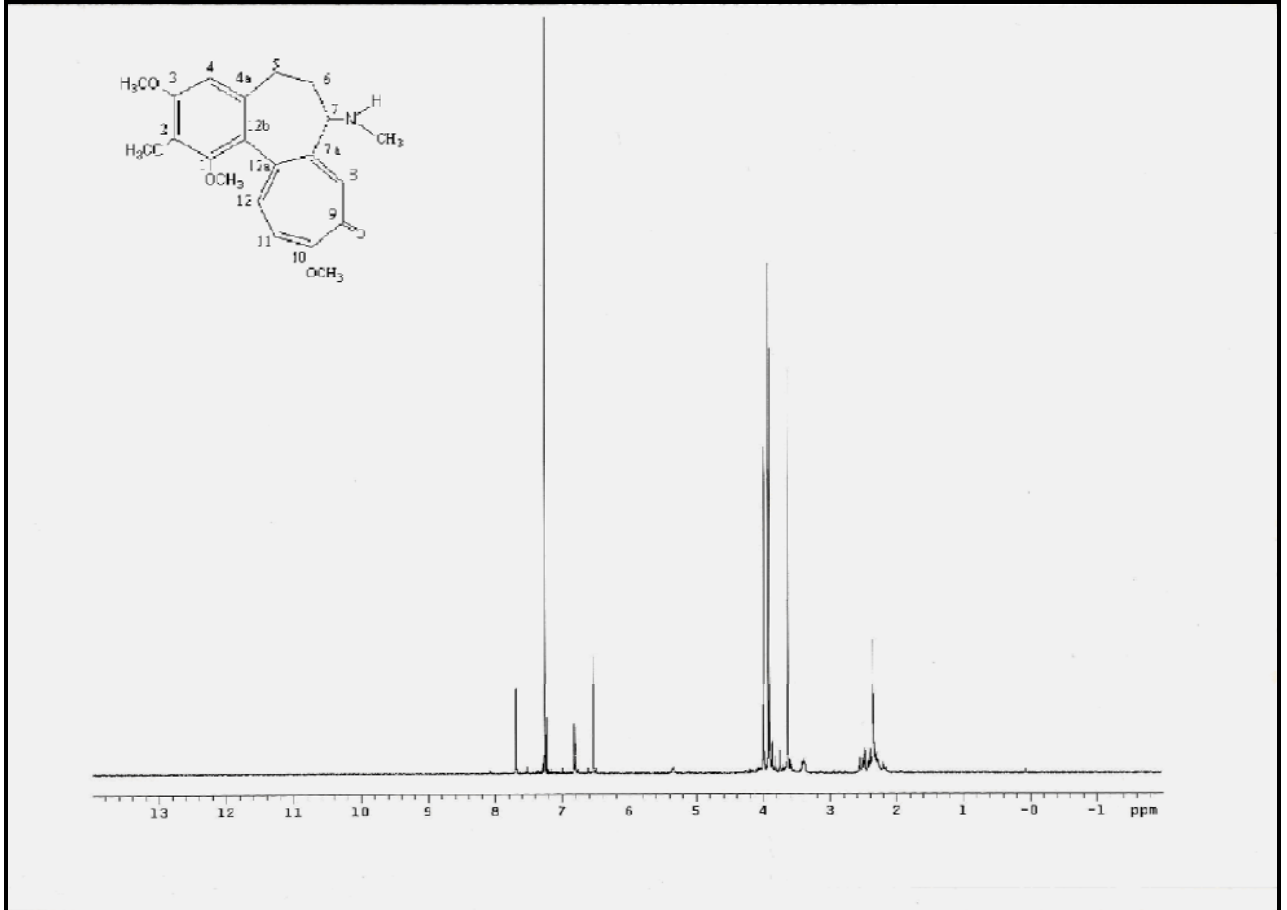
#### 4.4. Maddelerin Rf Değerleri

Tablo 4-5 *Colchicum bivonae* tohumlarından elde edilen maddelerin Rf değerleri

Tropolon Alkaloitleri	Çözücü Sistemleri					
	1	3	4	5	6	7
Demekolsin	0,41	0,76	0,65	0,30	0,36	0,22
2-demetildemekolsin	0,22	0,56	0,41	0,15	0,23	0,13
Kolşisin	0,22	0,59	0,53	0,26	0,32	0,23
N-deasetilkolşisin	0,13	0,34	0,29	0,17	0,22	0,21
N-deasetil-N-formilkolşisin	0,16	0,39	0,37	0,21	0,26	0,23
2,3-didemetilkolşisin	0,07	0,10	0,10	0,17	0,20	0,14
Kolşisilin	0,05	0,13	0,12	0,10	0,10	0,09

