

**NERIUM OLEANDER'İN BAZI
SUDA ÇÖZÜNEN BİLEŞİKLERİNİN
in vitro BİYOLOJİK ETKİLERİ**

Ecz. Bülent ERGUN

**Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Farmakoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Farmakoloji ve Toksikoloji Bilim Dalında
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

Danışman: Prof.Dr. Muzaffer TUNÇEL

Nisan 1992

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bülent Ergun'un DOKTORA tezi olarak hazırladığı "*Nerium oleander*'in Bazı Suda Çözünen Bileşiklerinin *in vitro* Biyolojik Etkileri" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

16.10.1992

Üye: Prof.Dr. İhsan SARIKARDAŞOĞLU (imza)

Üye: Prof.Dr. Mustafa TUNCEL (imza)

Üye: Doç.Dr. Asuman KARAKAYA (imza)

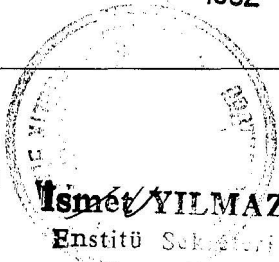
Üye: Doç.Dr. Sema BURGAL (imza)

Üye: Doç.Dr. Yusuf ÖZTÜRK (imza)

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...28.04.1992... gün ve ...180/452... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ASLI GİBİDİR

28.04.1992



(imza)
Enstitü Müdürü

Prof.Dr. Nurettin BASARAK

ÖZET

Bu çalışmada, dünyanın değişik bölgelerinde halk arasında bazı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan *Nerium oleander* bitkisinin kanser hastalığı üzerindeki terapötik etkisi incelenmiştir.

Bu amaçla, Muğla yöresinden toplanan bitkinin taze yaprakları su ile kaynatılarak elde edilen sulu ekstre diyalize tabi tutulmuştur. Diyalizat liyofilize edildikten sonra metanol ile muamele edilip metanole geçenler ayrılmıştır. Metanol fazı kolon kromatografisi yöntemiyle fraksiyonlara ayrılmış ve ince tabaka kromatografisi ile fraksiyonların içerdiği maddeler incelenerek steroid, flavonoid ve terpenoid yapıda oldukları saptanmıştır. Bu maddelerin laboratuvar koşullarında, *in vitro* ortamda tümör nekroz faktörü (TNF) testi ile, tümör hücrelerine karşı sitotoksikite için makrofajları aktive edici etkileri araştırılmıştır.

TNF testinin mikroskopik ve spektrofotometrik verilerine dayanılarak; flavonoid yapıdaki maddelerin tümör hücreleri üzerinde anlamlı bir sitotoksitenin oluşmasında etkili olmadıkları, steroid ve terpenoid yapıdaki maddelerin test koşullarında uygulanan bazı konsantrasyonlarda, makrofajları TNF salınımı için indükleyerek tümör hücreleri üzerinde zayıf bir sitotoksik etki oluşmasına neden oldukları sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apocynaceae, *Nerium oleander*, Kolon kromatografisi, Tümör nekroz faktörü, Antikarsinojenik aktivite.

SUMMARY

The anticarcinogenic activity of *Nerium oleander* plant, which is used world wide among folks of various regions for curing some cancer types, was investigated in this study.

For this purpose, the aqueous extract obtained by boiling the fresh leaves of the plant collected from Muğla region was dialyzed. Dialysate, after its lyophilization, was treated with methanol and the methanolic phase was separated. This phase was fractionated by column chromatography method and the contents of the fractions were analyzed using thin-layer chromatography. It was determined that the steroid, flavonoid and terpenoid structures were included in the content. The macrophage activating effect of those constituents for cytotoxicity on tumor cells were examined *in vitro* at the laboratory conditions using tumor necrosis factor(TNF) assay.

Depending on the microscopic and spectrophotometric data of TNF assay, it was concluded that: flavonoid materials do not seem to produce any significant cytotoxicity on the tumor cells while some concentrations of steroid and terpenoid materials applied at test conditions exhibit weak cytotoxic activity on tumor cells by inducing macrophage cells for the release of TNF.

Key Words: Apocynaceae, *Nerium oleander*, Column chromatography, Tumor necrosis factor, Anticarcinogenic activity.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında büyük bir anlayış ve iyi niyetle her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Hocam, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Bilimler Bölümü ve Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Muzaffer TUNÇEL'e,

Çalışmalarım için gerekli izini veren ve her konuda maddi manevi desteğini esirgemeyen Hocam, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. İhsan SARIKARDAŞOĞLU'na,

Teşvik ve yardımlarıyla çalışmalarına yön veren ve olanak sağlayan Hocam, Eczacılık Meslek Bilimleri Bölüm Başkanı ve Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. K. Hüsnü Can BAŞER'e,

Bilimsel danışmalarında bana kıymetli zamanlarını ayıran Hocam, Sayın Doç. Dr. Asuman KARAKAYA'ya,

Sonsuz maddi ve manevi desteklerinden dolayı Sayın Dr. İsmail CARBIK'a,

Anlayış ve sabırla her zaman yanımda olan eşim Şükran ERGUN'a

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KURAMSAL KISIM	2
2.1. Bitkinin Yeryüzünde Yayılışı	2
2.2. Bitkinin Dış Görünüşü ve Botanik Özellikleri	2
2.3. Bitkinin İçerdiği Kimyasal Bileşikler	3
2.3.1. Tarihçe	4
2.4. Farmakolojik Etkileri	6
2.4.1. Bitkinin geleneksel tıpta kullanımı	7
2.5. Toksikolojik Özelliği	8
2.5.1. Zehirlenme semptomları	9
2.5.2. Zehirlenmenin tedavisi	10
2.6. İmmün Sistem ve Kanser	11

İÇİNDEKİLER (devam)

SAYFA

2.6.1. Tümör nekroz faktörü	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	13
3.1. Gereç	13
3.1.1. Kullanılan bitkisel materyel ve immünolojik çalışma materyeli	13
3.1.2. Kimyasal madde ve çözeltiler	14
3.1.3. Kültür ortamı çözeltileri	15
3.1.4. Kullanılan aygıtlar	15
3.2. Yöntemler	16
3.2.1. Analitik çalışmalar	16
3.2.1.1. Ekstraksiyon	16
3.2.1.2. Gel filtrasyon	17
3.2.1.3. İTK araştırmaları	18
3.2.2. İmmünolojik çalışmalar	19
3.2.2.1. Besiyeri hazırlanması	19
3.2.2.2. Hücre pasajı	20
3.2.2.3. Neubauer odacığında hücrelerin sayılması	21
3.2.2.4. Tümör nekroz faktörü testi	21
3.2.2.4.1. Makrofaj hücrelerini elde etme yöntemi	21
3.2.2.4.2. Makrofaj hücre kültürü	22
3.2.2.4.3. L-929 fibroblast hücre kültürü	23
3.2.2.4.4. Makrofaj hücrelerinin üzerine test maddelerinin verilmesi	23
3.2.2.4.5. L-929 fibroblast hücrelerin boyanması	24

İÇİNDEKİLER (devam)

SAYFA

3.2.2.4.6. Makrofaj kültürlerinin üst kısımlarının L-929 fibroblast hücrelere aktarılması ..	24
3.2.2.4.7. Sonuçların değerlendirilmesi	25
3.2.2.4.8. TNF testinin şematik gösterimi	25
4. BULGULAR	26
4.1. Sephadex LH-20 Kolondan İnen Fraksiyonların Birleştirilmesi	26
4.2. İTK Sonuçları	27
4.3. TNF Testi Sonuçları	32
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	34
KAYNAKLAR DİZİNİ	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
3.2.2.3. Neubauer hücre sayma odacığının bir bölmesi	21
3.2.2.4.4. Çok gözlü doku kültür tabağı	24
4.1. Sephadex LH-20 kolona verilen metanol fazının UV ve refraktometre detektörlerince saptanan spektrumu	27
4.2.1. Fraksiyonların Etilasetat : Metanol : Su (81 : 11 : 8) sistemindeki kromatogramı	28
4.2.2. Fraksiyonların Metanol : Kloroform : Su (64 : 40 : 8) sistemindeki kromatogramı	29
4.2.3. Fraksiyonların Etilasetat : Formik asit : Asetik asit : Su (100: 11: 11: 27) sistemindeki kromatogramı	30
4.2.4. Fraksiyonların Toluol : Etilasetat : Asetik asit (12 : 4 : 0.5) sistemindeki kromatogramı	31
4.3.2. TNF testi sonuçlarının spektrofotometrik değerlendirmesinde, absorbans değerlerinin konsantrasyona karşı çizilen grafiği	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
2.5. Farklı türler için <i>N. oleander</i> 'in letal dozları	9
4.3.1. TNF testi sonunda fraksiyonların verildiği gözlerde okunan absorban değerleri ve madde konsantrasyonları	32

1. GİRİŞ VE AMAÇ

N. oleander L. (Apocynaceae) bitkisi çok eski çağlardan beri dünyanın çeşitli bölgelerinde, halk arasında değişik hazırlanma şekilleri ile çeşitli hastalıkları tedavi etmede kullanılmıştır(42). Bazı kaynaklarda bitkinin, içerdiği digital benzeri glikozitlerden dolayı kalp kuvvetlendirici ve diüretik etkilere sahip olduğu gösterilmektedir(35,42,53).

Bitkinin toksik özelliği Hippokrates'ten beri bilinmekte olup, çok eski çağlarda Yunan yazarlar tarafından belirtilmiştir(43,53). Yakın geçmişte yapılan bazı araştırmalarda Apocynaceae familyasının, *N. oleander*'i de kapsayan bir kaç türünün kanser tedavisinde etkin olduğu belirtilmekte ve dünyanın değişik bölgelerinde, halk arasında bazı kanser türlerinde kullanıldığına işaret edilmektedir(14,22).

Son yıllarda yapılan immünolojik araştırmalar, bağışıklık sistemindeki bir grup endojen maddenin kanser tedavisinde oldukça çarpıcı etkileri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Makrofajlar ve lenfositler tarafından *in vivo* olarak üretilen ve sitokinler adı verilen bu doğal sitotoksik etkili endojen maddelerden birisi de TNF'dir(25,28,33). Bu konudaki çalışmalar, bitkisel kaynaklı bazı bileşiklerin sitotoksik etkilerini, makrofaj aktivasyonunu sağlayarak TNF salınımı sonucunda gösterdiklerini ortaya koymuştur(6,30,33).

Bu çalışmada *N. oleander* bitkisinin içerdiği aktif maddelerde, antikarsinojenik aktivitenin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bitki, halk arasında çeşitli şekillerde hazırlanarak kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu yüzden üzerinde çalışılmasının yerinde olacağı fikri ile bu çalışmaya konu olarak seçilmiştir. Bitkinin Muğla yöresinden toplanan taze yaprakları su ile kaynatılarak aktif maddeler suya geçirilmiştir. Sulu ekstre diyaliz edilmiş ve diyalizat kısmı alınarak liyofilize edildikten sonra metanolde çözülmüştür. Metanole geçen kısım kolon kromatografisi ile fraksiyonlara ayrılarak bu fraksiyonların;

(a) İTK yöntemi ile içerdiği maddeler, (b) bu maddelerin, tümör nekroz faktörü (TNF) testi ile laboratuvar koşullarında *in vitro* ortamda, makrofajları tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösteren TNF salınımı için stimüle edebilme etkisi araştırılmıştır.

2. KURAMSAL KISIM

2.1. Bitkinin Yeryüzünde Yayılışı

N. oleander L. 160 cins ve 1000'in üzerinde türü kapsayan Apocynaceae familyasının bir üyesidir(43). Dünya üzerinde geniş yayılım alanı olan bitki, başlıca Akdeniz bölgesi ülkeleri Afrika ülkelerinin çoğu, Asya, Güney Amerika ve ABD'nin güneyinde yabani olarak yetiştiği gibi park ve bahçelerde süs bitkisi olarak da yetiştirilmektedir(3,5,10,14,22,35,38,39,42,43,53). Familya tedavi ve toksikoloji yönünden önemli olan birçok bitkiyi içermektedir(4).

