

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Veratrum album* BİTKİSİ SEKONDER**
METABOLİTLERİNİN VE
SİTOTOKSİSİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinem YILMAZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal BEDİR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 09.09.2015

Bornova - İZMİR

2015

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sinem YILMAZ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Veratrum album* Bitkisi Sekonder Metabolitlerinin ve Sitotoksisitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 09/09/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Raportör Üye : Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK

Üye : Yard. Doç. Dr. Çiğdem TOSUN

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Veratrum album* Bitkisi Sekonder Metabolitlerinin ve Sitotoksitelerinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

09/09/2015

İmzası

Sinem YILMAZ

ÖZET***Veratrum album* BİTKİSİ SEKONDER METABOLİTLERİNİN ve SİTOTOKSİSİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek lisans tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal BEDİR

Eylül 2015, 79 Sayfa

Liliaceae familyasından *Veratrum* bitkileri tıbbi açıdan önem ihtiva etmektedir. Akçöpleme ya da Ağukunduzu olarak bilinen bu bitkiler Kızılderili'ler ve sanayi öncesi topluluklar tarafından yara iyileştirmede, yılan ısırıklarında, epilepsi gibi hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılmıştır. *Veratrum* türlerinden izole edilen steroidal alkaloidler, Hedgehog gelişim yolağını inhibe ederek, kanser oluşumunu post-translasyonel modifikasyonlarla durdurması nedeniyle son dönemde ilgi odağı olmuştur.

Bu tez projesinde, ülkemizde tek tür ile temsil edilen *Veratrum* cinsi üyesi *V. album* bitkisi fitokimyasal açıdan çalışılmıştır. Özellikle steroidal alkaloidlerinin saflaştırılması ve yapı tayini çalışmaları sonrası kanser hücre hatlarına (MRC-5, LNCaP, U2-OS, HCC1937 ve 293HEK hücre hatları) karşı toksisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Haziran 2013'te Çambaşı Yaylası-Ordu'dan toplanan *Veratrum album* materyali üzerinde (rizom ve soğanlar) ekstraksiyon, fraksiyonlama ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucu 12 molekül elde edilerek, spektral yöntemlerle yedisinin yapı tayinleri yapılmıştır (resveratrol, oxyresveratrol, oxyresveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside, oxyresveratrol 2'-O- β -D-glucopyranoside, 2-O-methyl- α -D-fructofuranose, 2-O-methyl- β -D-fructofuranose ve jervine). Elde edilen moleküllerden jervin ve yapısı kısmen tanımlanabilen bir alkaloidin sitotoksiteleri WST-1 metodu ile çalışılmıştır. Test edilen iki molekülde de kayda değer bir sitotoksisite gözlenmemiştir.

Bu çalışma kapsamında saflaştırılarak yapı tayini yapılan; 2-O-methyl- α -D-fructofuranose, 2-O-methyl- β -D-fructofuranose ve oxyresveratrol 2'-O- β -D-glucopyranoside, *Veratrum* cinsinden ilk kez rapor edilmektedir.

ABSTRACT**INVESTIGATION CYTOTOXICITY and SECONDER
METABOLITES OF *Veratum album* PLANT**

YILMAZ, Sinem

MSc in Thesis, Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Erdal BEDİR

September 2015, 79 pages

Veratrum genus as a member of Liliacea family is important due to its medicinal properties. *Veratrum* species known as White Hellebore have been used to treat wounds, snake bites and epilepsy in traditional medicine by Native Americans and pre-industrial societies. Steroidal alkaloids isolated from *Veratrum* species have become more important recently due to their inhibitory effects on Hedgehog pathway, which results in post-translational modification directed anticancer effects.

In this thesis, *V. album*, the only member of *Veratrum* genus in Turkish flora, was studied phytochemically. We primarily made an attempt to isolate its steroidal alkaloids and to elucidate structures of the isolates that was followed by cytotoxicity screening towards cancer cell lines (MRC-5, LNCaP, U2-OS, HCC1937 and 293HEK cell line).

Extraction, fractionation and purification studies were performed on the plant material (rhizomes and bulbs) collected from Çambaşı Plateau - Ordu in June 2013. As a result of these studies, twelve compounds were purified, and structures of seven isolates were characterized by spectral methods (resveratrol, oxyresveratrol, oxyresveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside, oxyresveratrol 2'-O- β -D-glucopyranoside, 2-O-methyl- α -D-fructofuranose, 2-O-methyl - β -D-fructofuranose and jervine). Two of the compounds from steroidal alkaloid group, jervine together with a partly determined compound, were screened for cytotoxicity by WST method.

Both compounds provided unimportant cytotoxicity results versus cancer cell lines.

In this study, three compounds, namely 2-O-methyl- α -D-fructofuranose, 2-O-methyl- β -D-fructofuranose and oxyresveratrol 2'-O- β -D-glucopyranoside, are being reported for the first time from *Veratrum* genus.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim süre dahilinde, bana bilgisi ile yol gösteren ve manevi desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Erdal BEDİR'e, biyoaktivite çalışmaları kısmında benimle birikimini paylaşarak rehber olan ve vazgeçmememi söyleyerek daima motivasyonumu arttıran Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmam boyunca, her daim yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Serdar DEMİR, Özge ÖZÇINAR, Özgür TAĞ, Melis KÜÇÜKSOLAK, Selin AKTAR, Seda DUMAN, Güner EKİZ, Recep İLHAN ve Yalçın ERZURUMLU' ya, NMR analizlerini gerçekleştiren Salih GÜNNAZ'a teşekkür ederim.

Çalışmaların bir kısmını gerçekleştirdiğim Ege Üniversitesi Farmasötik Botanik A.B.D. ve Biyokimya A.B.D.'na teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen, geç saatlere kadar çalıştığım dönemlerde yanımda olan eşim Barış ANAMUR'a sabrı ve desteği için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı desteği ve 14-MÜH-044 numaralı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'nin ile katkıları ile yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

ÖZET	v
ASBTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Sekonder Metabolitler ve İlaç Keşfindeki Yerleri	2
2.1 Steoridal Alkaloidlerin Temel Yapısı	4
2.1.1 Kavenin tip alkaloidler	5
2.1.2 Veratrimin tip alkaloidler	8
2.1.3 Solanidin tip alkaloidler	9
2.1.4 Verazin tip alkaloidler	9
2.1.5 Jervin tip alkaloidler	10
2.2 <i>Veratrum</i> türü alkaloidlerinin keşfi	11
2.3 Sinyal iletimi ve Hedgehog yolağı	13
2.3.1 Hedgehog yolağının keşfi	14
2.3.2 Normal hedgehog yolağı	15
2.3.3 Hedgehog yolağı ve kanser	17
2.4 Hh Yolak İnhibitörleri ile Yapılan Belirgin Çalışmalar	20
3. MATERYAL	23
3.1 Bitkisel Materyalin Toplanması, Kurutulması ve Öğütülmesi	23
3.2 Ekstraksiyon İşleminin Gerçekleştirilmesi	23
3.3 Ayırma Safılaştırma İşlemleri	24
3.4 Sitotoksite Testi	24
4. MAKİNA ve TEÇHİZAT	25
5. YÖNTEMLER	26
5.1 Ekstrenin Hazırlanması	26
5.2 Alkaloid Ekstraksiyonunun Gerçekleştirilmesi	26
5.3 Ayırma Safılaştırma İşlemleri	27
5.4 Sitotoksisite Testi	29

İÇİNDEKİLER (Devam)

6. BULGULAR	31
6.1. C18 Ters Faz Kolon Kromatografisinden Elde Edilen ve Birleştirilen Fraksiyonlar	31
6.2. Resveratrol ve Türevlerinin İzolasyon Çalışmaları	31
6.3. Şeker Türevlerinin İzolasyon Çalışmaları	35
6.4. Steroidal Alkaloidlerin İzolasyonu	38
6.5. İzole Edilen Moleküllerin Yapı Tayinleri.....	41
6.5.1. A2 (60:40 karışım).....	41
6.5.2. A3 molekülü	46
6.5.3. A5 molekülü	49
6.5.4. A7 molekülü	51
6.5.5. A8 molekülü	56
6.5.6. B3 molekülü.....	61
6.5.7. Sitotoksikite sonuçları	64
7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	66
7.1. Resveratrol Türevlerinin Eldesi.....	66
7.2. Steroidal Alkaloidin Eldesi.....	68
7.3. Şeker Türevi Moleküllerin Eldesi.....	69
7.4. Biyoaktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	70
8. ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Ticari olarak öneme sahip bitkisel kökenli komponentlerin biyosentetik orjinleri (Balandrin et al., 1985).....	3
2.2. Aspirin (1), Digitoksin (2), Morfin (3), Kinin (4), ve Pilocarpin (5) ilaçlarının molekül yapıları (Mark, 2004).....	4
2.3. İzosteroidal ve steroidal alkaloidlerin temel iskelet yapıları (Li, Jiang et al. 2006)....	5
2.4. Kavenin tip alkaloidlerin molekül yapıları (Li, et al., 2006).....	7
2.5. Veratrimin tip alkaloidlerin molekül yapıları (Li et al., 2006).....	8
2.6. Solanidin tip alkaloidlerden 12β- hydroxyisorubijervine molekül yapısı (Li et al., 2006).....	9
2.7. Verazin tip alkaloidlerin molekül yapıları (Li et al., 2006).....	10
2.8. Jervin tip alkaloidlerin molekül yapıları (Li et al., 2006).....	11
2.9. <i>Veratrum album</i> bitkisi.....	12
2.10. Siklopiye sebep olan 3 alkaloidin molekül yapıları. A; sikloposin, B; jervin, C; siklopamin	13
2.11. Larval kutiküler fenotipleri. A, Normal suş. B-F, Hedgehog mutantlı larvalar (Mohler, 1988).....	15
2.12. Hedgehog sinyal iletim mekanizması. A, Hh ligandın yokluğunda. B, Hh ligandın varlığında (Ruch and Kim 2013).....	17
2.13. Kanserde anormal Hh yolağının aktivasyonunda farklı modellerin şematik gösterimi	19
3.1. Bitkisel Materyalin Kurutulması	23

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

5.1. Yoğunlaştırılmış MeOH ekstresi	26
5.2. Ayırma hunisi ile klasik alkaloit ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi	27
5.3. Alkaloit ekstraksiyonunun İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (61:32:7)).....	27
5.4. Silikaya emdirilmiş bazik faz.....	27
5.5. Silikaya emdirilmiş bazik ekstrenin C-18 kolon kromatografisi	29
6.1. Birleştirilen Fr 23-24'ün İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (61:32:7))	31
6.2. Fr 32-35 ve Fr 38-40'ın İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (61:32:7)).....	32
6.3. Elde edilen resveratrol ve türevlerinin birleştirilmiş fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH:H ₂ O (61:32:7)).....	32
6.4. Fr 23-24'ten alınan Fr 66-70 ve Fr 145-159 fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH:H ₂ O (61:32:7))	33
6.5. Fr 32-35'in İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH:H ₂ O (61:32:7)).....	33
6.6. Fr 32-35 [37-93] 'ten alınan fraksiyonların İTK profilleri (Çözgen sistemi; Hex: EtOAc: MeOH (10:10:3)).....	34
6.7. Fr 32-35 [37-93][33-55]' ten alınan fraksiyonların İTK profilleri (Çözgen sistemi; Hex: EtOAc:MeOH (10:10:4)).....	34
6.8. Fr 38-40'dan alınan Fr 39-47'nin İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH:H ₂ O (61:32:7)).....	35
6.9. Elde edilen şeker fraksiyonlarının yoğunlaştırılmış hali	36
6.10. Fr 1-5'in İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (61:32:7)).....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.11. Fr 1-5'ten alınan fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; EtOAc: MeOH:H ₂ O (75:20:15)).....	37
6.12. Fr 1-5'ten alınan fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; EtOAc: MeOH:H ₂ O (75:20:15)).....	37
6.13. Fr 1-5 [80-94]'ten alınan fraksiyonların İTK profili (Çözgen sistemi; EtOAc: MeOH:H ₂ O (75:20:15)).....	38
6.14. Fr 64-64'ten alınan Fr 307-315 f İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (70:30:3)).....	39
6.15. İzolasyon şeması.....	40
6.16. A2 minör molekülün kimyasal yapısı.....	41
6.17. A2 majör molekülün kimyasal yapısı	42
6.18. A2 minör molekülünün ¹ H-NMR datası	43
6.19. A2 majör molekülünün ¹ H-NMR datası	44
6.20. A2 molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	45
6.21. A3 molekülünün kimyasal yapısı	46
6.22. A3 molekülünün ¹ H-NMR datası	47
6.23. A3 molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	48
6.24. A5 molekülünün kimyasal yapısı	49
6.25. A5 molekülünün ¹ H-NMR datası	50
6.26. A7 molekülünün kimyasal yapısı	51
6.27. A7 molekülünün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR dataları	52
6.28. A7 molekülünün ¹ H-NMR spektrumu	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.29. A7 molekülünün ¹³ C-NMR spektrumu.....	54
6.30. A7 molekülünün LC-MS spektrumu	55
6.31. A8 molekülünün kimyasal yapısı	56
6.32. A8 molekülünün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR dataları	57
6.33. A8 molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	58
6.34. A8 molekülünün ¹³ C-NMR spektrumu.....	59
6.35. A8 molekülünün LC-MS spektrumu	60
6.36. B3 molekülünün kimyasal yapısı	61
6-37. B3 molekülünün ¹ H-NMR datası	62
6.38. B3 molekülünün ¹ H-NMR spektrumu.....	63
6.39. HCC1937 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri: A; DMSO, B;25 µM siklopamin, C; 25 µM B3, D; 25 µM B2	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Anormal Hh sinyal yolağının kanserde mekanizması	19
2.2. Hh yolağını hedefleyen inhibitörler	22
4.3 Makina ve Teçhizat Listesi	25
6.4 Makina ve Teçhizat Listesi	65

SİMGELER ve KISATLMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
Hh	Hedgehog
PTCH1	Patched-1
SMO	Smoothened
KIF 17	Kinesin aile üyesi 17
SUFU	Suppressor of fused
GLI	Glioma ilişkili
GDC-0449	Vismodegib
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsülfoksit
HCl	Hidroklorik asit
CHCl ₃	Kloroform
H ₂ O	Su
Hex	Hekzan
EtOAc	Etil asetat
NMR	Nükleer mantetik rezonans
MS	Kütle spektroskopisi
LNCaP	Androjen duyarlı insan prostat adenokarsinoma hücresi
MRC-5	İnsan sağlıklı akciğer fibroblast hücresi
U2-OS	İnsan osteosarkoma hücresi
HCC1937	İnsan duktal meme karsinoma
293HEK	İnsan sağlıklı embriyonik böbrek hücresi

1. GİRİŞ

Medikal açıdan; *Veratrum* ve *Fritillaria*, Liliacea familyasının en önemli türleridir. Akçöpleme olarak bilinen *Veratrum* türleri, Amerika yerlileri ve endüstri devri öncesi Avrupalılar tarafından tıbbi olarak farenjit öksürüğü, bademcik iltihabı, yara, yılan sokması, mani ve epilepsi ile venüs hastalığını tedavi etmek amacı ile kullanılmıştır. Emetik yan etkileri kullanımlarını kısıtlayana kadar, *Veratrum* alkaloidleri yüksek kan basıncını düşürmek için 19. yüzyılın sonlarına kadar yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Çince adı “*Li-lu*” olan birçok *Veratrum* türünün rizom ve kökleri, inmeden kaynaklanan afazi, dizanteri, sarılık, skabiyez ve süreğen sıtmanın tedavisinde Çin tıbbında yüzlerce yıl kullanılmıştır. Dünya genelinde Liliacea ailesinin 3500 türden fazla türü barındırmasına rağmen; zengin etnik kullanımlarından ötürü *Veratrum* türleri birçok fitokimyasal ve farmakolojik çalışmanın ana hedefi olmaya devam etmektedir ve yeni steroidal alkaloidlerin büyük çoğunluğu bu bitkilerden izole edilmektedir (Li, Jiang et al. 2006).

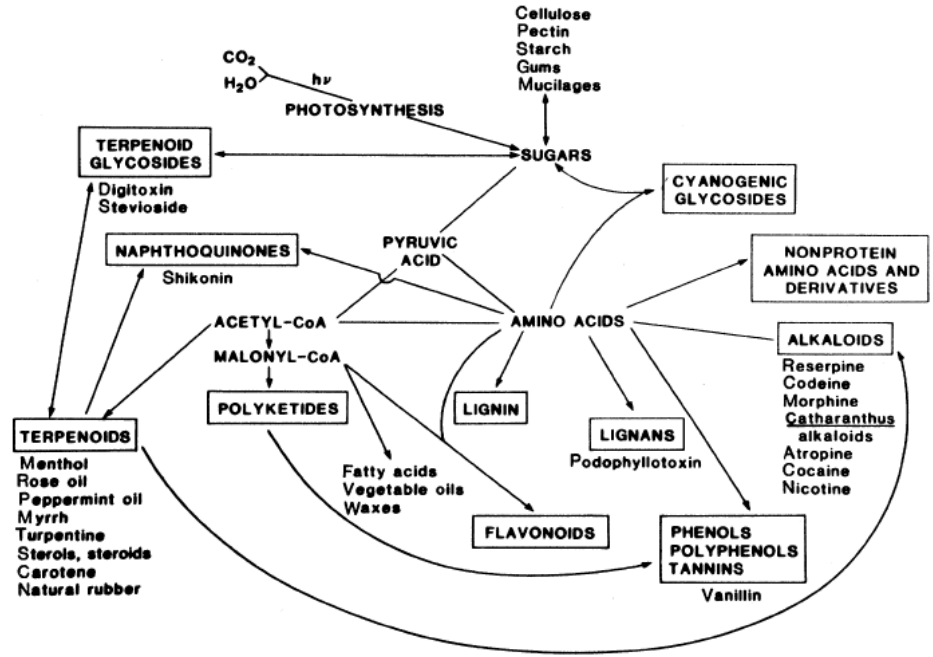
Bu projenin amacı; Karadeniz Bölgesi'nde akçöpleme olarak bilinen *Veratrum album* bitkisini sekonder metabolit prolifi yönünden incelemek, fitokimyasal çalışmalar gerçekleştirerek alkaloid grubu ve diğer sekonder metabolitleri saflaştırmak/karakterizasyonlarını yapmak ve izole edilen metabolitlerin sitotoksikite testlerini gerçekleştirmektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Sekonder Metabolitler ve İlaç Keşfindeki Yerleri

Modern kimya ve biyolojinin 200 yılı, hücre bölünmesi ve büyümesi, respirasyonu, depolaması gibi temel yaşam fonksiyonlarında yer alan primer metabolitleri tanımlamıştır. Biyolojideki sekonder metabolit kavramı, Kossel'e atfedilmiştir. Primer metabolitlere karşı bu metabolitleri tanımlayan ilk kişi olarak tarihe geçmiştir. 30 yıl sonra, Czapek bu metabolitlerin deaminasyon gibi sekonder modifikasyonlar olarak adlandırdığı nitrojen metabolizmasından kaynaklanabileceğini vurgulamıştır (Bourgaud et al., 2001).

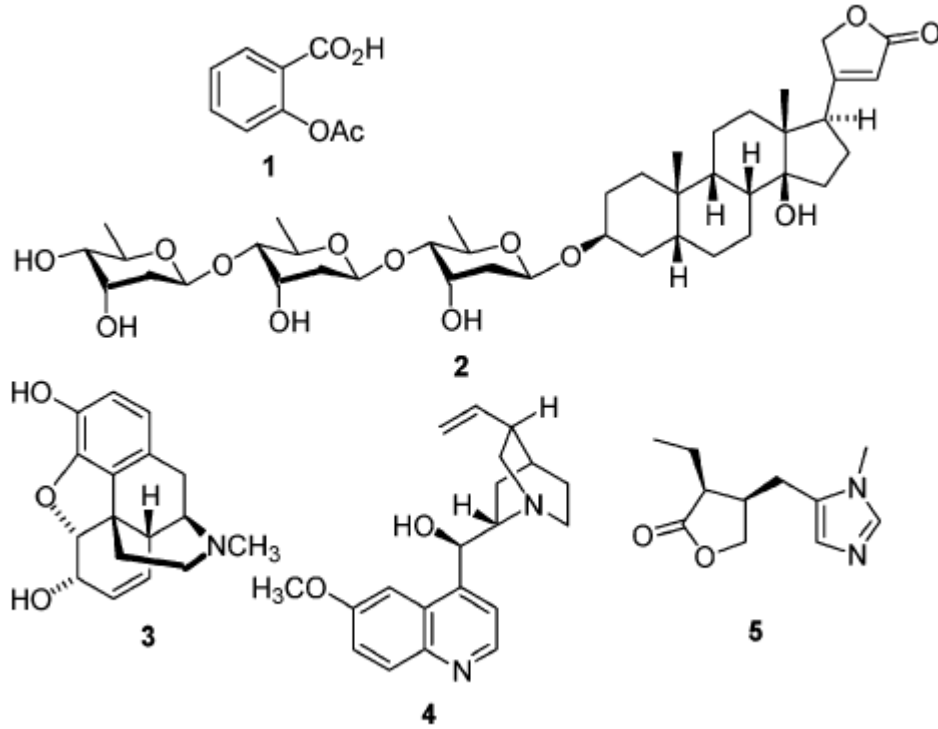
İlaç geliştirmede medikal öneme sahip yeni ürünlerin keşfi için, bitkiler büyük bir kaynağı oluşturmaktadır. Bitkilerden elden edilen ve önemli ilaçlar olan kimyasallar, günümüzde bir ya da daha fazla ülkede kullanılmaktadır. İlaç, tatlandırıcı, esans, boya ve pigment gibi kullanılan sekonder metabolitler ekonomik olarak önem arz etmektedir. Günümüzde satılan ilaçlar, ya doğal olarak elde edilen maddenin bir kopyası ya da basit sentetik modifikasyonudur. (Hussain et al., 2012).



Şekil 2-1. Ticari olarak öneme sahip bitkisel kökenli komponentlerin biyosentetik orjinleri (Balandrin et al., 1985).

Binlerce yıldır, doğal ürünler geleneksel ilaçların ve doğal zehirlerin kullanımı ile doğrudan ilişkilidir (Mark, 2004).

Birçok ilaç ya doğal ürün ya da onun bir türevi olarak üretildiği için; doğal ürünler ilaç araştırmalarında anahtar bir rol oynamaktadır. Günümüzde kullanımda olan ilaçların %40'ını, doğal ürünler ve onların yarı-sentetik ürünleri oluşturmaktadır. (Jacop, 2009).



Şekil 2-2. Aspirin (1), Digitoksin (2), Morfin (3), Kinin (4), ve Pilokarpin (5) ilaçlarının molekül yapıları (Mark, 2004).

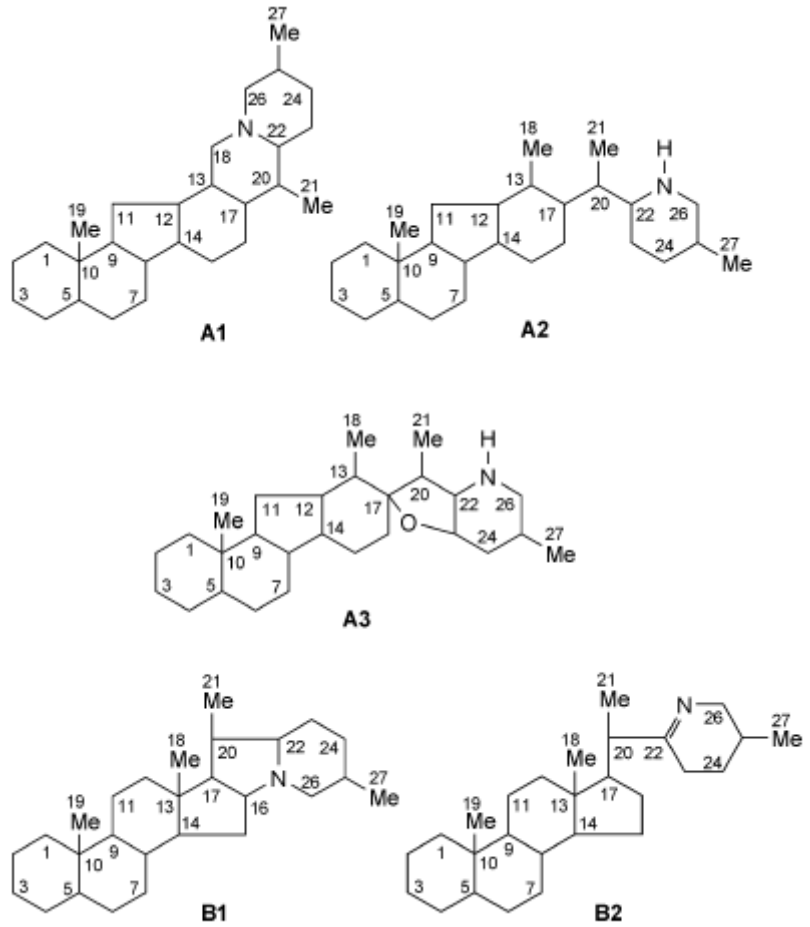
Baskın bir şekilde bitkilerden elde edilen geleneksel ilaçların klinik, farmakolojik ve kimyasal çalışmaları; aspirin, digitoksin, morfin, kinin ve pilokarpin gibi ilk ilaçların temelini oluşturmuştur (Mouhssen, 2013).