#### 4.5. Elde Edilen Maddelerin $^1\text{H}$ NMR Spektrumları:

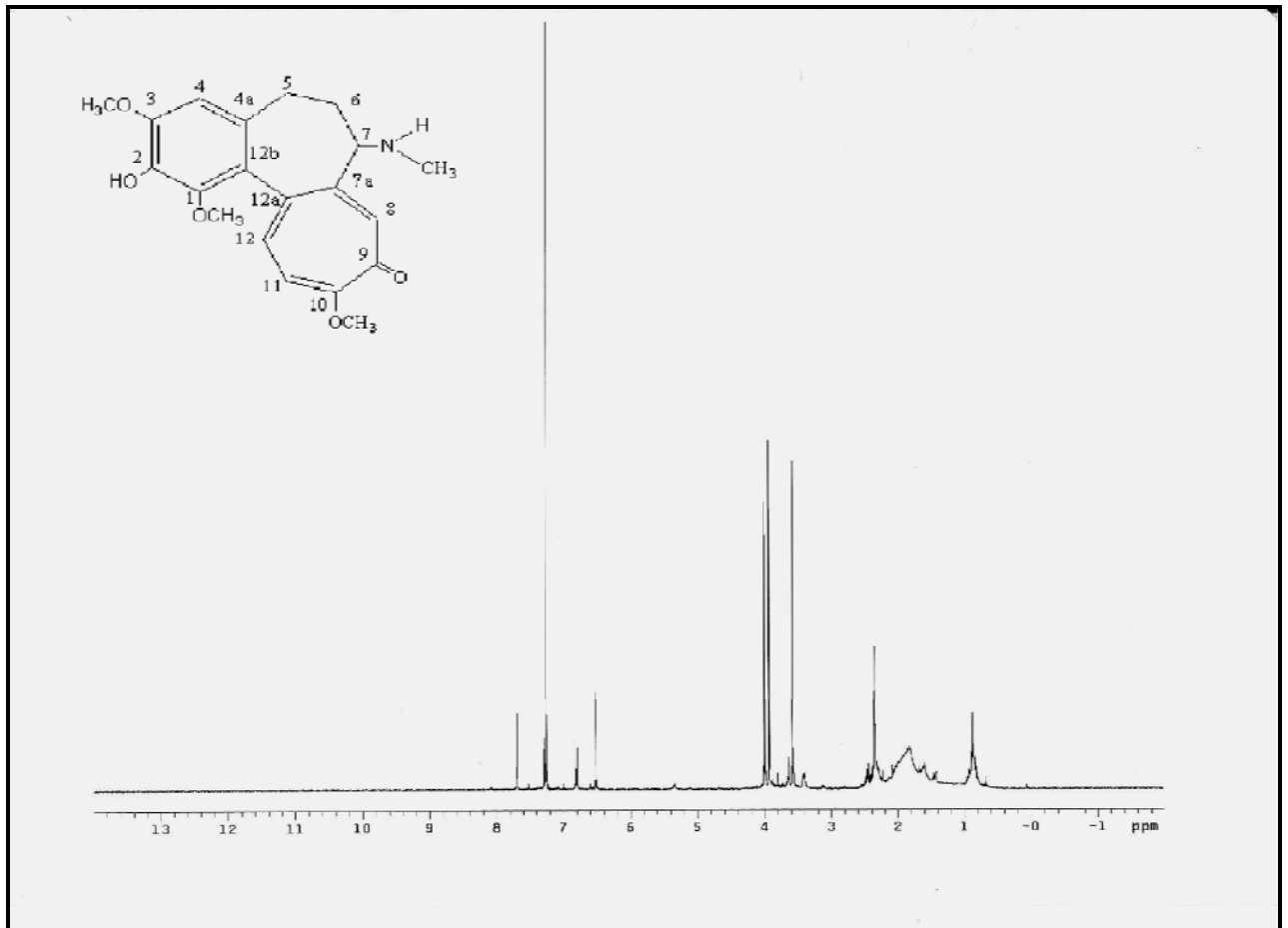
##### Demekolsin



Şekil 4-15. Demekolsinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  7,69 (1H, s; C-8H), 7,24 (1H, d, J 10 Hz; C-12H), 6,80 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,54 (1H, s; C-4H), 4,01 (3H, s; C-10 OMe), 3,92 (6H, s; C-2 ve -3 OMe), 3,63 (3H, s; C-1 OMe), 3,40 (1H m, C-7H); 2,24 (3H, s; NMe).

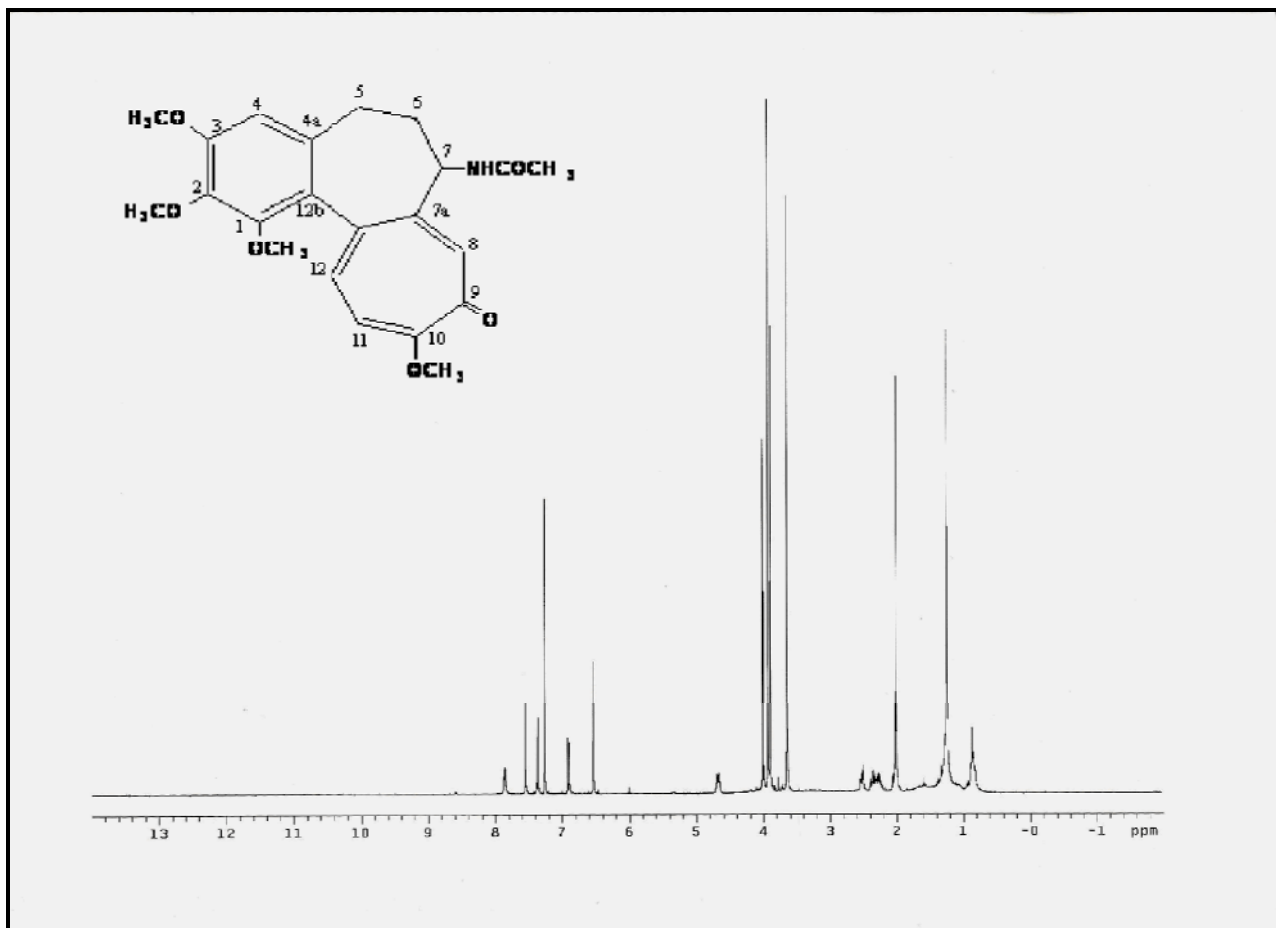
## 2-Demetildemekolsin



Şekil 4-16 2-demetildemekolsinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  7,69 (1H, s; C-8H), 7,24 (1H, d,  $J$  10 Hz; C-12H), 6,80 (1H, d,  $J$  10 Hz; C-11H), 6,54 (1H, s; C-4 H), 4,01 (3H, s; C-10 OMe), 3,92 (3H, s 3-OMe) 3,63 (3H, s; C-1 OMe), 3,40 (1H,m, C-7H); 2,24 (3H, s; NMe).