Değişik ülkelerde halk arasında Kaner, Rose laurel, İlili, Berberia, Difla, Adelfa, Ward el-himar, Somm el-himar, Alelia, Sea-side rose, Rosa francesca, Sweet-scented oleander, Laurier-rose isimleriyle bilinen bitki, Türkiye'de Ağaçiçeği, Kan ağacı (Muğla), Zakkum, Zıkkım ağacı gibi isimler almaktadır(3,5,10,14,22,38,42).

Bitkinin Türkiye'de yayıldığı bölgeler İstanbul, Gemlik (Marmara), İzmir, Balıkesir, Burhaniye, Akhisar, Aydın, Köyceğiz (Ege), Samsun (Karadeniz), Tarsus, Adana, Antakya-Amik ovası, İskenderun-Antakya yolunun iki kenarı (Akdeniz) olup özellikle sulak yerlerde yetişmektedir(2).

2.2. Bitkinin Dış Görünüşü ve Botanik Özellikleri

N. oleander Haziran-Eylül arasında çiçek açan, 2-6 m yüksekliğinde, kışın yapraklarını dökmeyen bir ağaççıktır. Gövdesi silindirik biçiminde, esmer renkli ve diktir. Yaprakları mızrak biçiminde sivri uçlu, kısa saplı, bazen karşılıklı, fakat genellikle vertisilattır. 1-3 cm genişlik ve 6-30 cm uzunluktadır. Orta damar alt yüzde dışarı doğru çıkık, yan damarlar orta damara hemen hemen dikey ve birbirlerine paralel, her iki yüzde tüysüz ve derimsidir, Üst yüzü koyu, alt yüzü ise açık yeşil renklidir. Kokusuz ve keskin

lezzetli olup bir nodusta 3-4 yaprak bulunur. Lamina uzunca, oval şekilli tam ve serttir. Çiçekler dal uçlarında toplanmıştır. Kaliks küçük koyu kırmızı renkli ve 5 sivri dişlidir. Korolla 5 parçalı pembe veya kırmızı nadiren beyaz renklidir. Pembe olanların üzerinde beyaz lekeler bulunur. Tüp şeklinde ve üst taraftan muntazam olmayan 5 parçalıdır. İç kısmında sivri lopları olan 5 parçalı ikinci bir korolla daha bulunur. Erkek organlar 5 tane, anterleri ok şeklinde, uçları tüylü ve bir arada stigmaya yapışıkır. Filamenti kısa ve beyaz renklidir. Ovarium 2 karpelden meydana gelmiş, tek meskenli ve çok tohumludur. Kısa bir stilusu, sarımsı renkli ve silindir şekilli bir stigmatı vardır. Meyva 10-15 cm. uzunluğunda bir kapsül olup karpellerin birleştiği yerden kıvrılarak açılır. Tohumları uzunca-oval şekilli ve esmer renkli olup tepesinde bir tüy demeti taşımaktadır(2,3,4).

2.3. Bitkinin İçerdiği Kimyasal Bileşikler

Bitkinin farklı kısımlarından çeşitli araştırmalar sonucunda glikozitler, steroidler, terpenoidler, polisakkaritler ve diğer bileşikler kapsayan yaklaşık 200 madde izole edilmiştir(6,42).

Bitkideki bileşiklerin %0.049'unu kateşik bileşikler, %0.014'ünü steroller, %4,3'ünü ursolik asit teşkil etmektedir. Ayrıca az miktarda uçucu yağ, sapogenin, siyanogenetik glikozit, flavon glikozitleri, vitamin C (%28,8 mg), eser miktarda Vitamin K ve karoten bulunduğu bildirilmektedir(10,53).

N. oleander yaprakları farmakolojik etkili, 2 glikozit grubu içermektedir. Bunların steroid glikozitler ve flavon glikozitleri oldukları belirtilmiştir(18,19). Bitkideki başlıca kardiak glikozit, oleandrin olarak adlandırılmıştır(4,16,17,20,35,42,49). Diğer glikozitlerden bazıları neriin, folinerin, rosagenin, kornevin, psödokuranin, rutin, kortenerin, oleandomisin, adinerin, isoadinerin, oleandrin-4, oleandrin-6, desasetil oleandrin, neriin D, neriin E (16-diasetilanhidro-oleandrin), neriin F (16-anhidrogitoksigenin), neriantin, odorosid A, odorosid H, neritalosid, gitoksigenin, strospesid ve ürekitoksindir(1,10,53,54).

Kabuklarda; kortenerin (yapıca folinerin'e çok benzer fakat optikçe inaktif olup folinerin'in 1/3 ü toksisiteye sahiptir), rosagenin (çok zehirli olup etki yönünden striknin'e benzer) ve neriin isimli glikozitlerin varlığı belirtilmiştir. Kabuklar ayrıca uçucu ve sabit yağ ile reçinemsî bir bileşik içermektedir. Çiçeklerde %0.03 oranında uçucu yağ bulunur. Tohumlar %17,43 yağ ile bir sitosterol ve birçok glikozit içermektedir(2,16,53). Yapraklar ve çiçekler hidrosiyamik asit içermektedir(10,53). Yapraklarda ayrıca reçine, tanen, glukoz ve steroid glikozitler de bulunmaktadır(2,4).

Oleandrin, oleandroz olarak da bilinir(53). Hidroliz sonucu aglikon olarak oleandrigenin (16-asetildigitoksigenin) ve şeker olarak da L-oleandroz vermektedir(2, 4,49). Oleandrin monosittir ve gitosigenin'in 3-glikozit-16-asetil türevidir(8,16,31). Steroid yapıdaki glikozitlerden adinerin'in γ -14-epoksikardenolid yapısında olduğu gösterilmiştir(55). Adinerin'in şeker kısmı D-diginoz olarak belirtilmiştir(46).

Bitkinin farklı kısımlarının ekstraktları üzerinde yapılan İTK analizleri sonucunda oleandrin ve neriin'in bütün organlarda, adinerin'in ise sadece yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve sap kısmında bulunduğu açıklanmaktadır(26).

2.3.1. Tarihçe

Bitkinin yapraklarında bulunan steroid glikozitlerin Schmiedeberg(1883) adlı bir araştırmacı tarafından açıklanarak neriin, oleandrin ve neriantin olarak isimlendirildiği Görlich (18) tarafından ifade edilmektedir. Tschesche ve arkadaşları (45), araştırmalarında steroid glikozitleri; oleandrin, desasetil oleandrin, adinerin ve neriantin olarak tanımlamışlardır. Görlich(16), bitkinin kurutulmuş yapraklarından suda çözünebilir glukoz-oleandrin olarak belirttiği oleandrin monoglukozit ve oleandrin diglukozit'i izole etmiştir.

Hörhammer ve arkadaşları(24), yaprakların metanol ekstresinden izole ettikleri flavon glikozitlerini, kuersetin-3-ramnoglukozit (rutin) ve kampferol-3-ramnoglukozit

olarak açıklamışlardır.

Duret(11), çalışmasında yapraklarda kafeik, p-kumarik ve klorojenik asitlerin varlığını göstermiştir. Paris ve Duret(34), Apocynaceae bitkileri üzerinde yaptıkları bir çalışmada yapraklardaki flavon miktarının en çok *N. oleander*'de bulunduğunu belirtmişlerdir.

Tschesche ve arkadaşları(47), yaprakların alkol ekstresinden gitoksigenin, odorosid H (digitoksigenindigitalozit), neritalosid (oleandrişenindigitalozit), ürekitoksin (oleandrinmonoglukozit), ve strospeşid isimli glikozitleri izole etmişlerdir.

Dominguez ve arkadaşları(9), çiçeklerden petrol eteri ekstraksiyonu ile β -sitosterol'ü izole etmişler ve İTK ile tanımlamışlardır.

Elgamal ve Fayez(13), İTK ile yapraklarda triterpenoid asitlerin (oleanolik asit, ursolik asit, betulinik asit) varlığını göstermişlerdir.

Karawya ve arkadaşları(27), büyümenin değişik basamaklarında, bitkinin farklı organlarındaki adinerin, oleandrin ve total kardenolidlerin miktarlarını saptamışlardır.

Tittel ve Wagner(44), farklı orijinli *Nerium* yapraklarındaki kardiyak glikozitlerin kalitatif ve kantitatif tayinlerini yapmışlar ve glikozit miktarlarının farklı olduğunu göstermişlerdir.

Hiermann ve arkadaşları(23), yaprakların metanol ekstresinden 2 flavon glikozit'i; izokuersitrin (kuersetin-3-o-glukopiranozit) ve kuersitrin (kuersetin-3-o-ramnozit) izole etmişlerdir.

Abe ve Yamauchi(1), kurutulmuş yaprakların metanol ekstresinden oleasid grubu glikozitleri (oleasid A, B, C, D, E, F) izole etmiş ve yapılarını açıklamışlardır.

Siddiqui ve arkadaşlarının(37,38,39,40,41), yaptıkları çeşitli çalışmalarda yaprakların metanol ekstresinden kumariloksi triterpenoidler (neriukumarik ve isoneriukumarik asit), kanerosid [3β -O-(D-diginosil)- 2α -hidroksi-8,14 β -epoksi-5 β -karda-16:17,20:22 dienolid] ve neriumosid [3β -O-(D-diginosil)- 2α , 14 β -dihidroksi-5 β -karda-16:17, 20:22 dienolid] isimli 2 kardiyak glikozit, kanerin [24-nor- 3β ,5-

dihidroksiursa-4(23), 18-dien-28-oik asit] ve 12, 13-dihidroksiursolik asit [3β -hidroksiursa-28-oik asit] isimli pentasikliktriterpenler ve oleanderolik asit [3β -p-hidroksi-fenoksi-11 α -metoksi-12 α -hidroksi-20-ursen-28-oik asit], kanerodion [28-hidroksi-20(29)-lupen-3,7-dion], kanerosin [3α -hidroksi-urs-18, 20-dien-28 oik asit] isimli triterpenler izole edilmiştir.

Son yıllarda, bitkinin yapraklarından düz zincirli hidroksi asit türevleri olan nerifol ve neriumol izole edilmiştir(42).

2.4. Farmakolojik Etkileri

Çeşitli araştırmacı gruplar tarafından, *N. oleander* bitkisinin glikozitleri ve diğer bileşikleri üzerinde yapılan çalışmalarda, kardiyotonik etkinin varlığı gösterilmiştir(42). Yapraklar, çiçekler ve kabukların kardiyotonik, diüretik ve antibakteriyel etkiler taşıdığı belirtilmiştir(10,24, 38,39).

Bitki kardiak, kardiyotonik, siyanogenetik, diüretik, emetik, emanogog, insektisit, parazitisit, purgatif, aksırtıcı, stimulan ve tonik etkili olarak bilinmektedir(10).

Bitkideki ana bileşik olan oleandrin kardiyotonik ve diüretik etkili olup kalbi stimüle etmektedir. Oleandrin farmakolojik aktivite ve kimyasal yapı bakımından, digitalis glikozitlerine çok benzemektedir(5,42,53). Çabuk absorbe olduğu, bradikardi ve diürez'in 24 saat içinde gözlemlendiği belirtilmiştir. Vücuttan yavaş atılmaktadır. Kedilerde minimum letal dozun %50'sinin i.v. enjeksiyonunun 15 günde vücuttan atıldığı gözlenmiştir(43,53).

Oleandrin, neriin ve diğer digitoksin benzeri glikozitlerin kardiak bozuklukların tedavisinde, digitalis ve oubain'in yerine başarıyla kullanılabilir olduğu söylenmektedir(43,53). Uterus üzerinde oleandrin'in küçük dozlarda kontraksiyonu inhibe ettiği ancak yüksek dozlarda tonusu arttırdığı belirtilmiştir(53).