Diğer ilaç keşfi metotlarına rağmen, doğal ürünler; yeni aday ilaçların ve tedavide kullanılan ilaçların büyük çoğunluğunu oluşturmakta ve özellikle anti-kanser, anti-hipertansif, anti-enfektif, immün baskılayıcı ve nörolojik hastalıkların tedavi alanlarında ya daha ileri klinik çalışmalara alınmakta ya da piyasaya girmektedirler (Butler, 2004).

2.1 Steoridal Alkaloitlerin Temel Yapısı

5 ya da 6 karbosiklik ya da heterosiklik halka ile birlikte 27 karbonlu yapıya sahip Liliacea steroidal alkaloitleri, içermiş oldukları karbon iskeletine göre izosteroidal ve steroidal alkaloitler olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. C-nor-D-homo-[14(13→12)-abeo] halka sistemi ile

karakterize edilen *Veratrum* steroidal alkaloitleri E ve F halkaları arasındaki bağlantı modeline göre kevanin (A1), veratrimin (A2) ve jervin (A3) tip alkaloitler olarak sınıflandırılır. Çoğunlukla 6 üyeli C halkası ve 5 üyeli D halkası içeren steroidal alkaloitler ise solanidin (B1) (nitrojen; indolizidin halkası ile bağlantılı ise) ve verazin (B2) (nitrojen; piperidin halkası ile bağlantılı ise) tip alkaloitler olarak sınıflandırılır (Li, Jiang et al. 2006).



Şekil 2-3. İzosteroidal ve steroidal alkaloitlerin temel iskelet yapıları (Li, Jiang et al. 2006)

2.1.1 Kavenin tip alkaloitler

Hekzasiklik benzo[7,8]fluoreno[2,1-b]kinolizin çekirdeği ile karakterize olan kavenin tip alkaloitler en büyük grubu oluşturmaktadır. Aşağıda belirtilen moleküller kavenin tip alkaloitler grubunda yer alan steroidal alkaloitlerden bazılarıdır:

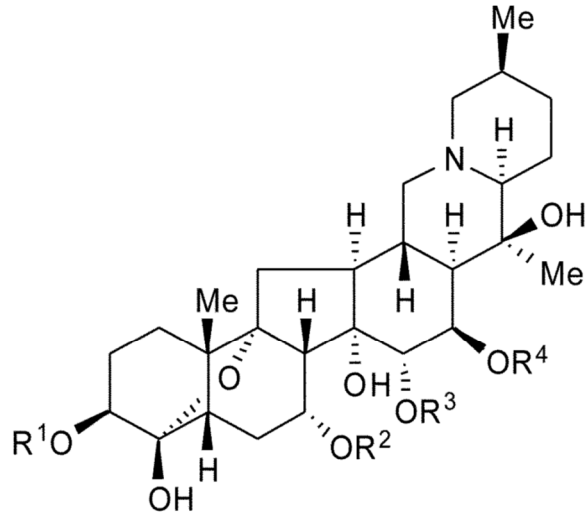
Germinalin (1) ve germitetrin (2) molekülleri, *V. lobelianum*'dan izole edilmiştir ve yapıları kimyasal dönüşüm, kütle ve NMR spektroskopisi ile belirlenmiştir (Samikov, et al., 1971).

V. stenophyllum'un toprak üstü bölgelerinden izole edilen stenofilin A (3)'nin yapısı, kimyasal dönüşüm ve spektroskopik dataların ışığında 3,15-diangeloylgermine olarak önerilmiştir (Liang, et al.,1984).

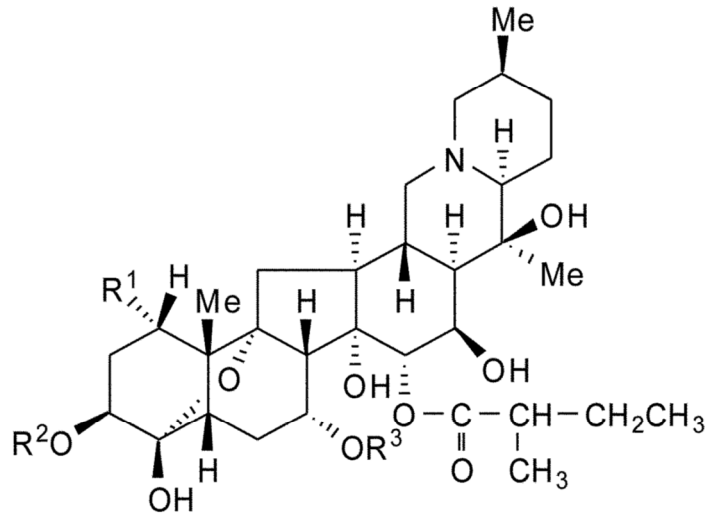
V. maackii'nin rizom ve köklerinden iyi bir verim ile elde edilen maackinin (4) steroidal alkaloidinin yapısı 1D ve 2D NMR teknikleri ile belirlenmiştir (Zhao, 1986).

V. nigrum var. *ussuriense*'nin toprak altı kısmından iki adet minör steroidal alkaloit olan verussurin (6) ve verabenzamin (7) izole edilmiştir (Rahman et al., 1992).

Türkiye'de toplanmış olan *V. album* rizomlarının ekstraksiyonu ile yeni bir molekül olarak neojerminalaninin molekül yapısı spektroskopik araştırmaların temeline göre elde edilmiştir (Rahman et al., 1996).



- 1 $R^1 = \text{COC(OH)(Me)CH(OAc)Me}$; $R^2 = R^4 = \text{H}$; $R^3 = \text{2-Methylbutyroyl}$
- 2 $R^1 = \text{COC(OH)(Me)CH(OAc)Me}$; $R^2 = \text{Ac}$; $R^3 = \text{2-Methylbutyroyl}$; $R^4 = \text{H}$
- 3 $R^1 = R^3 = \text{Angeloyl}$; $R^2 = R^4 = \text{H}$
- 4 $R^1 = R^3 = \text{Angeloyl}$; $R^2 = \text{Ac}$; $R^4 = \text{H}$
- 5 $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$; $R^4 = \text{2-Methylbutyroyl}$
- 9 $R^1 = R^2 = R^4 = \text{H}$; $R^3 = \text{Angeloyl}$



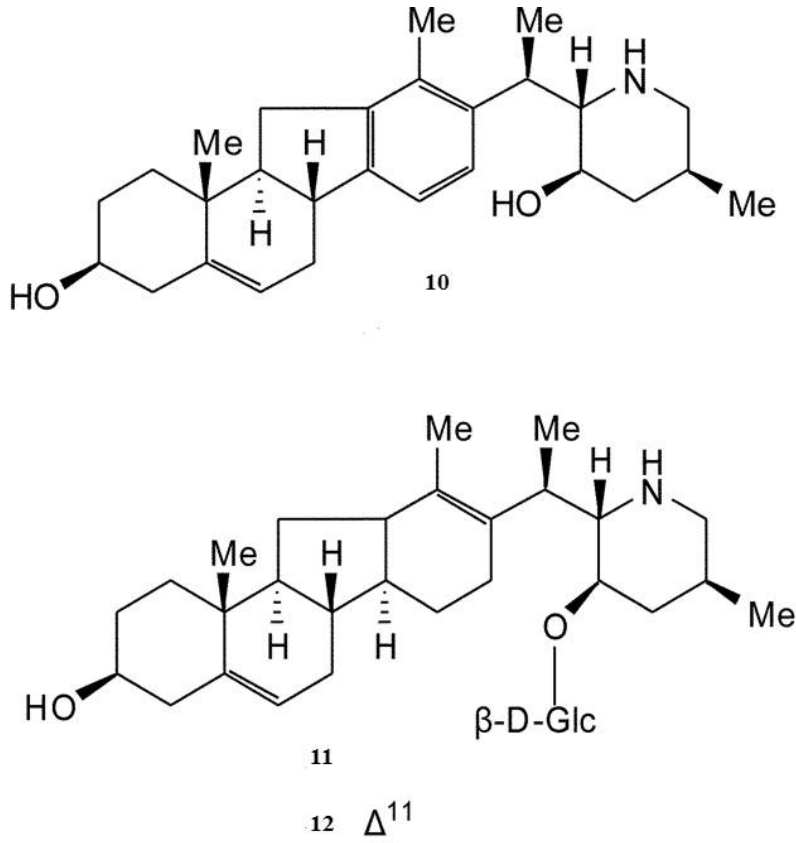
- 6 $R^1 = \text{H}$; $R^2 = -\text{OC}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})_2$; $R^3 = \text{Ac}$
- 7 $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{2-Hydroxy-2-methylbutyroyl}$; $R^3 = \text{H}$
- 8 $R^1 = \text{OAc}$; $R^2 = R^3 = \text{H}$

Şekil 2-4. Kavenin tip alkaloitlerin molekül yapıları (Li, et al., 2006).

2.1.2 Veratrimin tip alkaloidler

Veratrimin tip alkaloidler; E halkasının yokluğu ve çoğu analogun aromatik olmayan D halkası içermesine rağmen; aromatik D halkasının varlığı ile karakterizedir. Aşağıda belirtilen moleküller veratrimin tip alkaloidler grubunda yer alan steroidal alkaloidlerden bazılarıdır:

V. patulum rizomlarından izole edilen yeni steroidal bir bileşik olan 20-isoveratramine (10) ve iki yeni glikoalkaloit olan 23-O- β -D-glucopyranosyl-20-isoveratramine (11) ve (22S,23R,25S)-23-O- β -D-glucopyranosyl-5,11,13-veratratrione-3 β ,23-diol (12) moleküllerinin yapıları spektroskopik metotlar ile karakterize edilmiştir (Irsch et al., 1993).

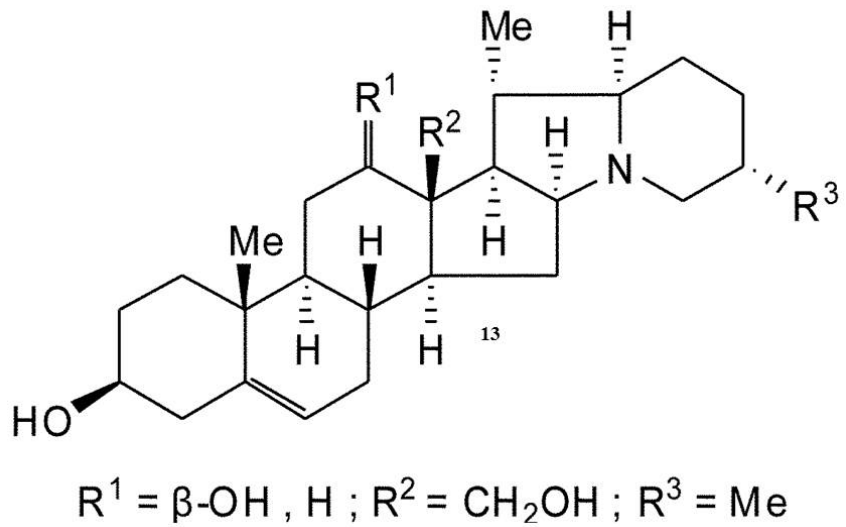


Şekil 2-5. Veratrimin tip alkaloidlerin molekül yapıları (Li et al., 2006).

2.1.3 Solanidin tip alkaloitler

Solanidin tip alkaloitler, indolizidin halkaya amino gruplarının dahil olması ile oluşan hekzasiklik karbon iskeletinden türemiştir. Aşağıda belirtilen molekül solanidin tip alkaloitler grubunda yer alan steroidal alkaloitlerden bazılarıdır:

V. viride rizom ve köklerinde yapılan fitokimyasal bir çalışmada, 12 β -hydroxyisorubijervine (13) molekülünün izolasyonu gerçekleştirilmiştir (El Sayed et al., 1995).



Şekil 2-6. Solanidin tip alkaloitlerden 12 β -hydroxyisorubijervine molekül yapısı (Li et al., 2006).

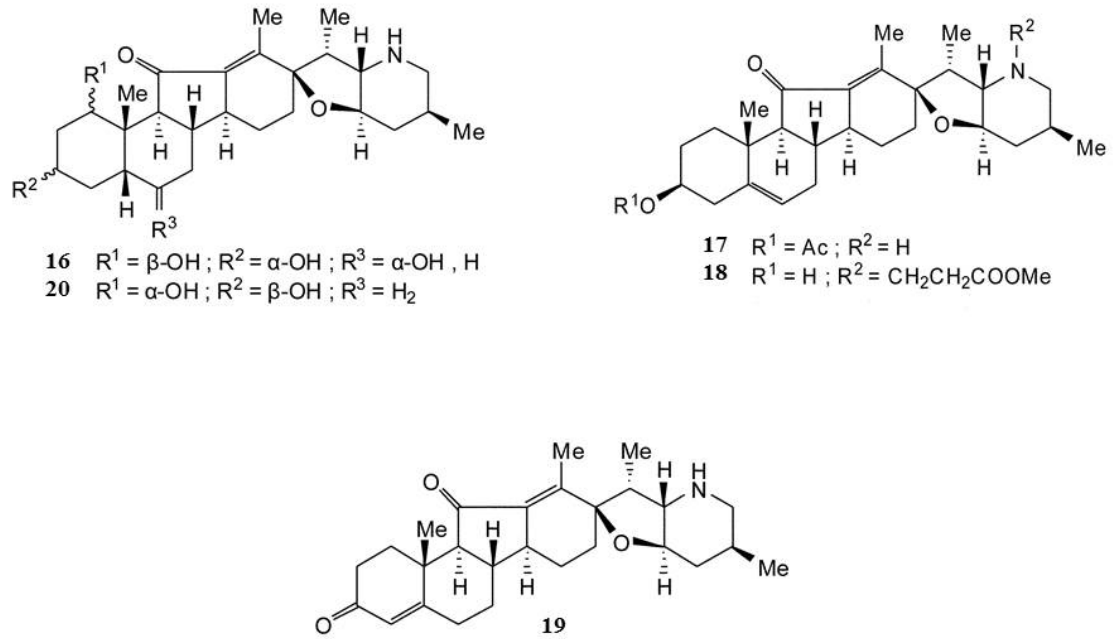
2.1.4 Verazin tip alkaloitler

22-23-26-epiminokolesten heterosiklik iskeletinden kaynaklanan alkaloit tipidir. Aşağıda belirtilen molekül verazin tip alkaloitler grubunda yer alan steroidal alkaloitlerden bazılarıdır:

V. stenophyllum'un toprak altı kısımlarından, stenofilin B (14) olarak adlandırılan yeni bir alkaloit izole edilmiştir. Bu molekülün yapısı, onun fitokimyasal özellikleri ve yapısı bilinen teinemin ve izoteinemin moleküllerinin kimyasal kayma değerlerinin kıyas edilmesi ile 3 β ,20 β -

Türkiye orjinli *V. album* bitkisinin yapraklarından; *O*-asetiljervin (17) ve metiljervin-N-3'-propanoat (18) iki yeni steroidal alkaloit olarak izole edilmiştir. Yapıları ve kısmi stereokimyaları, spektroskopik tekniklerin temeline göre belirlenmiştir (Rahman et al., 1991).

Aynı araştırma grubunun *V. album* bitkisi üzerinde yaptığı çalışmalar sayesinde, 2 tane daha yeni steroidal alkaloit literatüre kazandırılmıştır: jervionin (19) ve 1-hidroksi-5,6-dihidrojervine (20) (Rahman et al., 1992).



Şekil 2-8. Jervin tip alkaloitlerin molekül yapıları (Li et al., 2006).

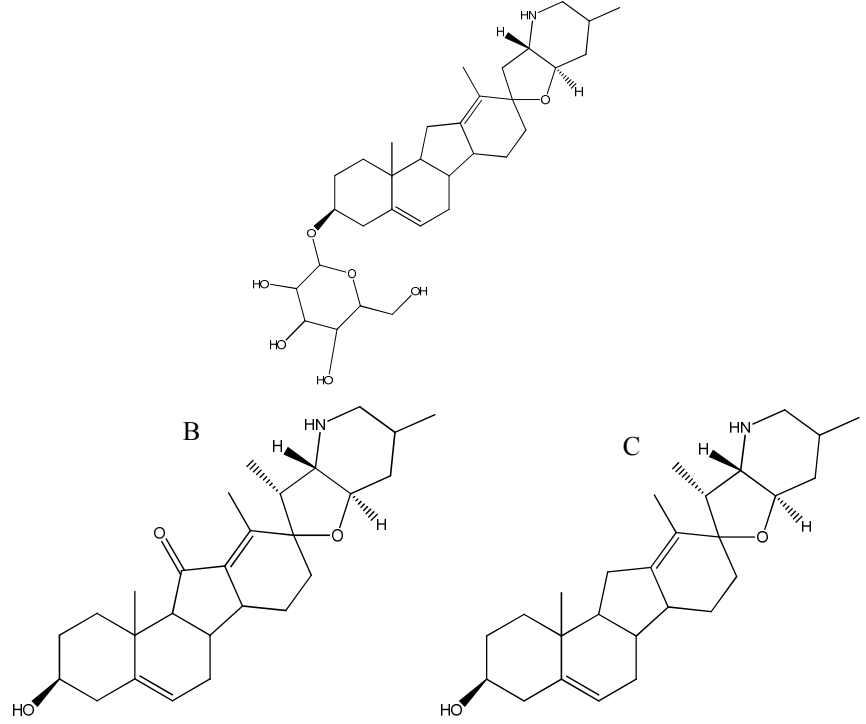
2.2 *Veratrum* türü alkaloitlerinin keşfi

20. yüzyılın ortalarında, ABD'nin Idaho eyaletinde, yeni doğan koyunların %25'inde siklopi gözlenmesi ile birlikte, bu durum endemik boyutlara ulaştığında ve ekonomik kayıplar daha fazla tolere edilemediğinde, koyunlar için ABD Tarım Bölümü'ne sorun ulaştırılmış ve yardım talep edilmiştir. Bölgeye gönderilmiş araştırmacılardan biri olan Lynn F. James, sorunu çözebilmek için 1950'li yılların sonlarına doğru koyunlarla birlikte 3 yaz dönemini geçirmiştir. Araştırmacı, kuraklık nedeni ile koyunların beslenebilmek için daha yüksek kesimlere çıktığı ve bu

bölgelerde yetişen *Veratrum californicum* ile beslendiklerini ortaya koymuştur. Zehirli Bitkiler Araştırma Laboratuvarı'ndan Richard F. Keeler'da gebe koyunların *Veratrum californicum* tüketimi ile yavrularındaki siklopi oluşumu arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmayı başarmıştır. Başlangıç çalışmaları, gebe koyunların embriyolarında siklopiye sebep olan *Veratrum californicum* alkaloitlerinin izolasyonunu hedeflemiştir. Embriyolarda siklopiye sebep olan moleküllerin; jervin, alkaloit X (glukozilsiklopamin, terminolojik adı sikloposin) ve siklopamin olduğu belirlenmiştir. Siklopaminin ABD'nin Idaho eyaletinde trajik keşfinden sonra, araştırmalar *Veratrum* kökenli steroidal alkaloitlerin biyoaktivitelerine yönelmiştir (Heretsch, Tzagkaroulaki et al. 2010).



Şekil 2-9. *Veratrum album* bitkisi



Şekil 2-10. Siklopiye sebep olan 3 alkaloitin molekül yapıları. A; sikloposin, B; jervin, C; siklopamin

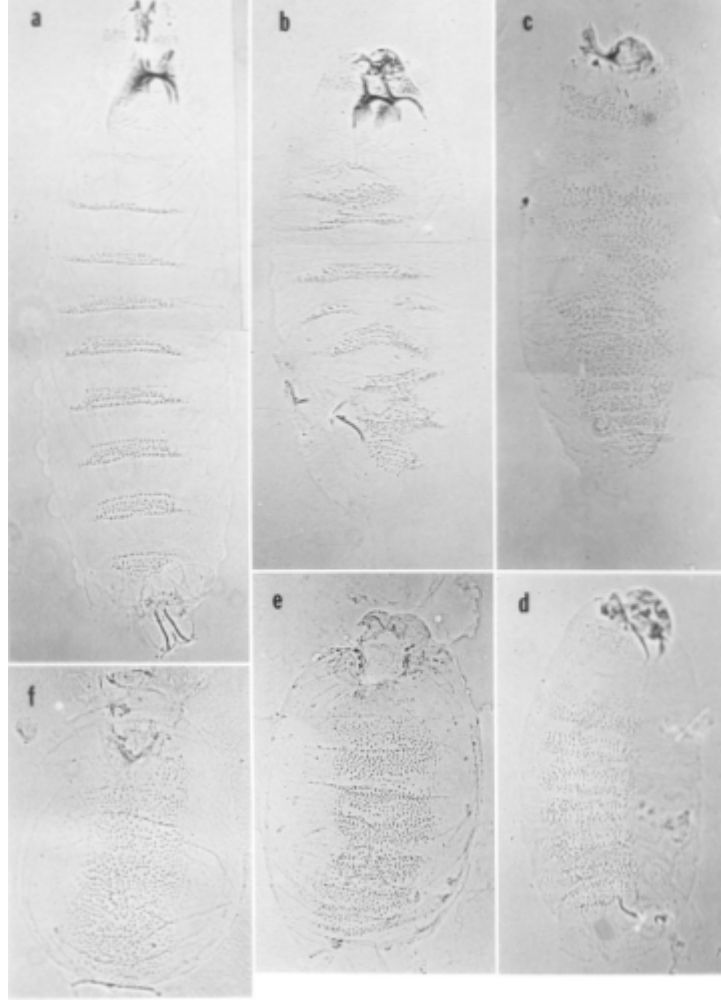
2.3 Sinyal iletimi ve Hedgehog yolağı

Onkoloji araştırmalarının en aktif alanlarından biri, malignitede düzgün işlemeyen hücrel sinyal yolaklarıdır. Hedef yolaklara müdahale eden yeni moleküllerin keşfine yoğun ilgi oluşmuştur. Bu yoğun çaba, tümörjenez ve metastatik sürece katkısı olan çoklu anahtar yolakların aydınlatılmasına yol açmıştır ve belirgin tümörlerde terapötik ilerlemenin gereklerini yerine getirmiştir. Kayda değer örnekler, HER-2 ile güçlendirilmiş meme kanserinde trastuzumab ile birlikte insan epidermal büyüme faktörü 2'yi (HER2), küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde erlotinip ile birlikte mutant epidermal büyüme faktör reseptörünü (EGFR) hedeflemeyi içermektedir. Birçoğu prelinik çalışmaların erken safhalarında olmasına rağmen, çeşitli yeni ve umut vaat eden ilaçlar aktif klinik çalışmalarda yer almaktadır (Marasani, Anil et al. 2010).

2.3.1 Hedgehog yolağının keşfi

1970’lerde, gelişim biyolojisindeki esas problem küçük bir yumurtanın karmaşık segmentli bir vücudu nasıl meydana getirdiği idi. 1970’lerin sonlarına doğru, Christiane Nüsslein-Volhard ve Eric Wieschaus, *Drosophila melanogaster*’ın segmentli ön ve arka vücut eksenlerinin gelişimini kontrol eden genlerdeki mutasyonları belirlemeyi başardılar ve doygunluk mutajenez tekniği ile vücut segmentasyonu gelişiminde yer alan gen gruplarının keşfini yaptılar (Nussleinvolhard and Wieschaus 1980). Bu araştırmacılar 1995 yılında, Edward Lewis ile yaptıkları *Drosophila* embriyogenezindeki genetik mutasyon çalışmaları için Nobel ödülünü kazanmışlardır (Lewis, 1998).

1992 yılında *Drosophila* Hedgehog (Hh) geni, Jym Mohler, Philip Beachy ve Thomas B. Kornberg’in laboratuvarı tarafından bağımsız olarak klonlanmıştır. Doğal suş embriyolarına kıyasla; bazı Hh mutantlarında anormal şekilli embriyolar gözlenmiştir (Şekil 3). Dikenli çıkıntılara sahip kısa larvaların varlığı; Hedgehog (kirpi) yolağının isminin nereden geldiğini açıklamaktadır (Mohler, 1988).



Şekil 2-11. Larval kutiküler fenotipleri. A, Normal suş. B-F, Hedgehog mutantlı larvalar (Mohler, 1988).