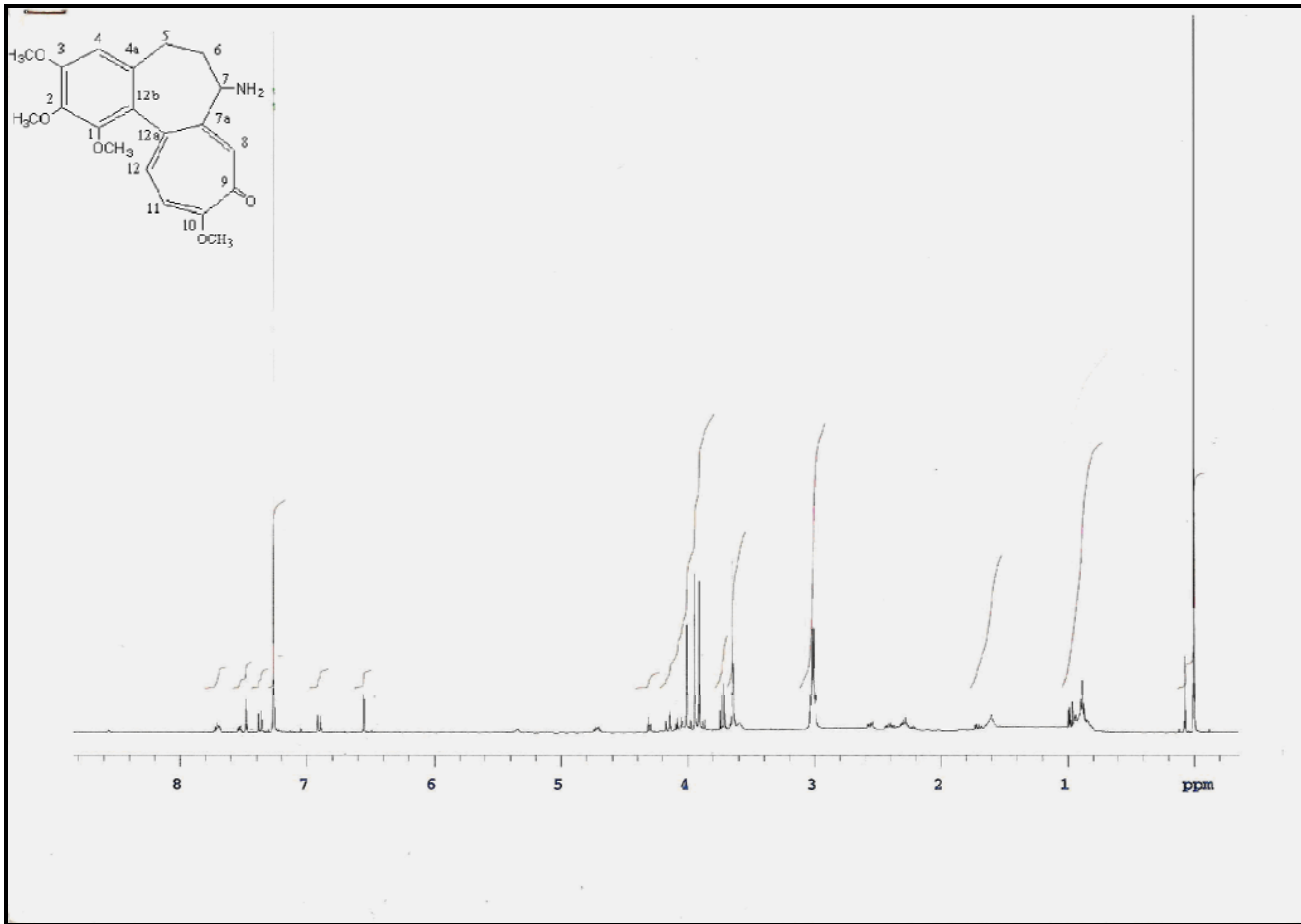
## Kolşisin



Şekil 4-17 Kolşisinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  7,62 (1 H, *s*; C-8 H), 7,38 (1 H, *d*, *J* 10 Hz; C-12 H), 6,88 (1H, *d*, *J* 10 Hz; C-11H), 6,55 (1H, *s*; C-4 H), 4,66 (1H, *m*, C-7H), 4,02 (3H, *s*; C-10 OMe), 3,93 ve 3,90 (2 x 3H, *s*; C-2 ve -3 OMe), 3,66 (3H, *s*; C-1 OMe), 1,99 (3H, *s*; NHC(=O)CH<sub>3</sub>) (55).

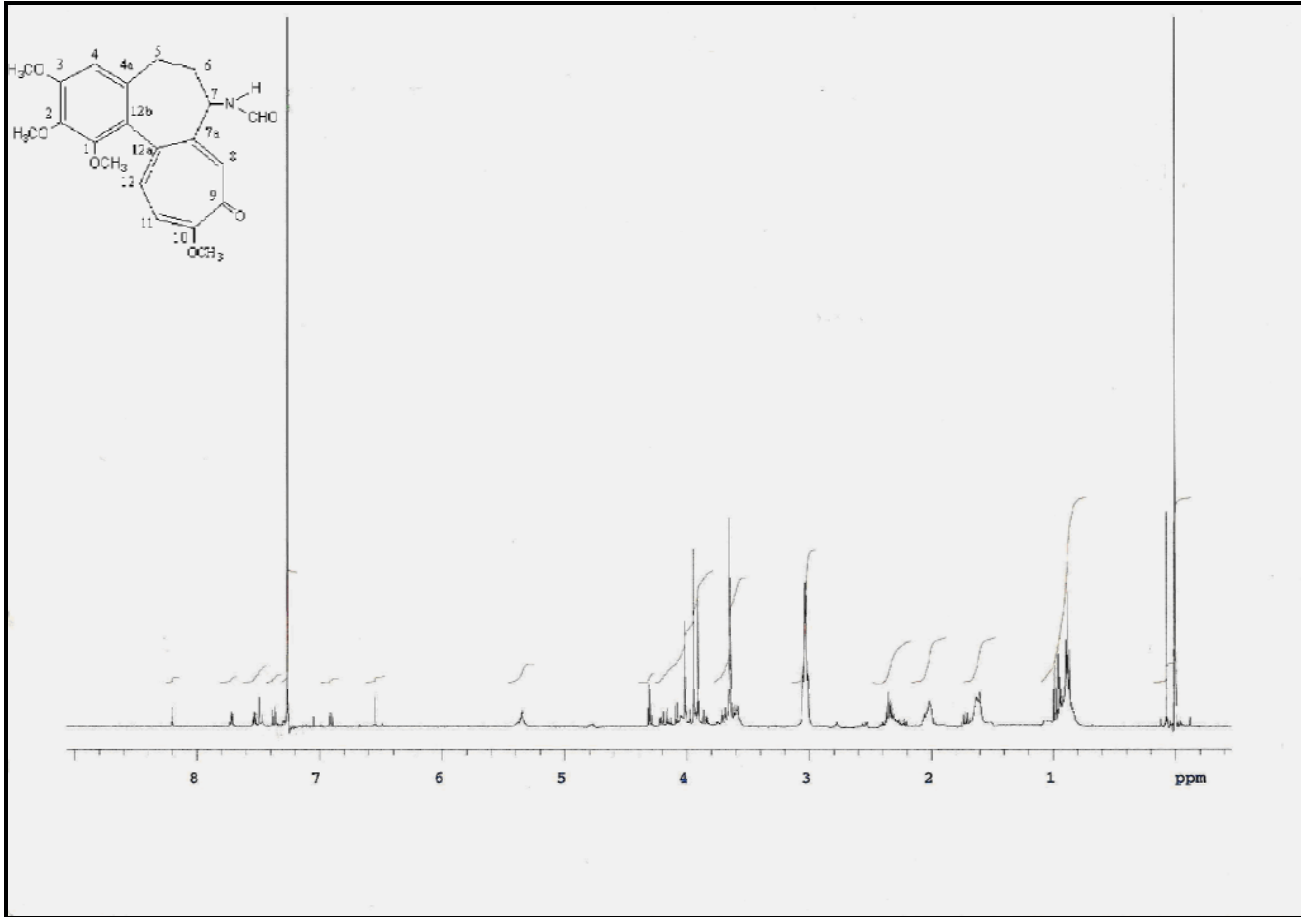
## N-deasetilkolşisin



Şekil 4-18 N-deasetilkolşisinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  7,62 (1 H, s; C-8 H), 7,38 (1 H, d, J 10 Hz; C-12 H), 6,88 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,55 (1H, s; C-4H), 4,31 (1H,m, C-7H), 4,02 (3H, s; C-10 OMe), 3,93 ve 3,90 (2 x 3H, s; C-2 ve -3 OMe), 3,66 (3H, s; C-1 OMe)