Digital grubunun tipik kardiak etkilerine sahip olan oleandrin'in digitoksininden iki üç kat daha aktif olduğu, organizmada daha az biriktiği, çok kolaylıkla atıldığı ve tavşanda

vazokonstriksiyon oluşturduğu rapor edilmiştir(53). Odorin'in de tavşan ve köpek kalbi üzerindeki etkisinin digital grupları ile aynı olduğu, neriodin'in digital benzeri etkide digitoksenden iki kat daha aktif olduğu belirtilmiştir(42).

Kornerin veya dolerin'in farelerde uygun dozlarda diürez oluşturduğu, ancak yüksek dozlarda diürezin hızını inhibe ettiği gösterilmiştir(53). Kornerin'in klinik deneylerde kardiyak hastalıklara karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle kalp kasının fonksiyonunu düzenlediği ve digitalis glikozitlerinden daha az kümülatif olduğu belirtilmiştir(10,53).

Bitkideki odorosid grubu glikozitlerde de digital benzeri aktivite görülmüştür(42). Flavon glikozitlerinin damar permeabilitesini etkilediği ve diüretik özelliklere sahip olduğu ileri sürülmüştür(10,48).

Yapraklardan elde edilen ekstrenin deney hayvanlarında kardiyotoksik aritmi'ye neden olduğu gözlenmiştir(35). Kumoriloksi pentasiklik triterpenlerin farelerde MSS de depresan aktiviteli olduğu gösterilmiştir(37,40).

Bitkinin bütün bölümleri negatif antibiyotik testi verir. Bununla beraber bir antibiyotik olan oleandomisin izole edilmiş ve penisilinlere ve diğer antibiyotiklere direnç gösteren stafilokoklara karşı etkili olduğu ispatlanmıştır(53).

2.4.1. Bitkinin geleneksel tıpta kullanımı

Bitkinin kök, yaprak ve kabuk gibi değişik organları Porto Riko, Küba, Kuzey Afrika, Venezuela, Hindistan, Libya, Antiller, Fas, Arjantin gibi ülkelerde halk arasında değişik kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Yaprakların kaynatma, yakı, merhem, dekoksion; kabukların toz, dekoksion; köklerin ise pasta ve lapa şeklinde hazırlanarak kullanıldığı belirtilmiştir(22).

Bitkinin halk arasında kullanıldığı hastalıklar astım, habis urlar, ekzama, nasır, abseli yaralar, deri altı rahatsızlıkları, adet güçlüğü, epilepsi, değişik kanser türleri, döküntülü hastalıklar, zona, sıtma, psöriyazis, saçkıran, uyuz, siğil ve tümörler, cüzzam,

göz hastalıkları şeklinde sayılabilir(10,38,39,42).

Yapraklar ve kabuklar deri hastalıklarında insektisit olarak kullanılmıştır. Yapraklar çocuk düşürücü ve adet söktürücü olarak dekoksiyon şeklinde kullanılmaktadır(10,53). Kabuklar'ın ratisit ve balık zehiri şeklinde kullanımı da belirtilmiştir(53). Eski çağlarda bitkiden yapılan bir şarap haricen yılan ısırmasında kullanılmıştır(42,53).

Etyopya, Guatemala ve Kuraçao'da yaprakların deri hastalıklarında yakı şeklinde, Venezuela'da yaprakların kaynatılarak buharı inhale edilmek şeklinde sinüs rahatsızlıklarında kullanıldığı belirtilmiştir(10). Güney Afrika'da ve Cezayir'de sıtma ve uyuz hastalıklarına karşı kullanılan bitkinin dermatit'e neden olduğu rapor edilmiştir(53). Bitkinin köklerinin toz haline getirilerek belsoğukluğunun tedavisinde kullanıldığı belirtilmiştir(12).

2.5. Toksikolojik Özelliği

N. oleander bitkisinin zehirliliği çok eski devirlerden beri bilinmektedir. Bitkinin taşıdığı kimyasal bileşikler insan ve hayvanlarda akut zehirlenmelere neden olmuştur. Zehirlenmeyi ortadan kaldırmak için zaman zaman kaynatma ve kurutma işlemleri uygulanmışsa da, dal ve yapraklardan suya geçen maddelerden dolayı bu suyun içilmesi hallerinde zehirlenmeler yine görülmüş ve rapor edilmiştir(3,4,10,53).

Zehirlenmeler daha çok bitkinin bünyesindeki kardiak glikozitlerden meydana gelmektedir. Bitkinin canlı çiçekleri ve parlak yaprakları çocuklar için risk oluşturmaktadır. Et pişirmek amacıyla bitkinin ince dallarının şiş olarak kullanılması, bu dallar ile yemeklerin karıştırılması veya çiçeklerin çiğnenmesi sonucu insanlarda öldürücü zehirlenmeler ortaya çıkmaktadır(7,10,35,42,43).

Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu *N. oleander* yapraklarının Şeker Kamışı Keneleri'ne karşı insektisit özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır(42). Bitki eski çağlarda

Afrika'nın muhtelif yerlerinde "Ok Zehiri" olarak da kullanılmıştır(14,53).

Çizelge 2.5.'de *N. oleander*'in insan ve hayvan türlerindeki letal dozları gösterilmiştir(42).

Çizelge 2.5. Farklı türler için *N. oleander*'in letal dozları

Türler	Preparasyon	Yol	Doz
İnsan	Yaprak	Oral	Bir yaprak
At	"	"	0.005% v.a. veya 15-20 g
Sığır	"	"	0.005% v.a. veya 10-20 g
Koyun	"	"	0.015% v.a. veya 1-5 g
Tavuk	"	"	15g
Ördek	"	"	3g
Kaz	"	"	6g
Kedi	Oleandrin	i.v.	0.101 mg/kg
"	"	s.c.	0.15 mg/kg
"	"	oral	0.4-0.5 mg/kg
Köpek	"	i.v.	0.135 mg/kg
"	"	oral	0.5 mg/kg

v.a.=vücut ağırlığı

i.v.=intravenöz

s.c.=subkütan

2.5.1. Zehirlenme semptomları

Oleander zehirlenmesinin insanlarda ve bazı hayvanlarda başlıca semptomları aşırı salivasyon, hipotansiyon, hipotermi, midriazis, inkoordinasyon, depresyon, konvülsiyonlar, bitkinlik, solunum güçlüğü ve siyanoz, taşikardi ve aritmi tarzında kalp yetmezliği, nevrozite, mide-barsak rahatsızlıkları (bulantı, şiddetli kusma, karın ağrısı, kanlı ishal, kolik) şeklindedir. Solunum ve kalp yetmezliği sonucu koma ve ölüm görülür(3,4,5,43,53).

1868 yılında, belsoğukluğunun tedavisi amacıyla bitkinin toz edilmiş köklerini kullandıktan sonra zehirlenerek ölen iki kişi üzerinde yapılan otopsi sonuçları 1890 yılında yayınlanan bir kaynakta şu şekilde belirtilmiştir(12).

- 1- Beyinde: Venöz sinüslerde tıkanma, diğer kısımlar normal,
- 2- Kalpde: Dış yüzeylerdeki damarlarda konjestiyon, kalp kavitelerinin siyah akıcı kan ile dolu olduğu, perikardda yaklaşık 60 ml sıvı bulunduğu,
- 3- Midede: Büyük egrinin arka yüzeyindeki damarlarda konjestiyon, periton zarının ön ve arka yüzeylerinde konjestiyon,
- 4- Karaciğerde: Damarlarda konjestiyon, büyüme,
- 5- Özofagusta: Koyu renkli bir mukus, boğazın üst kısmında kan,
- 6- Dalakta: Büyüme,
- 7- Böbreklerde: Sağlıklı bir görünüm,
- 8- Akciğerlerde: Sağlıklı bir görünüm,
- 9- İnce barsaklarda: Koyu renkli mukoz tabaka, onikiparmak barsağının mukoz yüzeyinin üst kısımlarında konjestiyon, ince barsaklar boyunca dağılmış kan birikintisi.

Eleştiri notu: Bu otopsi bulgularının pek çoğu normalde ve diğer zehirlenmelerde de görülebilir. Bir kısmına da tüberküloz, nevrit, siroz, alkolizm, pnömoni, tifo, muhtelif yetmezlik ve kanserli tablolarda da rastlamak mümkündür. Doğrudan doğruya zakkum zehirlenmesini anımsatacak şekilde bir bilimsellik ifade etmemektedir. 1868'de de esasen bundan daha fazlası beklenemez (Prof. Dr. İhsan Sarıkardaşoğlu, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eskişehir).

2.5.2. Zehirlenmenin tedavisi

Dipassium (dipotasyum EDTA) veya disodyum EDTA (i.v.), potasyum klorür, prokainamid, kinidin sülfat (oral veya parenteral) tedavide antidot olarak kullanılan maddelerdir. Antidot tedavisinin yanı sıra ayrıca gastrik lavaj ile semptomatik ve

destekleyici tedavinin uygulanması da gerekir. EDTA tuzları etkin şekilde kalsiyum ile kelat yaparak kalsiyum ve oleandrin'in kalp üzerindeki sinerjik etkisini azaltır(4,5,10).

Potasyum klorür'ün antidot olarak kullanılmasının bazı riskleri vardır ve çok etkin değildir. Laboratuvar araştırmaları; dipotasyum EDTA'nın anormal atrial çarpıntılarını, ventriküler ve supraventriküler aritmiler ile intraventriküler iletişim bozukluklarını ortadan kaldırmada etkili olduğunu göstermiştir(5).

2.6. İmmün Sistem ve Kanser

Bağışıklık sisteminin kimyası üzerindeki gelişmeler, kanseri de içine alan bir grup hastalığın tedavisi için önemli umut kapılarını açmıştır. Son yıllarda yapılan immünolojik ve nöroimmünolojik araştırmalar sürecinde önem kazanan bağışıklık sistemindeki bir grup endojen madde, kanser konusunda oldukça çarpıcı gelişmeleri ortaya çıkarmıştır. Bu endojen maddelere sitokinler adı verilmektedir. Sitokinler'in doğrudan doğruya vücudun oluşturduğu doğal sitotoksik maddeler oldukları belirtilmiştir(33). İnterferonlar, koloni stimüle edici faktörler (Colony Stimulating Factors-CSF), interlökinler ve tümör nekroz faktörü (Tumor Necrosis Factor-TNF) sitokinlere örnek olarak verilebilir(32,33). TNF'nin septik çok, parazit enfeksiyonları, böbrek nakli uyuşmazlığı ve neoplastik hastalıklar gibi farklı patolojik koşullarda ve makrofajların bazı maddeler ile aktivasyonundan sonra makrofajlar tarafından serum içine salındığı belirtilmiştir(21, 28,33).

Çok fonksiyonlu hücreler oldukları için nonspesifik savunma sisteminde özel bir konumu olan makrofajların, yabancı nesnelere fagositoz yeteneğine sahip olduğu ve indüksiyon ile oldukça aktif efektör hücrelere dönüştükleri gösterilmiştir(51).

Makrofajlar vücudun savunma sisteminde mikrobiyal enfeksiyonlara ve tümörlere karşı önemli rol oynamaktadırlar. Bu hücrelerin selektif stimülasyonu, hem immün savunmada aktive edilmiş makrofajların fonksiyonunu aydınlatmada, hem de terapötik uygulamaların geliştirilmesini sağlamak amacıyla önemlidir(30).

Fareler ve sıçanlar üzerinde yapılan birçok çalışma, çeşitli aktivasyon işlemlerinden sonra makrofajların tümör hücrelerine karşı toksik etkilerini göstermiştir(15).

Araştırmacılar lipopolisakkarit, polinosinik-polisitidilik asit, muramil dipeptit ve interferon-g gibi farklı etkenlerle makrofajların stimülasyonunu sağlamışlardır. Bu bileşikler, makrofaj aktive etme potansiyellerine ek olarak T veya B lenfositler üzerinde de etkiler göstermektedirler(30).