2.3.2 Normal hedgehog yolağı

Erken embriyogenez için gerekli olan Hedgehog (Hh) yolağı; gelişim sinyal yolağıdır. Hh sinyal iletiminin çeşitli molekülleri ve Hh geninin ilk olarak *Drosophila*'da keşfedilmesine rağmen; bu yolak insanlar dahil olmak üzere yüksek organizmalarda da korunmuş haldedir (Ingham and McMahon 2001).

Çoğu erişkin dokuda bu yolak aktif olmamasına rağmen; sinir sistemi ve diğer dokularda sınırlayıcı büyüme, erişkinlerde kök hücrelerin devamlılığı, hücrenin sağ kalımı, proliferasyonu için esastır (Mahindroo, Punchihewa et al. 2009).

Hh yolağının anormal aktivasyonu birçok malignitede belgelenmiştir ve bu durum Hh yolağını ilaç keşfi için potansiyel bir hedef yapmaktadır (Ingham and McMahon 2001).

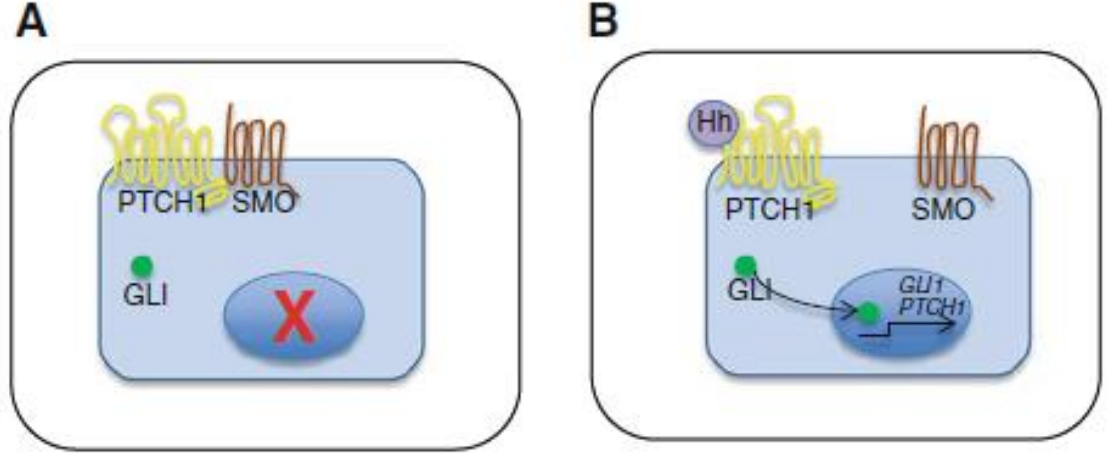
2.3.2.1 Memelilerde hedgehog yolağının anahtar molekülleri

Hedgehog sinyali; vertebralarda bulunan *Sonic*, *Indian* ve *Desert* hedgehog olarak isimlendirilen 3 adet çözünebilir ligandın birinin bağlanması ile aktive olmaktadır.

Hedgehog ligandları, gelişimin çeşitli safhalarında farklı dokulardan salgılanmaktadır ve bu ligandlar; transmembran bir protein olan Hedgehog reseptörü Patched-1'e (PTCH1) bağlanarak ve inhibe ederek alıcı hücredeki sinyal iletimini başlatabilmektedir (McMillan and Matsui, 2012).

Hedgehog ligandlarının yokluğunda, G-protein bağlantılı reseptör (GPCR) benzeri protein Smoothened (SMO); PTCH1 tarafından baskılanmaktadır. Hedgehog ligandları yok iken; PTCH1 silyum olarak adlandırılan hücre membranının kuyruk benzeri çıkıntısının alt kısımlarında yer almaktadır. Ligandın bağlanması; PTCH1'ın SMO üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırmaktadır (Şekil 4) (Ruch and Kim, 2013).

Özetle, ligandın bağlanması; fosforilasyon ve selektif proteoliz ile glioma ilişkili (GLI) transkripsiyonel regülatörleri modifiye eden SUFU gibi sitoplazmik komplekslerin SMO tarafından modüle edilmesine izin vermektedir.



Şekil 2-12. Hedgehog sinyal iletim mekanizması. A, Hh ligandın yokluğunda. B, Hh ligandın varlığında (Ruch and Kim 2013).

2.3.3 Hedgehog yolağı ve kanser

Kanserde Hedgehog yolağı için ligand bağımsız, ligand bağımlı otokrin ve ligand bağımlı parakrin olmak üzere 3 temel model önerilmektedir.

Tip 1 Hedgehog sinyali: ligand bağımsız, mutasyon kaynaklı

Malignitede Hh sinyalinin önemi, ilk olarak malign gliomalarda Hh hedef GLI1 geninin aşırı ifadesinin belirlenmesi ile önerilmiştir. Hh sinyal yolağının güncel bulguları, Gorlin sendromu olarak da bilinen bazal hücreli nevüs sendromlu hastalardaki çalışmalardan edinilmektedir. Ayrıca Gorlin sendromlu hastalar için bazal hücre karsinomu, medulablastoma ve rabdomiyosarkomun dahil olduğu spesifik maligniteler için artan risk söz konusudur. Bu sendrom, PTCH1’de aktif olmayan mutasyonlar ile karakterizedir ve bu durum SMO’nun yapısal aktivasyonuna ile sonuçlanmaktadır (Johnson, Rothman et al. 1996).

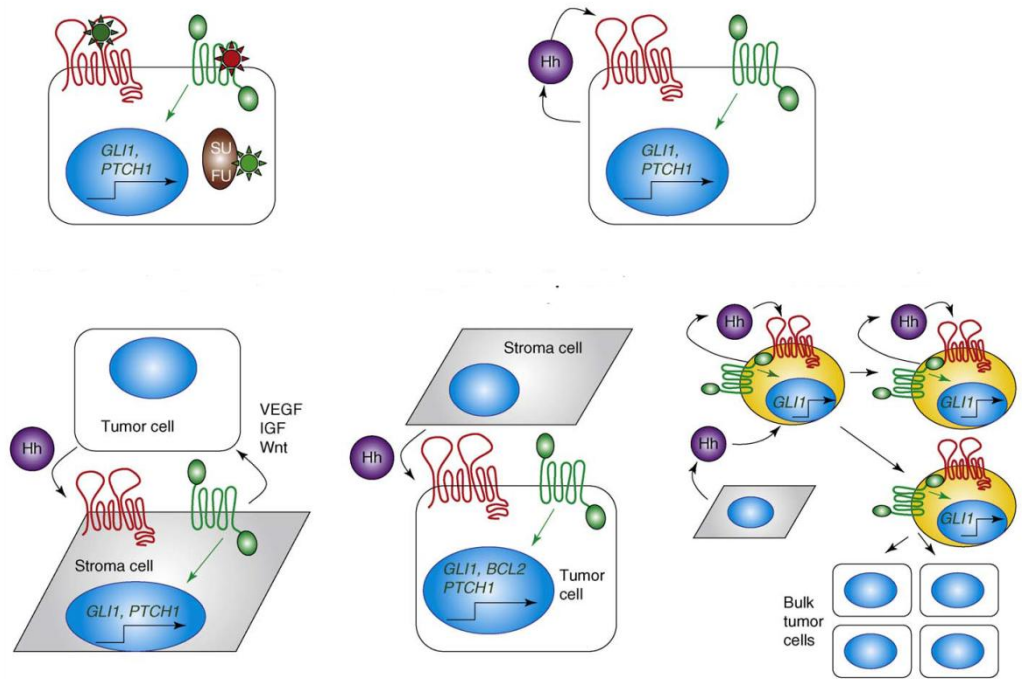
PTCH1 ve SUFU mutasyonlarının varlığı rabdomiyosarkomada ve bazal hücre karsinomasında da belirlenmiştir. Bu mutasyonların varlığı, Hh

sinyal yolağının tümör patogenezeine katkıda bulunduğunu net bir şekilde göstermektedir. (Ruch and Kim 2013).

Tip 2-3 Hedgehog sinyali: ligand bağımlı, otokrin ve parakrin

Ligand bağımlı mekanizmada anormal Hh sinyali, bazal hücre karsinomu, medulablastoma ve rabdomiyosarkoma dışında neoplazmada gerçekleşiyor gibi görünmektedir. Artan Hh ligand ifadesi, aktifleşen hedef hücrede Hh sinyalinin artışına neden olmaktadır. Teorik olarak bu durum; Hh ligandını salgılayan ve bu liganda tepki veren malign hücrenin aynı olması ya da farklı olması ile gerçekleşebilir. Hh ligandını salgılayan ve liganda cevap oluşturan malign hücre aynı ise mekanizma, otokrin mekanizma olarak isimlendirilirken; salgılayan ve alıcı hedef hücre birbirinden farklı ise mekanizma parakrin mekanizma olarak isimlendirilmektedir (Ruch and Kim 2013)

Otokrin mekanizma, gastrointestinal malignitelerin, melanomanın, akciğer ve prostat kanserlerinin dahil olduğu çeşitli tümör tipleri için rapor edilmiştir (Theunissen and de Sauvage 2009).



Şekil 2-13. Kanserde anormal Hh yolağının aktivasyonunda farklı modellerin şematik gösterimi

Çizelge 2.1.Anormal Hh sinyal yolağının kanserde mekanizması

	Mekanizma	Malignite örnekleri
Ligand bağımsız	SMO mutasyonları	BHK
	PTCH1 mutasyonları	BHK, medulablastoma, rabdomiyosarkoma
	SUFU mutasyonları	Medulablastoma, rabdomiyosarkoma
	Kök hücre regülasyonu	Meme, KML, MM
	Gli protein düzensizliği	Ewing sarkomu, pankreatik
Ligand bağımlı	Otokrin	Kolorektal, özofagal, gastrik, glioblastoma, melanoma, KHDAK, KHAK, prostat
	Parakrin	Kolorektal, KLL, lenfoma, MM, pankreatik

BHC; bazal hücre karsinomu, *KML*; kronik miyeloid lenfosit, *MM*; multiple miyeloma, , *KHDAK*; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, *KHAK*; küçük hücreli akciğer kanseri, *KLL*; kronik lenfositik lösemi

2.4 Hh Yolak İnhibitörleri ile Yapılan Belirgin Çalışmalar

Kanser için alternatif tedaviler günümüze kadar geliştirilmiştir. Kemoterapi, radyasyon, cerrahi operasyon ve immünoterapi kanser için güncel tedavi opsiyonlarıdır. Sentetik moleküllerin kullanıldığı kemoterapi kanser tedavisinde etkili olmasına rağmen; kanserli olmayan dokular üzerinde toksisitelerinden ötürü yan etkiler oluşturmaktadır. Hh yolağının stimülasyonu, karsinogenezi indükler ya da çeşitli organlardaki kanserlerin hücrel sağ kalımını sağlar. Anormal Hh aktivasyonu birlikte epitelyal kanserlerde, Hh spesifik küçük molekül inhibitörü siklopamin; yolağı bozarak şiddetli bir şekilde tümör büyümesini inhibe etmektedir. (Che, Zhang et al. 2013).

Bazal hücre karsinomu ve Hh sinyal yolağının anormal aktivasyonu arasındaki bağlantı, insan ve fare modellerinde saptanmıştır. Bazal hücre karsinomaları için oluşturulan *in vitro* modellerde, yeni ve küçük molekül olan Hh inhibitörü CUR61414, Hh yolağını bloklamış ve proliferasyonu inhibe etmiştir. Bu çalışma, Hh inhibitörü kullanmanın, bazal hücre karsinoma tedavisi için geçerli bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermiştir. (Williams, Guicherit et al. 2003)

Hh yolak inhibitörü olan GDC-0449, bazal hücre karsinoma (33), pankreas kanseri (8), medullablastoma (1) ve diğer kanser hastalarında (17) çalışılmıştır. GDC-0449; Hh yolağı inhibitörlerinin ilki olup, faz I çalışmasına girmiştir. Bu inhibitör, Hh yolağı mutasyonları ile ilişkili kanserlerde, medullablastoma ve bazal hücre karsinoma hastalarında klinik yararlanım göstermiştir. Bazal hücre karsinomlu 33 hastadaki tepki oranı %58 ve tepki süresi 12,8 aydır. Metastik medullablastomalı bir hastada kısa süreli kısmi yanıt gözlenmiştir. Genel olarak GDC-0449, iyi tolere edilmiştir. Bu sonuçlar, Hh yolak mutasyonları ile gelişen tümörlerde tedaviye yönelik strateji olarak Hh yolak inhibitörlerinin kavram kanıtını göstermiştir (LoRusso, Rudin et al. 2011).

Hedgehog'un aşırı ekspresyonunu içeren akciğer, pankreas, üst gastrointestinal kanal, kolorektal, prostat, meme ve melanoma tümörleri gibi çeşitli ligand bağımlı kanserler geçmiş yıllarda belirlenmiştir. Otokrin sisteme göre, bu tümörlerin Hh ligandlarının kendileri tarafından salgılandığı ve bu ligandlar ile kendi proliferasyon, sağ kalımlarını tetikledikleri öngörülmektedir. Bu durum, tümör gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Berman, Karhadkar et al. 2003).

Tümör hücrelerinin Hh ligandlarına yanıt veremediğine dair ilk öneri, Bushman ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Hh ile transfekte edilmiş insan LNCaP hücrelerinin (prostat kanseri) *in vitro* koşullarda aynı hızda, fakat *in vivo* koşullarda daha hızlı büyüdüğünü saptamışlardır. Hedgehog ligandına verilen yanıtta, fare stromasının ksenogreftin büyüme hızını etkilediği yargısına varmışlardır (Fan, Pepicelli et al. 2004).

PTCH1 ve SMO aracılığı ile gerçekleşen kanonikal Hh sinyali için gerekli primer siliyumun tümör hücrelerindeki eksikliği; Hh sinyal mekanizmasının ligand bağımlı parakrin mekanizma ile gerçekleşmesine neden olmaktadır. Stromal bölmede artan Hh sinyallerinin, tümör büyümesi ve sağ kalımı için uygun olan koşulları sağladığı düşünülmektedir. (Theunissen and de Sauvage 2009).

Çizelge 2.2. Hh yolagını hedefleyen inhibitörler

İnhibitör	Tip	Hedef	Hastalık	Faz çalışması
Siklopamin	KMİ	SMO	BHK	
Jervin	KMİ	SMO	<i>in vitro</i> çalışmalar	-
KAAD-siklopamin	KMİ	SMO	<i>in vitro</i> çalışmalar	-
IPI-926	KMİ	SMO	Pankreas	I
			Miyelofibrozis	II
GDC-0449	KMİ	SMO	İleri solid tümörler	I
			BHC	II
			BHNS	II
			KHAK	II
			MM	I
			Meme	I
			Pankreas	I
BMS-833923	KMİ	SMO	MM	I
			KHAK	I
			KML	I
			İleri solid tümörler	I
LDE225	KMİ	SMO	BHK,	II
			BHNS	II
			KML	II
			Medulablastoma	I/II
			Pankreas	I/II
PF-04449913	KMİ	SMO	İleri solid tümörler	I
			AML	I
LEQ 506	KMİ	SMO	İleri solid tümörler	I
5E1	mAb	Hh	<i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> çalışmalar	-

3. MATERYAL

3.1 Bitkisel Materyalin Toplanması, Kurutulması ve Öğütülmesi

Veratrum album bitkisi (soğan, kök ve gövde) Haziran 2013'te Çambaşı Yaylası-Ordu'dan toplanmış ve gölgede nemsiz bir ortamda kurutulmuştur.



Şekil 3-1. Bitkisel Materyalin Kurutulması

Ekstraksiyon işleminin verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için kurutulmuş bitkisel materyaller öğütülmüştür.

3.2 Ekstraksiyon İşleminin Gerçekleştirilmesi

Öğütülmüş olan bitkisel materyalin ekstraksiyon işlemi ultrasonik banyoda sonikasyon ile yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi metanolle (MeOH) gerçekleştirilmiştir. MeOH, döner evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Bu işlemin devamında, klasik alkaloit ekstraksiyon işlemi (asidik muamele ile amonyum tuzu haline getirilen alkaloitlerin sıvı-sıvı ekstraksiyonla suya çekilmesi ve devamında aynı şekilde bazik ortamda organik çözügene alınması) gerçekleştirilmiştir.

3.3 Ayırma Saflaştırma İşlemleri

Klasik alkaloit ekstraksiyonunun ardından organik çözünenin döner evapöratör ile uzaklaştırılmasının akabinde, elde edilen ekstrenin izolasyonu için esas olarak kolon kromatografi işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince kolon dolgu materyalleri; C-18 (45 µm, Chromabond), Silika jel (70-230 mesh, Merck) kullanılmıştır. Kolon kromatografisi esnasında fraksiyonların takibi için hazır plaka Silika jel (Silika gel 60 F254, 0,2 mm Merck-Millipore) ve hazır plaka RP (Silika gel 60 RP-18 F254, 0,2 mm, Merck-Millipore) kullanılmıştır. Ekstraksiyon ve izolasyon çalışmalarında kullanılan tüm çözünenler Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır.

3.4 Sitotoksite Testi

Veratrum album'dan izolasyonu gerçekleştirilen steroidal alkaloitlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenebilmesi için WST-1 proliferasyon ajanı (ROCHE) kullanılmıştır. Testte kullanılan saf moleküller, uygun çözünenlerde DMSO hazırlandıktan sonra ana stoklar halinde -20 °C'de saklanmıştır.

Denemelerde, 3 adet kanser ve 2 adet sağlıklı hücre hattı kullanılmıştır. Kullanılan hücre çeşitleri; MRC-5 (İnsan sağlıklı akciğer hücresi, ATTC katalog no: CCL-171™), HCC1937 (İnsan duktal meme karsinoma, ATTC katalog no: CRL-2336™), LNCaP (Androjen duyarlı İnsan prostat karsinoma, ATTC katalog no: CRL-1740™), U-2 OS (İnsan osteosarkoma, ATTC katalog no: HTB-96™), 293HEK (İnsan sağlıklı embriyonik böbrek hücresi, ATTC katalog no: CRL-3216™).

4. MAKİNA ve TEÇHİZAT

Proje süresince kullanılan makine ve teçhizat Tablo 4.1’de listelenmiştir.

Çizelge 4.3. Makina ve Teçhizat Listesi

Adı – Modeli	Kullanım Amacı
Hassas terazi; PRECISA XB 220A SCS	Dolgu materyallerinin, elde edilen tüm bileşik ve ekstraların miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo;	Ekstraksiyon ve moleküllerin çözündürme işlemleri için kullanılmıştır.
Evaporatör; Heidolph Instruments Laborota 4001- efficient	Çözenleri uzaklaştırmak için kullanılmıştır.
UV Lambası; CAMAG	Kolon kromatografisinden alınan örneklerin İTK plakalardaki spotlarının belirlenmesi için kullanılmıştır.
Liyofilizatör; LABCANCO freezone ⁶	Fraksiyonların ve saflaştırılan maddelerin liyofilizasyonunda kullanılmıştır.
NMR-VARIAN AS400	Moleküllerin yapı tayinlerinin gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır.
Agilent Jet Stream ESI 6460 LC-MS	Moleküllerin kütle spektrumlarının alınarak molekül ağırlığı ve molekül formüllerinin tespiti amacıyla kullanılmıştır.
Class 2 Laminer kabin; Esco Class 2BSC	Hücre kültürü çalışmaları için steril koşulların sağlanması amacıyla kullanılmıştır.
İnkübatör; Steri-Cycle CO ₂ Thermo Incubator	Sitotoksosite için kurulan deneylerde hücrelerin idamesi için kullanılmıştır.
Vacum konsantratör; Thermo scientific Salvant SPD121P	Fraksiyonların ve saf olarak elde edilen moleküllerin için kullanılmıştır.
Elisa plate okuyucu;Versa MAX micropalte reader	Sitotoksosite testlerinde plakalar için kullanılmıştır.

5. YÖNTEMLER

5.1 Ekstrenin Hazırlanması

Gölgede ve nemsiz ortamda kurutulan bitki, ekstraksiyonun verimliliğini arttırmak için öğütülmüştür. Toz halindeki 223 g bitkinin ekstraksiyon işlemi 4 L MeOH ile ultrasonik banyoda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminin tamamlanmasından sonra, MeOH döner evaporatörde (45 °C'yi geçmeyecek şekilde) uzaklaştırılmıştır. Ekstre, 61 g (%27 verim) olarak elde edilmiştir.



Şekil 5-1. Yoğunlaştırılmış MeOH ekstresi

5.2 Alkaloit Ekstraksiyonunun Gerçekleştirilmesi

Elde edilen ekstre, 500 ml MeOH'da çözülmüş ve %5'lik HCl ile pH değeri 2'ye kadar düşürülmüştür. Asidik faz, 500 ml hekzan ile partisyona tabi tutulmuştur. Bu işlem 5 kez gerçekleştirilmiştir. Asidik MeOH fazının pH değeri, sulu amonyak ile 10'a ayarlanmıştır. Yoğunlaştırma sonrası elde edilen bazik kısım 49.4 g olarak saptanırken; asidik kısım 9 g gelmiştir.



Şekil 5-2. Ayırma hunisi ile klasik alkaloit ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi



Şekil 5-3. Alkaloit ekstraksiyonunun İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH : H_2O (61:32:7))

5.3 Ayırma Saflaştırma İşlemleri

Elde edilen bazık kısım, 50 g silika jele emdirilmiştir.



Şekil 5-4. Silikaya emdirilirmiş bazık faz

Silikaya emdirilmiş alkaloit ekstresinin yarısı, C-18 karşıt faz kromatografisine uygulanmış ve sudan başlayıp metanole doğru giden çeşitli elüsyonlarla fraksiyonlar alınmıştır. 180 g C-18'in, ilk olarak %100 MeOH ile kolona (40 cm uzunluğunda, 6 cm çapında) dolumu yapılmış, sonrasında sistem %100 su ile şartlandırılmıştır.

Elüsyonlar her seferinde 1'er L olacak şekilde yapılmış ve fraksiyonlar (her biri yaklaşık 100 ml) nuçe erlenlerine toplanmıştır. 65 Fraksiyon toplanmıştır.

Elde edilen fraksiyonların, yapılan İTK analizleri sonunda birleştirmeleri yapılmış ve moleküllerin saflaştırılabilmeleri için farklı kolon sistemleri ile ayırma saflaştırma işlemlerine geçilmiştir.

Genel olarak kullanılan çözgen sistemleri şu şekildedir; CHCl₃: MeOH (95:5) (90:10), CHCl₃: MeOH: H₂O (80:20:2) (70:30:3) (61:32:7), Hex: EtOAc: H₂O (75:20:15), Hex: EtOAc: MeOH (10:10:2) (10:10:3) (10:10:4) (Silika jel kolon kromatografileri için), MeOH: H₂O (90:10) (80:20) (70:30) (RP kolon kromatografileri için).

Elde edilen fraksiyonların tatbikleri, pastör pipeti ile plağın alt ucundan 1 cm yukarıda olacak şekilde yaklaşık 0,5 cm ara ile yapılmıştır. Uygun çözgen sistemleri ile yürütülen plaklardaki spotların belirlenebilmesi için Vanilin-H₂SO₄ reaktifi kullanılmıştır.



Şekil 5-5. Silikaya emdirilmiş bazik ekstrenin C-18 kolon kromatografisi

5.4 Sitotoksosite Testi

Hücre proliferasyon ajanı WST-1; hücre popülasyonunda proliferasyonun non-radyoaktif, spektrofotometrik olarak ölçülebilmesi için kullanılmaktadır. Kullanıma hazır, güvenli, daha hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar oluşturduğu için diğer tetrazolyum tuzlarına (MTT, XTT, MTS) kıyasla daha avantajlıdır.

Stabil tetrazolyum tuzu WST-1, ilk başta hücre yüzeyinde gerçekleşen kompleks hücresel mekanizma ile çözünebilir formazana parçalanmaktadır. Bu biyo-indirgenme, canlı hücredeki NADP(H)'ın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle, oluşan formazan boyasının miktarı, doğrudan metabolik olarak aktif hücre ile orantılıdır.

Protokol: 96 Gözlü plakalara LNCaP (10×10^3), MRC-5, HCC1937, 293HEK ve U2OS hücreleri (5×10^3) 190 μ l/göz olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yaklaşık 24 saat (%80-90 tutunmaya başladığında) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin tamamlanmasından sonra, siklopamin, B2 ve B3 maddelerinin hazırlanan konsantrasyonları (0.1, 0.5, 1, 5 ve 25 μ M) hücrelere uygulanmıştır. Günlük gözlemler mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. 72 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin ortamları uzaklaştırılmış ve WST-1 ajanı sitotoksosite ortamı ile her göze eklenmiştir

(her göz için 10 µl WST-1 ajanı + 100 µl sitotoksisite ortamı verilmiştir). Plakalar; 37 °C ve %5 CO₂'lik inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. (0.5 ile 4 saat boyunca spektrofotometrede ölçüm alınmıştır). Belirlenen zaman aralıklarında ölçüm, 440 nm'de gerçekleştirilmiştir.