### N-deasetil-N-formilkolşisin

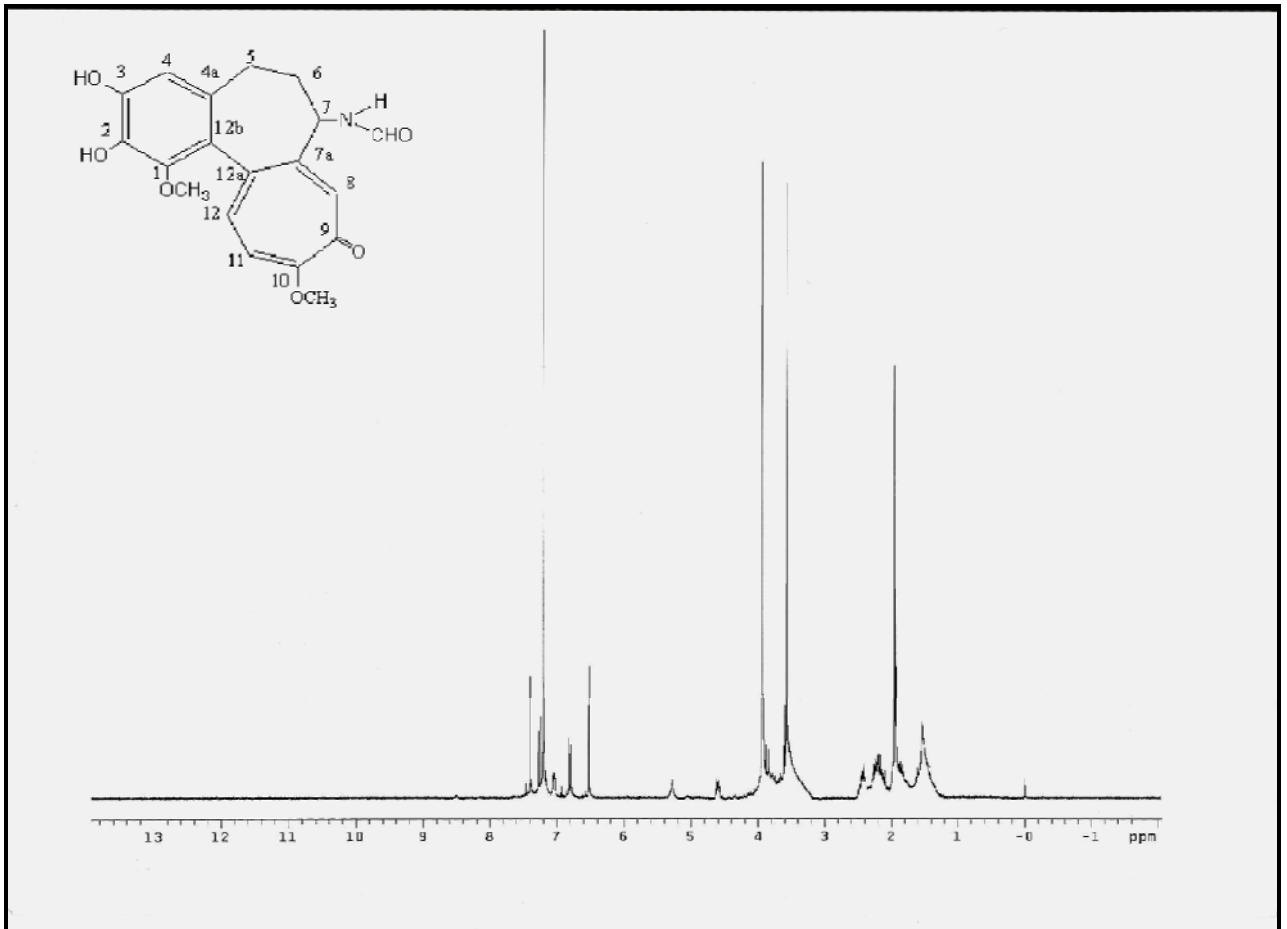


Şekil 4-19 N-deasetil-N-formilkolşisinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  8,22 (1 H s; NCHO), 7,62 (1 H, s; C-8 H), 7,38 (1 H, d, J 10 Hz; C-12 H), 6,88 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,55 (1H, s; C-4H), 4,32 (1H, m, C-7H), 4,02 (3H, s; C-10 OMe), 3,93 ve 3,90 (2 x 3H, s; C-2 ve -3 OMe), 3,66 (3H, s; C-1 OMe)



## 2,3-Didemetilkolşisin

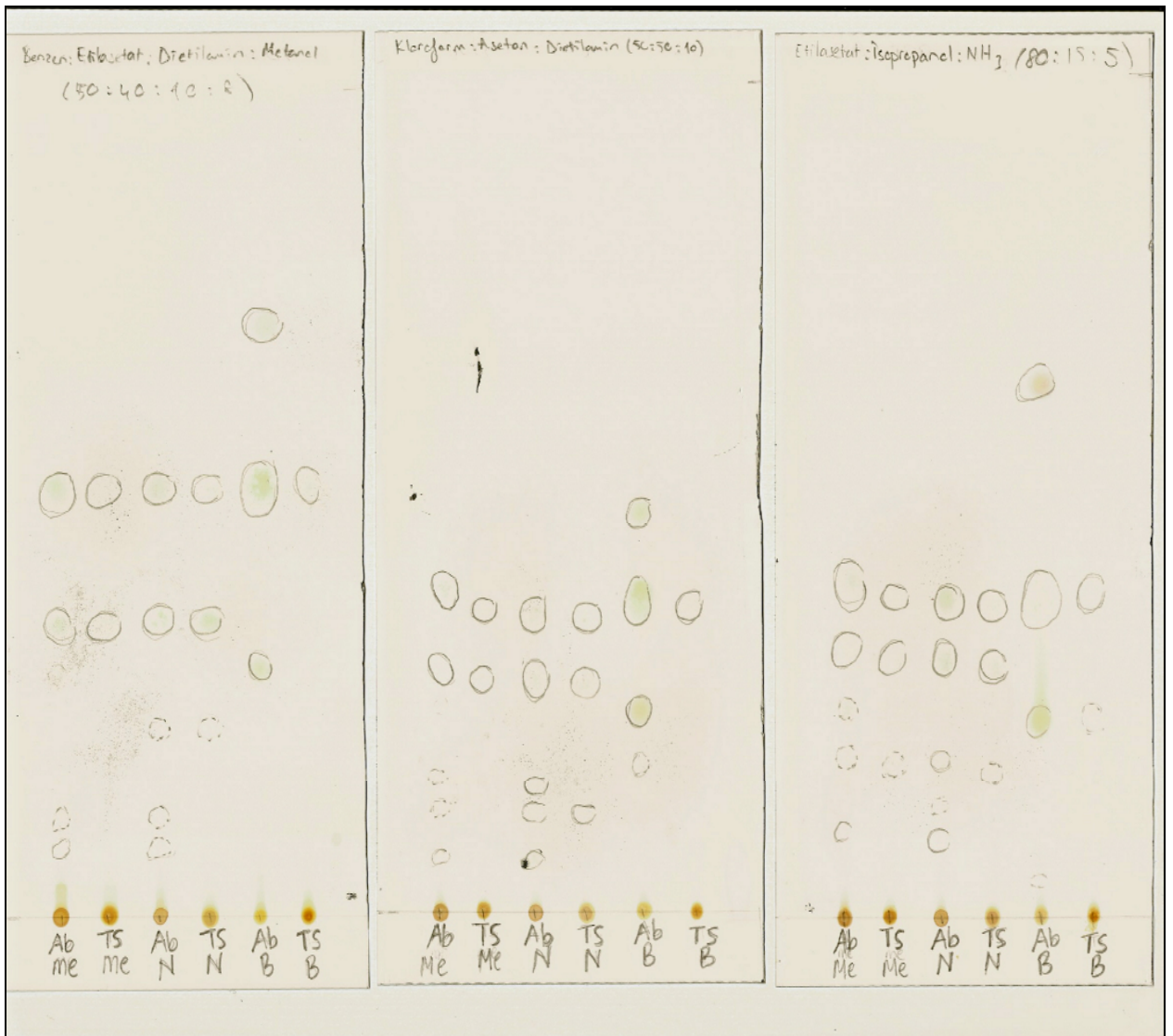


Şekil 4-20 2,3-didemetilkolşisinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  7,62 (1 H, s; C-8 H), 7,38 (1 H, d, J 10 Hz; C-12 H), 6,88 (1H, d, J 10 Hz; C-11H), 6,55 (1H, s; C-4H), 4,60 (1H,m, C-7H), 3,92 (3H, s; C-10 OMe), 3,58 (3H, s; C-1 OMe), 1,99 (3H, s;  $\text{NHCOCH}_3$ ).

#### 4.5. Metanol Ekstreleri ile Nötral ve Bazik Ekstrelerin Kromatografik olarak Karşılaştırılması

Ab m e 05 ile TS m e 05, Ab N 05 ile TS N 05 ve Ab B 05 ile TS B 05 3 ayrı sistemde (sırası ile Benzen: Etilasetat: Dietilamin: Metanol 50:40:10:8; Kloroform: Aseton: Dietilamin 50:50:10; Etilasetat: İzopropanol: Amonyak 80:15:5) İ.T.K. ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4-21).