Bazı bitkilerle yapılan çalışmalarda izole edilen polisakkarit yapıdaki bileşikler, immün sistem üzerindeki etkileriyle antineoplastik tedavide yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Yapılan araştırmalar bu bileşiklerin mikroorganizmalara ve tümör hücrelerine karşı sitotoksitate için makrofaj aktivasyonunu sağlayarak TNF üretimde etkili olduklarını göstermiştir(6,30,33).

2.6.1. Tümör nekroz faktörü (TNF)

Memorial Sloan-Kettering Kanser Merkezinde yapılan çalışmalar sürecinde, bakteriyel enfeksiyonlar esnasında insan organizması tarafından oluşturulan ve sonradan polipeptit yapılı olduğu anlaşılan bir bileşiğin, farelerdeki tümörlerde hemorajik nekroza neden olduğu bulunmuştur. Bu çalışma Lloyd J. Old tarafından gerçekleştirilmiş olup bu polipeptit yapılı bileşiğe, araştırmacı tümör nekroz faktörü adını vermiştir(32).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, TNF'nin aktive edilmiş makrofajlar ve lenfositler tarafından *in vivo* olarak üretilen ve 157 aminoasitten oluşan polipeptit yapılı bir hormon olduğu gösterilmiştir(25,28). Farmakolojik dozlarda kullanıldığı zaman *in vitro* ve *in vivo* birçok malign hücrelere karşı sitotoksik olduğu belirtilmiştir. Sitotoksitenin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır, fakat hem tümör hücrelerine karşı doğrudan bir toksisiteyi, hem de tümör damarlarında bir dolaylı etkiyi kapsamaktadır. Bu genel bir sitotoksitate değildir ve TNF bazı hematolojik hücre tipleri için büyüme faktörü veya bir ayırt edici etken olarak rol oynayabilir(25).

TNF'nin *in vivo* birçok etkilere sahip olduğu ve hem nötrofiller ve eozinofillerin aktivasyonundaki immün olayların mediyatörü olarak bir immün modülatör gibi fizyolojik rol oynadığı belirtilmiştir. Bu etkilerinin yanı sıra lipit metabolizmasında değişmelere neden olduğu ve antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir(25).

Tedavide, TNF ile Faz I ve II klinik denemelerde oldukça önemli başarılar elde edilmiştir. TNF ile gerçekleştirilen klinik denemeler sonucunda, bugüne kadar bilinen en düşük toksisiteli antineoplastik etken olduğu belirtilmiştir(33). Antitümör etkisinin doza bağımlı olduğu ve lokal verilşte (tümör içine) en iyi sonuçların alındığı belirtilen TNF ile sistemik uygulamada da tümörde iyileşme gözlenmiştir. TNF, antitümör etkisini birden fazla mekanizma ile göstermektedir. Hücre ölümünün DNA parçalanması ile ilgili olduğu belirtilmiştir. TNF reseptörleri duyarlı hücrelerde gösterilebilir fakat reseptörlerin sayısının TNF'nin antitümör aktivitesi ile ilişkili olmadığı söylenmektedir(25). TNF'nin interferonlarla birlikte bulunması halinde sitotoksik etkisinin arttığı gösterilmiştir(32). Diğer endojen faktörler ile *in vivo* etkileşime sitotoksik etkisini arttırabilir(25).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan bitkisel materyel ve immünolojik çalışma materyeli

Bu çalışmada, Muğla yöresinde yetişen *N. oleander* bitkisinin taze yaprakları kullanılmıştır. İmmünolojik çalışmalarda TNF testi için kullanılan L-929 fibroblast hücreler Fraunhofer Toksikoloji Enstitüsünden temin edilmiştir. (Fraunhofer Institut für Toxikologie, Nikolai-Fuchs-Str 1, 3000 Honnover 61, GERMANY). Makrofaj hücreleri C57 BL/6 erkek farelerden (4-8 haftalık) elde edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal madde ve çözeltiler

Sephadex LH-20 (<u>gözenek büyüklüğü</u> 25-100 μ M)	(Pharmacia)
Difenilboriloksietilamin	(Merck)
PEG-4000	(Merck)
3,5-Dinitrobenzoik asit	(Merck)
4-Hidroksi benzaldehit	(Merck)
Tiyoglikolat	(Becton-Dickinson)
Nötral kırmızısı boyası	(Serva)
Aktinomisin D	(Merck)
Sodyum hidroksit	(Merck)
Sodyum klorür	(Merck)
Potasyum klorür	(Merck)
Disodyumhidrojen fosfat $2H_2O$	(Merck)
Potasyumdihidrojen fosfat	(Merck)
Etil asetat	(Merck)
Metanol	(Merck)
Kloroform	(Merck)
Toluol	(Merck)
Etil alkol	(Merck)
Formik asit	(Merck)
Asetik asit (glasiyel)	(Merck)
Klorsülfonik asit	(Merck)
Sülfürik asit	(Merck)

3.1.3. Kültür ortamı çözeltileri

- | | |
|--|-----------|
| a. RPMI-1640 Medium (2.0 g/lit NaHCO ₃ , L-Glutaminsiz) | (Seromed) |
| b. Hepes-(1M)(50x)[N-2-Hidroksietilpiperazin-N'-2-etanolsulfonikası] | (Seromed) |
| c. Mem-Vitamin (100x) | (Seromed) |
| d. NEAA (100x) - Esansiyel olmayan aminoasitler | (Seromed) |
| e. Penisillin/Streptomisin -10.000U/10.000 µg/ml | (Seromed) |
| f. L-Glutamin (200mM) | (Seromed) |
| g. FCS - Föetal buzağı serumu | (Seromed) |
| h. Tripsin - EDTA (10x) | (Sigma) |

3.1.4. Kullanılan aygıtlar

Steril çalışma kabini

İnkübatör (Mettler)

Santrifüj (Hettich Rotanta/RP)

Fraksiyon kollektörü (LKB Bromma, 2111 Multirac)

UV detektör (LKB 2158 uvicord SD)

Differensiyel refraktometre (R-401 waters)

Mikroskop (Zeiss)

Doku kültür tabağı okuyucusu (MR 600-Dynatech)

Otomatik pipetör (Eppendorf)

Doku kültür şişesi (50ml-Nunclon Delta)

Çok gözlü doku kültür tabağı (F form, 96 gözlü-Nunclon Delta)

Steril pipet (5 cc, 10cc-Eppendorf)

3.1.3. a, b ve d sıralamalı çözeltiler buzdolabında (+4°C), c, e, f, g, h sıralamalı çözeltiler derin dondurucuda (-70°C) saklanmıştır.

Steril otomatik pipetör ucu (100-1000 µl-Eppendorf)

Steril enjektör filtresi (0,22 µm/Milipor)

Steril santrifüj tüpü (50 cc, Eppendorf)

Cam kolon

İTK plağı (Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm-Merck)

Diyaliz membranı (gözenek çapı: 24 Angström-Serva)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Analitik çalışmalar

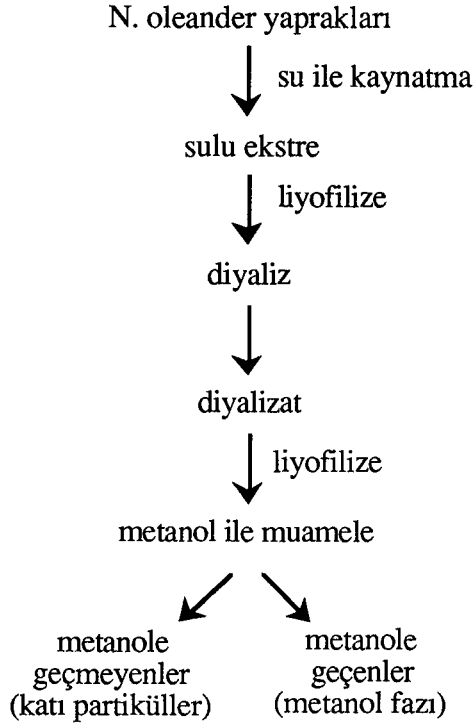
Bu bölümde yaprakların suda kaynatılması ile elde edilen sulu ekstre liyofilize edilip diyalize tabi tutularak diyalizat kısmı alınmış ve rotavaporda yoğunlaştırılarak liyofilize edildikten sonra metanol ile muamele edilmiştir. Metanole geçenler ayrılarak gel-filtrasyona tabi tutulmuştur. Kolondan inen eluatlar 3.2.1.2.'de açıklanan şekilde birleştirilip 3 ayrı fraksiyon elde edilmiştir. Her bir fraksiyon değişik çözücü sistemlerinde İTK ile incelenmiştir.

3.2.1.1. Ekstraksiyon

Bitkinin yaprakları parçalandıktan sonra distile suda 3 saat kaynatılmıştır. Süzülerek katı parçacıklar ayrıldıktan sonra süzüntü oda ısısına kadar soğutulup tekrar süzülmüştür. Süzüntü rotavaporda yoğunlaştırılarak liyofilize edilmiş ve suda çözülerek diyalize tabi tutulmuştur. Diyaliz işlemi 3 gün yapılmış ve her günün sonunda diyalizat kısmı alınmıştır. Birleştirilen diyalizatlar rotavaporda yoğunlaştırılıp liyofilize edilmiş ve metanol ile muamele edilerek (3 kez) metanol fazı ayrılmıştır.

Ekstraksiyon işlemi Şema 1'de özümlemiş şekilde verilmektedir.

ŞEMA 1



3.2.1.2. Gel-filtrasyon

Ekstraksiyon sonucu elde edilen metanol fazına kolon kromatografisi uygulanarak fraksiyonlandırma işlemi yapılmıştır. 10 ml çözelti Sephadex LH-20 kolona verilmiş ve %50'lik metanol ile elüsyona başlanmıştır. Fraksiyon kollektör yardımı ile her tüpte 10 ml fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonların, fraksiyon kollektörüne bağlı UV ve refraktometre detektörlerince tesbit edilen piklere göre, benzer olanları birleştirilmiş ve rotavaporda yoğunlaştırılıp liyofilize edilmiştir.

Gel -filtrasyon koşulları aşağıda verilmektedir.

Adsorban	:	Sephadex LH-20
Kolon uzunluğu	:	100 cm
Kolon iç çapı	:	1 cm

Elüsyon çözeltisi	:	% 50'lik metanol
Fraksiyon miktarı	:	10 ml
Çalışma ısısı	:	4-6°C

3.2.1.3. İTK araştırmaları

LH-20 Sephadex kolondan inen ve 3.2.1.2.'de açıklanan şekilde birleştirilen fraksiyonlar, İTK ile değişik çözücü sistemlerinde incelenerek fraksiyonların içerdiği maddeler araştırılmıştır.

İTK kontrolleri için 20x10 cm boyutlarında 0.25 mm kalınlıkta silikajel ile kaplanmış hazır cam plakları kullanılmıştır. Developman işlemi içine süzgeç kağıdı döşenmiş cam kromatografi tanklarında, tank çözücü sistemi ile doyurulduktan sonra gerçeleştirilmiştir. Fraksiyonların 1 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisinden İTK plaklarına 20 µl uygulanmış ve çözücü sistemi 10 cm sürüklenmiştir.

Tanktan çıkarılan plakların önce UV lambası altında 254 ve 365 nm de incelenmiş daha sonra renk belirteci püskürtülmüştür. Her iki inceleme sonunda görülen lekeler kromatogramlarda gösterilmiştir.

Kullanılan çözücü sistemleri aşağıda verilmektedir.

- i) Etil asetat : Metanol : Su (81:11:8)
- ii) Klorofm : Metanol : Su (64:40:8)
- iii) Etil asetat : Formik asit : Asetik asit : Su (100:11:11:27)
- iv) Toluol : Etilasetat : Asetik asit (12:4:0.5)

Kullanılan renk belirteçleri aşağıda verilmektedir.