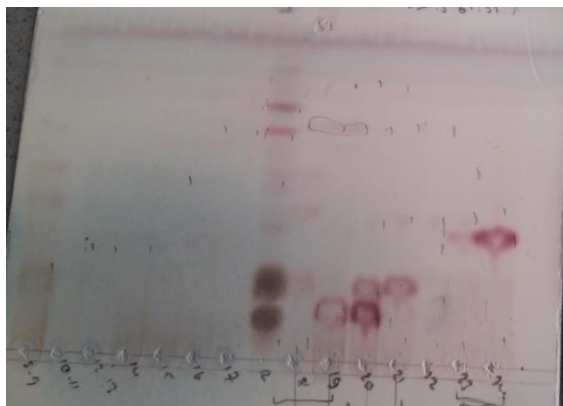
6. BULGULAR

6.1. C18 Ters Faz Kolon Kromatografisinden Elde Edilen ve Birleştirilen Fraksiyonlar

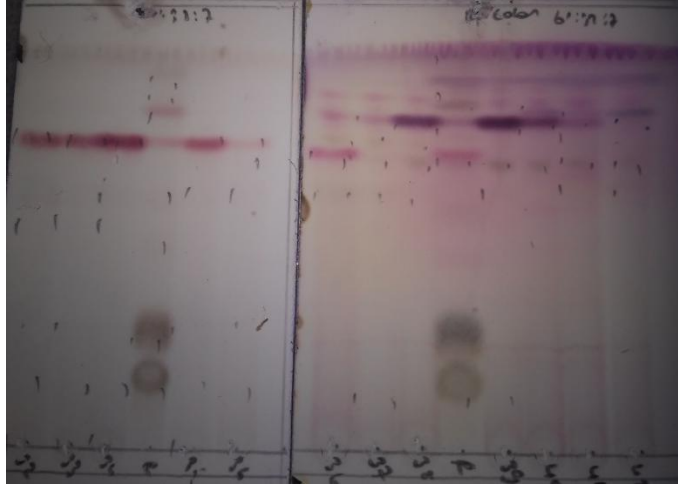
Alkaloit ekstraksiyonu ile elde edilen bazık kısmın MeOH'ı döner evaporatörde (45° C' yi geçmeyecek şekilde) uzaklaştırılmış ve 100 ml MeOH'ta çözündükten sonra; kolona kuru tatbik olarak uygulayabilmek için 50 g silika jele emdirilmiştir. Kuru tatbik için hazırlanan örneğin yarısı; C-18 karışt faz kromatografisi ile fraksiyonlanmıştır. Çözgen sistemi olarak H₂O:MeOH gradienti (%0 MeOH; 1000 ml, %10 MeOH; 1000 ml, %20 MeOH; 1000 ml; %30 MeOH; 2000 ml, %40 MeOH; 1000 ml, %50 MeOH; 1000 ml, %60 MeOH; 1000 ml, %70 MeOH; 1000 ml, %80 MeOH; 1000 ml) kullanılarak 65 fraksiyon toplanmıştır. İzolasyon şemasında, moleküllerin ayrımında izlenen yol verilmiştir (Şekil 30).

Elde edilen fraksiyonların İTK analizleri sonrası uygun birleştirmeler yapılmıştır.

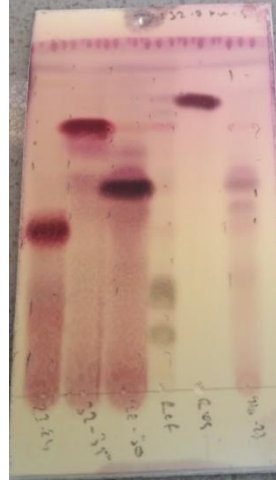
6.2. Resveratrol ve Türevlerinin İzolasyon Çalışmaları



Şekil 6-1. Birleştirilen Fr 23-24'ün İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl₃: MeOH: H₂O (61:32:7))

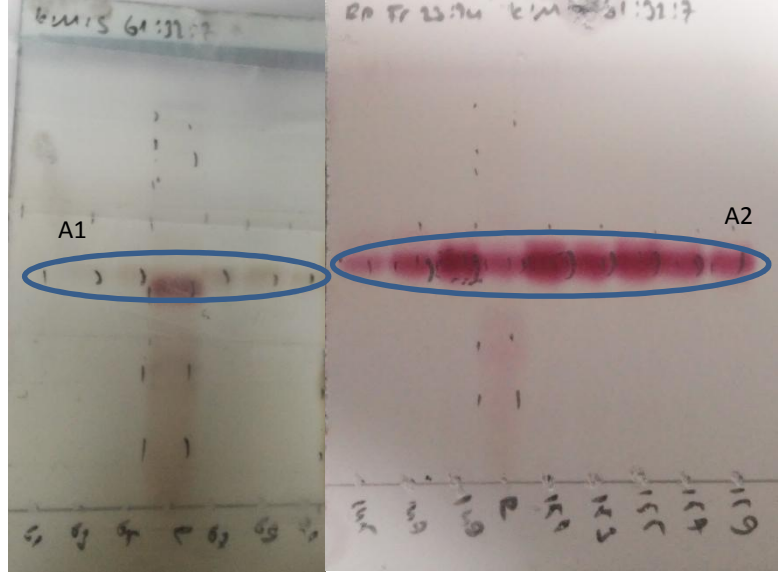


Şekil 6-2. Fr 32-35 ve Fr 38-40'ın İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH: H_2O (61:32:7))



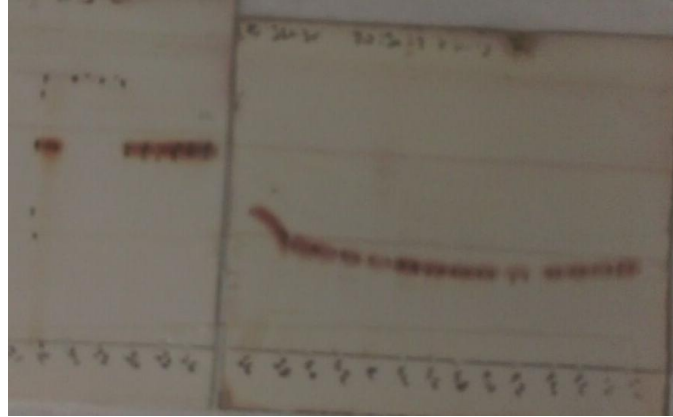
Şekil 6-3. Elde edilen resveratrol ve türevlerinin birleştirilmiş fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH: H_2O (61:32:7))

Fr 23-24'ün (113 mg) fraksiyonlanmasında, silika jel (40 g) kullanılarak açık kolon kromatografikromatografisi yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak CHCl_3 :MeOH: H_2O (80:20:2; 100 ml, 75:25:2,5; 50 ml, 70:30:3; 50 ml, 61:32:7; 50 ml) karışımları kullanılarak 168 fraksiyon toplanmıştır. Fr 23-24 üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 2 molekül (**A1** (2 mg); Fr 66-70, **A2** (9 mg); Fr 151-155) elde edilmiştir.



Şekil 6-4. Fr 23-24'ten alınan Fr 66-70 ve Fr 145-159 fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH : H_2O (61:32:7))

Fr 32-35'in (240 mg) saflaştırılmasında, silika jel (90 g) kullanılarak açık kolon kromatografisi yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak CHCl_3 : MeOH : H_2O (80:20:2; 100 ml) karışımları kullanılarak 100 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyon 32-35 üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 1 molekül (**A5** (45 mg); Fr 37-93) elde edilmiştir.



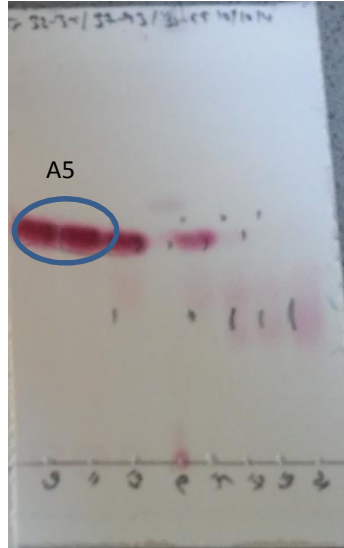
Şekil 6-5. Fr 32-35'in İTK profilleri (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH : H_2O (61:32:7))

Fr 32-35 'ten alınan Fr 37-93'ün minör kirlilikleri temizleyebilmek için sephadex LH 20 (20 g) kullanılarak kolon kromatografisi yapılmıştır. % 100 MeOH 'ta şartlanan kolona Fr 37-93 uygulanmıştır. Çözgen sistemi olarak %100 MeOH (100 ml) kullanılarak 110 fraksiyon toplanmıştır.



Şekil 6-6. Fr 32-35 [37-93] 'ten alınan fraksiyonların İTK profilleri (Çözgen sistemi; Hex: EtOAc: MeOH (10:10:3))

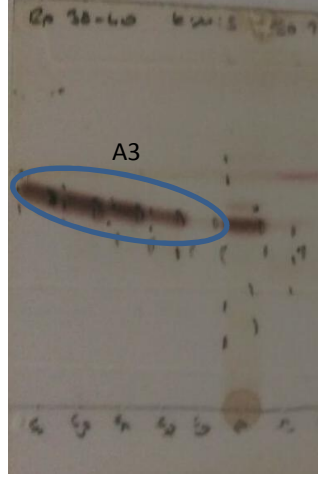
Fr 32-35 [37-93]'ten alınan Fr 33-55 birleştirilerek kütlesi (24 mg) belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonun izolasyonunda, silika jel (10 g) kolon kromatografisi yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak Hex: EtOAc: MeOH (10:10:2; 100 ml) karışımı ile 40 fraksiyon toplanmıştır. Bu fraksiyon üzerinde yapılan çalışmalar sonucu **A5** (14 mg) (Fr 9-11]) molekülü saf bir şekilde elde edilmiştir.



Şekil 6-7. Fr 32-35 [37-93][33-55]' ten alınan fraksiyonların İTK profilleri (Çözgen sistemi; Hex: EtOAc:MeOH (10:10:4))

Fr 38-40'ın (202 mg) fraksiyonlaması, silika jel (80 g) kullanılarak açık kolon kromatografisi ile yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak

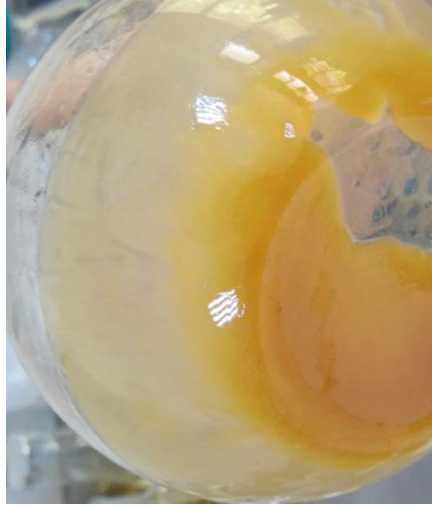
$\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20:2; 100 ml, 75:25:2,5; 100 ml) karışımları kullanılarak 115 fraksiyon toplanmıştır. Fraksiyon 38-40 üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 1 molekül (**A3** (38 mg); Fr 39-47) elde edilmiştir.



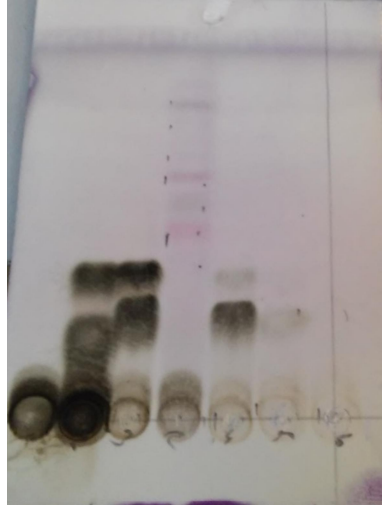
Şekil 6-8. Fr 38-40'dan alınan Fr 39-47'nin İTK profilleri (Çözgen sistemi; $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (61:32:7))

6.3. Şeker Türevlerinin İzolasyon Çalışmaları

C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 1-5 birleştirilmiştir. %100 H_2O içeren bu fraksiyonlar bütanol eklenerek döner evaporatörde 45 °C'yi geçmeyen sıcaklıkta yoğunlaştırılmıştır. Şekerce zengin olduğu öngörülen bu fraksiyon için uygun ayırma sistemi bulunduktan sonra ileri çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

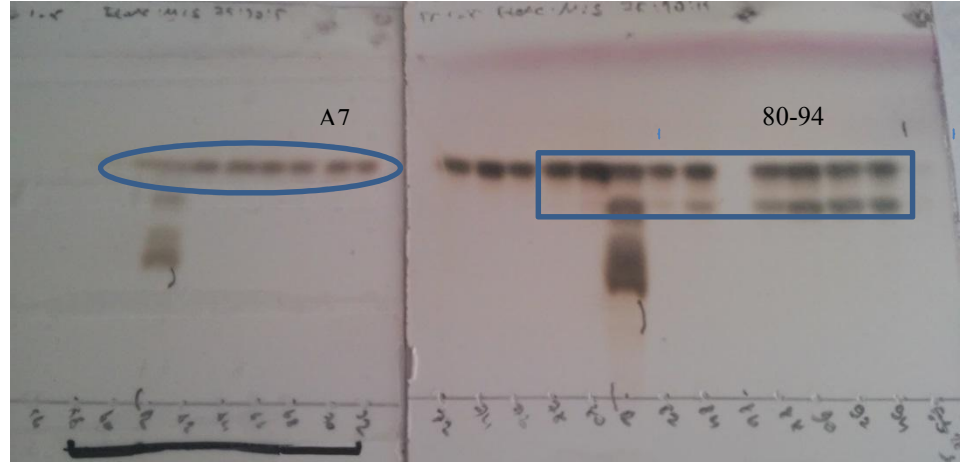


Şekil 6-9. Elde edilen şeker fraksiyonlarının yoğunlaştırılmış hali

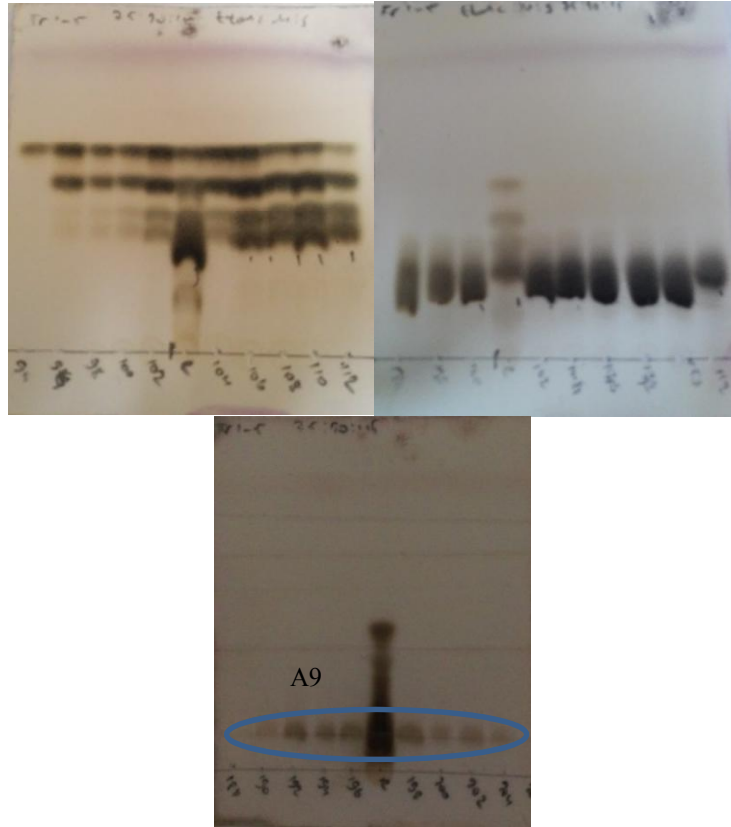


Şekil 6-10. Fr 1-5'in İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH: H_2O (61:32:7))

Elde edilen Fr 1-5 şeker fraksiyonlarının miktarı 9 g'dır. Bu fraksiyonun 2 g'ı için kolon kurulmuştur. Kolona verilecek olan fraksiyon, şekerli grupları içerdiği ve çözünürlük problemi yarattığı için kuru tatbik olarak kolona uygulanmıştır. Fraksiyon iyice çözündürme sonrası 5 g silikaya emdirilmiştir. Fr 1-5'in silika jel (300 g) kullanılarak açık kolon kromatografisi yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak EtOAc: MeOH: H_2O (75:20:15; 330 ml) karışımları kullanılarak 214 fraksiyon toplanmıştır. Fr 1-5 üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 2 molekül (**A7** (93 mg); Fr 58-76, **A9** (6 mg); Fr 190-204) elde edilmiştir.



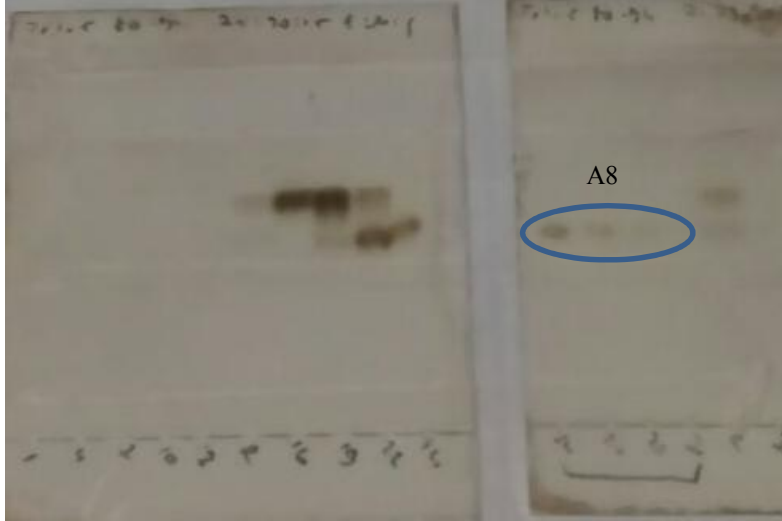
Şekil 6-11. Fr 1-5'ten alınan fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; EtOAc: MeOH:H₂O (75:20:15))



Şekil 6-12. Fr 1-5'ten alınan fraksiyonlarının İTK profilleri (Çözgen sistemi; EtOAc: MeOH:H₂O (75:20:15))

Fr 1-5'ten alınan Fr 80-94 birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyon (88 mg) üzerinde silika jel (20 g) kullanılarak açık kolon kromatografisi

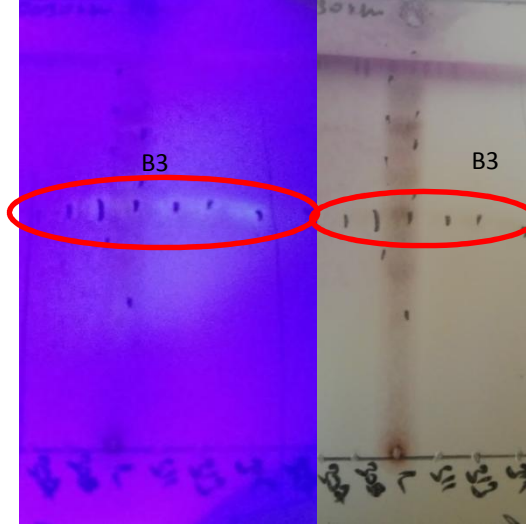
yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak EtOAc: MeOH: H₂O (75:20:15; 100 ml,) karışımları kullanılarak 40 fraksiyon toplanmıştır. Fr 80-94 üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 1 molekül (**A8** (13 mg); Fr 24-30) elde edilmiştir.



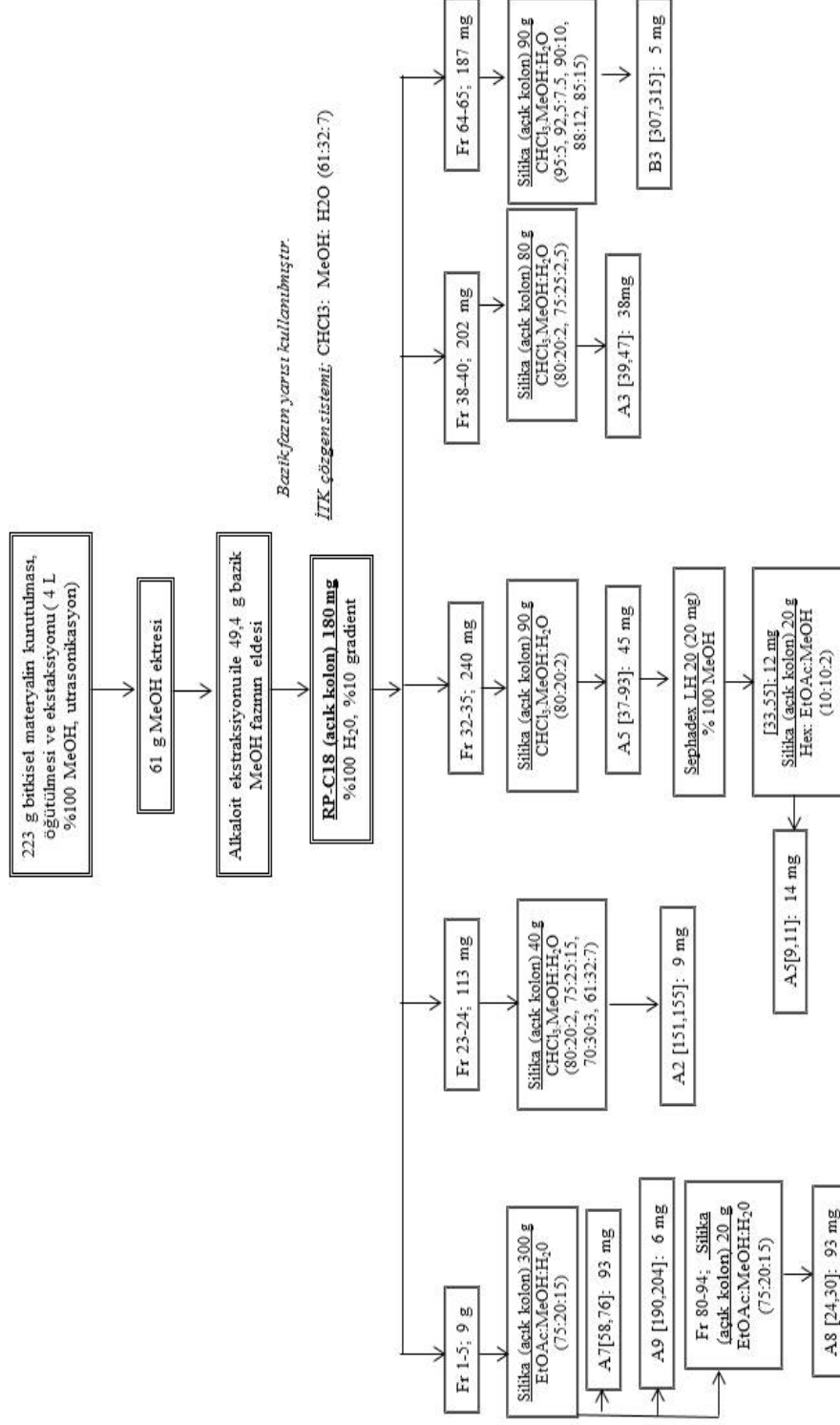
Şekil 6-13. Fr 1-5 [80-94]'ten alınan fraksiyonların İTK profili (Çözgen sistemi; EtOAc: MeOH:H₂O (75:20:15))

6.4. Steroidal Alkaloidlerin İzolasyonu

C-18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 64-65'in miktarı 187 mg'dır. Bu fraksiyonun, silika jel (90 mg) kullanılarak açık kolon kromatografisi yapılmıştır. Çözgen sistemi olarak CHCl₃: MeOH (95:5; 100 ml, 92:7,5; 100 ml, 90:10; 100 ml; 88:12; 100 ml, 85:15; 200 ml) karışımları kullanılarak 343 adet fraksiyon toplanmıştır. Fr 64-65 üzerinde yapılan kromatografik çalışmalar sonucu 1 molekül (**B3** (5 mg); Fr 307-315) elde edilmiştir.