Şekil 4-21 *Colchicum bivonae* ekstrlerinin kromatografik karşılaştırılması

#### 4.5.Sitotoksik Aktivite Testleri Sonuçları

##### 4.5.1.Brine Shrimp Letalite Testi

Sayılan larvalar Tablo 4-6'da belirtilmiş ve bu değerlere göre her numune için LD<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır.

Numuneler	Hayatta kalan larvalar								
	1 µg/ml			10 µg/ml			100 µg/ml		
Kolşisin (K)	2	3	1	0	0	1	0	0	0
Ts m.e. 05	10	10	10	10	10	9	2	1	1
Ab m.e. 05	10	10	10	10	10	10	0	0	0

**Tablo 4-6 BSL sonucu; 3 ayrı konsantrasyonda 3'er denemede hayatta kalan larva sayıları**

##### LD<sub>50</sub> Değerleri:

Finneya bilgisayar programı tarafından hesaplanan LD<sub>50</sub> değerleri aşağıda belirtilmiştir:

$$LD_{50} (K) = 0.1406 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50} (Ts m.e.) = 41.8930 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50} (Ab m.e.) = 31.6228 \mu\text{g/ml}$$

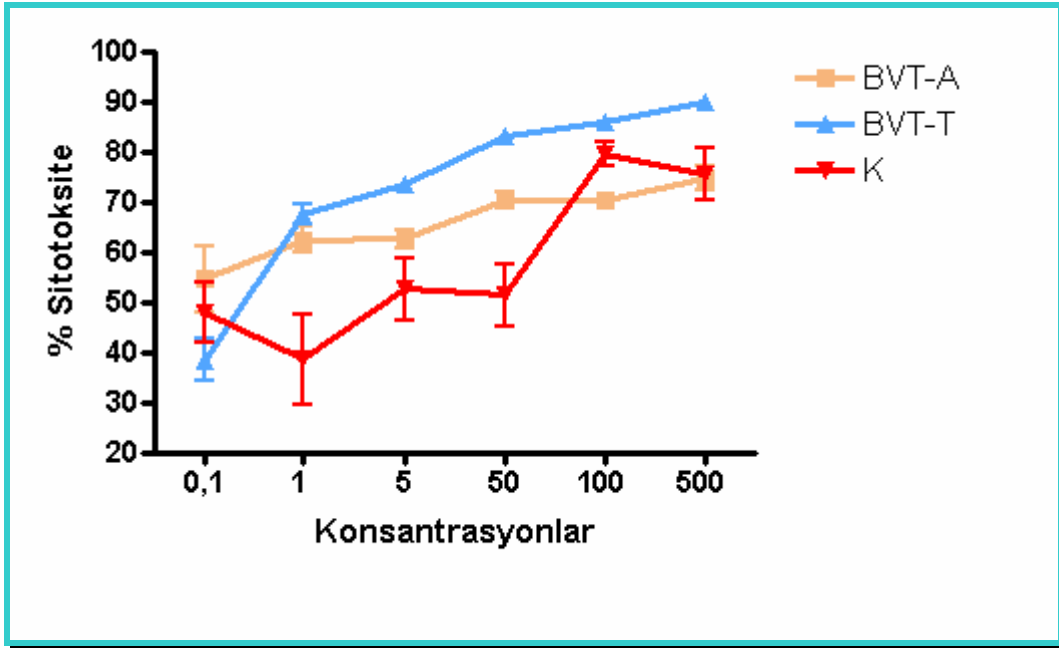
Bu değerlere göre **K**, **TS m.e**, **Ab m.e.** örneklerinin 3'ünün de sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Sitotoksik aktivite açısından, Abant'tan toplanan *Colchicum bivonae* tohum örnekleri daha aktif bulunmuştur.

#### 4.5.2. MTT Yöntemi ile Hücre Kültürleri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Tayini Sonuçları

BVT-A: Bolu, Abant'tan toplanan *Colchicum bivonae* tohumlarının metanol ekstraktleri

BVT-T: Tekirdağ, Saray'dan toplanan *Colchicum bivonae* tohumlarının metanol ekstraktleri

K: Kolşisin



Şekil 4-22 HL 60 hücre serisi üzerinde konsantrasyonlara göre sitotoksisite oranları


HL 60 Serisi Üzerinde LK<sub>50</sub> Değerleri:


K- LK<sub>50</sub> = 4,3 µg/ml

BVT-A LK<sub>50</sub> < 0,1 µg/ml

BVT-T LK<sub>50</sub> = 0,45 µg/ml

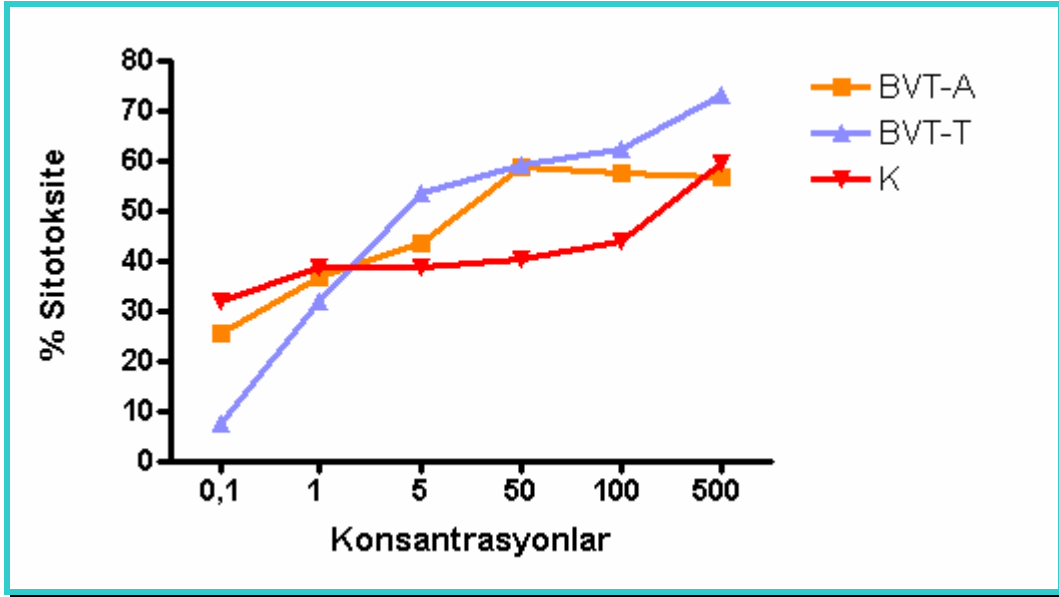
**Tablo 4-7 HL 60 serisi ile sitotoksik aktivite testinin, T-student testi kullanılarak (kolşisin ile karşılaştırma yapılarak) hesaplanan istatistiksel verileri (p> 0,050: anlamsız)**

 : anlamlı olarak yüksek konsantrasyonlar

 : anlamlı olarak düşük konsantrasyonlar

(1-6 arası konsantrasyonlar sırası ile 500, 100, 50, 10, 1, 0,1 µg/ml'yi göstermektedir)

Örnekler ve Konsantrasyonları (1-6)		Ortalama Absorbans	Standart Sapma (±)	Anlamlılık
<b>K</b>	1	75,46	10,41	-
	2	79,49	4,50	-
	3	51,35	12,64	-
	4	52,54	12,49	-
	5	38,50	18,03	-
	6	47,91	12,28	-
<b>BVT-A</b>	1	74,74	5,58	p>0,050
	2	70,41	1,96	<b>0,002</b>
	3	70,25	4,34	<b>0,009</b>
	4	62,63	4,42	p>0,050
	5	62,37	6,31	<b>0,016</b>
	6	54,49	16,56	p>0,050
<b>BVT-T</b>	1	89,89	3,38	<b>0,012</b>
	2	85,98	1,85	<b>0,012</b>
	3	82,89	2,36	<b>p&lt; 0,001</b>
	4	73,40	2,10	<b>0,003</b>
	5	67,41	4,69	<b>0,005</b>
	6	38,39	10,09	p>0,050