- i) Kedde reaktifi (kardenolidler için)

Çözelti 1. %3'lük 3,5-Dinitrobenzoik asit (etanolde)

Çözelti 2. 2N Sodyumhidroksit

Bu reaktif kullanılmadan hemen önce hazırlanıp, iki çözelti eşit hacimde karıştırılarak İTK plağına püskürtülmektedir.

- ii) Komarowsky reaktifi (Saponinler ve kortikosteroidler için)

Çözelti 1. % 50'lik sülfürik asit

Çözelti 2. % 2'lik 4-Hidroksibenzaldehit (metanolde)

Bu reaktif kullanılmadan hemen önce hazırlanmakta ve birinci çözülden 5 ml, ikinci çözülden 50 ml karıştırılarak İTK plağına püskürtülmektedir.

- iii) Naturstoff-Polietilenglikol reaktifi (Flavonoidler için)

Çözelti 1. % 1'lik Difenilboriloksietilamin (metanolde)

Çözelti 2. % 5 PEG-4000 (etanolde)

Önce birinci çözelti ve hemen arkasından ikinci çözelti İTK plağına püskürtülmektedir.

- iv) Klorosülfonik asit-Asetik asit (1:2)(Triterpenoik asitler için)

Çözümler yukarıda belirtilen oranlarda karıştırılıp İTK plağına püskürtülmektedir.

3.2.2. İmmünolojik çalışmalar

Bu bölümde kolondan inen ve 3.2.1.2.'deki yöntemle birleştirilen fraksiyonların makrofaj ve L-929 fibroblast hücreleri üzerinde, TNF testi ile sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Bütün çalışmalar steril gereçler kullanılarak yapılmıştır.

3.2.2.1. Besiyeri hazırlanması

500 ml hacimdeki RPMI-1640 medyum (steril) içine aşağıda belirtilen çözümler katılmıştır.

- i) 10 ml Hapes-tampon çözelti (1M)(50x)

- ii) 5 ml Mem-Vitamin (100x)

- iii) 5 ml NEAA (100x)
- iv) 5 ml Penicillin/Streptomycin-10.000U/10.000µg/ml
- v) 10 ml L-Glutamin (200 mM)
- vi) F C S

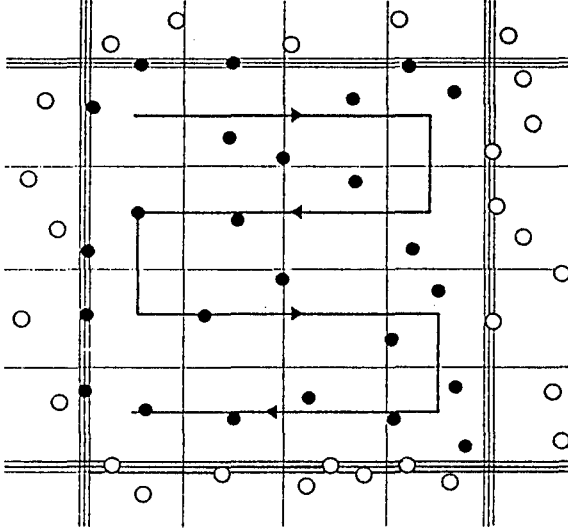
3.2.2.2. Hücre pasajı (Besiyerinin yenilenmesi)

Bu işlem immünolojik deneylerde kullanılan L-929 fibroblast hücrelerini canlı tutmak için 2-3 günde bir rutin olarak yapılmıştır.

- i) İnkübatörden alınan hücre kültür şişesi hafifçe çalkalanarak, ölü hücrelerin besiyeri çözeltisine geçmesi sağlanmış ve sonra steril bir pipetle kültür şişesi içindeki besiyeri alınarak atılmıştır.
- ii) Kültür şişesinde kalan serum artıklarını temizlemek için şişeye 5 ml N RPMI-1640 medyum konularak yıkanmış (2 kez) ve yıkama çözeltileri atılmıştır.
- iii) Kültür şişesine 5-10 ml tripsin çözeltisi (1/10 oranında fosfat tamponu ile seyreltilmiştir) konularak hafifçe çalkalanmış ve 1 dakika dinlendirildikten sonra tripsin çözeltisi pipetle alınarak şişenin ağzı sıkıca kapatılıp inkübatörde 5-10 dakika bekletilmiştir (%5 CO₂, % 95 nem ve 37°C de).
- iv) İnkübatörden alınan kültür şişesine 10-20 ml kadar besiyeri ilave edilerek çalkalanmış ve 5'er veya 10'ar ml'lik porsiyonlara bölünerek yeni kültür şişelerine alınmıştır.
- v) Kültür şişeleri kapakları yarı kapalı şekilde inkübatöre konularak inkübasyona bırakılmıştır (%5 CO₂, % 95 nem ve 37°C).

-
- 3.2.2.1. 1. Bütün maddeler 0,22 µm çapında enjektör filtresinden süzülerek konulmuştur.
 2. F C S konulmadan önce 1 saat 56°C de su banyosunda inaktive edilmiştir.
 3. Hazırlanan besiyeri 50 ml'lik steril şişelere konularak, kullanılmıncaya kadar derin dondurucuda (-70°C) saklanmıştır.

3.2.2.3. Neubauer odacığında hücrelerin sayılması(29)



Şekil 3.2.2.3. Neubauer hücre sayma odacığının bir bölümü

Şekilde Neubauer odacığının 16 küçük bölmeden oluşan bir bölümü görülmektedir. Herbir bölmenin hacmi $0.1 \mu\text{l}$ 'dir. Şekilde siyah noktalar ile gösterilen hücreler sayılmış, beyaz noktalar ise sayılmamıştır. Her biri 16 küçük bölmeden oluşan 4 bölme sayılarak ortalamaları alınmış ve bir bölme ($0.1 \mu\text{l}$ 'ye) düşen hücre sayısı saptanmıştır.

3.2.2.4. Tümör nekroz faktörü testi(36)

3.2.2.4.1. Makrofaj hücrelerini elde etme yöntemi

C57 BL/6 erkek fareye % 3'lük tiyoglikollat çözeltisi (RPMI-1640 medyum içinde hazırlanmıştır) i.p. olarak verilmiş ve 4 gün sonra farelerin karın boşluğu açılarak steril bir enjektör ile 5 ml soğuk fosfat tamponu (magnezyum ve kalsiyumsuz) farenin

karın boşluğuna enjekte edilmiştir. Enjektör çıkarılmadan 5 dakika lavaj yapıldıktan sonra aynı enjektörle verilen tampon çözeltinin yaklaşık 4 ml'si geri çekilmiş ve böylece makrofaj hücreleri elde edilmiştir.

Kullanılan fosfat tampon çözeltisi (pH:7.56)

- i) NaCl 8g
- ii) KCl 0.2g
- iii) Na₂HPO₄ . 2H₂O 1.2g
- iv) KH₂PO₄ 0.2g

Hazırlanışı: Maddeler bir miktar suda çözülüp distile su ile 1 lt'ye tamamlanmıştır.

3.2.2.4.2. Makrofaj hücre kültürü

- i) Makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltiden yaklaşık 20 µl alınarak Neubauer hücre sayma odacığında 0.1 µl'ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- ii) Bir santrifüj tüpüne alınan tampon çözeltisi santrifüj edilmiştir.

Santrifüj koşulları

Devir sayısı : 1500 devir/saniye

Isı : 10°C

Süre : 10

Fren hızı : 6

- iii) Santrifüjden alınan makrofaj hücrelerini içeren tampon çözeltinin üst kısmı atıldıktan sonra dibe çöken makrofaj hücrelerinin üzerine hücre sayısı 2.10⁶/ml olacak şekilde besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır.
- iv) Elde edilen makrofaj hücre süspansiyonu her göze 100 µl olacak şekilde doku kültür tabağına dağıtılarak (1.10⁵ makrofaj/100µl) inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir (%5CO₂ %95 nem, 37°C).

3.2.2.4.3. L-929 fibroblast hücre kültürü

- i) Hücre pasajının altıncı basamağında inkübatörden alınan kültür şişesine 5 ml besiyeri ilave edilerek çalkalanmıştır.
- ii) Süspansiyon halindeki çözeltiliden 20 µl alınarak Neubauer hücre sayma odacığında 3.2.2.3. de açıklanan yöntemle 0.1 µl'ye düşen hücre sayısı saptanmıştır.
- iii) L-929 fibroblast hücre sayısı $2 \cdot 10^6/10$ ml olacak şekilde besiyeri ilave edildikten sonra kültür şişesi çalkalanmıştır.
- iv) Hücre süspansiyonu doku kültür tabağına her göze 100 µl olacak şekilde dağıtılıp (2×10^4 L-929/100µl) inkübatörde 20 saat inkübe edilmiştir. (%5CO₂ %95 nem, 37°C).

3.2.2.4.4. Makrofaj hücrelerinin üzerine test maddelerinin verilmesi

- i) İnkübatörde 24 saat bekleyen makrofaj kültürlerinin üst kısmı tabana yapışmayan hücrelerin atılması için kültür tabağı ters çevrilerek dökülmüştür.
- ii) Doku kültür tabağında makrofaj hücrelerinin bulunduğu gözlere 100'er µl besiyeri ilave edilmiştir.
- iii) Şekil 3.2.2.4.4.'de gösterilen doku kültür tabağının yatay doğrultudaki A sırasındaki gözlerine 100 µl test edilecek maddeler (1 mg madde 1 ml RPMI-1640 medyumda çözüldü) verildikten sonra; A sırasındaki gözlerden başlayarak ve her seferinde 100'er µl alınarak düşey doğrultuda 8 göz aşağıya inilmiş ve böylece basamak şeklinde seyreltme yapılmıştır. Bu işlem sonunda birinci gözde (A-1) 50 µg/100 µl, sekizinci gözde (H-1) 0.39 µg/100 µl'lik bir konsantrasyon oluşumu sağlanmıştır.
- iv) Doku kültür tabağının bir gözüne test maddelerinin çözüldüğü RPMI-1640 medyum verilmiş ve aynı şekilde seyreltme yapılarak blank hazırlanmıştır.
- v) Üzerlerine test edilecek maddeler verilen makrofaj kültürleri, 24 saat inkübatörde tutulduktan sonra (%5CO₂ %95 nem, 37°C), üst kısmı L-929 fibroblast hücrelere aktarılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 3.2.2.4.4. Çok gözlü doku kültür tabağı

3.2.2.4.5. L-929 fibroblast hücrelerinin boyanması

İnkübatörden alınan kültür tabağındaki L-929 fibroblast hücreleri nötral kırmızısı boyası (% 0.1 RPMI-1640 içinde hazırlandı) ile boyanmıştır. Her göze 100 µl nötral kırmızısı verildikten sonra kültür tabağı 1/2 saat inkübe edilmiş ve üzerleri dökülerek test edilecek maddelerin verildiği makrofaj kültürlerinin üst kısımları L-929 fibroblast hücrelere aktarılmıştır.

3.2.2.4.6. Makrofaj kültürlerinin üst kısımlarının L-929 fibroblast hücrelere aktarılması

- 24 saat sonunda inkübatörden alınan makrofaj kültürlerinin üst kısımları nötral kırmızısı boyası ile boyanmış L-929 fibroblast hücrelerinin üzerine aktarılmıştır.

- ii) Makrofaj kültürlerinin verildiği her göze 100 µl Aktinomisin D çözeltisi verilmiştir (0.5 µg/göz).
- iii) L-929 fibroblast hücre kültür tabağı 18 saat inkübe edilmiştir (%5CO₂ %95 nem, 37°C).