Şekil 6-14. Fr 64-64'ten alınan Fr 307-315 f İTK profili (Çözgen sistemi; CHCl_3 : MeOH: H_2O (70:30:3))



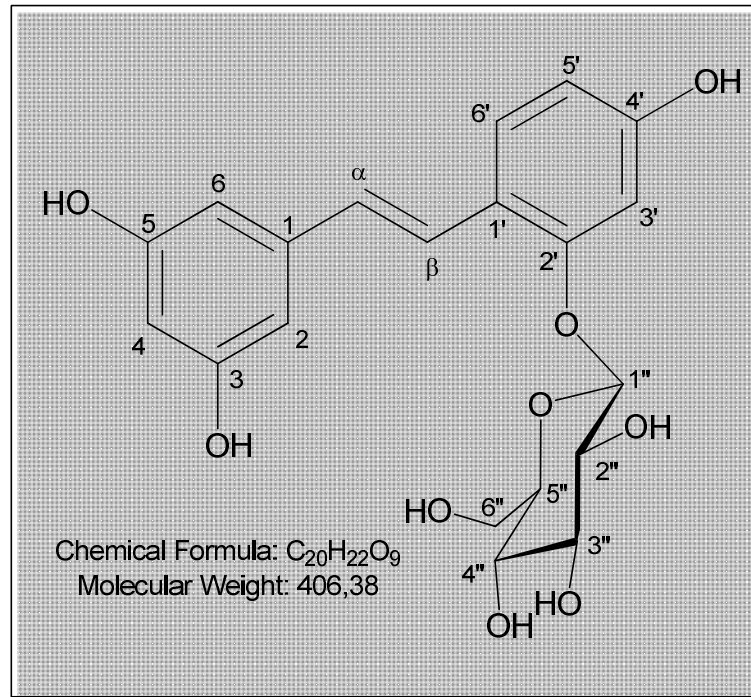
Şekil 6-15. İzolasyon şeması

6.5. İzole Edilen Moleküllerin Yapı Tayinleri

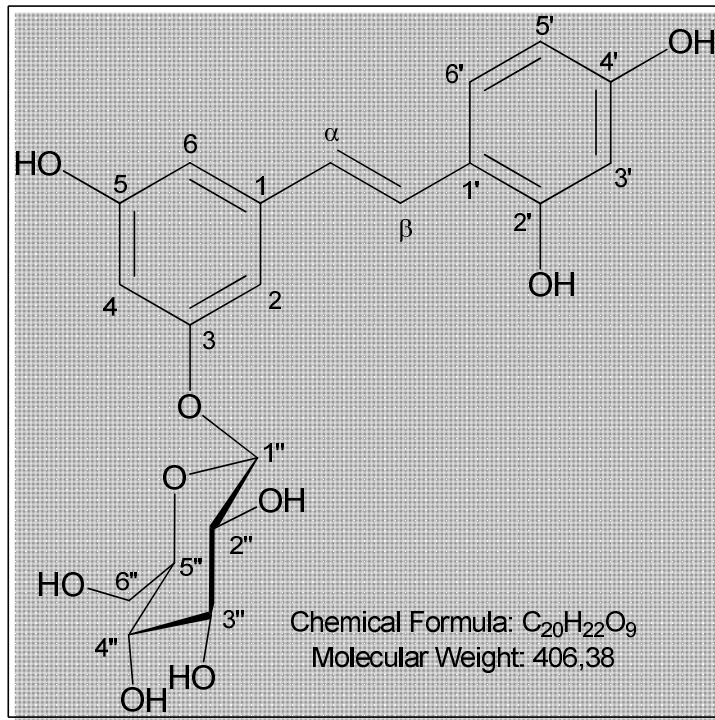
Çalışma boyunca izolasyonu gerçekleştirilen yedi maddenin [A2 (izomerik karışım), A3, A5, A7, A8, ve B3] NMR ve LC-ESI-MS spektrumları alınmıştır. Bu kısımda bileşiklerin kimyasal yapıları ve spektral verileri sunulmuştur. A9 molekülü referans bileşik ile İTK'da karşılaştırma yapılarak belirlenmiştir.

6.5.1. A2 (60:40 karışım)

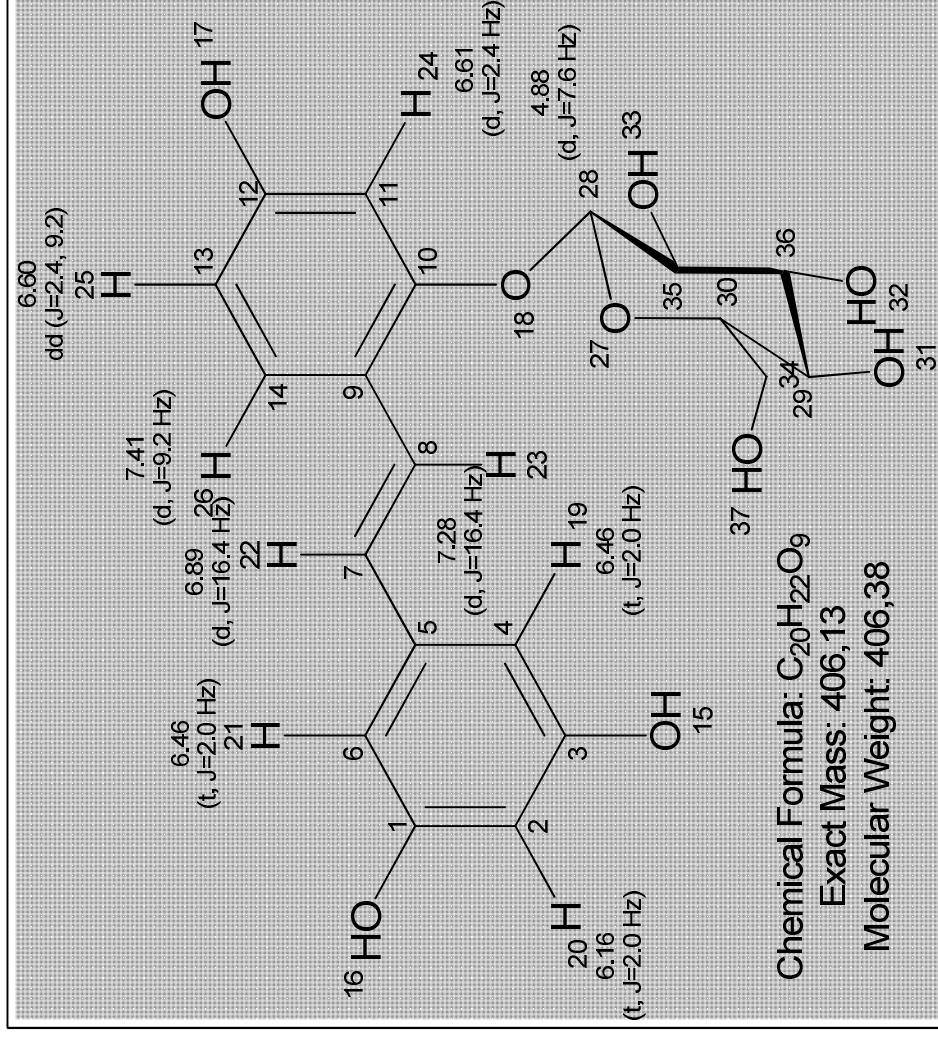
A2 kodlu madde; C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 23-24' ten izole edilmiştir. A2'nin yapılan spektral değerlendirmeler sonrası 60:40 oranında izomerik bir karışım olduğu görülmüştür. Karışımı oluşturan moleküllerin kimyasal yapıları, molekül formülleri/ağırlıkları ve ¹H-NMR verileri aşağıdaki şekillerde sunulmuştur (Şekil 6.16, Şekil 6.17, Şekil 6.18, Şekil 6.19 ve Şekil 6.20).



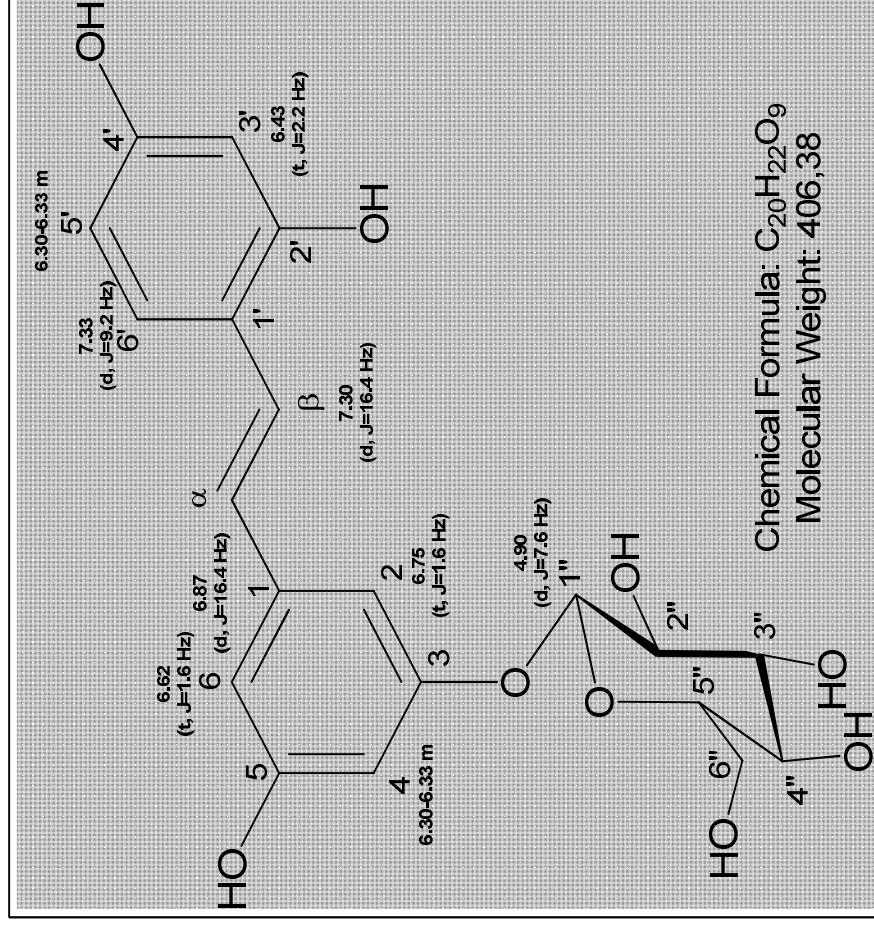
Şekil 6-16. A2 minör molekülün kimyasal yapısı



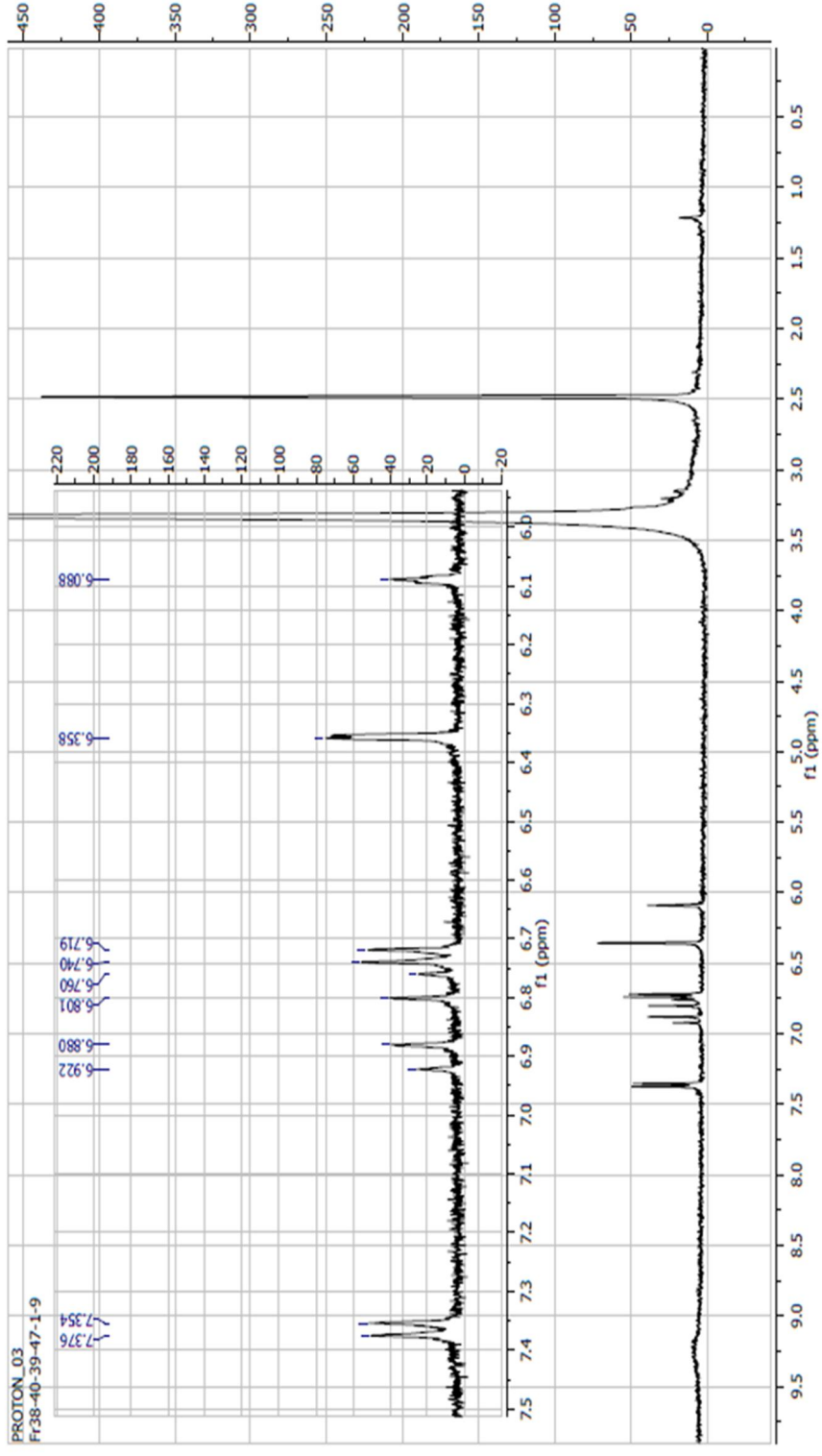
Şekil 6-17. A2 majör molekülün kimyasal yapısı



Şekil 6-18. A2 minör molekülünün 1H -NMR datası



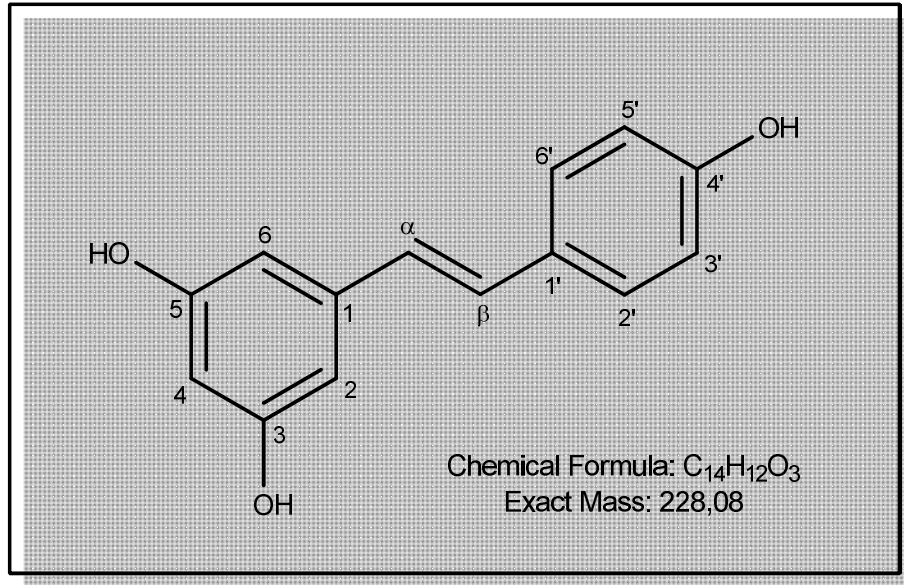
Şekil 6-19. A2 majör molekülünün 1H -NMR datası



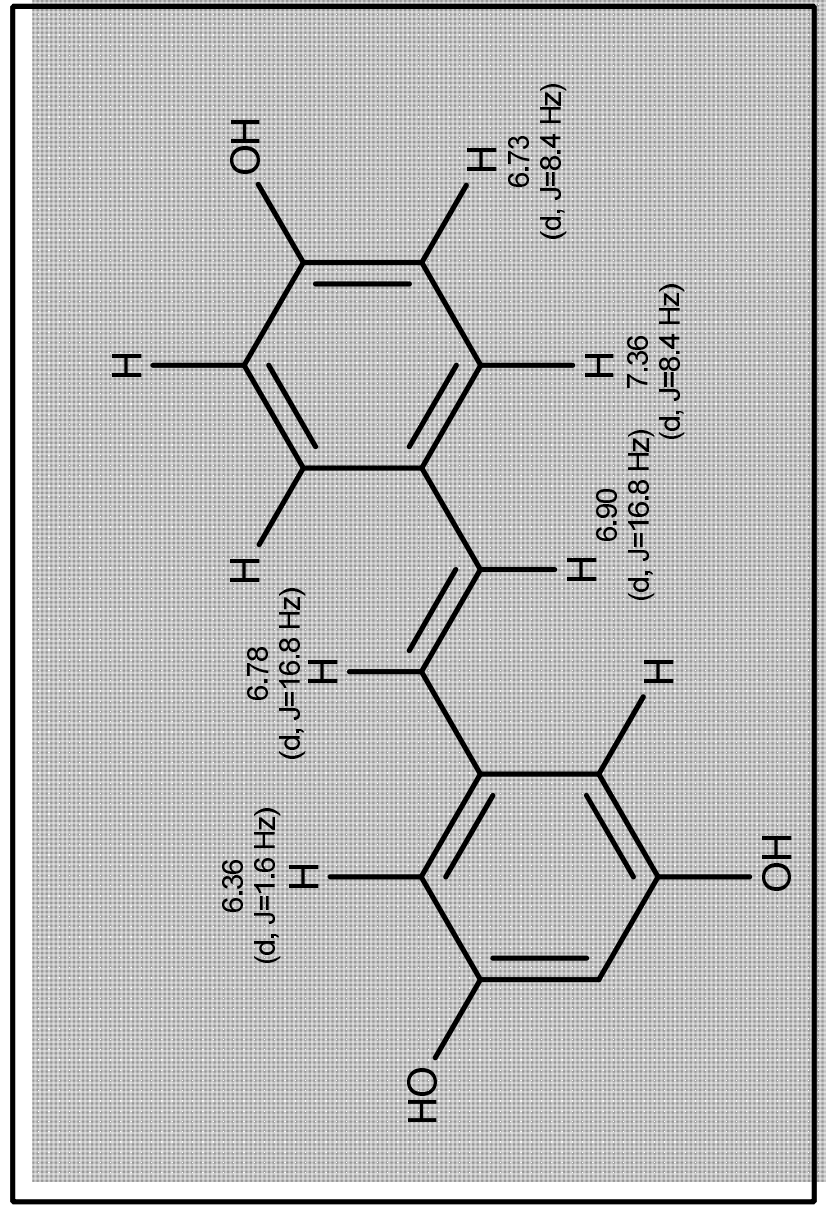
Şekil 6-20. A2 molekülünün ^1H -NMR spektrumu

6.5.2. A3 molekülü

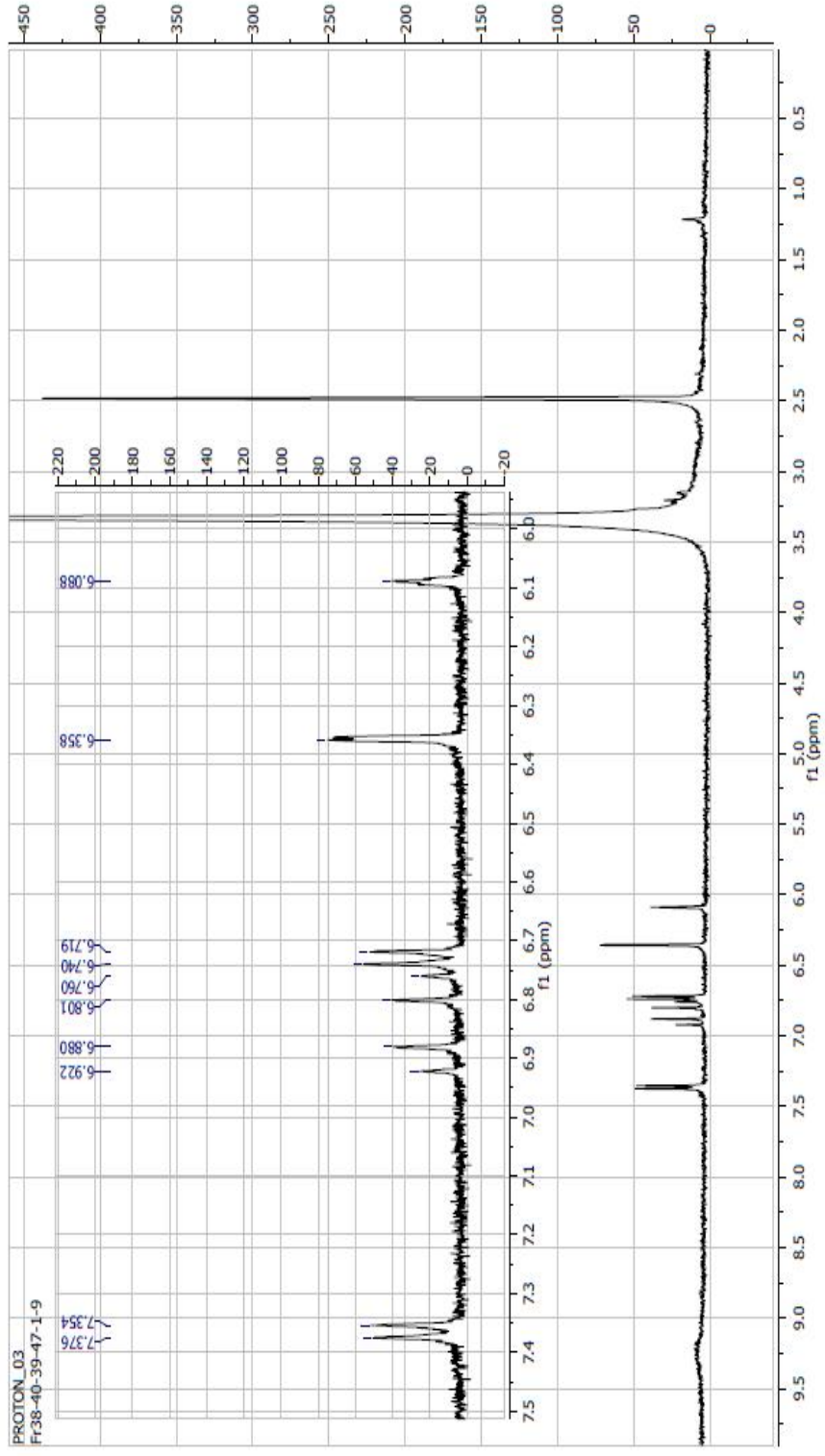
A3 molekülü; C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 38-40'dan izole edilmiştir. A3 molekülünün kimyasal yapısı, molekül formülü/ağırlığı ve ¹H-NMR verileri aşağıda sunulmuştur (Şekil 6.21, Şekil 6.22 ve Şekil 6.23).