Şekil 4-23 K 562 hücre serisi üzerinde konsantrasyonlara göre sitotoksite oranları

K 562 Serisi Üzerinde  $LK_{50}$  Değerleri:

K-  $LK_{50} = 246 \mu\text{g/ml}$

BVT-A  $LK_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$

BVT-T  $LK_{50} = 4,3 \mu\text{g/ml}$

**Tablo 4-8 K 562 serisi ile sitotoksik aktivite testinin T-student testi kullanılarak (kolşisin ile karşılaştırma yapılarak) hesaplanan istatistiksel verileri (p> 0,050: anlamsız)**

: anlamlı olarak yüksek konsantrasyonlar

: anlamlı olarak düşük konsantrasyonlar

(1-6 arası konsantrasyonlar sırası ile 500, 100, 50, 10, 1, 0,1 µg/ml'yi göstermektedir)

Örnekler ve Konsantrasyonları (1-6)		Ortalama Absorbans	Standart Sapma (±)	Anlamlılık
<b>K</b>	<b>1</b>	59,57	9,40	-
	<b>2</b>	43,84	16,74	-
	<b>3</b>	40,42	15,35	-
	<b>4</b>	38,68	14,78	-
	<b>5</b>	38,66	14,92	-
	<b>6</b>	32,02	19,96	-
<b>BVT-A</b>	<b>1</b>	56,62	18,58	p>0,050
	<b>2</b>	57,64	10,23	p>0,050
	<b>3</b>	58,64	8,40	<b>0,029</b>
	<b>4</b>	43,51	8,71	p>0,050
	<b>5</b>	36,57	13,01	p>0,050
	<b>6</b>	25,42	9,73	p>0,050
<b>BVT-T</b>	<b>1</b>	73,05	10,41	<b>0,040</b>
	<b>2</b>	62,33	9,38	<b>0,040</b>
	<b>3</b>	58,89	14,78	p>0,050
	<b>4</b>	53,53	11,98	p>0,050
	<b>5</b>	31,96	13,00	p>0,050
	<b>6</b>	7,32	8,88	<b>0,020</b>

## 5. TARTIŞMA

Kolşisin ve türevlerinin gut, ailevi Akdeniz ateşi, Behçet, amiloidoz, Hodgkin, siroz, psoriasis gibi hastalıkların tedavisinde etkin bir ilaç olması; kanser araştırmalarındaki önemi ve ayrıca tarım alanında poliploit bireylerin yetiştirilmesinde kullanımının artması nedeniyle, bu grup alkaloidlerin elde edilmesinde Avrupa’da yetişen ya da kültürü yapılan ve tek kaynak olarak kullanılan *Colchicum autumnale* (Sonbahar Acıçiğdemi) türü (Colchicaceae) ve Colchici semen drogu, Dünya gereksinimini karşılayamaz hale gelmiştir.

Türkiye’nin geofitler açısından gen merkezi olması ve dolayısıyla Avrupa’da sadece *C. autumnale* türü varken ülkemizde *Colchicum* cinsinin yaklaşık 40 kadar türle temsil edilmesi nedeniyle, İ Ü Eczacılık Fakültesi Farmakognozi’de 1970 lerde bu türler üzerinde kimyasal açıdan tarama çalışmaları başlatılmıştır. Araştırmaların devamında özellikle sonbaharda çiçek açan *Colchicum* türlerinden, yüksek tohum verimli ve büyük yumrulu olması nedeniyle alkaloid endüstrisinde, kültüre alınarak yararlanılabilecek yeni kaynaklar ortaya konmuştur,

Kolşisin ve türevleri açısından zengin olduğu saptanan türlerden biri olan *C. bivonae* Guss. bitkisinin öncelikle yumruları üzerinde, Prof.Dr. Turhan Baytop’un danışmanlığı altında Ecz. Begüm Orhon tarafından bir doktora tezi çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucu *C. bivonae* yumrularında  $\beta$ -lumikolşisin,  $\alpha$ -lumikolşisin, kornigerin, kolşisin, N-deasetil-N-formilkolşisin, 2-demetilkolşisin, 3-demetilkolşisin, N-deasetil-N-formilkolşisilin ve O-metilkreysigin bulunmuştur. Ancak demekolsin’ e rastlanmamıştır. *Colchicum* türlerininin drog elde edilmesinde kullanılan kısımları olarak özellikle tohumlar kabul edilmektedir. Önceki çalışmalarda sadece ana etken alkaloidlerinin miktarı açısından araştırılan *C. bivonae* türünün tohumlarının, bu tez çalışmasında ise kimyasal açıdan daha kapsamlı olarak araştırılması planlanmıştır.

Bu araştırmada, iki ayrı yöreden toplanan (Bolu, Abant ve Tekirdağ, Saray) *C. bivonae* tohumları üzerinde, ince tabaka kromatografisi ve kromatotron yöntemleri ile madde izolasyonları yapılmış ve elde edilen alkaloidlerin spektral yöntemlerle yapıları tayin edilmiştir. Ayrıca iki ayrı yöreden toplanan örnekler, kromatografik olarak ve sitotoksik aktivite açısından (Brine Shrimp Letalite Testi-BSL, MTT Sitotoksik Aktivite Testi) da birbirleriyle karşılaştırılmıştır.



Bu tez çalışmasının sonunda *C. bivonae* Guss. bitkisinin tohumlarında Bolu, Abant'tan toplanan örneklerden **kolşisin**, **N-deasetilkolşisin**, **N-deasetil-N-formilkolşisin**, **2,3-didemetilkolşisin**, **demekolsin**, **2-demetildemekolsin** ve **kolşisilin** olmak üzere tropolonik yapıda 7 alkaloid; Tekirdağ, Saray örneklerinden ise sadece **kolşisin** ve **demekolsin** alkaloidleri elde edilmiştir. Total tropolonik alkaloid miktarının daha yüksek bulunmasına rağmen Tekirdağ, Saray örneklerinde Bolu, Abant örneklerinde bulunan alkaloid çeşitliliği saptanamamıştır.

**Tablo 5-1 *Colchicum bivonae* tohumlarının metanol ekstrelerinden elde edilen maddeler ve miktarları**

Madde	Bolu, Abant (6,5 g ekstre)	Tekirdağ, Saray (5,3 g ekstre)
	Miktar (mg)	
Demekolsin	178,2	94,6
2-demetildemekolsin	20,9	—
Kolşisin	49,6	7
N-deasetilkolşisin	3,4	—
N-deasetil-N-formilkolşisin	2,3	—
2,3-didemetilkolşisin	8,1	—
Kolşisilin	3,1	—

Sitotoksisite çalışmaları sonucunda MTT yönteminde Tekirdağ, Saray'dan toplanmış tohum örneklerinin K 562 hücre serisi üzerinde Bolu, Abant örneklerine göre daha fazla, HL 60 hücre serisi üzerinde ise daha az sitotoksisiteye sahip olduğu, BSL testinde ise Bolu, Abant örneklerinin Tekirdağ, Saray örneklerine göre daha sitotoksik olduğu saptanmıştır.