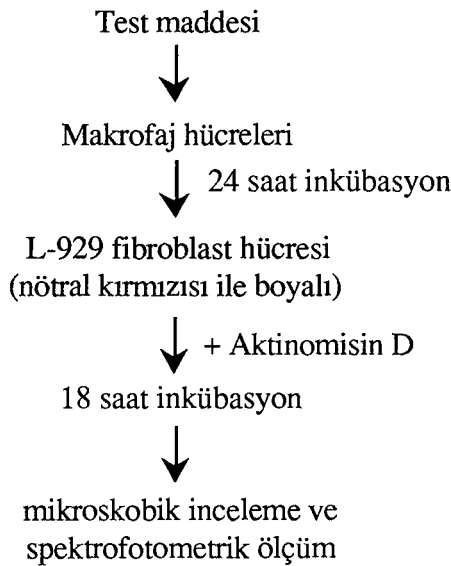
3.2.2.4.7. Sonuçların değerlendirilmesi

18 saat sonunda inkübatörden alınan L-929 fibroblast hücre kültür tabağı mikroskopta incelenmiş ve kültür tabağı okuyucusunda, ölen hücrelerden açığa çıkan boyanın absorbans değerleri okunarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.2.2.4.8. TNF testinin şematik gösterimi

TNF testi Şema 2'de özümlemiş şekilde verilmektedir.

ŞEMA 2



4. BULGULAR

Bu bölümde, 3.2.1.1.'de açıklanan şekilde elde edilen metanol fazının, 3.2.1.2. de ki yöntemle kolon kromatografisi uygulanarak elde edilen ve birleştirilen fraksiyonlarına, 4 değişik çözücü sisteminde yapılan İTK incelemelerinin ve antitümör aktiviteyi saptamak için uygulanan TNF testinin sonuçları verilmektedir.

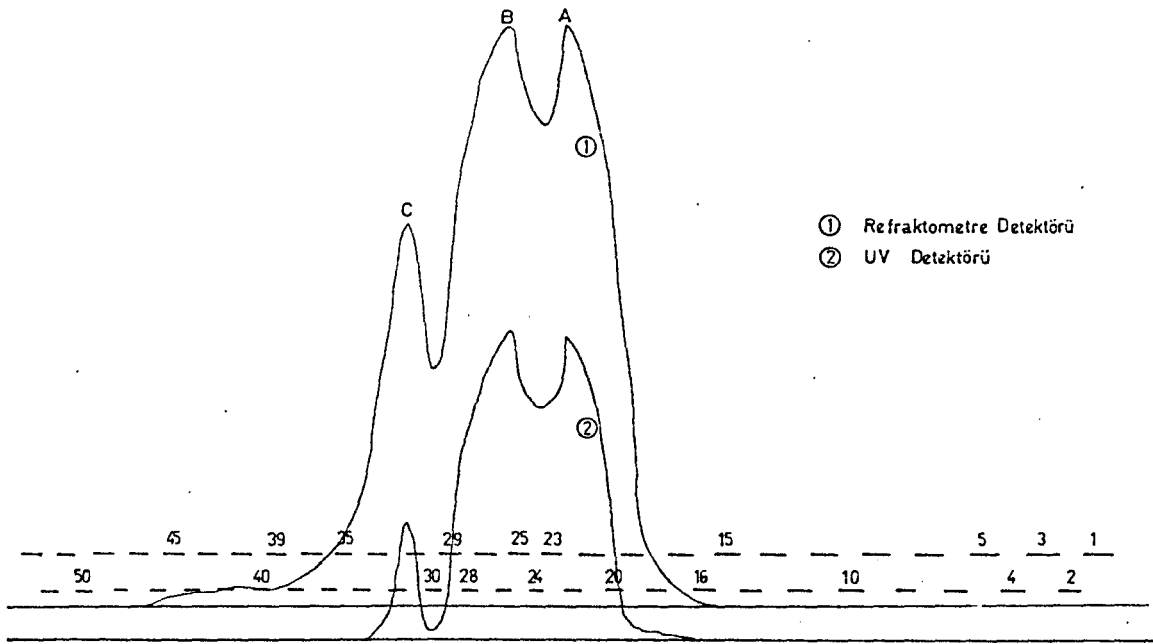
4.1.Sephadex LH-20 Kolondan İnen Fraksiyonların Birleştirilmesi

Kolondan inen fraksiyonlar, fraksiyon kollektörü vasıtasıyla 60 tüpte toplanmıştır. Her tüpte 10 ml fraksiyon toplanmış ve her bir fraksiyonun tüpte toplanmaya başlama ve bitiş zamanı spektrumda kesik çizgilerle belirtilmiştir. UV ve refraktometrik detektörlerce saptanan piklere bakılarak 16. ve 23. tüpler arasında (Şekil 4.1. A piki), 24. ve 28. tüpler arasında (Şekil 4.1. B piki), 29. ve 39. pikler arasında (Şekil 4.1. C piki) inen fraksiyonların benzer oldukları saptanmıştır.

Bu tüplerde toplanan fraksiyonlar birleştirilerek, rotavaporda yoğunlaştırılıp liyofilize edilmiş ve böylece metanol fazı 3 fraksiyona ayrılmıştır.

1. Fraksiyon : 16. ve 23. tüpler arasında toplanan fraksiyonlar
2. Fraksiyon : 24. ve 28. tüpler arasında toplanan fraksiyonlar
3. Fraksiyon : 29. ve 39. tüpler arasında toplanan fraksiyonlar

Kolondan inen fraksiyonların, UV ve refraktometre detektörlerince saptanan piklerini gösteren spektrum Şekil 4.1.'de verilmiştir.



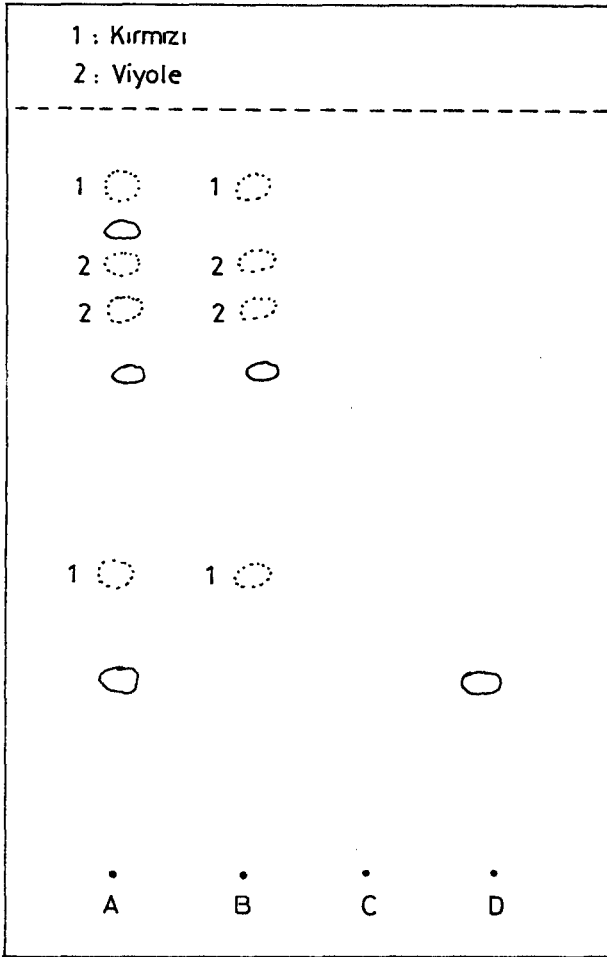
Şekil 4.1. Sephadex LH-20 kolona verilen metanol fazının UV ve refraktometre detektörlerince saptanan spektrumu

4.2. İTK Sonuçları

Metanol fazının Sephadex LH-20 kolondan inen ve 3.2.1.2.'de açıklanan yöntemle birleştirilen fraksiyonlarına 4 değişik çözücü sisteminde uygulanan İTK sonuçları aşağıdaki bölümlerde verilmektedir.

4.2.1. Etilasetat : Metanol : Su çözücü sistemindeki İTK sonuçları Şekil

4.2.1.'de gösterilmiştir.



A: Metanol fazı

B: 1. Fraksiyon

C: 2. Fraksiyon

D: 3. Fraksiyon

Renk belirteci: Kedde
reaktifi

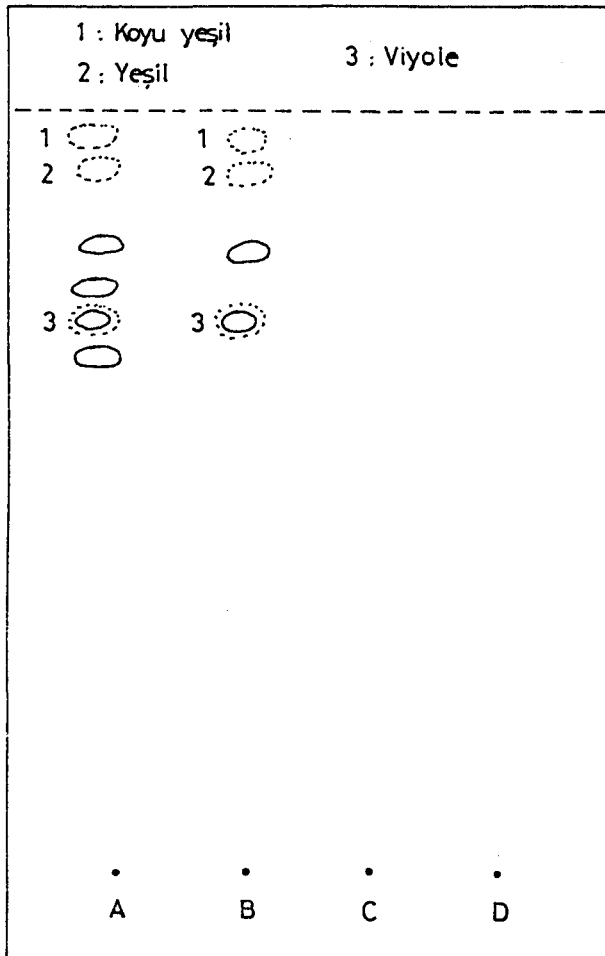
---- renk belirteci ile
görülen lekeler

— UV lambası altında
254 nm de görülen
lekeler

-.-.-. UV lambası altında
365 nm de görülen
lekeler

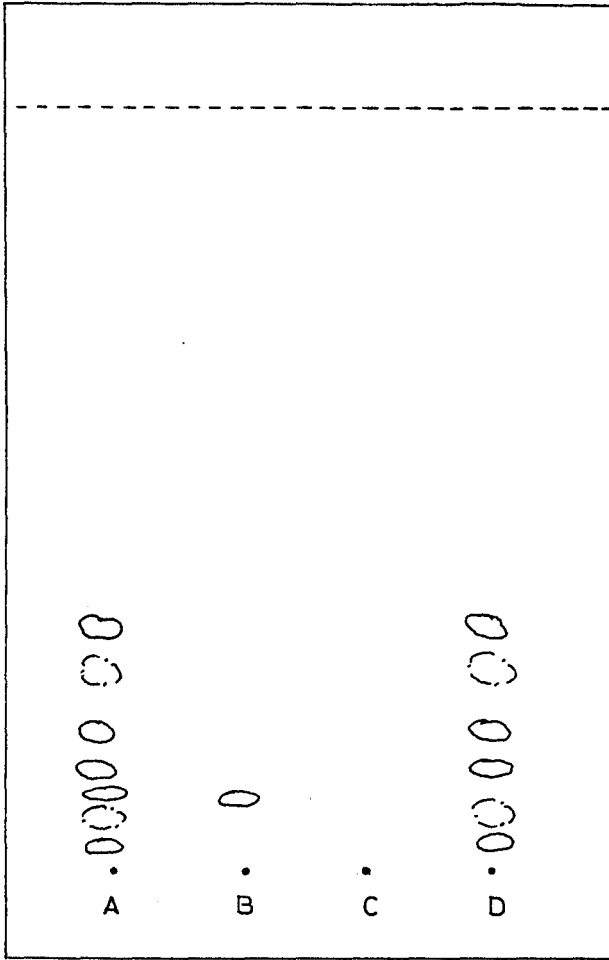
Şekil 4.2.1. Fraksiyonların, Etilasetat : Metanol : Su (81 : 11 : 8) sistemindeki kromatogramı

4.2.2. Metanol : Kloroform : Su çözücü sistemindeki ITK sonuçları Şekil 4.2.2.'de gösterilmiştir.



4.2.4. Toluol : Etilasetat : Asetik asit : çözücü sistemindeki İTK sonuçları Şekil

4.2.4.'de gösterilmiştir.