Şekil 6-21. A3 molekülünün kimyasal yapısı



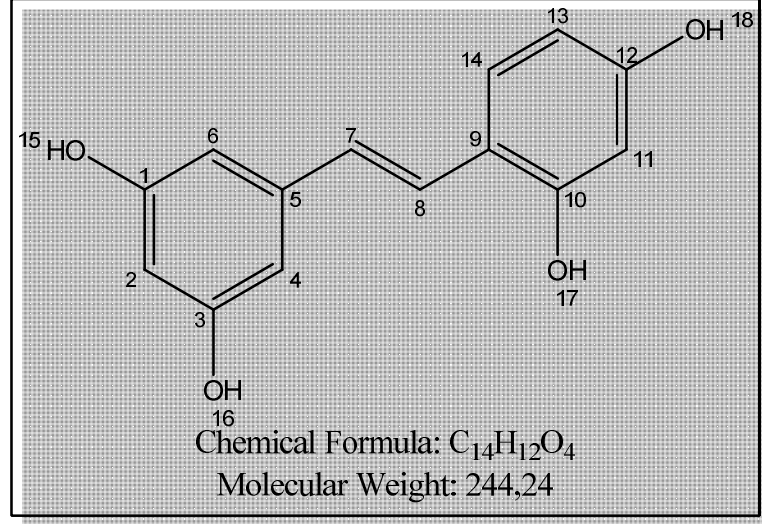
Şekil 6-22. A3 molekülünün ^1H -NMR datası



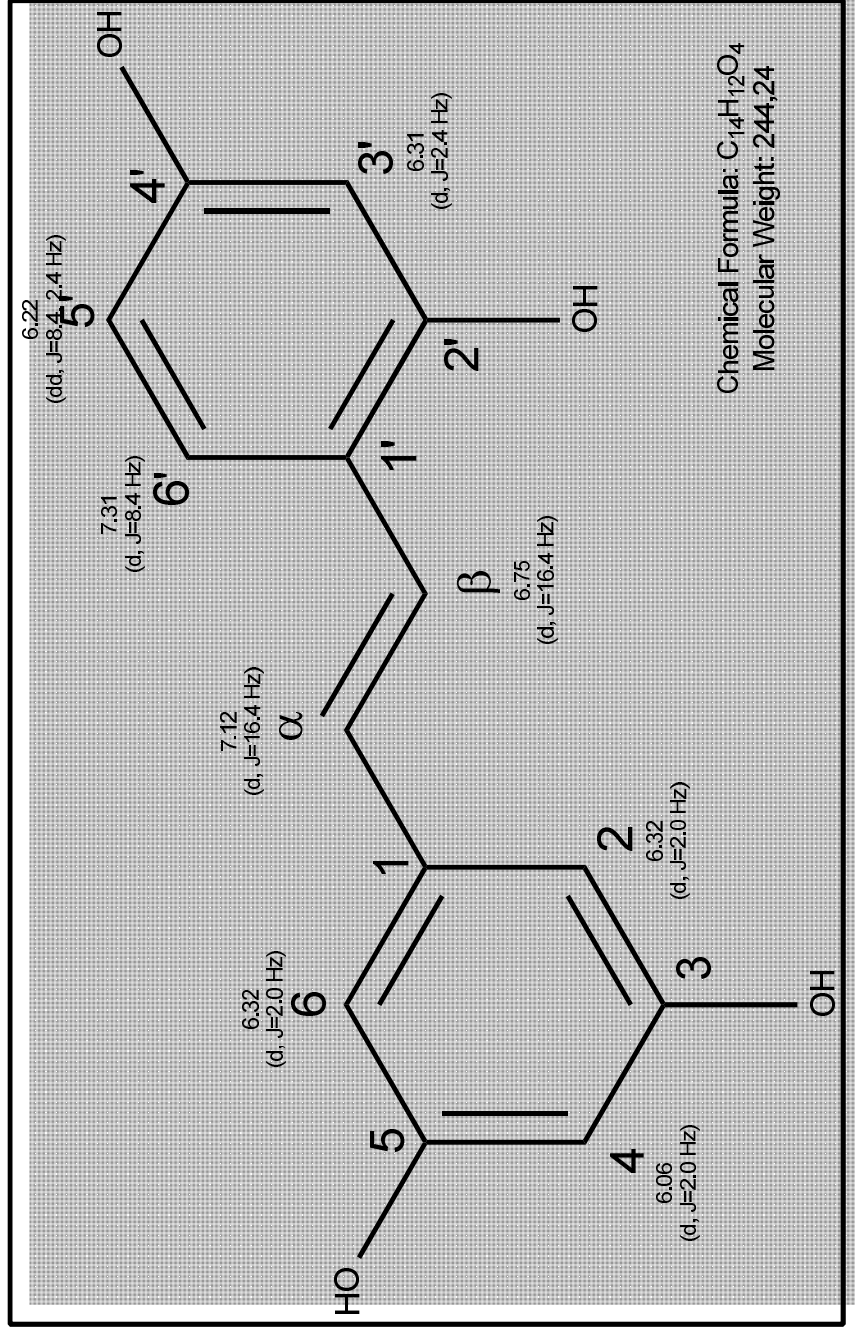
Şekil 6-23. A3 molekülünün ¹H-NMR spektrumu

6.5.3. A5 molekülü

A5 molekülü; C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 32-35' ten izole edilmiştir. A5 molekülünün kimyasal yapısı, molekül formülü/ağırlığı ve ¹H-NMR datası aşağıda sunulmuştur (Şekil 6.24 ve Şekil 6.25).



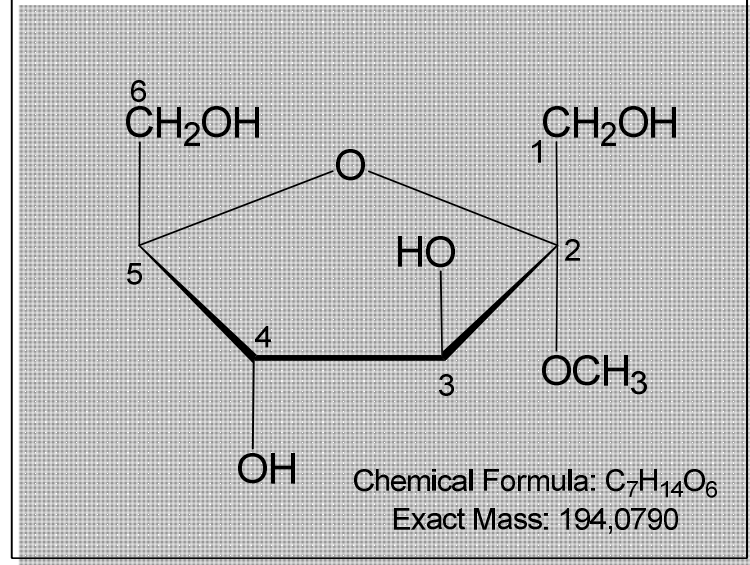
Şekil 6-24. A5 molekülünün kimyasal yapısı



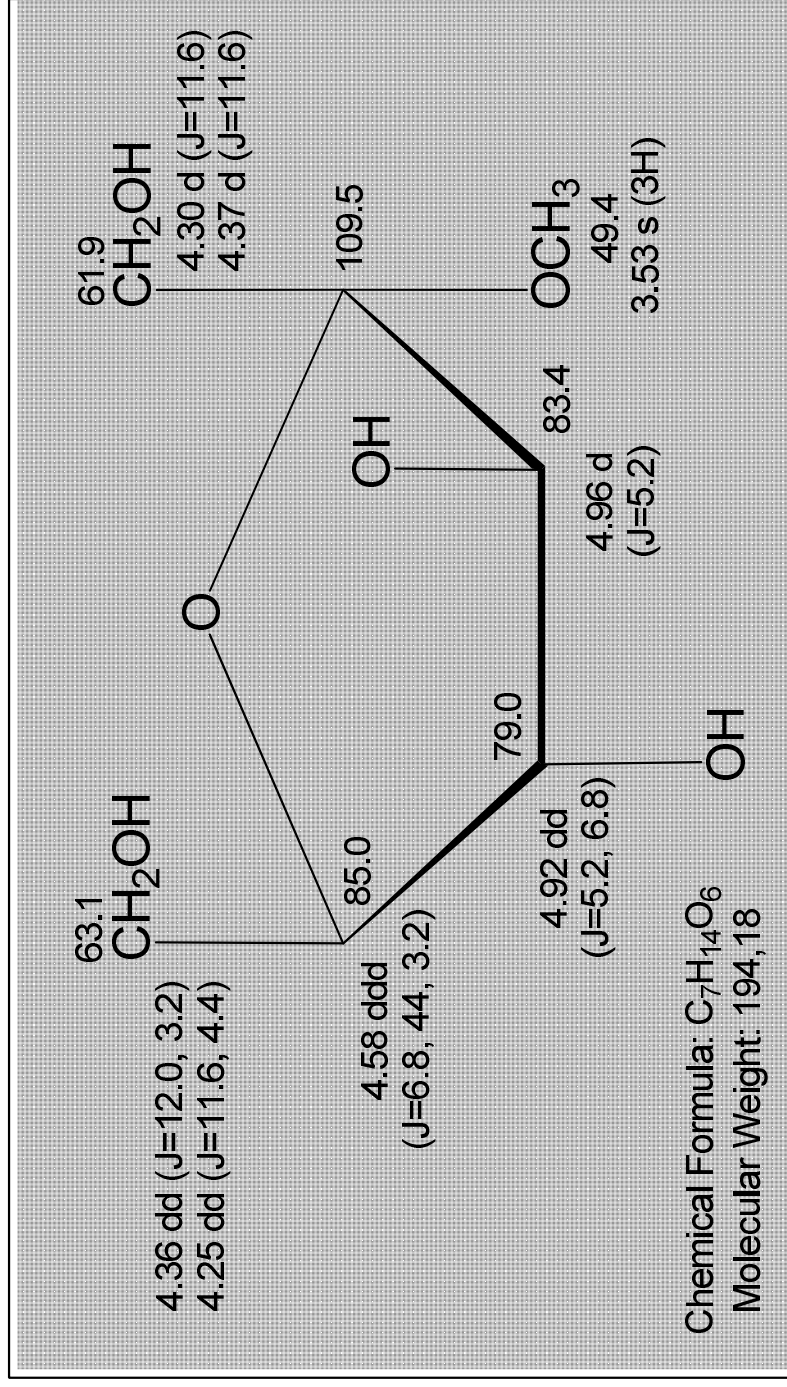
Şekil 6-25. A5 molekülünün $^1\text{H-NMR}$ datası

6.5.4. A7 molekülü

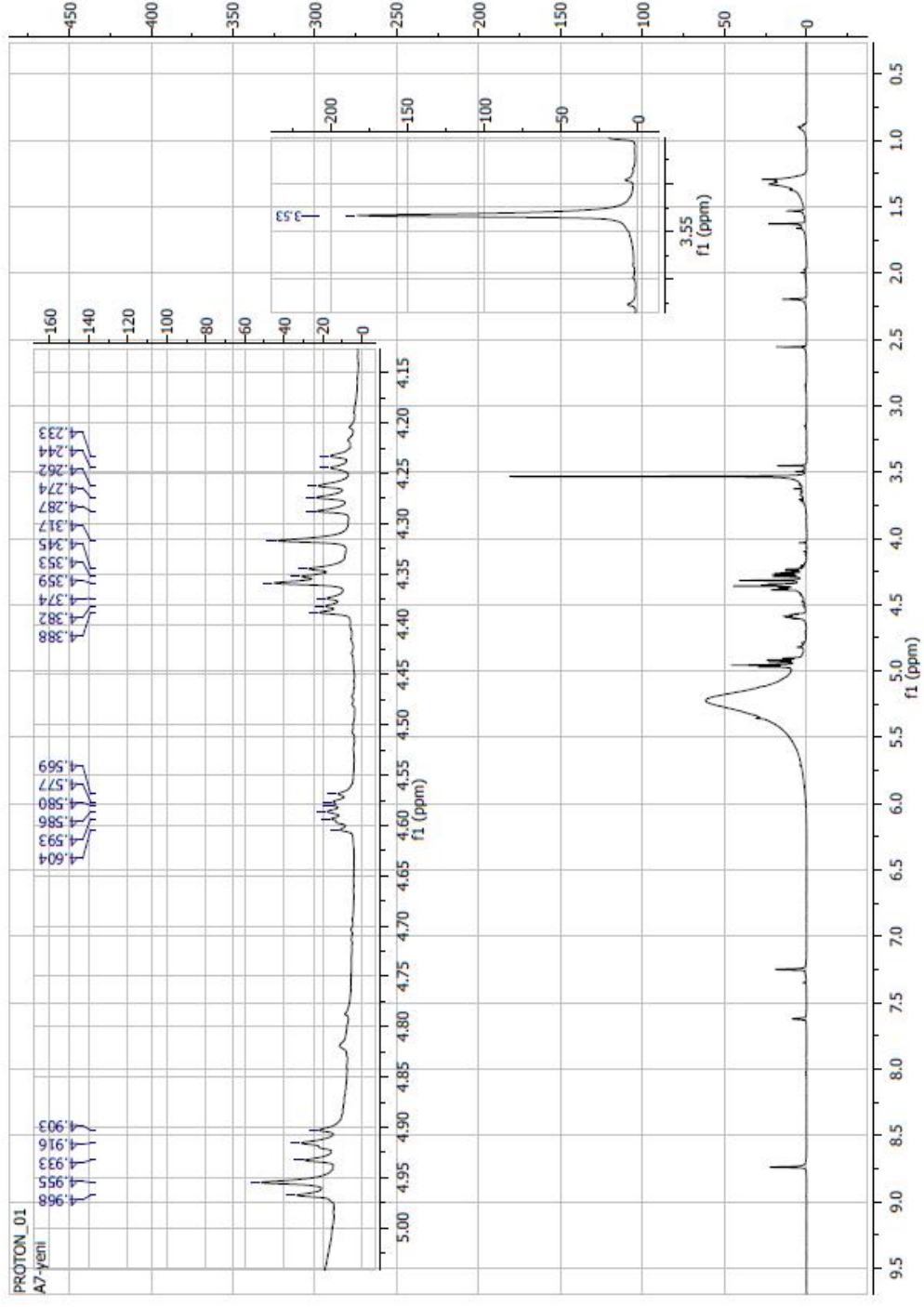
A7 molekülü; C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 1-5'ten izole edilmiştir. A7 molekülünün kimyasal yapısı, molekül formülü/ağırlığı ve ^1H - , ^{13}C -NMR dataları aşağıda sunulmuştur (Şekil 6.26, Şekil 6.27, Şekil 6.28 ve Şekil 6.29).



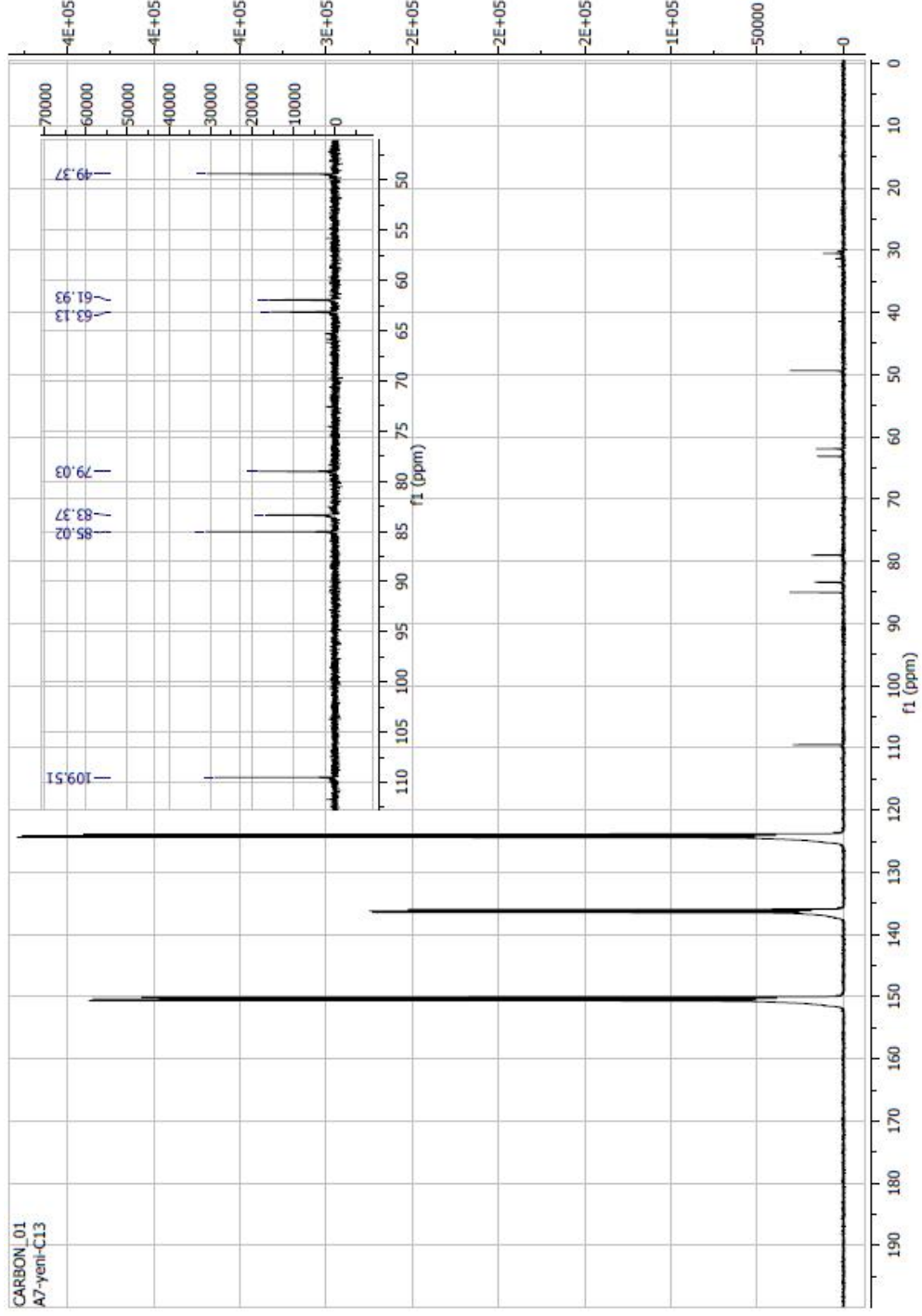
Şekil 6-26. A7 molekülünün kimyasal yapısı



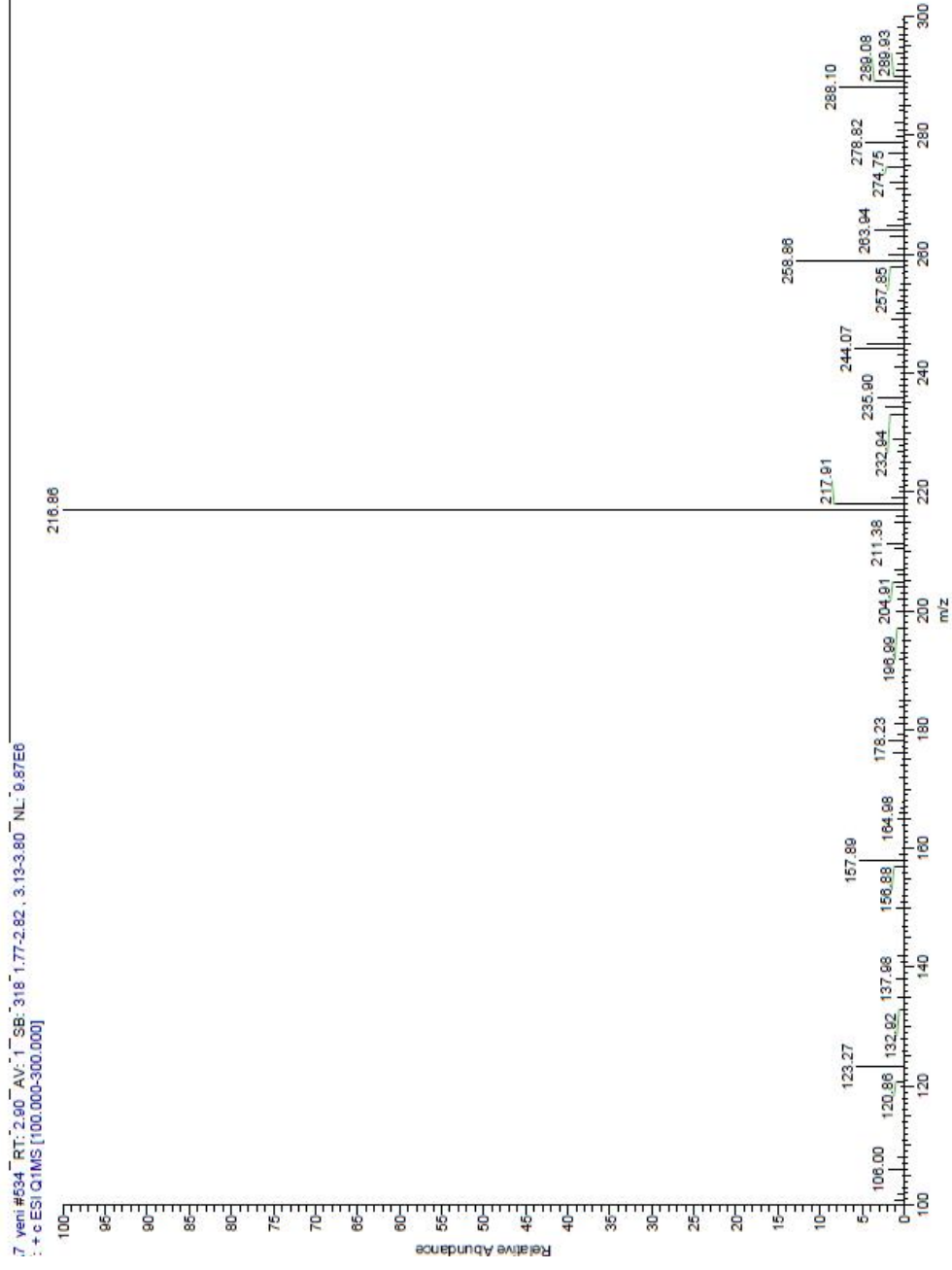
Şekil 6-27. A7 molekülünün ¹H-NMR ve ¹³C-NMR data'ları



Şekil 6-28. A7 molekülünün ^1H -NMR spektrumu



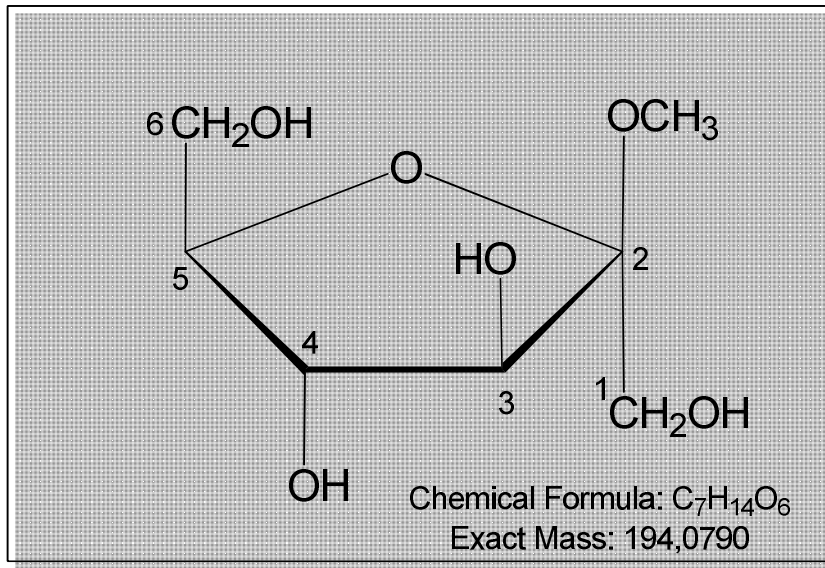
Şekil 6-29, A7 molekülünün ^{13}C -NMR spektrumu



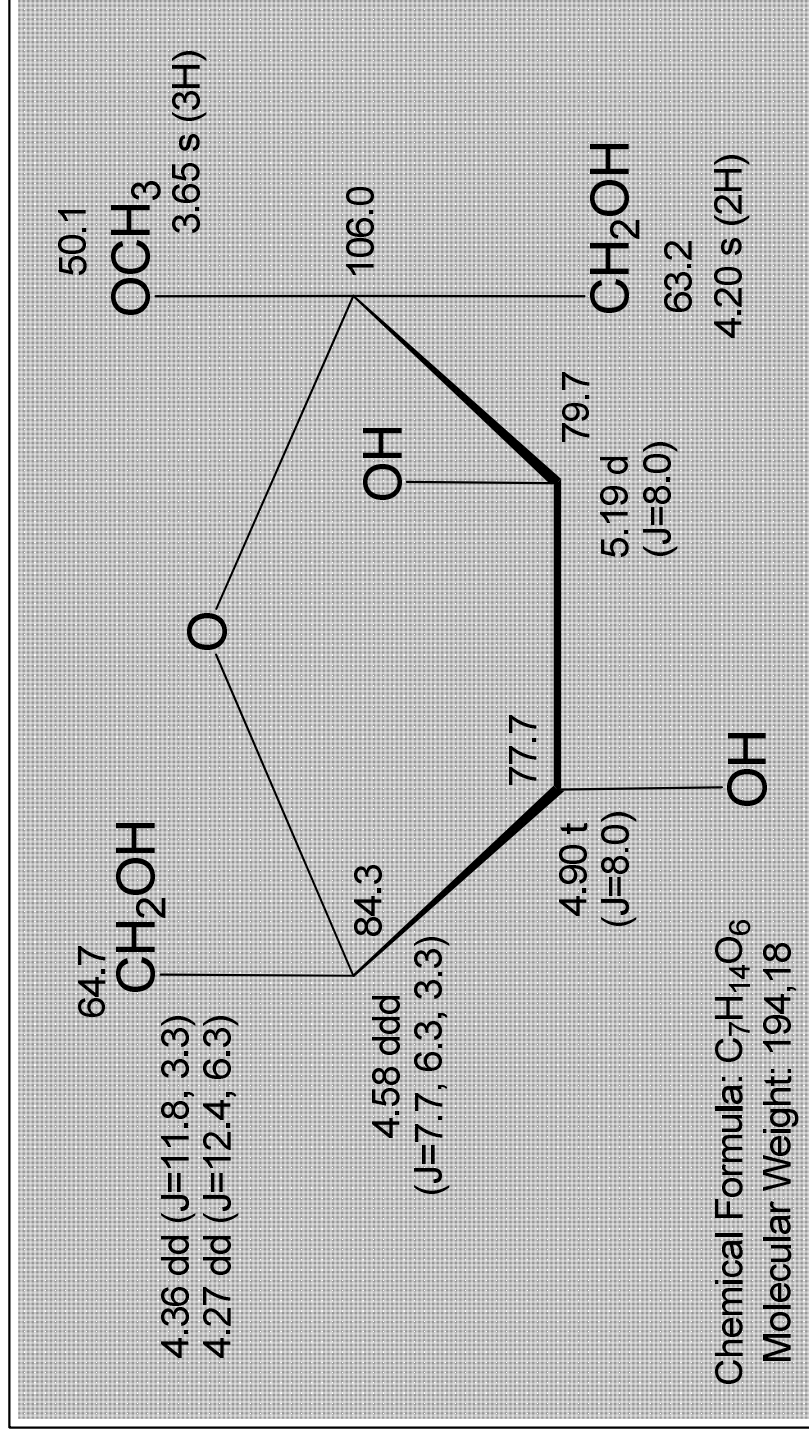
Şekil 6-30. A7 molekülünün LC-MS spektrumu