**KAYNAKLAR**

1. Ahern MJ, Reid C, Gordon TP, McCredie M, Brooks PM, Jones M. Does colchicine work? The results of the first controlled study in acute gout. *Aust N Z J Med* 1987 ; **17** (3): 301-4.
2. Ajaiyeoba EO, Abiodun OO, Falade MO, Oglobe NO, Ashidi JS, Happi CT et al. In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine* 2006; **13** (4): 295-8.
3. Alali FQ, El-Elimat T, Li C, Qandil A, Alkofahi A, Tawaha K et al. New Colchicinoids from a Native Jordanian Meadow Saffron *Colchicum brachyphyllum* Isolation of the First Naturally Occuring Dextrorotatory Colchicinoid. *J Nat Prod* 2005; **68**: 173-8.
4. Andreu JM, Timasheff SN. Interaction of tubulin with single ring analogues of colchicine. *Biochemistry* 1982; **21** (3): 534-43
5. Baktır G, Baktır E. *Eczacının Tıp Sözlüğü*. 2nd ed. İstanbul: Rehber Tıbbi Yayınlar; 1997. pp. 34.
6. Baytop T, Özcöbek G. Recherches sur les Alcaloïdes de *Colchicum chalconicum*, *micranthum*, *szovitsii* et *turcicum*. *J Fac Pharm İstanbul* 1970; **6**: 21-6.
7. Baytop T. *Farmakognozi Ders Kitabı Cilt 2*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 1971. pp. 56.
8. Baytop T. *Türkiye 'de Bitkilerle Tedavi*. 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999. pp. 139.
9. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 Update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1998; **28** (1): 48-59.

10. Ben-Chetrit E, Sherrmann JM, Zylber-Katz E, Levy M. Colchicine disposition in patients with familial Mediterranean fever with renal impairment. *J Rheumatol* 1994; **21**: 710-3.
11. Bodoki E, Oprean R, Vlase L, Tamas M, Sandulescu R. Fast Determination of Colchicine by TLC-Densitometry From Pharmaceuticals and Vegetal Extracts. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; **37** (5): 971-7
12. Brickell CD. Colchicum L. İçinde Davis PH, editor *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 8*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1984. pp. 329-51.
13. Brossi A, Boye O, Muzaffar A, Yeh HJC, Toome V, Wegrzynski B ve ark. a S, 7S-absolute configuration of natural (-)-colchicine and allo-congeners. *Febbs Letters* 1990; 5-7.
14. Callen JP. *Arthritis Rheum* 1987; **30** (4): 106.
15. Capraro HG, Brossi A. Tropolonic Colchicum Alkaloids. *The Alkaloids* 1984; **23**: 1-65.
16. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2002; **2**: 17.
17. Cernoch M, Malinsky J, Telupilova, Santavy F. Biological effect of colchicine derivatives in relation to their structure; principles of Colchicum and their derivatives. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1954; **99**: 141-62.
18. Cook JW, Loudon JD. Colchicum. *The Alkaloids* 1952; **2**: 261-329.
19. Cortese F, Bhattacharyya B, Wolff J. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *J Biol Chem* 1977; **252**: 1134-40.

20. Cromwell B T. The Alkaloids of Colchicum spp. İçinde Paech K and Tracey M V, editor. *Modern Methods of Plant Analysis*. Berlin: Springer-Verlag; 1955. pp. 432.
21. Cross AD, Syntex SA, Mexico DF, Santavy F. Substances from the Plants of the Sub-family Wurmbeoidea and Their Derivatives LXI. Ultraviolet-, Infrared-, and NMR-Spectroscopy of Colchicine Alkaloids and Some of Their Derivatives. *Beiträge Biochemie* 1965; 97-112.
22. Davis PH, editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 8*. Edinburgh: University Press; 1984: 67-8.
23. Davtyan TK, Mkrtychyan R, Manukyan HM, Avestiyan SA. Dexamethasone, colchicine and iodine-lithium- $\alpha$ -dextrin act differentially on the oxidative burst and endotoxin tolerance induction in vitro in patients with Behçet's disease. *International Immunopharmacology* 2006; 6:369-407.
24. Desbene S, Giorgi-Renault. Drugs that Inhibit Tubulin Polymerization: The Particular Case of Podophyllotoxin and Analogues. *Curr Med Chem-Anti Cancer Agents* 2002; 2: 71-90.
25. Dewick PM. *Natural Medicinal Plant-A Biosynthetic Approach*. 2nd ed. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd; 2003. pp. 341-2.
26. Dvorak Z, Ulrichova J, Modriansky M, Maurel P. Effect of Colchicine and Its Derivatives on the Expression of Selected Isoforms of Cytochrome P450 in Primary Cultures of Human Hepatocytes. *Acta Univ Olomuc, Fac Med* 2000; 143: 47-50.
27. Dumortier C, Potenziano JL, Bane S, Engelborghs Y. The mechanism of tubulin-colchicine recognition. *Eur J Biochem* 1997; 249: 265-9.

28. Erpek S. Aydınli bir Hekim: Tralles'li Aleksandr (Alexandros Trallianos). *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2003; **4** (2): 35-41.
29. Evans WC. *Trease and Evan's Pharmacognosy*. 15th ed. Edinburgh: W B Saunders; 2002. pp. 369-70, 401.
30. Favari L, Perez-Alvarez V. Comparative Effects of Colchicine and Silymarin on CCl<sub>4</sub>-Chronic Liver Damage in Rats. *Arch Med Res* 1997; **28** (1):11-7.
31. Fell KR, Ramsden D. Phytochemical investigations of some species of Colchicum. *J Pharm Pharmac* 1966; **18**: 126S-32S.
32. Fell KR, Ramsden D. Colchicum: A Review of Colchicums and the Sources, Chemistry, Biogenesis and Assay of Colchicine and its Congeners. *Lloydia* 1967; **30** (2): 123-40.
33. Ferron GM, Rochdi M, Jusko WJ, Scherrmann JM. Oral absorption characteristics and pharmacokinetics of colchicine in healthy volunteers after single and multiple doses. *J Clin Pharmacol* 1996; **36** (10): 874-83.
34. Fleming T, editor. *PDR for Herbal Medicines*. 2nd ed. New Jersey: Medical Economics Company; 2000. pp. 206-7.
35. Forni GP. Thiocolchicoside determination by HPLC in pharmaceutical formulations. *Fitoterapia* 1982; **1** (2): 3-8.
36. Geriler D, Thomasset N. Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J Immunol Methods* 1986; **94** (1-2): 57-63.
37. Girre C, Thomas G, Scherrmann JM, Crouzette J, Fournier PE. Model-independent pharmacokinetics of colchicine after oral administration to healthy volunteers. *Fundam Clin Pharmacol* 1989; **3** (5): 537-43.

38. Goldstein RC, Schwabe AD. Prophylactic colchicine therapy in familial Mediterranean fever. A controlled, double-blind study. *Ann Intern Med* 1974; **81**: 792.
39. Gunther RT. *The Greek Herbal of Dioscorides*. 2nd ed. New York: Hafner Publishing Company Inc; 1968. pp. 481-2.
40. Hamerslag FE. *The Technology and Chemistry of Alkaloids*. New York: D. Van Nostrand Company Inc. 1950; pp. 66.
41. Havas L. Colchicine Chronology. *Jour Hered* 1940; **31**:115.
42. Herbert RB, Kattah AE, Knagg E. The Biosynthesis of the phenethylisoquinoline alkaloid colchicine. Early and intermediate stages. *Tetrahedron* 1990; **46**: 7119-38.
43. Hirohata S, Kikuchi H. Review Behçet's disease. *Arthritis Res Ther* 2003; **5**: 139-146.
44. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 8th ed. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık; 1998. pp. 1051-2.
45. Kim KY, Schumacher HR, Hunsche E, Wertheimer AI, Kong SX. A Literature Review of the Epidemiology and Treatment of Acute Gout. *Clinical Therapeutics* 2003; **25** (6): 1593-1617.
46. Körner A, Kohn S. Development and optimization of a stability indicating method on a monolithic reversed phase column for Colchicum dry extract. *J Chromatogr A* 2005; **1089**: 148-57.
47. Larson RA, Yachnin S. Cytochalasin B is a Potent Mitogen for Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In Vitro. *J Clin Invest* 1983; **72**: 1268-76.