A: Metanol fazı

B: 1. Fraksiyon

C: 2. Fraksiyon

D: 3. Fraksiyon

Renk belirteci:

Klorsülfonik asit:

Asetik asit (1:2)

---- renk belirteci ile
görülen lekeler

— UV lambası altında
254 nm de görülen
lekeler

--- UV lambası altında
365 nm de görülen
lekeler

Şekil 4.2.4. Fraksiyonların, Toluol : Etilasetat : Asetik asit : (12 : 4 : 0.5) sistemindeki kromatogramı

4.3. TNF Testi Sonuçları

Test süresi bitiminde inkübatörden alınan L-929 fibroblast hücre tabağına, mikroskop altında bakılarak hücrelerin durumu incelenmiştir. Mikroskopik incelemeden sonra kültür tabağı okuyucusunda madde verilen gözlerdeki absorbans değerleri okunarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir. Herbir fraksiyon için 5 seri deney yapılmış ve ortalama absorbans değerleri alınmıştır.

4.3.1. TNF testi sonunda hücre kültür tabağında fraksiyonların verildiği gözlerde okunan absorbans değerleri ve gözlerdeki madde konsantrasyonları Çizelge 4.3.1.'de verilmiştir.

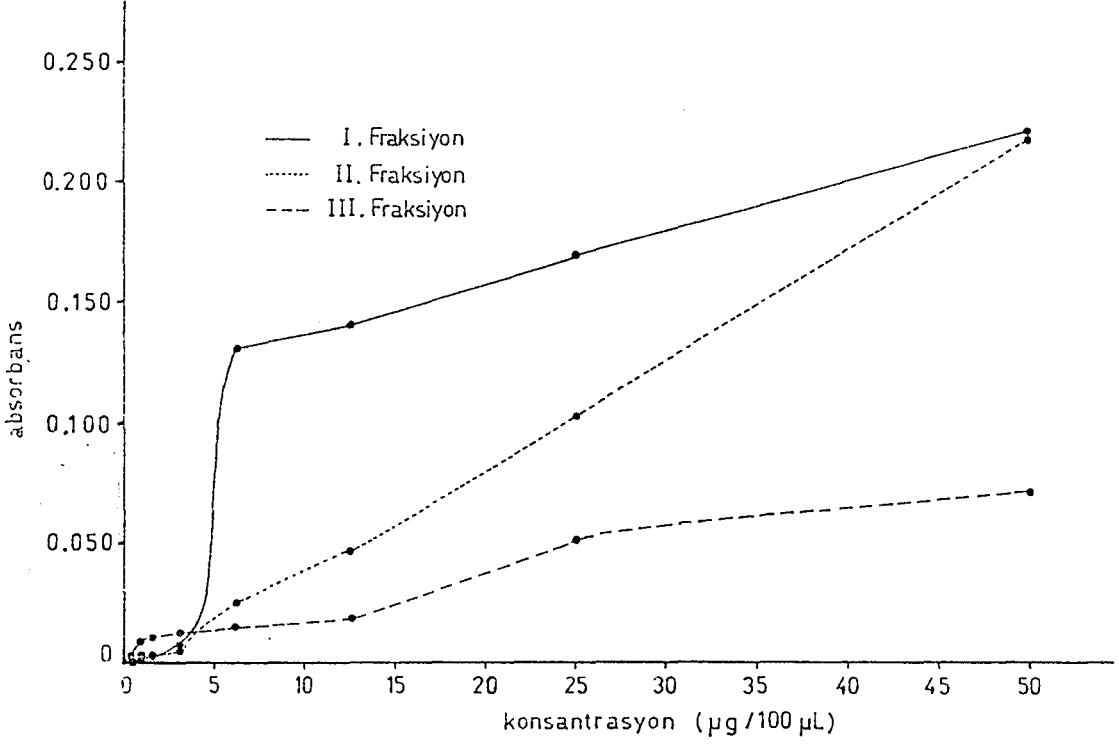
Çizelge 4.3.1. TNF testi sonunda fraksiyonların verildiği gözlerde okunan absorbans değerleri ve madde konsantrasyonları

Gözler	C($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$)	1. Fraksiyon	2. Fraksiyon	3. Fraksiyon
		A(absorbans)	A	A
1. göz (A-1)	50	0.403	0.252	0.400
2. göz (B-1)	25	0.350	0.233	0.282
3. göz (C-1)	12.5	0.322	0.199	0.227
4. göz (D-1)	6.25	0.312	0.196	0.206
5. göz (E-1)	3.12	0.185	0.191	0.187
6. göz (F-1)	1.56	0.183	0.190	0.183
7. göz (G-1)	0.78	0.181	0.188	0.182
8. göz (H-1)	0.39	0.180	0.181	0.181

4.3.1. 1. Blank olarak hazırlanan gözde okunan absorbans değeri 0.180'dir.

2. Herbir fraksiyon için 5 seri deney yapılmış ve ortalama absorbans değerleri alınmıştır.

4.3.2. TNF testi sonunda fraksiyonların verildiği gözlerde okunan ve Çizelge 4.3.1. de verilen absorban değerlerinden, blank olarak hazırlanan gözde okunan absorban değerinin (0.180) çıkarılması ile elde edilen absorban değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.3.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.3.2. TNF testi sonuçlarının spektrofotometrik değerlendirmesinde, absorban değerlerinin konsantrasyona karşı çizilen grafiği

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

N. oleander bitkisi halk arasında değişik kanser türlerinin tedavisinde kullanılmasına karşın yapılan literatür incelemesinde, yakın bir geçmişe kadar yapılan araştırmalarda bitkinin aktif maddelerinin yapısının aydınlatılması ve değişik farmakolojik aktivitelerinin saptanması üzerinde durulduğu görülmüştür. Bu araştırmalar sonunda bitkinin çeşitli kısımlarından glikozitler, steroidler ve terpenoidleri kapsayan yaklaşık 200 kadar madde izole edilmiştir(42). Birçok kaynakta bitkinin içerdiği başlıca etkili maddenin kardiyotonic bir glikozit olan oleandrin olduğu rapor edilmektedir(4,20,35,52). Oleandrin ve izole edilen diğer kardiyak glikozitlerin özellikle kalp üzerinde, digital benzeri etkilere sahip olduğu gösterilmiştir(10,42,53).

Son yıllarda, bitkinin sulu ekstresinden izole edilen polisakkarit yapıdaki bileşikler ile yapılan değişik immünolojik testlerde bu bileşiklerin immünostimulan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu polisakkaritlerin, makrofaj hücrelerini TNF üretmeleri için stimüle ettikleri ve böylece tümör hücreleri üzerinde dolaylı bir sitotoksik etki gösterdikleri belirtilmiştir. Bu bileşiklerin in vitro granülosit fagositoz ve lenfosit transformasyon deneylerinde de yüksek aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir(6).

Yapılan araştırmalarda, değişik bitkilerden izole edilen polisakkaritlerin de immünostimulan ve antineoplastik etkiler taşıdığı gösterilmiştir(30,33).

Analitik araştırmalarda, LH-20 Sephadex kolondan inen ve 3.2.1.2. deki yöntemle birleştirilen fraksiyonların içerdiği maddeleri saptamak için yapılan İTK incelemelerinde kullanılan çözücü sistemleri ve renk belirteçleri herbir fraksiyona uygulanmıştır. Bu fraksiyonlardaki maddelerin yürüdüğü çözücü sistemleri ile bu sistemlerde renk belirteçleri ve UV lambası altında verdikleri lekeler dikkate alınarak fraksiyonların steroid, flavonoid ve terpenoid yapıda maddeleri içerdikleri sonucuna varılmıştır(50,52).

Antitümör aktivitenin saptanması için yapılan TNF testi, sonuçların

değerlendirilmesi bölümünde modifiye edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemde, test sonunda hücre kültür tabağı ters çevrilerek ölü hücreler atılmakta ve kalan canlı hücreler kristal violet boyası ile boyanarak, boyanan hücreler mikroskopta sayılmakta ve böylece canlı hücre sayısı saptanmaktadır. Bir diğer yöntemde tümör hücreleri radyoaktif maddeler ile işaretlenmekte ve ölen hücrelerden açığa çıkan radyoaktivite miktarı ölçülerek veya işaretli hücreler sayılarak sonuçlar değerlendirilmektedir. Her iki yöntemde de kültür tabağının gözlerinde belli sayıda hücre bulunmaktadır(36).

Çalışmada kullanılan spektrofotometrik değerlendirme yönteminde ise, tümör hücreleri (L-929 fibroblast hücreler) nötral kırmızısı boyası ile boyanmış ve madde verilen her gözde ölen hücrelerden açığa çıkan boyanın absorbans değerleri, kör (blank) olarak hazırlanan gözde okunan absorbans değeriyle kıyaslanarak sitotoksikite değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmada, tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi araştırılan maddelerden steroid yapıda olanların 100 µg/100 µl konsantrasyonda makrofaj hücreleri üzerinde toksik etkisi görülmüştür. Makrofaj hücrelerinin ölümü sonucu TNF salgılaması söz konusu olamayacağından, maddelerin verildiği birinci gözlerde 50 µg/100µl'lik konsantrasyon oluşturulmuş ve düşey doğrultuda aşağıda gözlere inilerek basamak şeklinde seyreltme ile herbir gözde bir önceki gözün yarısı oranında konsantrasyon oluşumu sağlanmıştır. Böylece test edilen maddeler 8 değişik konsantrasyonda denenmiştir. Herbir gözdeki konsantrasyon değeri Çizelge 4.3.1.'de verilmiştir. Bu konsantrasyonlarda, test edilen maddelerin hem makrofaj hücreleri üzerindeki, hem de dolaylı olarak tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir.

TNF testi sonucunda yapılan spektrofotometrik değerlendirmede elde edilen absorbans değerleri, blank olarak hazırlanan gözde okunan absorbans değeriyle karşılaştırıldığında; son dört gözde (3.12 µg, 1.56 µg, 0.78 µg ve 0.39 µg/100 µl konsantrasyonlarda) her 3 fraksiyon için de okunan absorbans değerlerinin blank olarak hazırlanan gözdeki okunan absorbans değerine çok yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca bu

gözlerde yapılan mikroskopik incelemelerde L-929 fibroblast hücrelerin ölmediği izlenmiştir. Sonuç olarak, test edilen maddelerin yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda, makrofajları TNF salınımı için stimüle etmediği ve buna bağlı olarak da tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkinin oluşmadığı saptanmıştır.

Birinci fraksiyondaki maddelerin 6.25 µg, 12.5 µg, 25 µg/100 µl konsantrasyonda bulunduğu gözlerde okunan absorbans değerlerinin blank değerine göre yüksek olduğu, ancak bu gözlerde yapılan mikroskopik incelemelerde, ölen hücre sayısının fazla olmadığı izlenmiştir. Bu sonuçlara dayanılarak; İTK çalışmaları sonucu steroid glikozitleri içerdiği gözlenen birinci fraksiyonun, ilk dört gözdeki konsantrasyonlarda makrofaj hücrelerini indükleyerek bir miktar TNF salınımı ile tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye neden olduğu sonucuna varılmıştır.