6.5.5. A8 molekülü

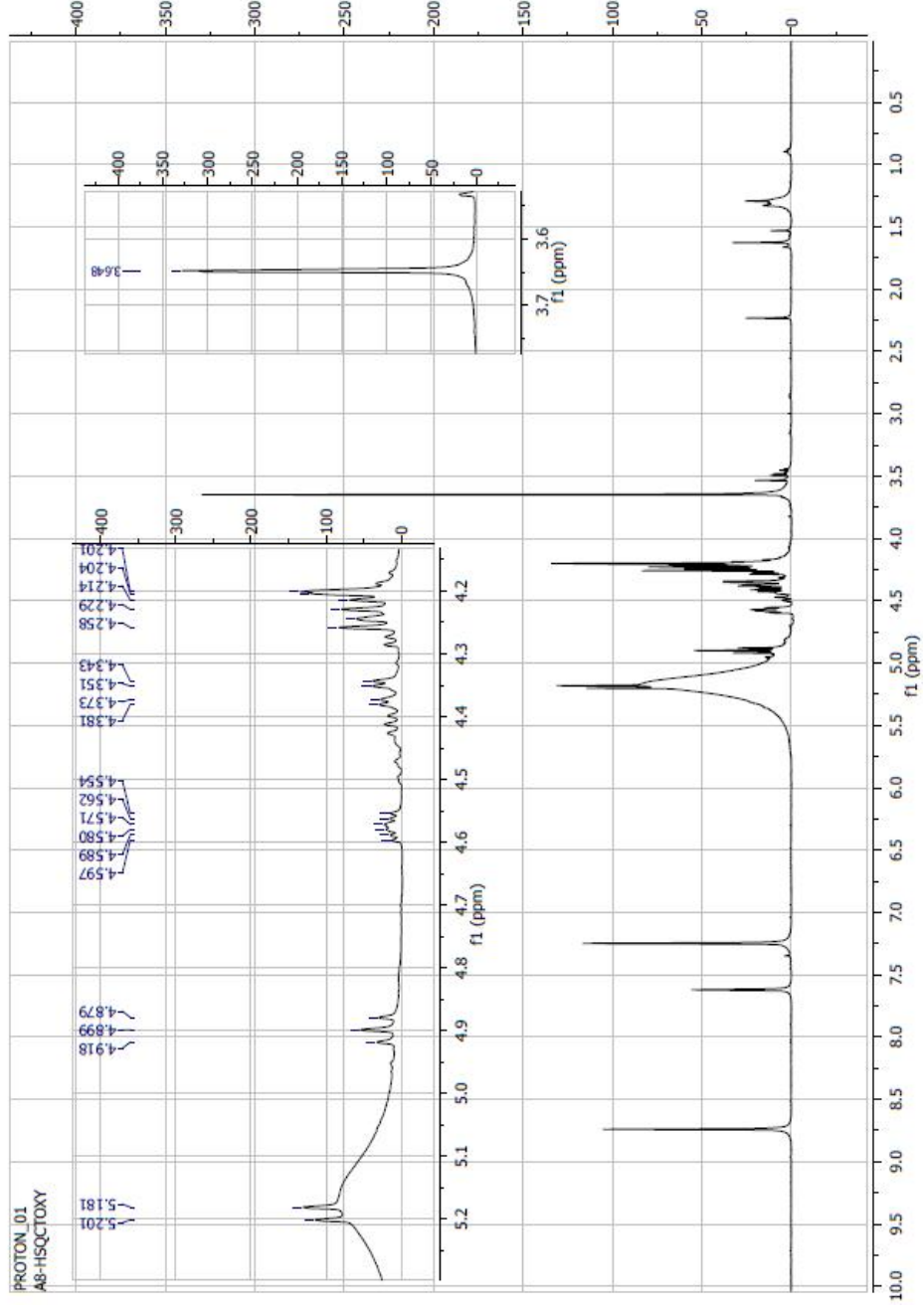
A8 molekülü; C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 1-5 ve devam kolonlarının birleştirilme fraksiyonlarından izole edilmiştir. A8 molekülünün kimyasal yapısı, molekül formülü/ağırlığı ve ^1H -, ^{13}C -NMR dataları aşağıda sunulmuştur (Şekil 6.31, Şekil 6.32, Şekil 6.33 ve Şekil 6.34).



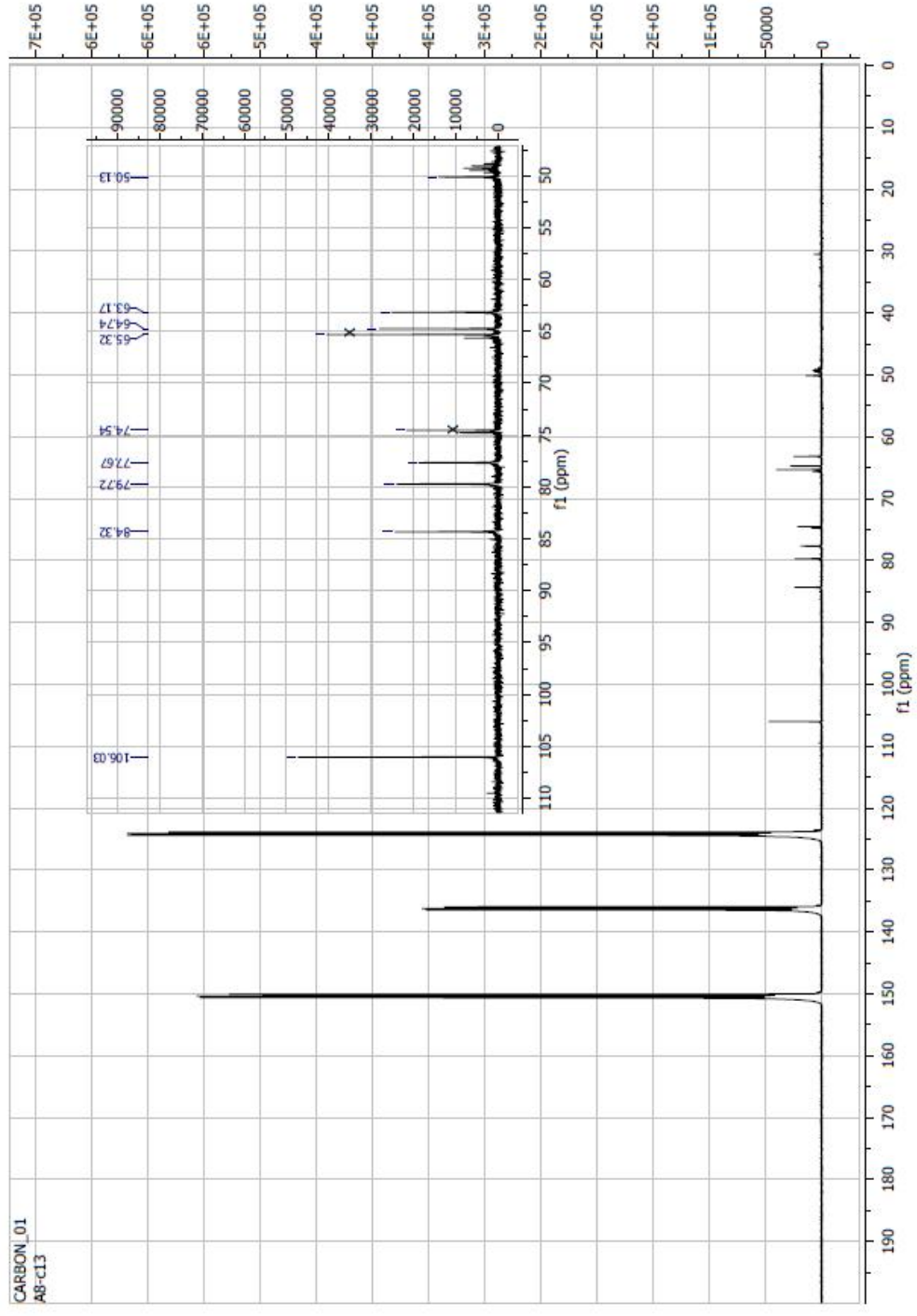
Şekil 6-31. A8 molekülünün kimyasal yapısı



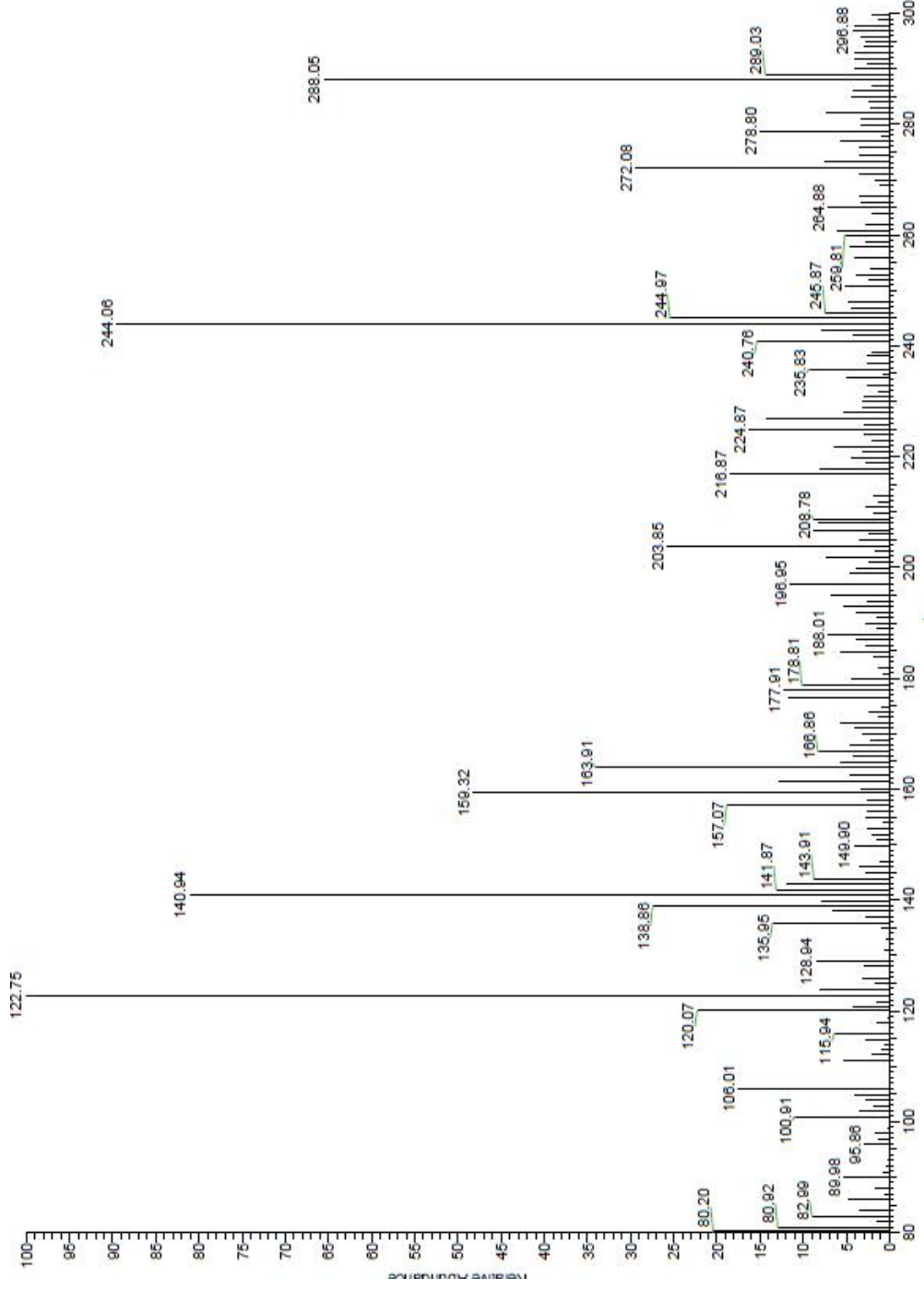
Şekil 6-32. A8 molekülünün ¹H-NMR ve ¹³C-NMR dataları



Şekil 6-33. A8 molekülünün ^1H -NMR spektrumu



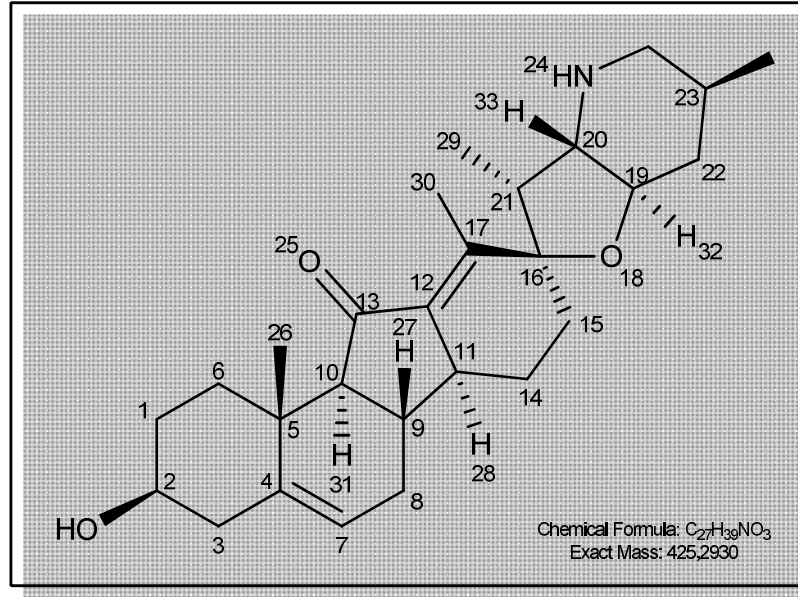
Şekil 6-34. A8 molekülünün ^{13}C -NMR spektrumu



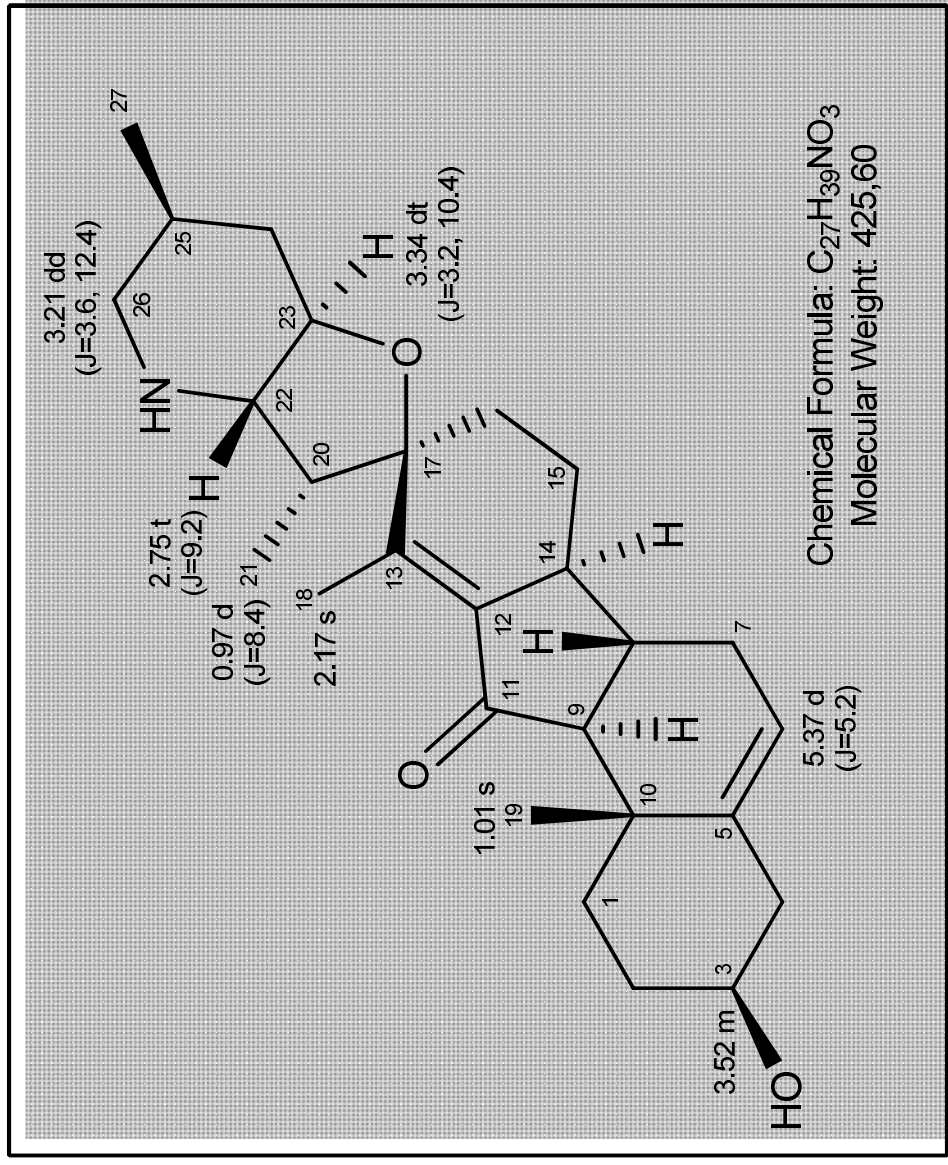
Şekil 6-35. A8 molekülünün LC-MS spektrumu

6.5.6. B3 molekülü

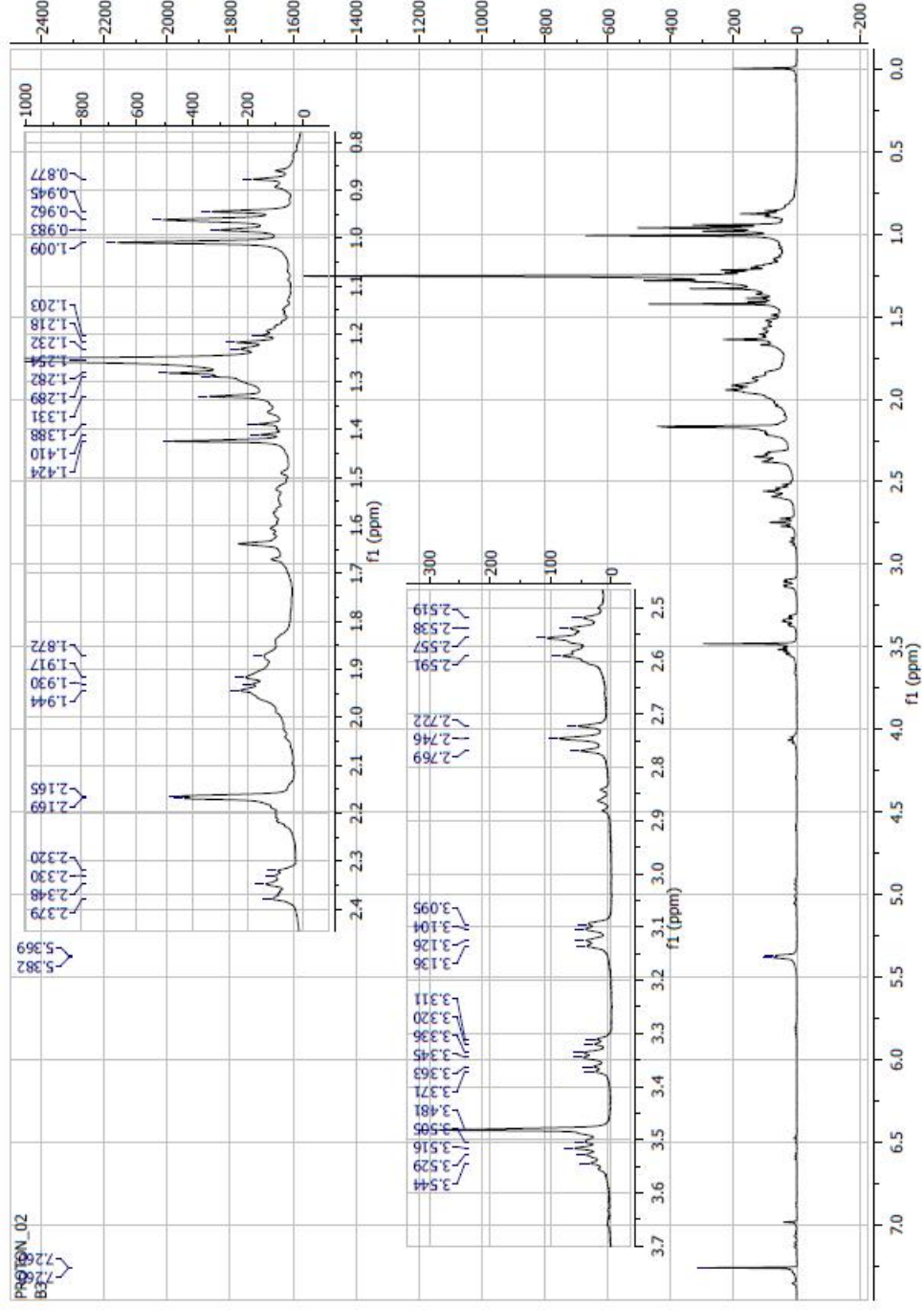
B3 molekülü; C18 ters faz kolon kromatografisinden alınan Fr 64-65'ten izole edilmiştir. **B3** molekülünün kimyasal yapısı, moleküler formülü/ağırlığı ve ¹H-NMR verileri aşağıda sunulmuştur (Şekil 6.36 ve Şekil 6.37).



Şekil 6-36. B3 molekülünün kimyasal yapısı



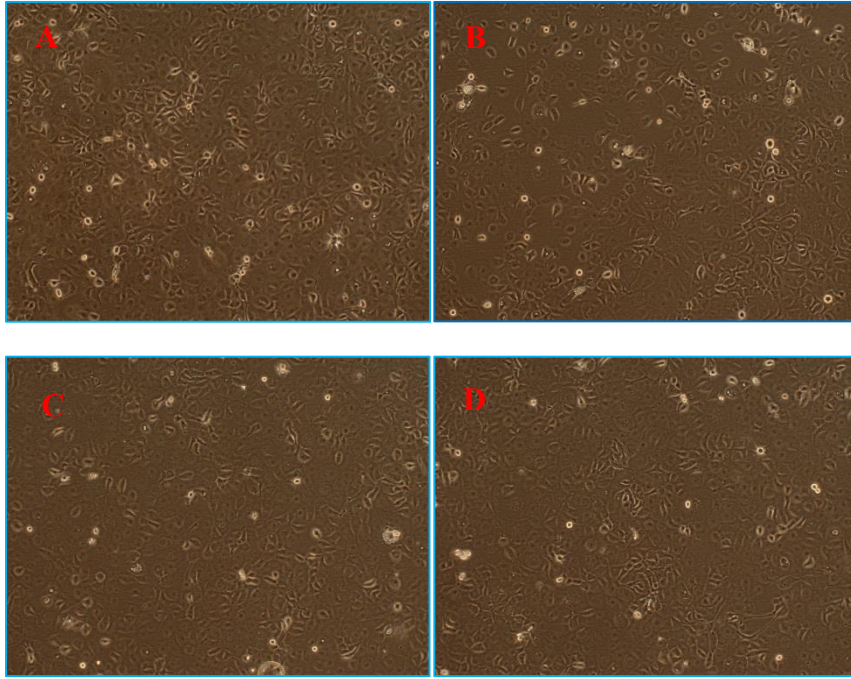
Şekil 6-37. B3 molekülünün 1H -NMR datası



Şekil 6-38. B3 molekülünün ¹H-NMR spektrumu

6.5.7. Sitotoksosite sonuçları

İzolasyonu ve yapı tayini yapılan moleküllerden iki tanesi (B2 ve B3) ile siklopamin bileşiğinin; MRC-5, LNCaP, U2OS, HCC1937 ve 293HEK hücre hatları üzerinde sitotoksiteleri WST-1 hücre proliferasyon reaktifi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmamız sonunda en yüksek doz olarak kullanılan 25 μ M dozda dahi hücre viabilitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Siklopamin, B2 ve B3 moleküllerinin en yüksek dozu olan 25 μ M ile birlikte kontrol olarak DMSO uygulanan hücrelerin mikroskopik görüntüleri HCC1937 hücre hatlarında morfolojik olarak da fark olmadığını göstermektedir (Şekil 6.39).