48. Lee SJ, Kim YG, Kang KW, Kim CW, Kim SG. Effects of colchicine on liver functions of cirrhotic rats: beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF  $\beta$  1 expression. *Chemico - Biological Interactions* 2004; **147**: 9-21.
49. Leete E, Nemeth PE. The Biogenesis of the Alkaloids of *Colchicum L.* The Incorporation of Phenylalanine into Colchicine. *J Am Chem Soc* 1960; **82** 6055-7.
50. Le Hello C. The Pharmacology and Therapeutic Aspects of Colchicine. *The Alkaloids* 2000; **53**: 288-352.
51. Levy M, Spino M, Read S. Colchicine: A State-of-the-Art Review. *Pharmacotherapy* 1991; **11** (3): 196-211.
52. Lidar M, Scherrmann JM, Shinar Y, Chetrit A, Niel E, Baruch-Gershoni R et al. *Semin Arthritis Rheum* 2004; **33**: 273-82.
53. Matsumura N, Mizushima Y. Leucocyte movement and colchicine treatment in Behget's disease. *Lancet* 1975; **2**: 813-817.
54. Mathew B, Baytop T. *The Bulbous Plants of Turkey*. London: B.T. Batsford Ltd; 1984. pp. 70-5.
55. Meksuriyen D, Lin LJ, Cordell GA. NMR Studies of Colchicine and its Photoisomers,  $\beta$ - and  $\gamma$ - Lumicolchicines. *J Nat Prod* 1988; **51** (1): 88-93.
56. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med* 1982; **45**: 31-4.
57. Mizushima Y, Matsumura N, Mori M, Shimizu T, Fukshima B, Mimura Y ve ark. Colchicine in Behcet's disease. *Lancet* 1977; **2**: 1037.

58. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.
59. Muzaffar A, Brossi A. Chemistry of Colchicine. *Pharmacother* 1991; **49**: 105-9.
60. Nasreen A, Gundlach H, Meinhart HZ. Incorporation of Phenethylisoquinolines Into Colchicine In Isolated Seeds of *Colchicum autumnale*. *Phytochemistry* 1997; **46** (1): 107-15.
61. Orhon B. *Colchicum bivonae* Guss. yumrularının alkaloitleri üzerinde araştırmalar. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Kürsüsü Doktora Tezi; 1981
62. Persson K. *Colchicum* L. İçinde: Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC, Hedge IC, editors. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 11*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 2000. pp. 246-65.
63. Persson K. A New Turkish Species of *Colchicum* (Colchicaceae) Related To *C.boissieri*. *Edinburgh J Bot* 2005; **62** (3): 181-92.
64. Poulev A, Deus-Neumann B, Bombardelli E, Zenk MH. Immunoassays for the Quantitative Determination of Colchicine. *Planta Med* 1994; **60**: 77-83.
65. Ray K, Bhattacharyya B, Biswas BB. Role of B-ring of colchicine in its binding to tubulin. *J Biol Chem* 1981; **256**: 6241-4.
66. Rosso A, Zuccaro S. Determination of alkaloids from the colchicines family by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; **825**: 96-101.



67. Rueffer M, Zenk MH. Microsome-mediated transformation of O-methyandrosimbine to demecolcine and colchicine. *FEBS Letters* 1998; **438**: 111-3.
68. Santavy F. Colchicine Alkaloids. İçinde Stahl E. *Thin Layer Chromatography*. Berlin: Springer-Verlag; 1969. pp. 425.
69. Santavy F. Colchicum Alkaloids and Related Substances-Their Chemistry and Biology. *Acta Univ Olomuc, Fac Med* 1979; **90**: 15-44.
70. Santavy F, Dvorackova S, Simanek V, Potesilova H. Isolation and Identification of Alkaloids of the Subfamily Wurmbaeoideae. *Acta Univ Olomuc, Fac Med* 1982; **105**:63-110.
71. Santavy F. Aduct of colchicine acetate and ethyl acetate. *Acta Univ Olomuc, Fac. Med* 1990; **90** (15): 15-44.
72. Simanek V, Husek A, Valka I, Sütlüoınar N. Phytochemical studies of Turkish Colchicum and Merendera species. *Herba Hungarica* 1990; **29** (3): 64-8.
73. Sütlüoınar N. *Türkiye'nin Sonbahar Colchicum Türlerinin Demekolsin, Kolşikozit ve Kolşisin Yönünden Değerlendirilmesi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Doğentlik tezi; 1985.
74. Sütlüoınar N. The Evaluation of Turkish Autumn Flowering Colchicum Species. *J Fac Pharm İstanbul* 1998; **32**: 1-7.
75. Sütlüoınar N. Investigations on Turkish Colchicum and Merendera Species. *Acta Pharm Turc* 2002; **44**: 175-81.
76. Süzer Ö. *Stedman Tıp Sözlüğü*. İstanbul: Sistem Yayıncılık; 1992.

77. Tanker M, Tanker N. *Farmakognozi Cilt 2*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1990. pp. 30.
78. Tüzün Y, Kotoğyan A, Mat C, Serdaroğlu S. Psoriasis Tedavisinde Colchicine'in Yeri. *10. Ulusal Dermatoloji Kongresi* 1984: 142-46.
79. Ulaşoğlu C, İlgün K. Kolşisin ile Karaciğre Sirozu Tedavisinden Alınan Sonuçlar. *Dirim* 1989; **1** (2): 53-9.
80. Ünal A. Hodgkin Lenfoma. *Türk Hematoloji Derneği Klinisyen-Patolog Ortak Lenfoma Kursu* 2004: 101-6.
81. Wallace SL, Ertel NH. Plazma levels of colchicine after administration of a single dose. *Metabolism* 1978; **22**: 749-53.
82. Wildman WC, Pursey BA. Colchicine and Related Compounds. *The Alkaloids* 1968; **11**: 407-55.
83. Zemer D, Revach M., Pras M., Modan B, Schor S, Sohar E ve ark. A controlled trial of colchicines in preventing attacks of familial Mediterrenian fever. *N Engl J Med* 1974; **291**: 932-4.
84. Zweig MH, Chignell CF. Interaction of some colchicine analogs, vinblastine and podophyllotoxin with rat brain microtubule protein. *Biochem Pharmacol* 1973; **22**: 2142-50.
85. Anonymous. 5 year results in 90 cases of breast cancer following combined treatment with colchicine derivatives, mastectomy and postoperative radiotherapy. *Chin. Med. J. (Engl. Ed.)* 1980; **93** (4): 227.
86. *British Pharmacopoeia*. London: London Her Majesty's Stationery Office; 1980. pp. 124.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Burçak	<b>Soyadı</b>	YEŞİLTEPE
<b>Doğ.Yeri</b>	Giresun-Merkez	<b>Doğ.Tar.</b>	20.04.1981
<b>Uyruğu</b>	T. C.	<b>TC Kim No</b>	29974650844
<b>Email</b>	byesil@istanbul.edu.tr	<b>Tel</b>	0212 440 00 00/13594

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İ. Ü. Eczacılık Fakültesi	2003
<b>Lise</b>	Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi	1999

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
<b>1.</b>	Araştırma görevlisi	İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2003-2006
<b>2.</b>			-
<b>3.</b>			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(İ.Ü.Yabancı Diller Bölümü Sınavı) Puanı
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	İyi	Çok iyi	55	77
<b>İtalyanca</b>	Orta	Zayıf	Zayıf	-	-

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	59,3	59,6	59,8
<b>(Diğer) Puanı</b>	-	-	-

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Power Point	Çok iyi
Chem draw	Çok iyi

**Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**

- XV. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı 2004 06-09 Ekim 2004- Katılım Sertifikası
- İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 23-24 Mayıs 2005 Deney Hayvanları Eğitim Sertifikası
- « Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids » Uluslararası Sempozyum 25-29 Nisan 2006 Katılım Sertifikası (poster bildirisi ile)

**Özel İlgi Alanları (Hobileri) :**

- Resim
- Sinema
- Fotoğraf
- Edebiyat
- Yabancı dil