İkinci fraksiyondaki maddelerin 25 µg/100 µl ve 50 µg/100 µl olduğu gözlerde blank değerine göre yüksek sayılabilecek absorbans değerleri okunmuştur. Bu konsantrasyonları içeren gözlerde yapılan mikroskopik incelemelerde çok az sayıda hücrenin öldüğü görülmüştür. Bu verilerin ışığı altında; flavon glikozitlerini içerdiği saptanan ikinci fraksiyonun tümör hücrelerine karşı anlamlı bir sitotoksik etki oluşmasında etkili olmadıkları görülmüştür.

Üçüncü fraksiyon'un 50 µg/100 µl konsantrasyonda olduğu gözde blank değerine göre yüksek bir absorbans değeri okunmuştur. Bu fraksiyon'un 6.25 µg, 12.5 µg ve 25µg/100µl konsantrasyonda madde içeren gözlerinde okunan absorbans değerleri de blank değerine göre artış göstermiştir. Bu konsantrasyonların bulunduğu gözlerde yapılan mikroskopik incelemelerde görülen ölü hücreler absorbans değerlerindeki artışları doğrulamıştır. Spektrofotometrik ve mikroskopik inceleme sonuçları; bu fraksiyonda bulunduğu saptanan terpenoid bileşeklerin test koşullarında uygulanan ilk dört gözdeki konsantrasyonlarda, makrofajlardan TNF salınımını sağlayarak tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduklarını göstermiştir.

Yapılan çalışmada *N. oleander* bitkisinin sulu ekstresinden elde edilen ve tümör

hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi araştırılan steroid glikozit, flavon glikoziti ve terpenoid yapıdaki bileşiklerin çalışma koşullarında uygulanan 8 ayrı konsantrasyonda, makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksik etkili olmadıkları bulunmuş, bu bulguları ek olarak steroid glikozitlerin ve terpenoidlerin test edilen 6.25 µg, 12.5 µg, 25 µg ve 50µg/100 µl konsantrasyonlarda makrofaj hücrelerini stimüle edip TNF salınımını sağlayarak, tümör hücreleri üzerinde zayıf bir sitotoksik etki oluşmasına neden oldukları sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abe, F. and Yamauchi, T.: Olesides; Novel Cardenolides with an Unusual Framework in Nerium. Chem. Pharm. Bull., 27(7): 1604-1610, 1979.
2. Baytop, T.: Türkiyenin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri. istanbul Üniv. Yay., No. 1039, s.320, 1963.
3. Baytop, T.: Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi İstanbul Üniv. Yay., No: 3255, s.411, 1984.
4. Baytop, T.: Türkiye'de Zehirli Bitkiler, Bitki Zehirlenmeleri ve Tedavi Yöntemleri. İstanbul Üniv. Yay., No: 3560, s. 22-271, 1989.
5. Burton, L.E., Picchioni, A.L., Chin L.: Dipotassium Edetate as an Antidote in Poisoning from *Oleander* and its Chief Glycoside, Oleandrin. Arc. Int. Pharmacodyn., 58(1) : 202-211, 1965.
6. Carbık, İ., Başer, K.H.C., Özel, H.Z., Ergun, B., Wagner. H.: Immunologically Active Polysaccharides from the Aqueous Extract of *Nerium oleander*. Planta Med., 56: 668, 1990.
7. Cheung, K., Hinds, J.A., Duffy, P.: Detection of Poisoning by Plant-Origin Cardiac Glycoside with the Abbott TDx Analyzer. Clin. Chem., 35(2): 295-297, 1989.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

8. Claus, E.P., Tyler, V.E., Brady, L.R.: Pharmacognosy. 6th Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1970, p.96.
9. Dominguez, S.X.A., Gallardo, A.M., Arauz, J., Rivera, R.: Estudio químico de las variedades de flores rosa y blanca del laurel rosa (*Nerium oleander*). Ciencia, Méx., 25(3): 103-106, 1967.
10. Duke, J.A.: Handbook of Medicinal Herbs. 3rd Ed., CRC Press, Florida 1986, p. 327.
11. Duret, S. and Paris, R.: Chimiotaxonomie des Polyphénols des Apocynacées. Planta Med. Phytother., 4(3): 210-215, 1972.
12. Dymock, W.: Pharmacographia Indica. The Institute of Health and Tibbi Research
Republished under the auspices of Hamdard National Foundation of
Pakistan. Vol: 2, 1890, p. 398.
13. Elgamal, M.H.A. und Fayez, M.B.E.: Dünnschichtchromatographie von,
Triterpenoid säuren. Z. Analyt. Chem., 211 : 190-194, 1965.
14. Elkhey, M. A., Elmoghazy, A.M., Salem, S.A., Karawya, M.S.: Macro and
Micromorphology of *Nerium oleander* L. Grown in Egypt. Part 1. The
Steam and Leaf U.A.R.J. Pharm. Sci., 11(1) : 123-136, 1970.
15. Escobar, M.R. and Friedman, H.: Macrophages and Lymphocytes. Nature,
Functions, and Interaction, Part B. Plenum Press, New York, 1980, p. 361.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

16. Evans, W.C.: Trease and Evans' Pharmacognosy. 13th Ed., Baillière Tindall, London, 1989, p.512.
17. Fauconnet, L. and Pouly, P.L.: Les cardénolides du laurier-rose. Pharm. Acta Helv., 37: 301-308, 1962.
18. Görlich, B.: Chemische Wertbestimmung von Oleanderextrakt. Planta Med., 9: 442-455, 1961.
19. Görlich, B.: Chemische Wertbestimmung von Oleanderextrakt. Dtsch. Apoth. Ztg., 41 : 1301, 1961.
20. Görlich, B.: Determination of the glycosides in a phytogetic cardiovascular agent. Arzneimittel-Forsch., 15(5): 493-503, 1965.
21. Guy, G.B., Bee, Ng.S., Peng, C.S.: Lymphokine Signal Transduction. Prog. in Growth Factor Research, 2 : 45-70, 1990.
22. Hartwell, J.L.: Plants Used Against Cancer. A Survey. Lloydia, 30(4): 379-410, 1967.
23. Hiermann, A., Kartnig, Th., Lukasczyk, K.: Über das Vorkommen von Flavonoiden in *Nerium oleander* L. Sci. Pharm., 50: 71-75, 1982.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

24. Hörhammer, L., Wagner, H., Luck, R.: Zur Kenntnis der Flavonglykoside von *Nerium oleander* L. Arch. Pharmazie, 289(11): 613-618, 1956.
25. Jones, A.L. and Selby, P.: Clinical Applications of Tumour Necrosis Factor. Prog. in Growth Factor Research, 1: 107-122, 1989.
26. Karawya, M.S., Balbaa, S.I., Khayyal, S.E.: Isolation of Oleandrin and Adynerin from *Nerium oleander* L. Growing in Egypt. J. Pharm. Sci., 14(2): 113-116, 1973.
27. Karawya, M.S. Balbaa, S.I., Khayyal, S.E.: Estimation of Cardenolides in *Nerium oleander*. Planta Med., 23(1): 70-73, 1973.
28. Liabakk, N. B., Nustad, K., Espevik, T.: A Rapid and Sensitive Immunoassay for Tumor Necrosis factor Using Magnetic Monodisperse Polymer Particles. J. Immunol. Methods, 134: 253-259, 1990.
29. Lindl, T., und Bauer, J.: Zell-und Gewebekultur. Geustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1987, p.78.
30. Luettig, B., Steinmüller, C., Gifford, G.E., Wagner, H.: Macrophage Activation by the Polysaccharide Arabinogalactan Isolated from Plant Cell Cultures of *Echinacea purpurea*. J. of the National Cancer Institute., 81(9): 669-675, 1989.
31. Neumann, W.: Über Glykoside des Oleanders. Ber., 70: 1547-1554, 1937.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

32. Old, L.J.: Tumor Necrosis Factor. In Lyphokine Reports. E. Pick (Ed.) Academic Press, New York, 1981.
33. Öztürk, Y. ve Başer, K.H.C.: İmmün Sistem, Kanser ve Polisakkaritler. VII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildirileri, Ankara, 1988, s.181-197.
34. Paris, R.R., Duret, S.: Flavonoids of various Apocynaceae. Plant. Med. Phytother., 8(4): 318-325, 1974.
35. Radford, D.J., Gillies, A.D., Hinds, J.A., Duffy, P.: Naturally Occuring Cardiac Glycosides. Med. J. Aust., 144(10): 540-544, 1986.
36. Ruff, M.R., Gifford, G.E.: Rabbit Tumor Necrosis Factor: Mechanism of Action. Inf. and Immunity, 31(1): 380-385, 1981.
37. Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Hafeez, F., Begum, S.: Isolation and Structure of Neriucoumaric and Isoneriucoumaric Acids from the leaves of *Nerium oleander*. Planta med., 53(5): 424-427, 1987.
38. Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S., Siddiqui, B.S.: Isolation and Structure of Two Cardiac Glycosides from the Leaves of *Nerium oleander*. Phytochemistry. 26(1): 237-241, 1987.
39. Siddiqui, S., Begum, S., Sidduqui, B.S., Hafeez, F.: Kanerin and 12, 13-Dihydrourosolic Acid, Two New Pentacyclic Triterpenes from the Leaves of *Nerium oleander*. J. Nat. Prod., 52(1): 57-62, 1989.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

40. Siddiqui, S., Begum, S., Hafeez, F., Siddiqui, B. S.: Two Triterpenes from the Leaves of *Nerium oleander*. *Phytochemistry*. 28(4): 1187-1191, 1989.
41. Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Begum, S., Hafeez, F.: Kanerocin: A New Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*. *Planta med.*, 55(3): 292-293, 1989.
42. Siddiqui, S., Siddiqui, B.S., Begum, S., Hafeez, F.: Chemical Constituents of *Nerium oleander*. *Pak. J.Sci. Res.*, 33(4): 127-141, 1990.
43. Szabuniewicz, M., McCrady, J.D., Camp, B.J.: Treatment of Experimentally Induced Oleander Poisoning. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 189: 12-21, 1971.
44. Tittel, G und Wagner, H.: Qualitative und Quantitative Analyse von Herzglykosiddrogen durch HPLC-Verfahren. *Planta Med.*, 43(3): 252-260, 1981.
45. Tschesche, R.: Plant Cardiac Poisons XXV. The Constitution of Adynerin and the Position of the Double Bond in Scilliroside. *Chem. Ber.*, 87: 413-423, 1954.
46. Tschesche, R. und Snatzke, G.: Über pflanzliche Herzgifte: Über Adynerin und Neriantin. *Chem. Ber.*, 88:511-520, 1955.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

47. Tschesche, R., Chaudhuri, P.K., Snatzke, G.: Weitere Cardenolidglykoside aus den Blättern von *Nerium oleander* L. *Naturwissenschaften*. 51(6): 139-140, 1964.
48. Wagner, H. und Luck, R.: Zur Kenntnis der Inhaltstoffe von *Nerium oleander*. *Naturwissenschaften*. 42(22): 607, 1955.
49. Wagner, H.: Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. 2., bearbeitete Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1982.
50. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M.: Drognalyse. Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1983, p. 195.
51. Wagner, H. and Jurcic, K.: Introduction to Immunology and Immunological Screening methods. Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, 1990, p. 248.
52. Wagner, H. und Bladt., S.: Pharmazeutische Biologie. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen von Arzneilich Verwendeten Drogen und Drogeninhaltsstoffen. 5. Ausgabe, Herstellung: Hierronymus Buchreproduktions GmbH, München, 1990, p. 39.
53. Watt, J.M. and Breyer-Brandwijk, M.G.: Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. 2nd Ed., E. and S. Livingstone Ltd. Edinburg and London, 1962, p. 88-93.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

54. Yamauchi, T., Takata, N., Mimura, T.: Cardiac Glycosides of the Leaves of *Nerium odorum*. *Phytochemistry*, 14: 1379-1382, 1975.
55. Yamauchi, T., Abe, F., Tachibana, Y., Atal, C.K., Sharma, B.M., Imre, Z.: Quantitative Variations in the Cardiac Glycodies of *oleander*. *Phytochemistry*, 22(10): 2211-2214, 1983.