Şekil 6-39. HCC1937 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri: A; DMSO, B; 25 μ M siklopamin, C; 25 μ M B3, D; 25 μ M B2

Sitotoksosite deneyine daha önce laboratuvarımızda izole edilmiş ve sitotoksik olduğu bilinen ÖA7 kodlu madde de pozitif kontrol olarak dahil edilmiş ve bu maddenin HCC1937 duktal meme karsinoma hücre hattında IC50 değeri 8.737 ± 0.12 μ M olarak tespit edilmiştir (Tablo 6.1).

Çizelge 6.4. Moleküllerin IC₅₀ değerleri

MADDE	IC₅₀ (µM)
Siklopamin	> 25 µM
B3	> 25 µM
B2	> 25 µM
ÖA7	8.737 ± 0.12 µM

7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

7.1. Resveratrol Türevlerinin Eldesi

3,5,4' tri-hidroksistilben ya da resveratrol, sınırlı bitki türlerinde üretilen sekonder bir metabolittir. Resveratrol kelime kökeni olarak; Latince ön ek 'Res' (İngilizce from; Türkçe –den anlamına gelmektedir.), *Veratrum* bitkisinin adını belirtebilmek için 'verat' ve alkol gruplarını barındırdığını gösteren son ek 'ol' hecelerinden oluşmaktadır. *Veratrum* türlerinden özellikle de; *Veratrum grandiflorum* bitkisinden resveratrol ve analogları izole edilmiştir. Birçok çalışmada, resveratrolün kanser, viral enfeksiyon, nörodejeneratif ve Alzhemir gibi önemli hastalıkların patolojisinde koruyucu ajan olduğu rapor edilmiştir. Tümörden türetilmiş çeşitli hücre hatlarındaki in vitro çalışmalarda resveratrolün proliferasyonu durdurduğu gösterilmiştir. (Delmas, Lancon et al. 2006).

Akciğer fibroblastı olan MRC-5 hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, resveratrolün DNA'nın oksidatif hasarına karşı koruyucu etki gösterdiği ve senesensle ilişkili nükleer boyutta ve DNA içeriğindeki artışı azalttığı rapor edilmiştir. MRC-5 hücre hattının ikilenme süresi üzerinde yapılan çalışmada ise hücrenin ömrünü uzattığını belirlemişlerdir. (Giovannelli, Pitozzi et al. 2011).

A2 kodlu maddenin ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde 60/40 oranında bir karışım olduğu fark edilmiştir. Spektruma detaylı bakıldığında, moleküllerin oxyresveratrol türevi monoglikozidik yapılar olduğu öngörülmüştür. Bu yargıya aromatik bölgede gözlenen simetrik 1,3,5-trisüstitüe benzen, 1,2,4-trisüstitüe benzen, disüstitüe trans-olefinik sistem sinyalleri ve 7.6 Hz yarılmaya sahip anomerik proton rezonansından hareketle varılmıştır (Şekil 6.18 ve Şekil 6.20).

Veratrum album üzerinde Aydın ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada elde edilen oxyresveratrol 3-*O*- β -D-glucopyranoside molekülü ile elde ettiğimiz karışımdaki majör bileşenin kimyasal kayma değerlerinin tam olarak örtüştüğü görülmüştür.

Minör bileşiğin ise glikozidasyon noktasının farklı olduğu düşünülmüştür. Bu noktada, 1,3,5-trisüstitüe aromatik halkaya ait H-2 ve H-6 sinyallerinin özdeş rezonansa gelmesi, C3(OH) ve C5(OH) üzerinden glikozidasyon olmadığını ortaya koymuştur. Bu durum C2' veya C4' pozisyonundan şeker grubunun bağlandığına işaret etmiştir ki ¹H-NMR verilerimizin literatür ile karşılaştırması yapıldığında, *Schoenocaulon officinale* türünden elde edilen oxyresveratrol 2'-O-β-D-glucopyranoside ile tam olarak uyduğu saptanmıştır (Kanchanapoom, Suga et al. 2002)

Ayrıca, karışımın negatif mod LC-MS spektrumunda m/z 451'de [M+Cl]⁻ iyonunun gözlenmesi de önerilen yapıları doğrulamıştır.

Sonuç olarak A2 kodlu karışımımızdaki bileşenlerin yapısı oxyresveratrol 3-O-β-D-glucopyranoside ve oxyresveratrol 2'-O-β-D-glucopyranoside olarak tayin edilmiştir. Oxyresveratrol 2'-O-β-D-glucopyranoside, *Veratrum album* bitkisinden ilk defa izole edilmiştir.

A3 bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu simetrik bir 1,3,5-trisüstitüe ve 1,4-disüstitüe benzen halka sistemleri göstermiştir (Bakınız Şekil 6.22 ve Şekil 6.23) İlk sistem 6.09 ppm'de gözlenen (d, J=1.6 Hz) ve δ 6.36'da rezonansa gelen 2 protonluk bir dublet sinyalden (J=1.6 Hz) oluşurken, diğer aromatik halka AA'XX' sistem şeklinde 2 rezonans içermektedir [δ 7.36, d, J=8.4 Hz ve δ 6.73, d, J=8.4 Hz, her biri 2H). Bu sinyaller, ¹H-NMR spektrumunda görülen trans-olefinik sistem kökenli 6.78 ppm (d, J=16.8 Hz) ve 6.90 ppm (d, J=16.8 Hz) rezonansları ile birlikte değerlendirildiğinde bileşiğin kimyasal yapısının daha önce *V. album*'dan da bir kez rapor edilen resveratrol olduğu anlaşılmıştır (Takaoka, M., 1939.)

Sonuç olarak A3 bileşiğinin yapısı 1,3-benzenediol,5-[(1E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl] olarak tayin edilmiştir.

A5 kodlu maddenin ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde, simetrik bir 1,3,5-trisüstitüe benzen (δ 6.06, 1H, d, J=2.0 Hz; δ 6.32, 2H, d, J=2.0 Hz) ve 1,2,4-trisüstitüe benzen yapısı (δ 6.31, d, J=2.4 Hz; δ 6.22, dd, J=8.4,

2.4 Hz; δ 7.31, d, J=8.4 Hz, her biri 1H) ile birlikte disüstitüe trans-olefinik bir sistem gözlenmiştir (δ 6.75, d, J=16.4 Hz; δ 7.12, d, J=16.4 Hz) (Şekil 6.23., Ek 8.3). Bu verilerin yine Aydın et al. (2014) tarafından *V. album*'dan rapor edilmiş stilben yapısındaki oxyresveratrol ile tam uyum içinde olduğu görülmüştür (Aydın, Cakir et al. 2014).

Sonuç olarak A5 kodlu molekülün yapısı 4-[(1E)-2-(3,5-Dihydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol olarak tayin edilmiştir.

7.2. Steroidal Alkaloitin Eldesi

B3 kodlu maddenin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde Veratrum cinsinde sıklıkla karşılaşılan steroidal yapıda bir alkaloit öngörülmüştür. Nitekim bileşiğin İTK kromatogramlarında Dragendorf reaktifi ile alınan pozitif sonuçta alkaloit yapıyı doğrulamıştır.

Bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ 5.37'de gözlenen olefinik karakterdeki dublet sinyal C-6'ya, δ 2.17'de gözlenen singlet şeklindeki metil sinyali çift bağ üzerinde yer alan (C12-C13) Me-18 grubuna, 1.01 ppm'de görülen 3 protonluk singlet rezonans Me-19'a, δ 0.95 ve 0.97'de gözlenen dublet şeklindeki metil sinyalleri ise sırasıyla Me-27 ve Me-21'e literatür verileri ışığında hızlıca atanmıştır (Attaurrahman, Ali et al. 1992). Ayrıca, E ve F halkalarının kesişme noktasında δ 2.75'te triplet gözlenen H-22 ve tripletin dubleti şeklinde 3.34 ppm'de görülen karakteristik H-23 sinyali jervin-tipi bir steroidal alkaloite işaret etmiştir.

Bileşiğin LC-MS spektrumunda m/z 426'da saptanan $[\text{M}+\text{H}]^+$ verisi *Veratrum album*'dan saflaştırılan jervin isimli sekonder metabolit ile uyuşmuştur (Aydın et al., 2014).

Yapılan karşılaştırmada NMR verilerimizin jervine'in verileri ile tam olarak örtüşmesi (Şekil 6.36 ve Şekil 6.37) B3 molekülünün kimyasal yapısını saptamamızı sağlamıştır.

7.3. Şeker Türevi Moleküllerin Eldesi

A7 bileşiği, A8 ile tamamen benzer İTK görüntüsü sergilerken, silika jel plak üzerinde çok az apolar davranmıştır. LC-ESI-MS spektrumunda A8 ile aynı kütleyi verirken ($[M+Na]^+$ 216.9), 1H ve ^{13}C spektrumu yine bir mono-O-metil fructose türevine işaret etmiştir (Şekil 6.26, Şekil 6.27, Şekil 6.28 ve Şekil 6.29).

Bileşiğin ^{13}C -NMR verileri A8'ten farklı olarak 80 ppm'in üstünde iki rezonans gösterirken, katerner karakterdeki C-2'nin 109.5 ppm'e kaydığı görülmüştür. Literatür verileri ile özellikle karbon kimyasal kaymaları karşılaştırıldığında A7'nin A8 bileşiğinin izomeri olduğu ve kimyasal yapısının 2-O-methyl- α -D-fructofuranose olduğu anlaşılmıştır (Barrow, Collins et al. 1984).

A8 bileşiği *V. album* bitkisinin polar fraksiyonundan saflaştırılmıştır ve İTK üzerinde sergilemiş olduğu davranış (UV aktif olmaması ve asit püskürtme/ısıtma sonrası koyu kahverengi-siyah renge dönüşümü) bir şeker türevi olduğunu düşündürmüştür. LC-ESI-MS spektrumunda gözlenen $[M+Na]^+$ 216.9 iyonundan hareketle bileşiğin molekül formülü $C_7H_{14}O_6$ olarak belirlenmiştir.

A8'in 1H ve ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde (Şekil 6.31 ve Şekil 6.32), bir fruktoz türevi olabileceği öngörülmüştür. Bununla birlikte 1H -NMR spektrumunda 3.65 ppm'de görülen 3 protonluk metil singleti ve ^{13}C - NMR spektrumundaki δ 50.1 rezonansı yapıda bir O-metil grubu bulunduğunu göstermiştir (Şekil 6.33 ve Şekil 6.34). Bu durum MS spektrumundan gözlenen 14 amu'luk kütle artışını da açıklamıştır (MW Fructose:180).

Bileşiğin ^{13}C -NMR verileri ile literatür karşılaştırması yapıldığında şeker iskeletinin α -D-fructofuranoside ile örtüştüğü görülmüştür (Abreu, Pereira et al. 2001).

7.4. Biyoaktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

1930’larda *Veratrum* ekstraktları, insanlardaki yüksek kan basıncının tedavisi için kullanılmıştır. Tedavi edilen hastalar, bu ekstraktın dar terapötik indeksinden ötürü yan etkilerine maruz kalmışlardır. Toksisiteleri ve diğer daha az toksik olan ilaçların eldesi nedeniyle, yüksek kan basıncının tedavisinde *Veratrum* ekstraktlarının kullanımı devam etmemiştir (Schep LJ et al., 2006).

Amerika yerlileri ve endüstri devri öncesi Avrupalılar tarafından kurutulmuş *Veratrum* kökleri insektisit olarak kullanılmıştır. Geleneksel Çin tıbbında ise, eksternal parazitlerin öldürülmesi, mani, derideki kaşıntıları durdurmak, skabiyez tedavisi için kullanılmıştır (Li, Jiang et al. 2006).

20. yüzyılın ortalarında kendini trajik olarak gösteren ve araştırmalar sonucu keşfedilen *Veratrum* steroidal alkaloidleri, biyoaktivite çalışmaları için yoğun ilgi oluşturmıştır. Kanserin patogenizinde, Hh yolağı mutasyonlarının ve anormal aktivasyonunun payı kayda değer bir şekilde olduğu için; Hh yolağı inhibitörleri ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Siklopaminin zayıf farmokinetik özelliklerinden ötürü yarı sentez yolu ile elde edilen siklopamin türevlerinden IPI-926, GDC-0449 ve LDE225, klinik çalışmalara girmiştir.

Hh/GLI sinyal yolağı; farklı hücre tiplerinin birçoğunun farklılaşması ve proliferasyonun da dahil olduğu omurgalıların gelişiminde birçok açıdan önemli rol oynamaktadır. Omurgalı Hh ailesi 3 tane üyeden oluşmaktadır: sonic Hh (Shh), desert Hh ve indian Hh. Shh kapsamlı bir şekilde karakterize edilen omurgalı homologudur ve embriyonik gelişim sürecinde, özellikle birçok dokunun hücre proliferasyonunun indüklenmesi için önemlidir (Ingham and McMahon 2001) (Takahiro et al.,2008).

Gelişimdeki kritik rolünün yanında; erişkin dokulardaki anormal Hh/GLI sinyali, deride, prostatta, üst gastrointestinal boşlukta, pankreasta ve akciğerde kanser oluşum ve gelişimine sebep olmaktadır. Bazal hücre karsinomu ve medullablastoma gibi insan tümörlerinin birçoğunda, Hh/GLI

sinyali PTCH1 ya da SMO'daki mutasyonlardan kaynaklı aktive olmaktadır. Bu nedenle; Hh/GLI sinyal yolağının son basamağı olan GLI fonksiyonunu bozmak, SMO ya da PCTH1'daki mutasyonlardan oluşan kanserlerin tedavisi için iyi bir hedef olabilir (Takahiro et al., 2008).

B3, siklopaminin (Cayman Chemical, Katalog no: 4449-51-8) ve yapısı tam olarak belirlenemeyen B2'nin ana stoğu 12,5 mM hazırlanmıştır ve dilüsyonları yapılmıştır. B2 ve B3 molekülleri DMSO'da iyi bir şekilde çözülebilmektedir. Fakat 12,5 mM siklopamin için çözünürlük problemi yaşanmıştır. Çözünürlük problemini aşabilmek için ultrasonik banyo (1 saat) kullanılmıştır. Komponentler, hücrelere uygulanmasından önce, hücre ortamında dilüsyonu yapılmıştır. Bu aşamada, siklopaminin en yüksek dozunu oluşturan 25 μ M'da çökelme gözlenmiştir. B2 ve B3 moleküllerinde herhangi bir çözünürlük ve çökelme problemi yaşanmamıştır. Siklopamin, kuvvetli bir Hh yolağı inhibitörü olmasına rağmen zayıf farmokinetik ve çözünürlük problemlerinden ötürü sitotoksikite çalışmalarında ölüm gözlenmemiştir. Siklopaminin bu zayıf farmokinetik özelliği, klinik çalışmalara girmesini engellemiştir. Bu durum çözünürlük probleminden kaynaklanabilir. MSDS verilerine göre, siklopamin, DMSO ve etanolde çözünmektedir (Maksimum 10 mM). Etanoldeki çözünürlük denemesinde de aynı problem yaşanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre *Veratrum album* siklopamin içeriği yönünden *Veratrum californicum* kadar zengin olmadığından bu açıdan ticari değildir.

8. ÖNERİLER

Çalışma sürecinde yeterli miktarda elde edilemeyen ve henüz tamamlanmamış moleküllerin izolasyonları tamamlanmalıdır. Böylece miktar arttırma ile hem yapı tayinleri yapılabilir hem de ileri modifikasyonlar için moleküller kullanılabilir. Yapı tayinleri gerçekleştirilen moleküllerden B3'ün sitotoksik etkileri farklı hücre hatlarında (Pankeas kanseri hücre hatları) çalışılarak etkinliği belirlenebilir.

Ayrıca elde edilen resveratrol ve analoglarının yara iyileştirme özellikleri (kombinasyon uygulamalar ile), anti-oksidad, anti-mikrobiyal ve telomeraz enzimi aktivasyonu üzerindeki etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abreu, P., Pereira, A. and Relva, A.,** 2001, Characterisation of a sugar fraction from *Sarcocephalus latifolius* stem bark extract, *Carbohydrate Polymers*, 45(2): 155-160pp.
- Atta-ur, R., Ali, R. A., Choudhary, M. I., Sener, B. and Turkoz, S.,** 1991, Alkaloids from *Veratrum album*, *Phytochemistry*, 30;368pp.
- Atta-ur, R., Ali, R. A. and Choudhary, M. I.,** 1992, New Steroidal Alkaloids from Rhizomes of *Veratrum album*, *Journal of Natural Products*, 55(5): 565-570pp.
- Atta-Ur, R., Ali, R.A., Ashraf, M., Choudhary, M.I., Sener, B. and Turkoz, S.,** 1996, Steroidal Alkaloids *Veratrum album*, 43(4): 907-91pp.
- Aydin, T., Cakir, A., Kazaz, C., Bayrak, N., Bayir, Y. and Taskesenligil, Y.,** 2014, Insecticidal Metabolites from the Rhizomes of *Veratrum album* against Adults of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, *Chemistry & Biodiversity*, 11(8): 1192-1204pp.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S. and Bollinger, W. H.,** 1985, Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials, *Science* 228: 1154-60pp.
- Barrow, K. D., Collins, J. G., Rogers, P. L. and Smith, G. M.,** 1984, The Structure of a Novel Polysaccharide Isolated from *Zymomonas mobilis* Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *European Journal of Biochemistry*, 145(1): 173-179pp.
- Berman, D. M., et al.,** 2003, Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours, *Nature*, 425(6960): 846-851pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E.,** 2001, Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science*, 161(5) 839–851pp.
- Butler, M.S.,** 2004, The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery, *J. Nat. Prod.*, 2004, 67 (12), 2141-2153pp.
- Che, J., Zhang, F.Z., Zhao, C.Q., Hu, X.D. and Fan, S.J.,** 2013, Cyclopamine is a novel Hedgehog signaling inhibitor with significant anti-proliferative, anti-invasive and anti-estrogenic potency in human breast cancer cells, *Oncology Letters* , 5(4): 1417-1421pp.
- Corbit, K. C., Aanstad, P. Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. R. and Reiter, J. F.,** 2005, Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium, *Nature*, 437(7061): 1018-1021pp.
- Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B. and Latruffe, N.,** 2006, Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer, *Current Drug Targets* 7(4): 423-442pp.
- El Sayed, K.A., Mcchesney, J.D., Halim, A.F., Zaghoul, A.M. and Voehler, M.,** Two steroidal alkaloids from *Veratrum viride*, *Phytochemistry*, 38(6): 1547-1550pp.
- Fan, L., Pepicelli, C. V., Dibble, C. C., Catbagan, W., Zarycki, J. L., Laciak, R. and Gipp, J.,** 2004, Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth, *Endocrinology* 145(8): 3961-3970pp.
- Grancai, D., Suchy, V., Tomko, J. and Dolejs, L.,** 1986, *Veratrum* alkaloids: Rhamnoveracintine-a new glycoalkaloid from *Veratrum album ssp. Lobelianum (BERNH) Suessenguth*, *Chem. Pap.*, 40(6): 835–838.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Giovannelli, L., Pitozzi, V., Jacomelli, M., Mulinacci, N., Laurenzana, A., Dolara, P. and Mocali, A.,** 2011, Protective Effects of Resveratrol Against Senescence-Associated Changes in Cultured Human Fibroblasts, Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences, 66(1): 9-18pp.
- Heretsch, P., Lito, T. and Athanassios, G.,** 2010, "Cyclopamine and Hedgehog Signaling: Chemistry, Biology, Medical Perspectives, Angewandte Chemie-International Edition, 49(20): 3418-3427pp.
- Irsch, E.M., Pachaly, P., Breitmaier, E. and Sin, K.S.,** 1993, Alkaloids from Veratrum patulum, Part 1: Isolation and Structure Elucidation of New Steroid Alkaloid Glycosides, CHEMINFORM 24(27):272-283pp.
- Hussain S., M.S, Fareed, S., Ansari, S., Rahman, A., Ahmad, I.Z. and Saeed, M.,** 2002, Current approaches toward production of secondary plant metabolites, J Pharm Bioallied Sciencie, 4(1): 10–20pp.
- Ingham, P. W. and McMahon, A. P.,** 2001, Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles, Genes & Development, 15(23): 3059-3087pp.
- Jacob, J.E.,** 2009, Natural Products-Based Drug Discovery: Some Bottlenecks and Considerations, Current Science, 96(6): 753-754pp.
- Johnson, R. L., et al.** (1996). "Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome." Science **272**(5268): 1668-1671.
- Kanchanapoom, T., Suga, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Kamel, M.S. and Mohamed, M.H.,** 2002, Stilbene and 2-arylbenzofuran glucosides from the rhizomes of Schoenocaulon officinale, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 50(6): 863-865pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Lahlou, M.**, 2013, The Success of Natural Products in Drug Discovery, Pharmacology & Pharmacy, 4:17-31pp.
- Liang G.Y. and Sun N.J.**, 1984, Chemical studies on active principles of *Veratrum stenophyllum*. III. Studies on the structure of beta 1-chaconine and the partial structures of stenophylline C and stenophylline D, Yao Xue Xue Bao., 19(6):431-6pp.
- Liang G.Y. and Sun N.J.**, 1984, Distribution of Alkaloids in Traditional Chinese Medicinal Plants Acta Pharm. Sin., 19, 131.
- Li, H.J., Jiang, Y. and Li, P.**, 2006, Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the Liliaceae family, Natural Product Reports, 23(5): 735-752pp.
- LoRusso, P. M., Rudin, C.M., Reddy, J.C., Tibes, R., Weiss, G.J., Borad, M.J., Hann, C.L., Brahmer, J.R., Chang, I., Darbonne, W.C., Graham, R.A., Zerivitz, K.L., Low, J.A. and Von Hoff, D.D.**, 2011, Phase I Trial of Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449) in Patients with Refractory, Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors, Clinical Cancer Research 17(8): 2502-2511pp.
- Mahindroo, N., Punchihewa, C. and Fujii, N.**, 2009, Hedgehog-Gli Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Agents, Journal of Medicinal Chemistry, 52(13): 3829-3845pp.
- Maun, H. R., Wen, X., Lingel, A., de Sauvage, F.J., Lazarus, R.A., Scales, S.J. and Hymowitz, S.G.**, 2010, Hedgehog Pathway Antagonist 5E1 Binds Hedgehog at the Pseudo-active Site." Journal of Biological Chemistry, 285(34): 26570-26580pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- McMillan, R. and Matsui, W.**, 2012, Molecular Pathways: The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer." *Clinical Cancer Research*, 18(18): 4883-4888pp.
- Mohler, J.**, 1988, Requirement for Hedgehog , a Segmental Polarity Gene, in Patterning Larval and Adult Cuticle of *Drosophila*, *Genetics*, **120**(4): 1061-1072pp.
- Nussleinvolhard, C. and Wieschaus, E.**, 1980, Mutations Affecting Segment Number and Polarity in *Drosophila*, *Nature*, 287(5785): 795-801pp.
- Ruch, J. M. and Kim, E. J.**, 2013, Hedgehog Signaling Pathway and Cancer Therapeutics: Progress to Date, *Drugs*, 73(7): 613-623pp.
- Shakirov, R., Nakhatov, I. and Yunusov, S.Y.**, 1984, tructure of verdine, *Chemistry of Natural Compounds*, 20(3):375-376pp.
- Samikov, K., Shakirov, R. and Yunusov, S.Y.**, 1971, Alkaloids of *Veratrum lobelianum* the structure of germinaline, *Chemistry of Natural Compounds*, 7(6): 762-764pp.
- Stanton, B. Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M., Lee, S.W., Koehler, A.N., Chen, J.K., Fox, J.L., Mandinova, A. and Schreiber, S.L.**, 2009, A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells, *Nature Chemical Biology*, 5(3): 154-156pp.
- Theunissen, J.W. and de Sauvage, F. J.**, 2009, Paracrine Hedgehog Signaling in Cancer." *Cancer Research* , 69(15): 6007-6010pp.
- Tremblay, M. R., et al.**, 2008, Semisynthetic Cyclopamine Analogues as Potent and Orally Bioavailable Hedgehog Pathway Antagonists, *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(21): 6646-6649pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Visvader, J. E. and Lindeman G. J.,** 2008, Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." *Nature Reviews Cancer*, 8(10): 755-768pp.
- Williams, J. A., Guicherit, O.M., Zaharian, B.I., Xu, Y., Chai, L., Wichterle, H., Kon, C., Gatchalian, C., Porter, J.A., Rubin, L.L. and Wang, F.Y.,** 2003, Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: Effects on basal cell carcinoma-like lesions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8): 4616-4621pp.
- Zhao, W.J.,** 1986, Chemical studies of the alkaloids of *Veratrum maackii*, *Zhong Yao Tong Bao.*, 11(5):38-9pp.

ÖZGEÇMİŞ

ADI-SOYADI: Sinem YILMAZ

DOĞUM YILI: 1986

İLETİŞİM: yilmaz.sinem.ege@gmail.com

EĞİTİM DURUMU:

Yüksek Lisans (2013-2015): Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Lisans (2007-2011): Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi

Biyomühendislik Bölümü